

**DÉBORA FERNANDA VERES RONIK**

**NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA HUMANA CONTENDO APOCININA  
OBTIDAS POR NANO *SPRAY DRYER* PARA DIRECIONAMENTO  
CEREBRAL: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

**GUARAPUAVA**

**2014**

**DÉBORA FERNANDA VERES RONIK**

**NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA HUMANA CONTENDO APOCININA  
OBTIDAS POR NANO *SPRAY DRYER* PARA DIRECIONAMENTO  
CEREBRAL: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, da UNICENTRO/PR.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil.

Co-orientadora: Prof. Dra. Rubiana Mara Mainardes

**GUARAPUAVA**

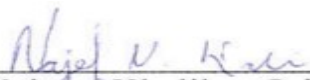
2014

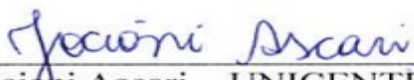
**TERMO DE APROVAÇÃO**


DÉBORA FERNANDA VERES RONIK

**NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA HUMANA CONTENDO APOCININA OBTIDAS  
POR NANO SPRAY DRYER PARA DIRECIONAMENTO CEREBRAL: AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação aprovada em 05/05/2014 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil – Orientador – UNICENTRO  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Jociani Ascari – UNICENTRO  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo César Ghedini – UFG  
Membro

Guarapuava- PR  
2014

*Nenhum obstáculo é tão grande se a  
sua vontade de vencer for maior !!!!!*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as bênçãos.

Aos meus pais pelo incentivo em lutar sempre por meus sonhos e objetivos. Agradeço as inúmeras vezes que precisaram renegar suas vontades por pensar em meu bem estar. Pelas palavras de força e perseverança quando a caminhada estava um pouco pesada. Grata pelo amor e carinho incondicional.

Aos meus irmãos por sempre vibrarem a cada conquista que obtive e comemorarem com muito orgulho cada vitória.

Ao meu orientador Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil, pelo ensinamento que me foi transmitido, pela confiança paciência e por toda contribuição tanto na vida acadêmica quanto profissional.

À Prof. Dra Rubiana Mara Mainardes, pela co-orientação e todos os ensinamentos transmitidos.

Às minhas amigas do peito Clê e Jú pela grande parceria. Sentirei muitas saudades dos momentos de descontração, pelos cafés no meio da tarde e também das discussões de protocolos de experimento. Obrigada por permitirem que esta jornada de estudo e pesquisa fosse um pouco mais leve e alegre. Serão eternas em meu coração !!!!!

À Jô por “abraçar” minha causa. Pela amiga querida que gentilmente ajudou-me na discussão de protocolos e no desenvolvimento dos experimentos. Sempre de forma carinhosa e atenciosa contribuiu para que este trabalho pudesse ser concretizado.

Às amigas que conquistei durante os dois anos de mestrado: Fran, Pati e Sil, os momentos que convivi com vocês serão muito lembrados. Contem sempre comigo !!!

Aos amigos do Laboratório de Nanotecnologia da UNICENTRO: Aline, Thaysa, Lori, Lú Camargo, Daniel, Leizi, Lú Facco, Emilli, Michel, Diani e Lígia pela amizade. Meu obrigada pelos momentos agradáveis de convívio, desejo muito sucesso !!!!

Ao Prof. Dr. Ricardo Yoshimitsu Miyahara do DEFIS pelas contribuições na análise do DSC.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Policiano Almeida do LAPECI, em especial aos alunos de mestrado Naiane, Joslaine e Mateus pela contribuição nas análises de tamanho de partícula, zeta e infravermelho.

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

A todos que sempre torceram pelo meu sucesso, os sinceros agradecimentos e desejo tudo em dobro !!!!

## RESUMO

Diversos fármacos amplamente utilizados pela indústria farmacêutica provêm de origem natural. A apocinina é um metoxi-catecol obtido da *Picrorhiza kurroa*, planta natural das montanhas da Índia, sendo utilizada para o tratamento de doenças articulares inflamatórias crônicas, aterosclerose e ação neuroprotetora. O seu principal mecanismo de ação é impedir a formação da NADPH oxidase, complexo enzimático envolvido na geração de espécies reativas de oxigênio. Estas espécies em altas concentrações causam desequilíbrio entre o balanço redox resultando em dano celular. A NADPH oxidase, presente na região cerebral, contribui para a ocorrência de neuropatologias relacionadas com alta concentração de espécies reativas. Também a barreira hematoencefálica que protege o tecido cerebral atua impedindo a transposição do fármaco do sangue para o sistema nervoso central, dificultando o equilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes. A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar a qual compreende a utilização de dispositivos que permitem o transporte e carreamento melhorados de fármacos. Sistemas nanoestruturados com modificação de cargas de superfície facilitam a transposição do fármaco para a região cerebral. No presente estudo desenvolveu-se nanopartículas de albumina humana contendo apocinina pelo método de nano *spray dryer* e modificação da superfície através da incorporação do tensoativo polissorbato 80. Analisou-se as características físico-químicas e atividade antioxidante sobre o ácido hipocloroso (HOCl) e o radical (ABTS<sup>•+</sup>). A caracterização físico-química das nanopartículas demonstrou eficiência de encapsulação do fármaco com variações entre 28 e 60%, diâmetros médios reduzidos entre 150-200 nm, baixo índice de polidispersão e alterações da carga de superfície. Os ensaios de raio-x e DSC mostraram nanopartículas com caráter amorfo. A análise de espectrometria na região do infravermelho indicou ausência de interação intermolecular entre fármaco e polímero. Os ensaios da ação antioxidante da apocinina nanoestruturada frente ao ABTS<sup>•+</sup> e o HOCl indicou perfil de inibição semelhante ao fármaco livre. O método de nano *spray dryer* mostrou-se eficiente, adequando e a apocinina nanoestruturada manteve sua atividade biológica comparada com o fármaco livre.

Palavras-chave: Apocinina. Nanopartículas. HSA. Polissorbato 80. Direcionamento cerebral. *Spray dryer*.

## ABSTRACT

Several drugs widely used by pharmaceutical industry come from natural origin. Apocynin is a methoxy-catechol obtained from *Picrorhiza kurroa*, a plant natural from India mountains, and it is used for treatment of chronic joint disease inflammatory, atherosclerosis and it has neuroprotective action. Its main action mechanism is to prevent the formation of NADPH oxidase, which is an enzymatic complex involved in generation of reactive species of oxygen. These species when high concentrated cause instability in the redox balance and as a result causing cellular damage. NADPH contained in brain region contributes to development of neuropathologies related to high concentration of reactive species. Furthermore, the blood-brain barrier which protects the brain tissue acts as a avoider of the transposition of the drug from blood to central nervous system, and it hampers the balance between oxidant and anti-oxidant agents. Nanotechnology is a multidisciplinary science which comprises the use of devices that allow the transportation and the enhanced carriage of drugs. Nanostructured systems with modified surface charges make easier the drug transposition to brain region. In the present study human albumin nanoparticles containing apocynin by nano *spray dryer* method and the surface modification thought polysorbate 80 surfactant incorporation. Physico-chemical characteristics have been analysed as well as its anti-oxidant activity on hypochlorous acid (HOCl) and the radical (ABTS<sup>•+</sup>). The nanoparticles physico-chemical characterization had shown efficiency of drug encapsulation with variation between 28 and 60%, average diameters were reduced between 150 – 200 nm, low polydispersity index and alteration of surface charges. X- Ray and DSC assays had shown nanoparticles with amorphous character. The spectrometric analysis in infrared region indicated absence of intermolecular interaction between drug and polymer. The apocynin antioxidant action assays with ABTS<sup>•+</sup> and with HOCl indicated inhibition profile similar to free drug. The spray drier method had shown efficiency, with adequations and the nanostructured apocynin kept its biological activity when compared to free drug.

Keys-word: Apocynin, nanoparticles, HSA, polysorbate 80, brain directing, *Spray Drier*



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1- Estrutura molecular da apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona)..... | 17 |
|---|----|

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1- Delineamento das formulações desenvolvidas com as variadas concentrações de tensoativo.....             | 37 |
| Tabela 2- Eficiência de encapsulação da apocinina em diferentes concentrações do PS80.....                        | 45 |
| Tabela 3- Variação do tamanho médio e IPD de nanopartículas de apocinina em diferentes concentrações do PS80..... | 47 |
| Tabela 4- Valores do potencial zeta das nanopartículas com diferentes concentrações de PS80.....                  | 51 |
| Tabela 5- Porcentagem de inibição do radical ABTS•+ sobre a apocinina livre e nanopartículas de apocinina.....    | 63 |
| Tabela 6- Potencial de inibição da apocinina livre e em nanopartículas na inibição do HOCl.....                   | 65 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABTS<sup>+</sup>** :Radical 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

**ACN:** Acetonitrila

**ATP:** Adenosina trifosfato

**APO:** Apocinina

**ANOVA:** Análise de variância

**Apo E:** Apolipoproteína E

**Apo B:** Apolipoproteína B

**BHE:** Barreira hemato-encefálica

**CAT:** Catalase

**Cl<sup>-</sup>:** Íon cloreto

**CLAE:** Cromatografia líquida de alta eficiência

**DLS:** Dinamic light scattering

**DSC:** Calorimetria Exploratória Diferencial

**DPR:** Desvio padrão relativo

**DPPH:** Radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil

**DRX:** Raio X

**EE:** Eficiência de encapsulação

**ERO:** Espécies reativas de oxigênio

**FDA:** Food and Drug Administration

**GSH:** Glutathiona reduzida

**GSSG:** Glutathiona oxidada

**HSA:** Albumina humana

**HOCl:** Ácido hipocloroso

**HPLC:** High performance liquid chromatography

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogênio

**IPD:** Índice de polidispersão

**IgM:** Imunoglobulina M

**IgG:** Imunoglobulina G

**IPD:** Índice de polidispersão

**KCl:** Cloreto de potássio

**KBr:** Brometo de potássio

**LDLR:** Receptor de lipoproteínas de baixa densidade

**LPMN:** Leucócito polimorfonuclear

**LRP:** Receptor de lipoproteínas de baixa densidade

**LDL:** Lipoproteína de baixa densidade

**MPO:** Mieloperoxidase

**NADPH oxidase:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase

**O<sub>2</sub>:** Oxigênio molecular

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Ânion superóxido

**·OH:** Radical hidroxil

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>:** Oxigênio singlete

**ORAC:** Capacidade antioxidante de redução do oxigênio

**PS80:** Polissorbato 80

**PLA:** Ácido poli-láctico

**PLGA:** Ácido poli (láctico-glicólico)

**PCL** poli ([-caprolactona)

**PGA** Ácido poli-glicólico

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**SOD:** Superóxido dismutase

**TMB:** Tetrametilbenzidina



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| LISTA DE TABELAS.....   | 1  |
| SUMÁRIO.....  | 10 |
| 1.INTRODUÇÃO.....   | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 17 |
| 2.1 Apocinina.....  | 17 |
| 2.2 Doenças neurodegenerativas relacionadas com processos oxidativos.....             | 19 |
| 2.3 Antioxidantes.....  | 21 |
| 2.4 Sistemas nanoestruturados como carreadores de fármacos.....                       | 23 |
| 2.4.1 Polímero.....   | 25 |
| 2.4.2 Nanopartículas como estratégia para o direcionamento cerebral de fármacos.....  | 27 |
| 2.5 Método de obtenção das nanopartículas: secagem por atomização (spray dryer) ..... | 29 |
| 2.6.3Espectroscopia na região do infravermelho.....                                   | 34 |
| 3 OBJETIVOS.....  | 35 |
| 3.1 Objetivos gerais.....   | 35 |
| 3.2 Objetivos específicos.....  | 35 |
| 4 MATERIAIS.....  | 35 |
| 4.1 Reagentes.....  | 35 |
| 4.2 Equipamentos .....  | 36 |
| 5.3 Caracterização físico-química das nanopartículas.....                             | 39 |
| 5.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho.....                                  | 40 |
| 6.3.3 Determinação da carga de superfície: potencial zeta .....                       | 51 |
| 6.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho.....                                  | 55 |
| 6.3.5 Ensaio de difração de raio-x (DRX) .....  | 58 |

Substâncias no estado sólido podem apresentar por característica amorfa ou cristalina. Geralmente, sólidos amorfos demonstram maior solubilidade do que formas cristalinas, tal fato decorre da energia livre envolvida no processo de dissolução. Sólidos com propriedade amorfa possuem moléculas dispersas aleatoriamente e assim, necessitam de pouca energia para

|  |    |
|--|----|
| separa-los, refletindo em uma dissolução mais rápida quando comparada com a forma cristalina (RIEKES et al., 2011).....  | 59 |
| O difratograma da apocinina livre (Figura 12, (a)) exibiu intensos e numerosos picos distintos, indicando um grau de cristalinidade do fármaco. Já a HSA (Figura 12 (b)) apresenta halos alargados indicando que a proteína apresenta característica amorfa. A Figura 12 (c) refere-se às nanopartículas que receberam a adição do PS80 como revestimento observa-se ausência de picos de difração e presença de halos. Ao avaliar o difratograma das nanopartículas é possível observar que o processo de nanoencapsulação promoveu uma diminuição notável dos picos de difração característicos da apocinina levando a amorfização do fármaco.....   | 60 |
| 6.3.6 Análise térmica (DSC).....   | 60 |
| .....  | 60 |
| Através da calorimetria exploratória diferencial (DSC) realizou-se a verificação do estado físico da apocinina nanoestruturada. O método tem por função auxiliar a compreender a forma de associação do fármaco às nanopartículas, da mesma maneira a ocorrência de qualquer incompatibilidade ou interação química fármaco/polímero. Mudanças nos perfis termoanalíticos dos compostos, tais como deslocamentos, redução ou desaparecimento de picos na curva de DSC quando comparados aos perfis das espécies individualmente, pode ser indicativo de certa incompatibilidade fármaco/polímero ou polímero/ polímero ou que houve interação química entre eles decorrente do aquecimento (BOGDANOVA et al., 1996). ..... | 60 |
| Realizou-se a comparação dos perfis termoanalíticos da apocinina e albumina pura, das nanopartículas revestidas com PS80, nanopartículas de albumina vazias, bem como da mistura física (fármaco/polímero) nas mesmas proporções da obtenção das nanopartículas com resultados expressos na Figura 13. ....  | 60 |
| 6.4 Estudo do potencial antioxidante.....  | 62 |
| 6.4.1 Ensaio de descoloração do ABTS•+ .....   | 63 |

## 1.INTRODUÇÃO

O emprego de plantas medicinais é uma prática tradicional, transmitida de geração em geração para o tratamento de diversas enfermidades. Sua utilização é ampla e mesmo sem comprovação científica aplica-se para a terapêutica de várias patologias como doenças crônicas e infecções (RATES, 2001). Todavia, seu uso não é limitado somente na medicina popular, tendo contribuições, ao longo dos anos, para a obtenção de uma gama de fármacos que são até hoje utilizados na medicina, tais como rutina, colchicina, emetina e vincristina (LIU & WEBSTER, 2003; BALUNAS & KINGHORN, 2005; GURIN-FAKIM, 2006).

Dentre as inúmeras plantas com aplicação medicinal destaca-se a *Picrorhiza kurroa* Royale de onde se obtém o metoxi-catecol apocinina, tipicamente encontrada nas regiões montanhosas da Índia, Tibet, Nepal e Paquistão. Estudos atribuem a este metoxi-catecol as propriedades antioxidante e anti-inflamatória (ENGELS et al., 1992; WANG et al., 2008). Na literatura há vários relatos de seu uso para o tratamento de patologias tais como artrite reumatóide, asma e isquemia/ reperfusão (ENGELS et al., 1992; LAFEBER et al., 1999; CHEN, SONG & CHAN, 2009).

O mecanismo de inibição do fármaco em processos inflamatórios não está totalmente elucidado, todavia, sabe-se que causa um efeito supressor sob o complexo enzimático NADPH-oxidase (nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase) (BEDARD & KRAUSE, 2007). A NADPH-oxidase (NOX) é um grupo de enzimas transmembrana presente em diversas células com função de catalisar a transferência de elétrons através da membrana celular. Relaciona-se com a formação de espécies reativas que, quando em excesso resultam em quadros de estresse oxidativo que podem ser deletérios por danificar estruturas celulares (LAMBETH, KRAUSE & CLARK, 2008).

A NOX, também presente na região cerebral, contribui para a ocorrência de neuropatologias relacionadas com a alta concentração destas espécies oxidativas que se tornam danosas ao nível neuronal (SORG, 2004). Há indicativos de que a apocinina tem a propriedade de reagir com grupos tióis do complexo enzimático desativando-a com subsequente queda na produção e geração de agentes nocivos (XIMENES et al., 2007; SUN et al., 2008).

Como o fármaco tem poder de inibição frente a processos oxidativos justifica-se seu emprego no tratamento de doenças de ordem neuronal decorrentes do desbalanço redox (STEFANSKA et al., 2010). Todavia é necessário explicar meios de carreamento melhorados

do fármaco que permitam a transposição do fármaco para o cérebro, rompendo a barreira que protege o tecido cerebral (KREUTER, 2001; KREUTER, 2002; KREUTER, 2012).

Pesquisas a respeito da nanotecnologia farmacêutica vêm a ser uma ferramenta para se desenvolver sistemas nanoestruturados com o intuito de direcionar, minimizar efeitos colaterais e/ou proporcionar a liberação dirigida de um fármaco (FERRARI, 2005; De JONG & BORN, 2008). Neste contexto tem-se o emprego de nanopartículas poliméricas, as quais podem vir a sanar problemas relacionados à natureza do fármaco, bem como melhorar as condições de transporte e disponibilidade (WEI & MA, 2004; ALEXIS et al., 2008; ARMENTANO et al., 2010).

O direcionamento de drogas para a região cerebral tem sua eficácia relativamente melhorada quando ocorre a funcionalização destes sistemas nanoparticulados com tensoativos (TROSTER, MILLER & KREUTER, 1990; KREUTER, 2001; BLASI et al., 2007). Mais especificamente tensoativos com afinidade pelo meio aquoso possuem a propriedade de aumentar a hidrofiliabilidade da partícula e, grande maioria, permite a liberação em sítios-alvos. Todavia, tais características dependem da natureza do surfactante como, estrutura química e físico-química bem como parâmetros bioquímicos. Entre esses se destacam os polissorbatos 20, 40, 60 e especialmente o 80 (PS80) utilizado no presente estudo (KREUTER et al., 1997).

O PS80 é um surfactante empregado para facilitar a entrega de drogas para o Sistema Nervoso Central (SNC) (GELPERINA et al, 2010; WANG et al, 2009). Tem por característica ser hidrofílico, não-iônico e ao revestir sistemas particulados gera alterações das propriedades físico-químicas destas partículas (RAMGE et al., 2000; BAKER et al., 2004; GAO & JIANG, 2006). Isto propicia a queda do reconhecimento das nanopartículas pelo sistema fagocitário e consequente aumento da permanência na circulação sanguínea, alterando de forma significativa a farmacocinética e distribuição destas partículas (PASSIRANI et al., 1998; PRINZEN et al., 2007).

Nesta perspectiva o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados revestidos com substâncias que facilitem a passagem da droga para a região cerebral é um meio alternativo para o tratamento de doenças neurodegenerativas ocasionadas pelo desequilíbrio de forças oxidantes e a defesa antioxidante.

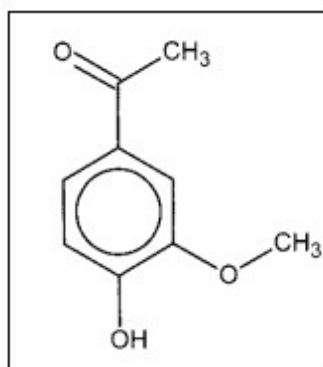


## •2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 12.1 Apocinina

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) (**Figura 1**) é um composto pertencente à classe dos metóxi-catecóis isolada pela primeira vez das raízes da planta nativa indiana *Picrorhiza kurroa* Royale (Scrophulariaceae), tipicamente encontrada nas montanhas do Himalaia. Tem por característica ser uma planta rasteira e tem sido utilizada, durante séculos, na medicina indiana para o tratamento de processos inflamatórios (ENGELS et al., 1992). Apresenta como características peso molecular de 166,17 g/mol, ponto de fusão de 115°C com odor fraco de baunilha (PETRÔNIO et al., 2013). Quanto a suas características farmacocinéticas apresenta baixa solubilidade em água, estreita relação dose-resposta e baixa biodisponibilidade por via oral, com recuperação de apenas 2,8% e meia vida de cerca de 6 minutos (CONNEL et al, 2011; WANG et al., 2013).

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



Estudos *in vivo* indicam ação benéfica da apocinina para o tratamento de processos inflamatórios, dentre outros: doenças articulares inflamatórias crônicas, quadros de hipertensão, ação neuroprotetora em isquemia/ reperusão induzida em modelo animal, efeitos benéficos no tratamento de aterosclerose e processos inflamatórios do trato respiratório e alérgicos. (LAFEBER et al., 1999; MUIJSERS et al., 2001; PETERS, HILTERMANN & STOLK, 2001; HOUGEE et al., 2006).

O mecanismo de ação e os efeitos biológicos deste metoxi-catecol não estão totalmente elucidados, todavia há indícios de possuir a propriedade de bloquear a cascata de ativação do complexo enzimático NADPH-oxidase (STOLK et al., 1994; BEN-SHAUL et al., 2001).

A NADPH oxidase é um complexo multienzimático presente em diversas células, sendo sua forma melhor caracterizada a fagocítica, presente em macrófagos e neutrófilos que atua como mecanismo de defesa devido a geração de espécies reativas. Este complexo é composto por seis subunidades: duas proteínas transmembrana: p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>phox</sup> que formam o citocromo b558 e três fatores citosólicos ligados (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>) e uma GTPase (Rac1 ou Rac2). A ativação celular por estímulos fisiológicos ou moléculas indutoras de quimiotaxia leva a fosforilação da proteína citoplasmática p47<sup>phox</sup>, gerando uma cascata de eventos que resulta na migração dos fatores citosólicos da membrana e, montagem do complexo enzimático que resulta na produção de ERO (espécies reativas de oxigênio) para o meio extracelular atuando na defesa do hospedeiro (BARBIERI et al., 2004; SORCE & KRAUSE, 2009).

O complexo enzimático exerce papel essencial na imunidade inata, ao participar do processo catalítico com formação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), um precursor de espécies reativas, propiciando a destruição de agentes invasores durante o processo de fagocitose (BERGENDI et al., 1999; BABIOR, LAMBETH & NAUSEEF, 2002).

A NADPH-oxidase é encontrada em altas concentrações em células do sistema imunológico, como em fagócitos para fins de defesa do hospedeiro, entretanto, estudos têm reconhecido vários componentes protéicos deste complexo expressos no cérebro, fator que pode contribuir para a promoção de lesões oxidativas e progressão para processos de neurodegeneração (GREEN, et al., 2001; ABRAMOV et al., 2004; SIMONS et al., 1990).

O mecanismo de ação da apocinina ocorre através de sua metabolização com a enzima catalítica mieloperoxidase (MPO), presente nos fagócitos, com formação de um produto dimérico, a diapocinina (JOHNSON et al., 2002; XIMENES, 2007). O dímero por conseguinte causa a inibição da translocação dos componentes citosólicos da NADPH-oxidase através de sua conjugação com resíduos de grupos tióis da proteína citosólica p47<sup>phox</sup> dificultando a migração da proteína para a membrana celular, inibindo a montagem do complexo enzimático (HEYWORTH et al., 1991; STOLK, 1994).

Estudos de Kanegae e colaboradores (2007) estão de acordo com achados anteriores, afirmando que a apocinina necessita de prévia ativação por oxidação em presença de peróxido

de hidrogênio e/ou MPO produzindo um dímero o qual é metabolicamente ativo e apresenta capacidade de inibir a ativação do complexo enzimático.

Diversos são os trabalhos os quais se referem ao metoxi-catecol com molécula de escolha quando se deseja determinar o envolvimento do sistema NADPH-oxidase em modelos experimentais tanto *in vitro* como *in vivo*. Dodd-o e colaboradores (2004) ao induzir lesão pulmonar em suínos através de circulação extracorpórea observaram que o tratamento com o fármaco via intravenosa diminui a ativação basal de neutrófilos periféricos e queda na geração de ERO em células endoteliais quando comparado com o grupo controle.

Para Wang e colaboradores (2006) a apocinina apresentou a capacidade de proteger danos oxidativos induzidos por isquemia cerebral em roedores. Estudos realizados por Lafeber e colegas (1999) conferem ao fármaco a capacidade de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células mononucleares obtidas através de pacientes portadores da doença inflamatória crônica artrite reumatóide. Rupin e colaboradores (2004) submeteram células endoteliais de cordão umbilical à isquemia/reperfusão, ocasionando à ativação celular com aumento da produção de ERO e maior expressão de moléculas de adesão, as selectinas. Após a co-cultura dessas células com o fármaco observaram inibição da geração de ERO bem como queda da expressão destas selectinas.

Como o fármaco mostrou atuar de forma eficaz em desbalanços do equilíbrio redox, seu emprego para o tratamento de doenças neurodegenerativas de origem oxidativa e/ou inflamatória torna-se uma alternativa viável. Entretanto devido a algumas propriedades farmacocinéticas não favoráveis torna-se necessário desenvolver mecanismos que melhorem seu perfil farmacocinético (KELLY et al., 2009).

## ***12.2 Doenças neurodegenerativas relacionadas com processos oxidativos***

Processos oxidativos induzidos no meio celular estão relacionados com a etiologia de variadas patologias, incluindo neurodegenerações, como a doença de Alzheimer e Parkinson, cardiopatias, inflamações crônicas e envelhecimento (BUTTERFIELD, PERLUGUI, & SULTANA, 2006; NORRIS & GIASON, 2005; SANTOS et al., 2011). Além disso, danos na estrutura do DNA ocasionado por radicais livres contribuem para processos de mutagênese e carcinogênese (PELICANO, CARNEY & HUANG 2004).

O termo “estresse oxidativo” é definido como um desequilíbrio entre espécies reativas, compostos potencialmente reativos e o sistema antioxidante de remoção. Este desbalanço resulta em oxidação excessiva de moléculas biológicas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em dano celular (FARACI, 2006). Fatores como predisposição genética e questões ambientais como radiação ultravioleta podem agravar o dano oxidativo ou diminuir a capacidade das células em degradar tais agentes nocivos (HIRAGI, 2010).

Casos em que o estresse oxidativo é de frequência moderada, geralmente tem-se concomitantemente o aumento da defesa antioxidante enzimática endógena, porém se ocorrência for demasiada há a ocorrência de dano ou morte celular (ANDERSON, 1996). A peroxidação lipídica é um dos maiores efeitos do estresse oxidativo por causar agravos às membranas e aumentar a fluidez comprometendo sua integridade e inativando a interação entre as membranas com receptores ou enzimas (BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006).

O termo espécie reativa é definido como qualquer composto que seja potencialmente reativo, sendo de natureza radicalar (radicais livres) ou não radicalar. Um radical livre é qualquer molécula orgânica, inorgânica ou átomo que contém elétrons não pareados em orbitais mais externos. Devido a sua instabilidade eletrônica tornam-se extremamente reativos. Já uma espécie reativa não radicalar, mesmo com ausência de elétrons não pareados, são agentes oxidantes que podem se converter em radicais livres (HALLIVEL, 1994).

Neste contexto destacam-se as Espécies reativas de oxigênio geradas em um ambiente de reações de oxido-redução, onde o oxigênio molecular ( $O_2$ ) doa ou recebe elétrons gerando, dentre outras espécies os radicais livres: radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) e espécies não radicalares: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

Todas as estruturas celulares do corpo sofrem com lesões oxidativas, todavia o Sistema Nervoso Central (SNC) é extremamente susceptível aos danos oxidativos (MANTHA et al., 2006). Isto é atribuído a baixa capacidade de regeneração celular quando comparado com outros órgãos e a morte de neurônios induzida tanto por toxinas quanto pelo processo normal de envelhecimento resultam em comprometimento de todo o sistema nervoso (ANSARI & SCHEFF, 2010). Além disso, a região cerebral necessita de um elevado consumo de oxigênio, fato este atribuído ao alto consumo de ATP pelos neurônios para desempenhar suas funções. A mitocôndria que é uma organela celular envolvida na geração de energia e respiração celular é também considerada a maior fonte de geração de radicais livres, os quais

são produzidos como um subproduto do metabolismo energético normal (HALLIWELL, 2001; CADENAS, 2004; SORGE, 2004).

Para Khan e colaboradores (2010) processos oxidativos na região cerebral manifestam-se principalmente por peroxidação lipídica devido a particularidades do ambiente como alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e lipídeos e baixo teor de antioxidantes endógenos permitindo assim que este local seja mais susceptível à processos oxidativos que resultam em alterações estruturais e funcionais de membranas celulares com subsequente morte celular.

Além disto, a região cerebral é composta, dentre outras estruturas, pela microglia que são as menores células da região cerebral e derivam de uma linhagem mieloide com ação fagocitária (SIMARD & RIVEST, 2004; HESS et al., 2004; MALM et al., 2005; SIMARD et al., 2006). Estas células estão em processo constante de vigília, permitindo uma reação rápida frente a patógenos invasores (DAVALOS et al., 2005). Segundo Block e colaboradores (2007) estas células ao detectarem a presença de patógenos sofrem ativação e tem-se início processos de proliferação, migração, fagocitose, apresentação de antígenos para as células T e geração de espécies oxidantes. Este processo é extremamente útil para a remoção e/ou morte de agentes invasores na região cerebral, todavia podem lesar as estruturas neuronais contribuindo para a ocorrência de neurodegenerações.

Neste contexto fármacos com função antioxidante podem desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento de neuropatologias decorrentes do desequilíbrio entre espécies oxidantes e a defesa antioxidante (RATMAN et al., 2006). Todavia, deve-se levar em consideração a dificuldade de fármacos direcionados para a região cerebral em ultrapassar a barreira que isola o tecido cerebral dos elementos circulantes no sistema sanguíneo (TOSI et al., 2008).

### ***12.3 Antioxidantes***

Segundo Halliwell (1995) uma definição aceitável de antioxidante é qualquer substância quando presente em baixas concentrações, em comparação com as do substrato oxidável, diminui, inibe ou atrasa significativamente os processos oxidativos. Adiado ou prevenindo a oxidação de lipídeos ou biomoléculas impedindo a iniciação ou propagação de reações de oxidação em cadeia. Têm por propriedade atuar em diferentes níveis de proteção

do organismo, seja através do impedimento da formação de radicais livres, interceptando os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou fontes exógenas de maneira a dificultar o ataque sobre biomoléculas ou reparando lesões ocasionadas por estes radicais (BRAVO, 1998; BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Deve-se ressaltar que as células são dotadas de uma gama de mecanismos de ação antioxidante endógeno, dentre eles, supressores da formação de ERO, sistemas enzimáticos, quelantes de íons metálicos envolvidos com a iniciação da peroxidação lipídica e sequestradores de ERO (HALLIVELL & GUTTERIDGE, 1990). Estes mecanismos podem atuar ou não em sinergismo, sendo essências para a proteção de danos oxidativos dificultando que os intermediários reativos oxidem biomoléculas (JONES et al., 1995; BLOKHINA, VIROLAINEN & FAGERSTEDT, 2003; VALKO et al., 2007; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

Como sistemas enzimáticos pode-se citar a superóxido dismutase (SOD) presente nas mitocôndrias e com função catalítica de transformar o radical superóxido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); a catalase (CAT) presente nas mitocôndrias e peroxissomos, sendo sua atividade variada de acordo com órgão ou tecido em que se localiza e é mais encontrada no fígado e rins. Seu mecanismo está envolvido na eliminação do  $H_2O_2$  gerado durante a oxidação de ácidos graxos. A glutathione peroxidase (Gpx), presente no citosol e matriz mitocondrial, têm a propriedade de proteção contra peroxidação enzimática tanto endógena quanto exógena. Atua catalisando a redução de peróxido de hidrogênio à custa da glutathione (GSH). Assim age na captação de água, catalisando a peroxidação da GSH, obtendo-se como produto a glutathione na forma dissulfeto oxidada (GSSG) (WANG et al., 2005).

Entre os sequestradores não enzimáticos pode-se citar as vitaminas E e C, flavonóides e a glutathione (BIEWENGA et al., 1997; REES et al., 2008). A glutathione (GSH) é um tripeptídeo formado por resíduos de ácido glutâmico, glicina e cisteína, a qual possui grupos sulfídricos (tiois) que estão majoritariamente envolvidos nos processos bioquímicos do organismo (KRANCE et al., 2010). Pode ser definido como um sequestrador não enzimático de radicais livres, exercendo ação antioxidante (LU, 2013).

A GSH é encontrada sob duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), em tecidos saudáveis prevalece sua forma biologicamente ativa, reduzida. O par GSH/GSSG é um potente indicador do estado redox celular e, alterações neste estado estão relacionadas com alterações no meio celular, uma vez que em condições de estresse oxidativo a forma reduzida converte-se na forma oxidada, diminuindo a razão GSH/GSSG (FORMAN, ZHANG &

RINNA, 2009). Independente da localização dentro das células ou na corrente sanguínea todo sistema antioxidante é essencial para a proteção de danos oxidativos (JONES et al, 1995; VALKO et al, 2007; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

Diversos são os métodos aplicáveis para se avaliar a atividade antioxidante *in vitro* com o intuito de permitir rápida seleção de substâncias com potencial antioxidante. Técnicas eletroquímicas são aplicáveis por correlacionar potenciais de oxidação, intensidade de corrente além de outros parâmetros eletroquímicos relacionados à capacidade oxidante, destacando-se a voltametria cíclica e de pulso diferencial (REBELO et al., 2013). Já métodos espectrofotométricos são ensaios relativamente simples, os quais se baseiam na capacidade de mudança de cor da amostra. Os ensaios mais utilizados recebem o nome do reagente que terá sua absorção reduzida pelo antioxidante, como exemplo pode ser citado os ensaios com DPPH e ABTS (BUTERA et al., 2002, ABDERRAHIM et al., 2013).

O método ABTS (2,2-azino-bis-3-etil-benzolína-6-sulfonado) determina a habilidade do antioxidante em sequestrar radicais cromóforos que simulam ERO. A técnica apresenta praticidade, rapidez e elevada sensibilidade sendo amplamente empregada para se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (ARNAO, 2000).

#### **12.4 Sistemas nanoestruturados como carreadores de fármacos**

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar a qual engloba uma vasta e variada gama de dispositivos derivados da biologia, engenharia, química e física com a manipulação de materiais em escala nanométrica. Diversas são as áreas que utilizam a nanotecnologia, em especial na área da saúde, observa-se um contínuo progresso criando novas oportunidades para o avanço da ciência médica e tratamento de doenças na área da saúde humana (HORTON & KHAN, 2006; SAHOO et al., 2002).

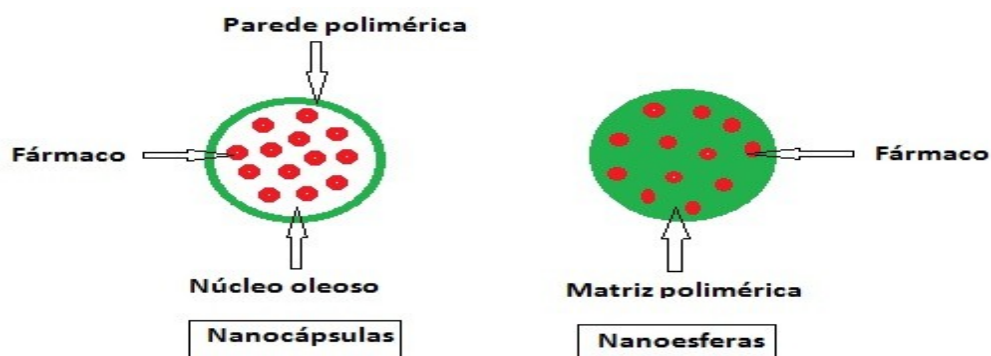
Na área biomédica torna-se possível especificar as seguintes aplicações: direcionamento de fármacos, aplicação em cosméticos, carregamento de proteínas, diagnósticos, uso em implantes e para fármacos com ação antioxidante, tais como: curcumina e ácido elágico (JAIN, 2000; BAO & POTTS, 2001; CALVO et al., 2001; FERRARI, 2005; LIU & WEBSTER, 2007; ANKOLA et al., 2007; SHAIKH et al., 2009; AWASTHI et al., 2010; KUMARI, YADAV & YADAV, 2010; CHATTERJEE, 2013).

No âmbito farmacêutico sistemas nanoestruturados são utilizados quando se deseja um aumento do controle de liberação do fármaco, maior especificidade e seletividade ao local de ação, além da diminuição de efeitos colaterais e da dose (BARRATT, 2000). Em termos gerais, estes sistemas dão preferência às moléculas que apresentam dificuldade de serem entregues através dos meios convencionais decorrentes de suas propriedades farmacocinéticas, tais como: estreito índice terapêutico, alta toxicidade, baixa solubilidade e permeabilidade (BHARDWAJ et al., 2009). A alteração dessas propriedades acarreta em variação nos perfis de liberação do fármaco por elas vinculados, tendo por resultado diferenças na distribuição e absorção das partículas *in vivo* (MAINARDES et al., 2009).

As vantagens no uso desses nanocarreadores são decorrentes de suas propriedades, as quais permitem com que se tenha um sistema de liberação ideal do fármaco. Diante disto há um maior controle da absorção e distribuição tecidual do fármaco, com intensificação do efeito terapêutico e diminuição do efeito nocivo de fármacos com potencial de toxicidade (KREUTER et al., 1995; SCHROEDER, 1998; GULYAEV, 1999; ALEXIS et al., 2008).

O termo nanopartícula quando destinado à liberação controlada de fármacos é amplo e refere-se a partículas poliméricas, as quais apresentam tamanho inferior a 1000 nm (1 $\mu$ m), sendo constituídas de polímeros de origem sintética ou natural. São subdivididas de acordo à organização em nível molecular do polímero em nanoesferas e nanocápsulas. Denominam-se nanoesferas aos sistemas matriciais no qual o fármaco está fisicamente e uniformemente disperso, ao passo que as nanocápsulas são sistemas vesiculares no qual a droga está confinada a uma cavidade rodeada por uma membrana de polímero (**Figura 2**). (SINGH & LILLARD, 2009).

**Figura 2-** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.





Estes sistemas de entrega são mecanismos atrativos por apresentarem como vantagens a proteção do fármaco contra degradação, maior concentração da droga nos sítios alvos, menor absorção da droga pelo sistema retículo endotelial do corpo, além do método de preparação ser geralmente simples e de fácil escalonamento (GREF et al., 1994; GARCIA, et al., 2005). A funcionalização apropriada destes sistemas nanoestruturados permite a distribuição dos fármacos para em diversos locais do corpo, inclusive na região cerebral, durante um período de tempo sustentado (HANS & LOWMAN, 2002; TOSI et al., 2008).

I

#### **12.4.1 Polímero**

A seleção de um polímero deve levar em consideração características, tais como massa molecular, grau de cristalinidade e propriedades físico-químicas. Estas, por sua vez, podem influir na cinética de liberação, na estabilidade do fármaco além de alterar a compatibilidade com o organismo (BOSTAMAN et al., 1990; ANDERSON & SHIVE, 2012).

Há uma gama de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis os quais podem ser utilizados para a formulação dessas nanopartículas, que podem variar de sintéticos a naturais (HILLAIREAU & COUVREUR, 2009). Dentre os polímeros sintéticos frequentemente utilizados pode-se citar o ácido poli-láctico (PLA), ácido poli (láctico-glicólico) (PLGA), poli ([-caprolactona) (PCL) e o ácido poli-glicólico (PGA) (DILLEN et al., 2004; LEMARCHAND et al., 2006; DAMGÉ, MAINCENT & UBRICH 2007; GELPERINA et al., 2010; ESSA, RABANE & HILDGEN, 2011). Já os polímeros de origem natural apresentam como vantagem alta biocompatibilidade e solubilidade em água, podendo ser de origem proteica como albumina, colágeno e gelatina ou de polissacarídeos como alginato, quitosana e dextrano (COIMBRA, 2010).

A albumina é um polímero natural, uma proteína, utilizada na área farmacêutica como transportadora de fármacos devido a suas propriedades como boa biodegradabilidade e biocompatibilidade (SOPPIMATH et al., 2001; RAVAL, PATEL & PATEL, 2010).

A albumina de soro humano (HSA) caracteriza-se por ser uma proteína plasmática, com grande abundância no soro humano (35-50 g/L soro humano) e tempo de meia-vida média de 19 dias, representando cerca de 50% do conteúdo total de proteínas no plasma. Como a maioria das proteínas do plasma é sintetizada no fígado, onde é produzida a uma velocidade de aproximadamente 0,7 mg/h (HIROSE, TACHIBANA & TANABE, 2010).

Tem por característica alta estabilidade em uma faixa de pH de 4 a 9 e pode ser aquecida a 60°C por até 10 horas sem efeitos estruturais deletérios (KRATZ, 2008). A HSA é mais utilizada que a albumina bovina devido a sua propriedade de evitar uma possível resposta imunológica *in vivo*, todavia a sequência de aminoácidos é bem preservada e, quando comparadas apresentam 75% de homologia (CARACENI, 2013).

Sua estrutura primária é composta de uma única cadeia polipeptídica, contendo 585 resíduos de aminoácidos como ácido aspártico e glutâmico, lisina, arginina e triptofano com peso molecular de 66.5 kDa e 17 pontes dissulfeto.

A estrutura secundária é composta majoritariamente por  $\alpha$  hélices, sendo estabilizadas por ligações de hidrogênio dos oxigênios das carbonilas e dos nitrogênios das amidas dos aminoácidos subsequentes estando unidos pelas ligações peptídicas. A estrutura terciária, elucidada através de difração de raio-x demonstra que a proteína tem forma semelhante de um coração. A HSA é formada por três domínios homólogos (locais I, II e III), cada uma deles é composto por dois sub-domínios separados (A e B) que são helicoidais e contém várias ligações cruzadas de pontes dissulfeto, as quais têm por propriedade estabilizar a conformação espacial da molécula (SUGIO et al., 1999; FANALI et al., 2012).

A HSA tem como característica peculiar ser uma proteína cujo arranjo tridimensional depende unicamente da presença das 17 pontes dissulfeto, o que justifica sua habilidade em se manter estável diante de condições desnaturantes mais severas. Dentre as várias características desta proteína, pode-se citar sua propriedade de interagir rapidamente e com grande afinidade a diversos ligantes. Isto decorre de sua capacidade em alterar sua conformação interna de modo rápido. Regiões polares estão estruturalmente arranjadas na parede externa da proteína, garantindo maior solubilidade em meio aquoso e favorecendo as ligações com compostos orgânicos e inorgânicos. Já os grupos hidrofóbicos estão na região mais interna entre as hélices da proteína (ESPÓSITO, 2000; SEZER et al., 2011).

A albumina tem a capacidade de alterar sua conformação interna de modo rápido, onde regiões hidrofóbicas e grupos substituintes carregados auxiliam no processo de fixação dos ligantes à sua estrutura. Sua conformação pode ser subdividida em sítios os quais tem maior afinidade por diferentes tipos de ligantes. Sítios I e II (compostos aromáticos, ácidos carboxílicos e ligantes heterocíclicos), sítios III e V (ácidos graxos de cadeia longa) e sítios (V e VI) íons metálicos (KRATZ, 2000; KRATZ, 2014).

Sua utilização como polímero na produção de nanopartículas é uma prática viável devido a suas propriedades como alta biodegradabilidade e biocompatibilidade e baixa

imunogenicidade (WARTLICK et al., 2004). Vários são os trabalhos da literatura que utilizando sistemas nanoparticulados de HSA para a incorporação de drogas obtiveram resultados positivos como resposta (LANGER et al., 2003; ANHOR, CHRISTIAN-MAHLER & LANGER, 2008; LANGER et al., 2008; CHEN et al., 2010; WACKER et al., 2010).

Nanopartículas de HSA para direcionamento pulmonar apresentaram ausência de toxicidade e inflamação com eficiente captação nas células epiteliais brônquicas humanas (BROZOSKA et al., 2004). Ganciclovir sob a forma nanoparticulada de HSA apresentou melhora em seu perfil de atividade antiviral e ausência de reações auto-imune quando administrado por via intra-vítrea (KIM, ROBINSON & CSAKY, 2009). Nanopartículas de HSA contendo doxorubicina mantiveram sua atividade biológica. Seu efeito quando nanoparticulado apresentou aumento quando comparado com o fármaco em solução (DREIS et al., 2007). Trabalhos de Kufleitner e colaboradores (2010) indicam que nanopartículas de HSA contendo obidoxime, utilizado para o tratamento de envenenamento por organofosforados, apresentou liberação *in vitro* do fármaco na região cerebral.

#### **12.4.2 Nanopartículas como estratégia para o direcionamento cerebral de fármacos**

O emprego da nanotecnologia torna-se relevante por contribuir para o desenvolvimento de novos sistemas de entrega de drogas. Nanocarreadores podem ser ajustados, fazendo o transporte de fármacos em variadas regiões do corpo, incluindo a região cerebral (WANG et al., 2009; KREUTER, 2012; PANYAM & LABHASETWAR, 2012; FROZZA et al., 2013).

A efetividade dos sistemas de administração de medicamentos apoiados na nanotecnologia é influenciada, principalmente pelo tamanho, carga superficial e hidrofobicidade. Estas particularidades estão diretamente relacionadas com os perfis de distribuição, absorção, liberação e eficácia terapêutica *in vivo* (MATHIOWITZ et al., 1997; BHARDWAJ et al., 2009). Tais sistemas apresentam como características: transporte em maior concentração, liberação controlada e veiculação melhorada através da modificação de superfície. Diante do exposto sistemas nanoparticulados atuam como um meio estratégico atraente para a veiculação de fármacos que atuam no SNC (ESSA et al., 2011).

Ampliar o conhecimento do desenvolvimento de tratamentos para doenças da região cerebral torna-se um desafio devido ao número limitado de fármacos que conseguem

ultrapassar a barreira que isola o tecido cerebral das substâncias circulantes no sistema sanguíneo (KREUTER, 2001; TOSI et al., 2008).

Este sistema de isolamento cerebral é conhecido como barreira hemato-encefálica (BHE), estando localizada na interface entre o sangue e o tecido cerebral. É constituída por um conjunto de células que inclui os astrócitos, membrana basal, células da microglia e neurônios, formando uma unidade neurovascular funcional (MISRA et al., 2003; KAUR et al., 2008). O sistema é responsável pela proteção do cérebro desempenhando um papel essencial no controle preciso e elevado do ambiente cerebral, garantindo a efetividade da transmissão nervosa (BLASI et al., 2007; VERGONI et al., 2009; CHEN & LIU, 2012).

Segundo Weiss e colaboradores (2009) a BHE têm por função regular as trocas entre o sangue e os compartimentos do cérebro através: (i) do impedimento da difusão de solutos hidrofílicos, (ii) regulação da migração transendotelial das células circulantes no sangue e patógenos, (iii) promoção do efluxo de moléculas hidrofóbicas e fármacos do cérebro para o sangue e (iv) mediação do transporte ativo de nutrientes para o cérebro. Grande parte das partículas só atingem a região cerebral se ligadas a transportadores específicos ou receptores expressos no lado luminal das células endoteliais.

Diversos trabalhos demonstraram que a entrega para a região cerebral de fármacos pode ser melhorada ao se utilizar transportadores coloidais estericamente estabilizados, tais como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, dendrímeros, nanogéis e nanopartículas poliméricas GELPERINA et al., 2002; VINOGRADOV, BRONICH & KABANOV, 2002; KAUR et al., 2008; WILSON et al., 2008; KANNAN et al., 2012; HAO et al., 2013; HUA & CABOT, 2013).

O processo de opsonização é facilitado devido à presença de interações hidrofóbicas entre as opsoninas e a superfície da partícula. (BAZILE et al., 1995). Qualquer partícula de origem exógena quando na corrente sanguínea tem imediatamente à sua superfície a adsorção de proteínas plasmáticas, as opsoninas. Tal processo tem por objetivo permitir que as partículas sejam rapidamente reconhecidas pelos macrófagos do sistema fagocítico sendo rapidamente eliminadas da corrente sanguínea (MISRA et al., 2003; WEISS, 2009).

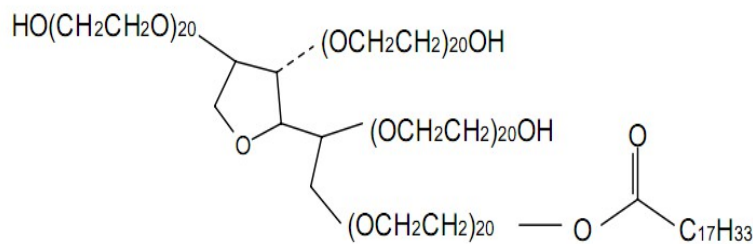
Tendo em vista a existência destes obstáculos, torna-se relevante o desenvolvimento de sistemas que dificultem a captura destas partículas pelo sistema de defesa, aumentando a concentração do fármaco no sangue (PERACCHIA et al., 1998, PERACCHIA et al., 1999).

Uma metodologia promissora para esta proposta é a modificação superficial dos sistemas nanoparticulados através da adsorção ou ligação covalente de polímeros hidrofílicos

e modificação da carga superficial, tamanho e hidrofiliicidade (WONG et al., 2012). Tensoativos hidrofílicos têm a propriedade de modificar a superfície das nanopartículas aumentando a hidrofiliicidade da partícula, dificultando a interação com as opsoninas. Todavia tal propriedade depende da natureza, estrutura química e características físico-química do tensoativo (KREUTER, 2001).

O Polissorbato 80 (monoleato de polioxietilenossorbitano) é um éster de sorbitan etoxilado comercialmente conhecido com Tween 80<sup>®</sup> (**Figura 3**). É um tensoativo não-iônico que apresenta alta hidrofiliicidade, sendo amplamente utilizado na área farmacêutica como emulsionante e dispersante de medicamentos, em cosméticos, formulações agroquímicas e alimentos (BAM et al., 1998).

**Figura 3-** Estrutura química do Polissorbato 80 (monoleato de polioxietilenossorbitano).



Estudos Wilson e colaboradores (2008) indicam que o PS80 pode formar uma barreira de proteção hidrofílica na superfície das nanopartículas, repelindo a adsorção das opsoninas via efeito de repulsão estérica que, pode diminuir níveis de englobamento por parte dos fagócitos.

Nanopartículas recobertas com o PS80 são sistemas de direcionamento de fármacos para o cérebro por apresentarem a propriedade de transpor a BHE (ZHAO, 2013). Todavia o mecanismo que permite a entrega do fármaco até a região cerebral não está totalmente elucidado, mas uma das possibilidades envolvidas nesse carreamento é a endocitose mediada por receptores. Na região cerebral estão presentes os receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) que tem a função de atravessar a BHE do colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL), essencial para a fisiologia cerebral. Uma partícula recoberta com o PS80 tem a propriedade de mimetizar a LDL, ligando-se aos receptores expressos na BHE e facilitar o transporte de drogas para a região cerebral. (GULYAEV et al., 1999).

Diante do exposto, sistemas nanoestruturados com funcionalização da superfície tornam-se uma alternativa favorável para o desenvolvimento de estruturas que consigam modificar o perfil biológico bem como melhorar características físico-químicas e a farmacocinética do fármaco.

## **12.5 Método de obtenção das nanopartículas: secagem por atomização (*spray dryer*)**

Variados são os métodos que podem ser utilizados para a nanoencapsulação de fármacos. Todavia, a escolha da técnica mais adequada deve considerar fatores como tamanho desejado da partícula, propriedades físicas e químicas dos polímeros, aplicação do produto final, dispositivos associados à liberação, bem como custo e escala de produção. Devem-se considerar parâmetros como a propriedade do ativo bem como o tipo de partícula desejada, de acordo com sua capacidade de liberação e proteção. Ademais, deve-se levar em conta sua finalidade, morfologia e estabilidade bem como os parâmetros envolvidos no processo de manufatura (SOUTO, SEVERINO & SANTANA, 2012; JAMEKHORSHIED, SADRAMELI & FARID, 2014).

Diversas são as técnicas de preparação de sistemas nanoparticulados, estes podem ser classificados em três principais grupos: i) métodos físico-químicos: destina-se a produção de nanopartículas que utilizam polímeros pré-formados e com indução de sua precipitação por evaporação e emulsificação do solvente, tais como coacervação e envolvimento lipossômico ii) métodos químicos: síntese química *in situ* das macromoléculas, resultando em polimerização ou reações de policondensação interfacial: polimerização interfacial e inclusão molecular e iii) métodos mecânicos: utiliza-se dispositivos de alta energia, como homogeneizadores de alta pressão ou moinhos úmidos de alta energia: *spray dryer*, *spray coating*, *spray chilling* (SINGH & LILLARD, 2009; LI et al., 2010).

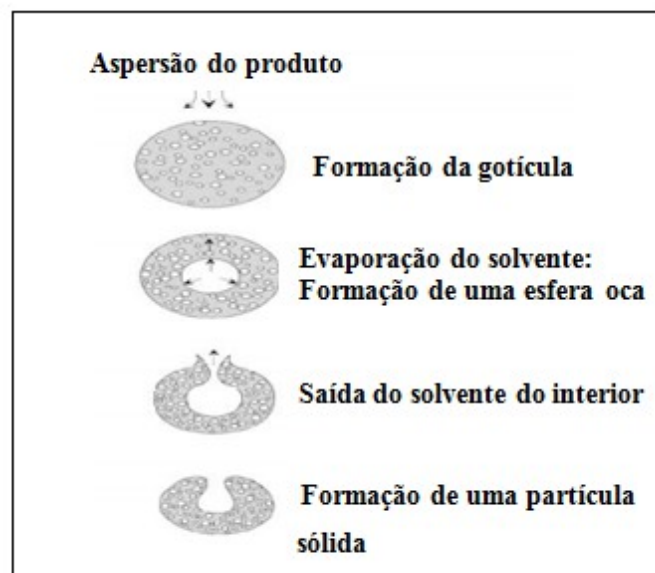
Em presença de diferentes e variados métodos aplicáveis para a produção de nanopartículas tem-se a secagem por atomização *spray dryer* sendo uma técnica difundida na indústria farmacêutica, e objeto de estudo do presente trabalho. Primeiros relatos da utilização da técnica para a formação de partículas secas foram em meados de 1860, com sua primeira patente de exclusividade em 1872. Todavia, ocorreram problemas em seus dispositivos primitivos, os quais ocasionaram problemas em aspectos como eficiência, desempenho e segurança do processo. Diante disto somente em 1920, com a evolução de seus dispositivos

foi possível seu emprego para produção de leite em pó. Sendo esta a primeira aplicabilidade em escala industrial de *spray dryer* (REDDY et al., 2014).

Na indústria farmacêutica os primeiros relatos do uso da técnica destinam-se para a obtenção de extratos secos de plantas. A partir de então, esta metodologia vem apresentando grande relevância devido a sua capacidade de secar até mesmo extratos mais termolábeis com ausência de decomposição de seus componentes (SOLLOHUB & CAL, 2010). Aplica-se na produção de excipientes e formulações pulmonares, microencapsulação e secagem de matérias termosensíveis, dentre outros (NANDIYANTO & OKUYAMA, 2011).

A técnica consiste em um método mecânico o qual promove a mistura entre uma massa fluída e um gás aquecido, sendo pulverizada na forma de gotículas, produzindo uma grande área superficial, posteriormente ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido, com ocorrência de transferência de calor e evaporação do solvente de maneira rápida e uniforme com formação da gotícula sólida (**Figura 4**). (KIM & JUNG, 2007; VICENTE et al., 2013).

**Figura 4-** Representação esquemática da formação de partícula por atomização.



(Adaptado: Cao et al., 2000)

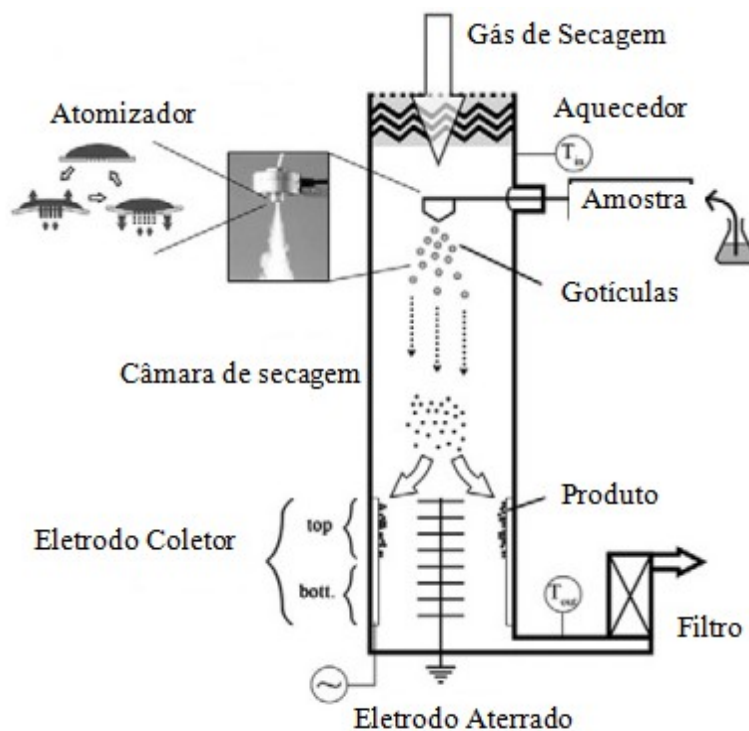
Atribuem-se como vantagens do processo de atomização: alta reprodutibilidade; possibilidade de transformar líquidos em sólidos; maior controle do tamanho da partícula; secagem de produtos termolábeis, insumos biológicos e farmacêuticos além da produção em

larga escala com elaboração de partículas uniformes, de pequenas dimensões e esféricas com boa eficiência, bem como baixo custo do processo (BORREGUEIRO et al., 2011).

A seleção cuidadosa das condições variáveis do processo como metodologia e condições de atomização; temperatura de entrada e saída do ar, distribuição da temperatura, vazão de alimentação, taxa de aspiração, velocidade de atomização, umidade e fluxo de ar e concentração da solução/suspensão de alimentação influenciam na obtenção de partículas com tamanho, conteúdo de umidade e distribuição granulométrica apropriados. Além do mais, estas variáveis são determinantes da morfologia das partículas formadas (VEHRING, 2007; TONON, BRABET & HUBINGER, 2008).

Para melhor elucidar o mecanismo de funcionamento do sistema de atomização pode-se observar o esquema abaixo representado (**Figura 5**).

**Figura 5-** Desenho esquemático de um sistema de atomização Spray Dryer.



(Adaptado Li et al., 2010)

Basicamente no mecanismo de atomização a emulsão, solução ou dispersão é bombeada por entre o bico atomizador na forma de spray para a câmara de secagem por onde passa um fluxo de ar quente. As gotículas quando em presença do ar aquecido e a alta relação área de superfície/volume promovem rápida evaporação da água, sendo as gotículas



transformadas em partículas. A velocidade do processo e, por conseguinte o curto tempo de processamento oportuniza a secagem de produtos até temperaturas sensíveis sem degradação (Manual BUCHI, 2014)

Para tal, faz-se necessário um sistema de bombeamento por onde a suspensão é aspirada até a parte superior, sendo aquecida até uma temperatura (de entrada ou INLET) adequada para a atomização. Através do bico do atomizador com saída para dois fluídos: suspensão e o gás (ar ou N<sub>2</sub>) há a injeção simultânea de ambos na câmara de secagem. Têm-se início o processo de atomização quando a massa líquida sob efeito da compressão do gás é gotejada pelo bico do atomizador ejetando milhões de gotas por segundo. Estas gotículas extremamente finas são secas em partículas sólidas, as quais são carregadas eletrostaticamente e depositadas na superfície do eletrodo coletor. O gás de secagem sai do coletor de pulverização e a temperatura de saída é mensurada enquanto o gás é filtrado.

## **2.6 Métodos instrumentais utilizados para a caracterização de sistemas nanoestruturados**

### **2.6.1 Espectroscopia de correlação de fótons: *dynamic light scattering* (DLS)**

A técnica consiste em atravessar a amostra com feixe de laser de modo que as nanopartículas espalhem a luz. Devido ao fato destas partículas em suspensão apresentarem movimento Browniano, dependendo da velocidade de difusão das partículas ocorre variação do espalhamento da luz, sendo possível determinar o diâmetro médio das partículas (XU, 2008). Amostras com partículas de menor diâmetro movimentam-se mais rapidamente, obtendo-se rápidas modificações no espalhamento da luz. Todavia partículas maiores apresentam menores flutuações na intensidade de espalhamento de luz.

### **2.6.1 Determinação da carga de superfície: potencial zeta**

A carga de superfície exprime o potencial de superfície da partícula, sendo influenciado por mudanças na interface com o meio dispersante, decorrentes da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão (JAIN & SARAF, 2009). A técnica tem por princípio o

espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das nanopartículas, que consiste na aplicação de um campo elétrico de força conhecida através da amostra.

Segundo Schaffazick e colaboradores (2003) a determinação da carga de superfície apresenta relevância, estando relacionada com a estabilidade da nanopartícula e com a resposta biológica do fármaco. Para Hans e Lowman (2002) a carga superficial pode influenciar a estabilidade das partículas em suspensão, através da repulsão eletrostática entre as partículas. Sistemas nanoparticulados fisicamente estáveis apresentam um potencial zeta mínimo de  $\pm 30$  mV, indicando boa estabilidade eletrostática.

Quando o valor do potencial zeta, em módulo, apresenta-se alto, há indicativos de que interações repulsivas entre as partículas são maiores, levando a formação de partículas mais estáveis, culminando com o decréscimo da agregação.

### **2.6.1 Espectroscopia na região do infravermelho**

A análise da espectroscopia na região do infravermelho tem por objetivo detectar os grupos funcionais e identificar possíveis interações intermoleculares, resultando em caracterização do fármaco, polímeros e adjuvantes. A caracterização é realizada por meio de deslocamentos, variações de intensidade, alargamento ou aparecimento de novas bandas. (LOPES & FASCIO, 2004).

### **2.6.1 Difração de raio-x (DRX)**

A DRX tem por objetivo observar a microestrutura e identificar as fases cristalina e amorfa em 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 (BEYERLEIN et al., 2010).

A técnica apresenta elevada relevância em aspectos relacionados ao controle de liberação de fármacos, uma vez que pode afetar a velocidade de dissolução no processo de entrega da droga. O método pode diferenciar os materiais entre amorfos ou cristalinos, uma vez que substâncias cristalinas tem por característica a presença de picos definidos, mas em

uma substância amorfa não é possível observar planos nítidos característicos de cristais (GURUNATH et al., 2013).

### **2.6.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A técnica de DSC é um método termo-analítico com propriedade de investigar a interação entre polímero e o fármaco em diversas formulações. Assim torna possível obter informações úteis a respeito da morfologia do polímero e sobre o estado de dispersão sólida ou molecular do fármaco presente nos sistemas poliméricos. Além disto, através da técnica podem-se obter informações a respeito de incompatibilidade física ou química entre fármaco, polímero e adjuvantes (STORPIRTIS et al., 2011).

## **2 OBJETIVOS**

### **13.1 Objetivos gerais**

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver nanopartículas de albumina humana pelo método de atomização *spray dryer* incorporadas com polissorbato 80 contendo apocinina para direcionamento cerebral e avaliação da atividade antioxidante.

### **13.2 Objetivos específicos**

- Obtenção de nanopartículas de albumina humana contendo apocinina obtidas pelo método *spray dryer*;
- Modificação de superfície das nanopartículas com incorporação do PS80, em diferentes concentrações e incorporado durante a formulação ou como revestimento;
- Caracterização físico-química das nanopartículas avaliando-se os parâmetros: diâmetro médio, índice de polidispersividade, carga de superfície, interação fármaco-polímero e determinação da eficiência de encapsulação e

- Avaliação da atividade antioxidante da apocinina quando em um sistema nanoparticulado.

## 2 MATERIAIS

### 14.1 Reagentes

- Apocinina (Aldrich Chemistry)
- Albumina de soro humano- 96-99% (Sigma)
- Álcool etílico (P.A) (Vetec)
- Água Ultrapura (sistema Milli-Q Gradiente Millipore<sup>®</sup>, resistividade de 18.2 M $\pm$  cm);
- Ácido acético grau HPLC (Vetec)
- Acetonitrila grau HPLC ( Tédia)
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) ( Aldrich Chemistry)
- Polissorbato 80 (Sigma ChemicalCo., USA);
- Tampão PBS 50 mM pH 7,4
- TMB

### 14.2 Equipamentos

- Agitador tipo vortex- Vertex<sup>®</sup>;
- Banho Ultrasônico - Unique<sup>®</sup>;
- Balança analítica – Tecnal<sup>®</sup>;
- Capela de fluxo laminar;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência-Waters Alliance (detector PDA, coluna fase reversa C18 (125 mm X 4 mm) tamanho de partícula 5 $\mu$ m- Merck Millipore<sup>®</sup>);
- Desruptor de células Ultrasônico - Unique<sup>®</sup>;
- Difratômetro Raios X (Bruker- Mod.D2 PHASER);
- Espectrofotômetro de Infravermelho-Termo Electron Nicolet FT-IR (Thermo Electron Corporation);
- Equipamento para medida do espalhamento dinâmico da luz e potencial zeta – (Malvern<sup>®</sup> nano ZS90);

- Incubadora com agitação orbital (Quimis<sup>®</sup>);
  - Leitor de microplacas (Spectra Max 190- Molecular Devices);
  - Membranas filtrantes (acetato de celulose 0,22 µm e PTFE 0,45 µm) - Millipore<sup>®</sup>;
  - Nano Spray Drying B-90 (BUCHI<sup>®</sup>)
  - Pipetas monocal (Labmate<sup>®</sup>);
  - Sistema de ultrapurificação de água (MilliQ Gradiente Millipore<sup>®</sup>);
  - Sistema de calorimetria exploratória diferencial ( T.A Instruments, modelo SDT Q600);
  - Ultracentrífuga refrigerada (Hermle Labortechnik<sup>®</sup> Z36HK).

## 2METODOLOGIA

A finalidade do presente estudo é o desenvolvimento tecnológico de nanopartículas poliméricas com incorporação do PS80 para direcionamento cerebral. Assim foi realizado um delineamento de diferentes formulações, com variações da concentração do tensoativo e diferentes método de incorporação: adicionando-o no momento da formulação ou após as nanopartículas já preparadas, como revestimento. As formulações foram desenvolvidas de acordo com a **Tabela 1**:

**Tabela 1-** Delineamento das formulações desenvolvidas com as variadas concentrações de tensoativo.

| Formulação | Tensoativo na formulação (%) | Tensoativo como revestimento (%) |
|------------|------------------------------|----------------------------------|
| F1         | 0,05                         | 1                                |
| F2         | 0,05                         | 1                                |
| F3         | 0,05                         | 1                                |
| F4         | 0,05                         | 1                                |
| F5         | 0,05                         | 1                                |

### 5.1 Método para quantificação da Apocinina

Para análise quantitativa da apocinina utilizou-se a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme metodologia descrita anteriormente por Oliveira (2013) e validada conforme parâmetros da International Conference on Harmonization (ICH). Seguindo-se assim todos os parâmetros e condições previamente estabelecidas para assegurar a quantificação adequada da droga. As condições foram:

- ✓ fase móvel: acetonitrila: água (ácido acético 0,1%) 60: 40 (v/v);
- ✓ vazão da fase móvel: 0,8 mL/min;
- ✓ tempo de corrida: 3 minutos;

- ✓ eluição isocrática;
- ✓ volume de injeção: 20 µL;
- ✓ comprimento de onda: 276 nm;
- ✓ coluna fase reversa C 18 (125 mm X 4 mm), tamanho de partícula 5 µm- Merck Millipore®;
- ✓ temperatura da coluna: 25°C e
- ✓ detector: PDA-UV-Vis.

Todavia, com o intuito de analisar se os quesitos pré-estabelecidos são aplicáveis as condições laboratoriais para o desenvolvimento do presente trabalho, primeiramente realizou-se a construção de uma curva padrão com 8 concentrações da droga (5; 10; 20; 40; 50; 60; 80 e 100 µg/mL). Sendo os valores correspondentes à área sob a curva foram utilizados para o cálculo da equação da reta através da regressão linear, bem como, para o cálculo do coeficiente de correlação (r), útil para estimar a qualidade da curva e sua linearidade no intervalo das concentrações testadas.

## 5.2 Obtenção das nanopartículas de apocinina

As nanopartículas foram obtidas pela técnica de atomização por *spray dryer*, anteriormente descrita por Li e colaboradores (2010). Foi dissolvido 100 mg de HSA em 4 mL de água ultra pura com prévia dissolução das diferentes concentrações do PS80. A esta solução adicionou-se a apocinina na concentração 25 mg/mL dissolvida em etanol. Esta mistura foi previamente filtrada em membrana de 0,22 µm antes do processo de atomização para evitar o entupimento devido a quaisquer partículas não dissolvidas na malha de pulverização.

Para a formulação em que o PS80 foi utilizado para revestir seguiu-se a metodologia de Pereverzeva e colaboradores (2007) e a concentração do surfactante de acordo com estudos prévios de Tian e colaboradores (2011). As nanopartículas foram ressuspensas a uma solução de PS80 a 1% em água destilada na proporção 1:1 (m/v) com posterior incubação por 30 minutos a 20°C.

Os parâmetros utilizados para atomização da amostra foram:

- ✓ fluxo do ar de atomização: 130 L/min;
- ✓ temperatura de entrada de ar (INLET): 100°C;
- ✓ temperatura de saída de ar (OUTLET): 40- 46 °C;
- ✓ pressão: 35 bar;
- ✓ spray: 100%;
- ✓ temperatura atomizador: 100°C;
- ✓ malha do atomizador: 4,0 µm.

As partículas foram coletadas do aparelho com ajuda de uma espátula e armazenadas em micro tubos tipo eppendorf envoltos com papel parafilme e armazenados em dessecador. Após o processo de preparo as amostras foram caracterizadas. Para ensaios de ação antioxidante optou-se por uma única formulação sendo considerada a mais adequada para ensaios futuros.

### **15.3 Caracterização físico-química das nanopartículas**

O estudo de caracterização dos sistemas nanoestruturados apresenta significativa relevância, uma vez que as propriedades como hidrofobicidade, composição polimérica das partículas, carga superficial, perfil de biodegradação do fármaco e substâncias adjuvantes apresentam grande influência nos processos de absorção, biodistribuição e eliminação do fármaco (REIS et al., 2006). Dentre as principais características que devem ser avaliadas pode-se citar: tamanho, carga superficial e cristalinidade do sistema nanoestruturado (HANS & LOWMAN, 2002).

#### **5.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação**

A apocinina presente nas nanopartículas foi quantificada por CLAE. Para tal, 10 mg das nanopartículas foram dissolvidas em 1,5 mL de etanol. Posteriormente a solução foi homogeneizada em agitador vórtex e levada a centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos. Em seguida, coletou-se uma alíquota de 10 µL do sobrenadante e adicionou-se 990 µL da fase móvel acetonitrila (1:100), o sistema foi filtrado em membrana de 0,22 µm com posterior leitura.

### **5.3.2 Determinação do tamanho e índice de polidispersão (IPD)**

O tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram determinados pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons, *Light Scattering*. Para tal análise utilizou-se uma pequena alíquota do pó o qual foi disperso em 2 mL de água purificada e analisadas com ângulo de dispersão de 90° e temperatura de 20°C. Todas as análises foram realizadas em 3 determinações bem como o índice de polidispersão calculou-se a média e o desvio-padrão.

### **5.3.3 Determinação da carga de superfície: potencial zeta**

A carga de superfície das nanopartículas foi determinada através da capacidade da mobilidade eletroforética das partículas utilizando o módulo de potencial zeta. Para tal análise utilizou-se uma pequena alíquota do pó acondicionadas em célula eletroforética, previamente dispersas em 2 mL de solução de KCl 1mM. Todas as análises foram realizadas em 3 determinações, calculou-se a média e o desvio-padrão.

### **15.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho**

Para tal análise, preparou-se pastilhas de KBr que foram analisadas na faixa de 250 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros das nanopartículas com o polissorbato contendo apocinina foram analisados e comparados com os espectros obtidos do polímero, do fármaco e do tensoativo sendo seus espectros comparados entre si.

### **5.3.5 Ensaio de difração de raio-x (DRX)**

A análise foi realizada utilizando radiação Cu  $K\alpha$  em temperatura ambiente. Estabeleceu-se como parâmetros: tensão 30 kV e corrente 10 mA, sendo as amostras acondicionadas em suporte de vidro e digitalizadas a partir de 5° para 60°.



### 5.3.6 Análise térmica (DSC)

Executou-se o ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC), em que as amostras (10 mg) foram pesadas em cadinho de alumínio sendo aquecidas em atmosfera de nitrogênio, com variação de 30- 450°C, sob razão de aquecimento de 10°C/min e vazão de 100 mL/min. Foi necessário realizar a calibração da célula de DSC, verificada anteriormente aos ensaios utilizando padrões de zinco, oxalato de cálcio e safira.

## 5.4 Estudo do potencial antioxidante

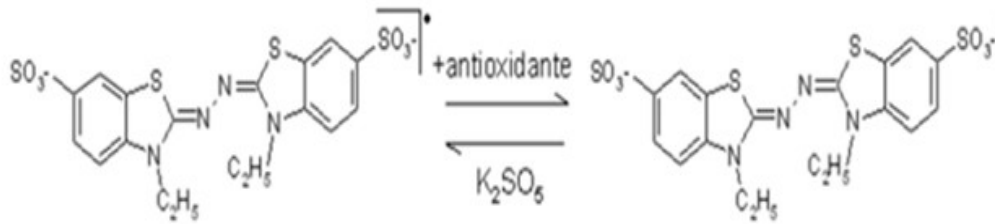
A atividade antioxidante da apocinina presente em nanopartículas foi realizada através dos ensaios de inibição do radical 2,2-azinobis (3- etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>) e do HOCl e do radical.

### 5.4.1 Ensaio de descoloração do radical ABTS<sup>•+</sup>

O acompanhamento da atividade antioxidante das nanopartículas de apocinina foi analisado através do estudo de descoloração do radical ABTS<sup>•+</sup> previamente descrito por Re e colaboradores (1999).

O radical ABTS<sup>•+</sup> é gerado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio (**Figura 6**), apresentando-se como um cromóforo verde /azul. Quando em presença de um antioxidante o radical pré-formado o reduz novamente em ABTS resultando em uma supressão da cor da solução. O mecanismo de ação envolvido neste processo consiste em monitorar o decaimento do radical ABTS<sup>•+</sup> produzido pela oxidação do ABTS quando em presença da amostra antioxidante. O potencial antioxidante das nanopartículas foi monitorado através do grau de descoloração analisado pela absorção do cátion radical em 734 nm.

**Figura 6-** Mecanismo de formação do radical ABTS<sup>•+</sup>.



Para o ensaio 10  $\mu\text{L}$  da amostra (fármaco livre, nanoencapsulado e nanopartículas vazias) em quatro concentrações: 1,25; 2,50; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$  foram incubadas com 190  $\mu\text{L}$  de solução de ABTS<sup>•+</sup> por 30 minutos a 25°C, com posterior leitura da absorbância em 734 nm em leitor de microplacas. Os tempos analisados foram: 0; 24; 48 e 72 horas.

A interação entre o ABTS<sup>•+</sup> e a amostras foram avaliadas pelo decréscimo da absorbância após o período de incubação. As leituras foram realizadas em triplicata sendo a atividade antioxidante calculada como porcentagem de inibição do ABTS<sup>•+</sup>, seguindo a equação 1. Os resultados foram analisados utilizando o software PRISMA, versão 5 e feito teste ANOVA one-way seguindo da análise de regressão e pós-teste de Tukey.

$$\text{Inibição} = \left| \frac{(Ac - Aa)}{Ac} \right| \times 100$$

(Equação 1)

Onde: Ac: absorbância do controle e Aa: absorbância da amostra

•Preparo do ABTS<sup>•+</sup>:

Para tal, partiu-se de uma mistura aquosa de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (2,45 mM) que foi incubada à temperatura ambiente por 12 horas e ausência de luz com o intuito de formar o radical. No momento do uso, a solução foi previamente diluída em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4) até a obtenção da absorbância próxima de 0,8 com leitura em 734 nm.

#### 5.4.2 Potencial de inibição do HOCl

A investigação do potencial antioxidante das nanopartículas de apocinina com o HOCl foi realizada em tampão fosfato de sódio (PB) 50 mM, pH 7,4.

Para o ensaio utilizou-se 10  $\mu\text{L}$  da amostra (fármaco livre, nanoencapsulado e nanopartículas vazias) em quatro concentrações 0,15; 0,30; 0,60; 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mais 50  $\mu\text{L}$  de HOCl (100  $\mu\text{M}$ ) foram incubadas por 10 minutos a 37°C. O HOCl remanescente foi revelado pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de tetrametilbenzidina (TMB) o qual apresenta produto de oxidação com absorção máxima em 652 nm (PAINO et al., 2005). O volume final foi completado com PBS para 200  $\mu\text{L}$  com posterior leitura em leitor de microplaca. O ensaio foi realizado em triplicata.

- Preparo do HOCl:

O  $\text{OCl}^-/\text{HOCl}$  foi obtido através do NaOCl diluído em NaOH 0,05  $\text{mol.L}^{-1}$  com ajuste da concentração usando  $[\epsilon]_{295\text{nm}} = 350 \text{ cm}^{-1}$ .

- Para o preparo do TMB:

Preparou-se uma solução de TMB a 0,014  $\text{mol.L}^{-1}$ , para preparar essa solução dissolveu-se 0,034 g de TMB em 5 mL de dimetilformamida e adicionou-se 4,9 mL de ácido acético 0,8  $\text{mol.L}^{-1}$  e 0,1 mL de KI 0,01  $\text{mol.L}^{-1}$ .

A porcentagem de inibição das nanopartículas e do fármaco livre sobre o HOCl foi calculada conforme equação 1.

## 5.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos com média  $\pm$  desvio padrão (DP). Para a análise estatística foi utilizando o software PRISMA versão 5. ANOVA one-way foi realizado, seguindo da análise de regressão e pós-teste de Tukey.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

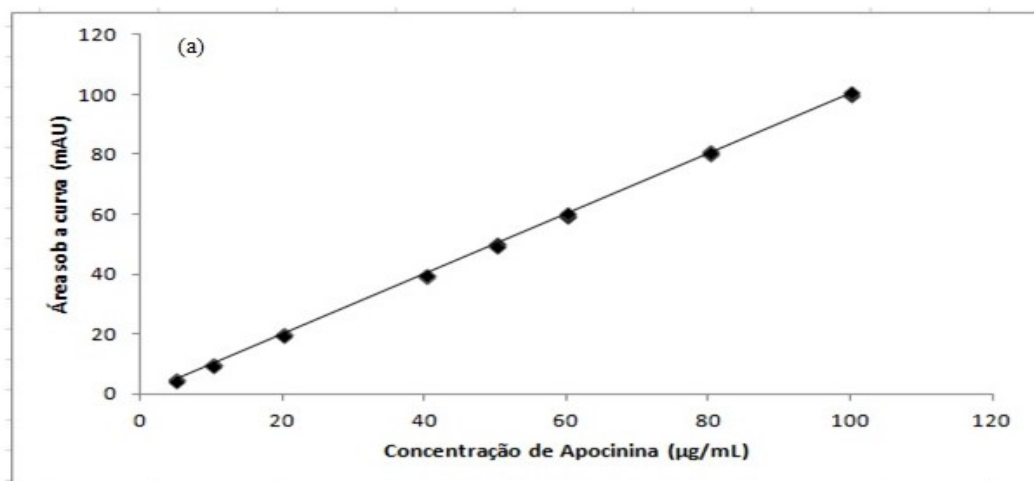
### 6.1 Método para quantificação de apocinina em nanopartículas

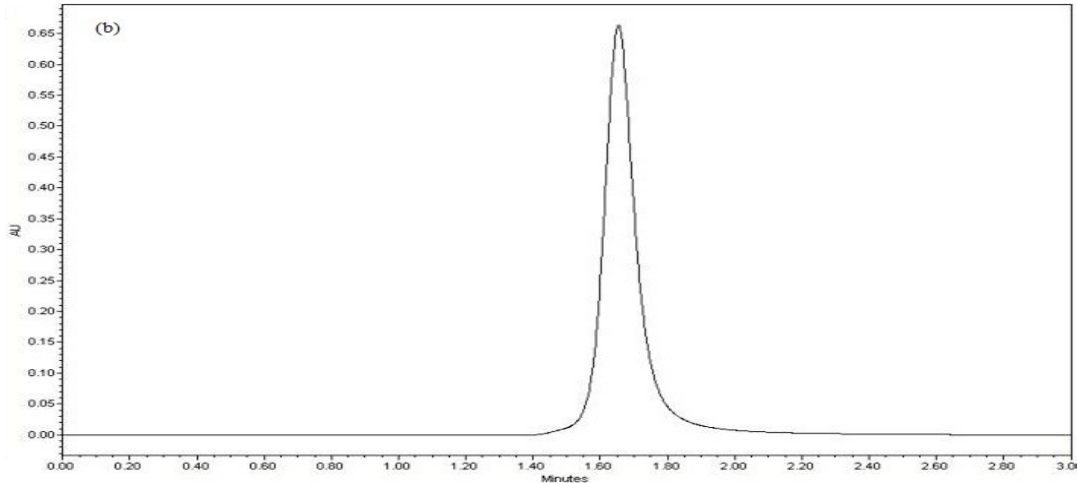
As condições cromatográficas adequadas para a quantificação da apocinina por CLAE seguiram metodologia previamente estabelecida e validada.

A linearidade de um método é a sua capacidade de apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração da amostra dentro de um intervalo especificado. Assim sua avaliação é determinada a partir do coeficiente de correlação ( $r$ ) com valor mínimo aceitável de 0,99 (ANVISA, 2003). Nas condições pré-determinadas foi possível observar linearidade adequada na faixa de concentração de 5 a 100  $\mu\text{g/mL}$  com coeficiente de correlação de 0,9992 (**Figura 7 (a)**) estando o método de acordo com os preceitos da ANVISA.

A partir da regressão linear dos dados experimentais foi obtida a equação da reta:  $y = 93500 + 2340x$ . Por conseguinte, seguiram-se fielmente as condições e parâmetros previamente estabelecidos. Obtiveram-se como resultados picos simétricos, estreitos e com ausência de ruídos de base, como pode ser observado na **Figura 7 (b)**.

**Figura 7-** (a) Curva padrão da apocinina em acetonitrila. Fase móvel: ACN: água com ácido acético 0,1% (60:40 v/v).  $\lambda$  276 nm e (b) cromatograma de solução padrão de apocinina (10  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ). Equação da reta:  $93500 + 2340x$  ( $r: 0,9992$ ).





Diante destes resultados infere-se que ao se seguir a metodologia de validação analítica para a apocinina em CLAE devidamente validada os resultados serão autênticos não implicando em prejuízo dos ensaios e análises futuras.

## 6.2 Obtenção das nanopartículas de HSA contendo Apocinina

As nanopartículas obtidas pelo método de atomização por *spray dryer* apresentaram-se como características: forma de pó, coloração levemente amarelada com ausência de higroscopicidade.

## 6.3 Caracterização físico-química das nanopartículas

Propriedades físico-químicas dos sistemas nanoparticulados exercem papel fundamental na determinação da liberação da droga, na citotoxicidade e absorção celular, bem como em sua farmacocinética e biodistribuição, influenciando no perfil de ação do fármaco encapsulado (YAN et al., 2010).

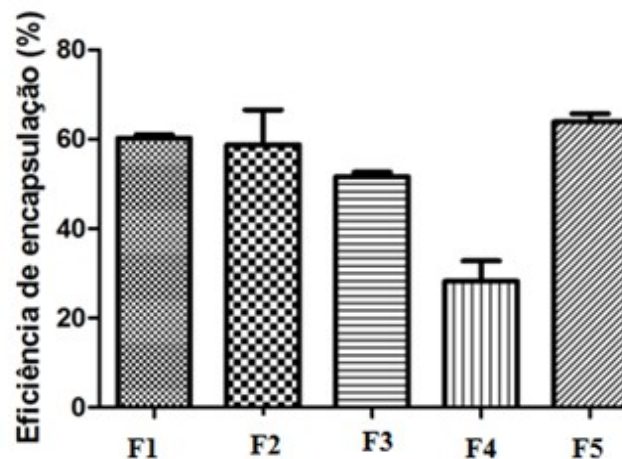
### 6.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação das nanopartículas de HSA contendo apocinina foi determinada por CLAE, com resultados expressos na **Tabela 2** e na **Figura 8**.

**Tabela 2-** Eficiência de encapsulação da apocinina em diferentes concentrações do PS80.

**Formulação** **E.E % (média ± DPR)** **F1** 60,20 ± 1,97 **F2** 58,76 ± 13,55 **F3** 51,23 ± 1,70 **F4** 28,23 ± 7,80 **F5** 64,39 ± 7,63 (n=3)

**Figura 8-** Representação gráfica da eficiência de encapsulação das diferentes formulações.



F1: sem PS80; F2: PS80 0,05%; F3: 0,5%; F4: PS80 1% formulação; F5: PS80 1% revestimento

Observa-se nítida diferença para os resultados obtidos com diferentes formulações. A formulação F1 quando comparada com a amostra F2, F3 e F4 demonstrou haver diferença estatística ( $p < 0,05$ ), já quando comparada com a F5 não houve diferença ( $p > 0,05$ ). A formulação F4 foi a que apresentou menor resposta frente à eficiência, uma possível justificativa para tal fato segue estudos de Pérez e colaboradores (2009), os quais afirmam que o PS80 tem tendência a reduzir a energia livre do sistema por adsorção na interface. Todavia se ocorre aumento da concentração do surfactante há desestabilização do sistema através da saturação desta interface. A redução da energia total continua através de outros mecanismos como cristalização, floculação ou separação de fases. Diante disso, tende-se a má formação das partículas o que resulta em encapsulação inadequada do fármaco.

A utilização de nano *spray dryer* para a encapsulação de matérias é uma técnica que reproduz elevados índices de eficiência de encapsulação (ELZOGHBY, SAMY & ELGIDY, 2012). Todavia, segundo Wu e colaboradores (2014) ao encapsular sulforafano, composto com propriedades anticarcinogênica, antioxidante e anti-inflamatória, com diferentes matérias obtiveram resultados variando entre 27,1 a 44,5%. Os autores concluíram que os valores foram influenciados pelo tipo de material utilizado para compor as paredes da nanopartícula.

Resultado semelhante foi obtido por Jain & Banerjee (2008) em seus estudos com sistemas nanoparticulados de cloridrato de ciprofloxacino com diferentes polímeros naturais: quitosana, albumina bovina, gelatina e nanopartículas lipídicas obtiveram variações na eficiência de encapsulação, entre 35 e 48%, sendo resultado mais satisfatório para nanopartículas quando incorporadas com a albumina.

Trabalhos de Waterhouse e colegas (2013) ao investigar a encapsulação por *spray dryer* da quercetina e vanilina com diferentes polímeros naturais obtiveram resultados variando entre 8,9 a 18,5% dependendo do polímero. Segundo os autores a variação da eficiência de encapsulação foi influenciada pela estabilidade térmica dos compostos.

Algumas propriedades da droga como polaridade, solubilidade, bioatividade, hidrofobicidade ou hidrofiliicidade e estabilidade estão diretamente relacionadas com sua estrutura química (PEREZ-JIMÉNEZ et al., 2008). A técnica de encapsulação por *spray dryer* é um meio alternativo para que se possa melhorar, alterar ou proteger os bioativos de condições adversas que possam influir, ou alterar o perfil de ação (FAVARO-TRINDADE et al., 2010).

### 6.3.2 Determinação do tamanho e do índice de polidispersão (IPD)

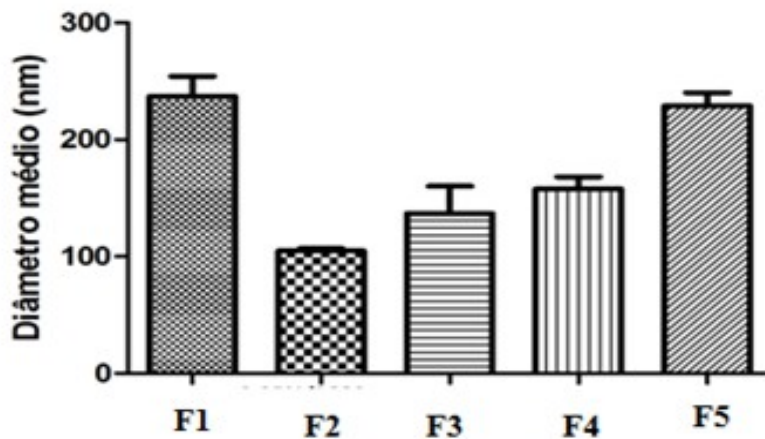
O tamanho de partícula e o índice de polidispersão das amostras obtidas pelo método de atomização estão apresentados na **Tabela 3** e na **Figura 9**.

**Tabela 3-** Variação do tamanho médio e IPD de nanopartículas de apocinina em diferentes concentrações do PS80.

| Formulação     | Diâmetro médio (nm) (média ± DPR) | IPD   |
|----------------|-----------------------------------|-------|
| F2             |                                   |       |
| F3             |                                   |       |
| F4             |                                   |       |
|                | 5237,03 ± 29,44                   |       |
|                | 104,85 ± 5,02                     |       |
| 136,76 ± 25,17 |                                   |       |
|                | 157,80 ± 25,17                    |       |
|                | 228,80 ± 27,43                    | 0,613 |

0,343  
 0,322  
 0,536  
 0,308(n=3)

**Figura 9-** Representação gráfica da variação do diâmetro médio das nanopartículas de apocinina em diferentes concentrações do PS80.



F1: sem PS80; F2: PS80 0,05%; F3: 0,5%; F4:PS80 1% formulação; F5: PS80 1% revestimento

Com base na **tabela 3** e na **figura 9** pode-se observar que ao se comparar as formulações F1 com F2, F3 e F4 indicam haver diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). E também as três formulações F2, F3 e F4 apresentaram diferença estatística entre si com  $p < 0,05$ . Já a formulação F1 quando comparada com F5 não apresentaram diferença entre si ( $p > 0,05$ ).

Sabe-se que o tamanho da partícula é um parâmetro importante na aderência, bem como na interação com as células biológicas. Partículas em escala nanométrica são conduzidas mais facilmente para diferentes regiões do corpo. (ALLEMANN et al.,1993). Para todas as formulações pode-se observar que os valores estão dentro dos parâmetros os quais definem estas partículas como sistemas nanoestruturados, tamanho inferior a 1000 nm.

A incorporação do PS80 em várias concentrações não levou a diferenças significativas no tamanho das partículas. Todavia, as formulações com ausência do tensoativo (F1) e a revestida com o tensoativo (F5) apresentaram dimensões maiores quando comparadas com as outras formulações.



O PS80 é um surfactante não-iônico utilizado como excipiente para produtos farmacêuticos, dentre outras ações, influencia o tamanho dos sistemas nanoparticulados (WANG et al., 2008). Além disso, é comprovadamente o reagente de revestimento de superfície mais eficaz para facilitar a entrega de nanopartículas ao cérebro (GELPERINA et al., 2002; GAO & JIANG, 2006).

A incorporação de tensoativos durante a formulação de partículas de origem proteica como as de HSA em *spray dryer* tem grande relevância na estabilidade, por atuar na diminuição da ocorrência de quadros de desnaturação e agregação proteica (AJMARA & SCHERLIE, 2014). A desnaturação é dificultada devido ao fato do surfactante atuar na região interfacial das gotas de pulverização, e assim, reduz o contato da proteína com a superfície de secagem, dificultando a ocorrência de perdas estruturais (MAA, NGUYEN & HSU, 1998).

As proteínas podem sofrer perda estrutural quando expostas a uma interface ar/água, sendo frequentemente desnaturadas. Levando em consideração a grande área de superfície na atomização, há a ocorrência de uma desnaturação em potencial. Possivelmente a incorporação de tensoativo à formulação resulta em melhorias da estabilidade da proteína, impedindo ou reduzindo as interações da proteína com a superfície (BROADHEAD et al., 1994; MUMENTHALER, HSU & PEARLMAN, 1994).

Já a inibição da agregação proteica ocorre quando o tensoativo estando na formulação ocupa a interface hidrofóbica ar/líquido impedindo que as moléculas de proteína venham a se acumular ou se agregarem na superfície da gotícula. Além disto, dificulta a interação proteína-proteína o que resulta em sistemas particulados com tamanho inferior frente aos sistemas com ausência de tensoativo (MOSQUEIRA et al., 2000).

Os resultados obtidos mostram que as nanopartículas com ausência do tensoativo apresentaram tamanho relativamente aumentado quando comparado com as três formulações que receberam concentrações variadas do PS80 no momento da formulação, isto comprava a influência do tensoativo como inibidor da agregação. Já a formulação a qual o PS80 atuou como revestimento observa-se partículas com dimensões maiores, decorrente do fato do tensoativo não atuar na diminuição da agregação proteica, uma vez que sua incorporação ocorreu quando as nanopartículas já estavam formadas.

No processo de atomização por nano *spray dryer* há outras condições e parâmetros que podem influenciar no produto final. Assim, torna-se relevante avaliar quais condições podem influenciar no tamanho da nanopartícula. Dentre outros parâmetros e condições pode-se citar:

concentração da droga e tensoativo, temperaturas de entrada, saída e do atomizador e vazão do fluxo (ELVERSSON & MILLQVIST-FUREBY, 2005; TONON et al., 2008)

O mecanismo básico de funcionamento do nano *spray dryer* baseia-se no controle preciso das micro-gotas. O atomizador possui uma cabeça que inclui um atuador piezoelétrico com uma membrana de aço inoxidável fina. A membrana tem uma série de orifícios, chamado de malha do atomizador (com aberturas entre 4,0; 5,5 ou 7,0  $\mu\text{m}$ ) a qual sofre vibração na frequência ultra-sônica (60 kHz). Estas vibrações da membrana ejetam gotículas de tamanho preciso a alta velocidade. Quanto menor o tamanho da malha, menores são as gotas e partículas ejetadas (manual BUCH, 2014).

Estudos de Lee e colaboradores (2011) ao otimizar um método de preparação de nanopartículas proteicas analisaram o papel de algumas variáveis do processo no produto final como concentração do tensoativo, concentração de albumina, temperatura de entrada (INLET) e fluxo de nitrogênio. Concluíram que tais fatores têm impacto mínimo sob o tamanho da partícula. Todavia, observaram redução das dimensões da partícula quando se variou a abertura da malha do atomizador, obtendo-se resultados mais satisfatórios em diâmetros menores. Isto corrobora com achados de Schmid e colaboradores (2011) os quais constam uma estreita analogia entre o tamanho da partícula sólida formada após a secagem e as dimensões da gota formada pela malha do atomizador.

Baba & Nishida (2013) ao investigar a preparação de nanocristais de diferentes esteroides com um Nano Spray dryer B- 90 fizeram a monitoração do tamanho de partícula através das diferentes aberturas da malha do atomizador. Como resultado, a morfologia dos nanocristais apresentaram-se esféricos e as dimensões e a distribuição de tamanho de cada amostra foi proporcional ao decréscimo do tamanho da abertura da malha.

Já quanto à influência da concentração de sólidos sob o tamanho de partícula pode-se citar estudos de Elversson & Millqvist-Fureby (2005). Os autores comprovam a influência da concentração de sólidos sob o tamanho de partícula. Todavia, tal estudo aponta que o tamanho da partícula aumenta consideravelmente com a concentração de sólidos em soluções diluídas até 5% (m/v), entretanto, há ausência de alteração em soluções mais concentradas.

Além da determinação do diâmetro médio, foi possível determinar o índice de polidispersão das amostras. O índice de polidispersão baseia-se em parâmetros como o tamanho médio da partícula, o índice de refração do solvente, o ângulo de medição e a variância da distribuição, tendo por propriedade determinar a homogeneidade do tamanho das partículas analisadas (GAUMET et al., 2008).

O índice de polidispersão com valores inferiores a 0,25 indica distribuição de tamanho homogênea e valores acima de 0,5 sugere quadros de heterogeneidade das partículas na amostra (PATRAVALE et al., 2003). Índices com baixos valores significam baixa dispersão em torno da média, indicando robustez do método (PEREIRA et al., 2008).

Como pode ser observado somente a formulação F1 apresentou heterogeneidade de tamanho das partículas, estando todas as outras formulações com tamanho compatível com sistema homogêneo.

### 16.3.3 Determinação da carga de superfície: potencial zeta

O PS80 é um tensoativo não iônico com ampla aplicação em sistemas nanoestruturados quando se tem por objetivo um direcionamento cerebral (KREUTER, 2002; TIAN, 2011). Mudanças no potencial zeta de um sistema estável são indicativos de alteração da carga superficial do material. (LEMARCHAND et al., 2004). O potencial zeta de cada amostra analisada está expresso na **Tabela 4**.

**Tabela 4-** Valores do potencial zeta das nanopartículas com diferentes concentrações de PS80.

#### Formulação Potencial Zeta (mV)

|          |        |
|----------|--------|
| F1       | -12,01 |
| F2       | -24,40 |
| F3       | -20,66 |
| F4       | -19,68 |
| F5-20,50 | -20,66 |

A carga de superfície das nanopartículas que receberam a adição do PS80 como revestimento foi significativamente menor que as outras formulações. A carga total da albumina é dependente do pH, levando em consideração seu ponto isoelétrico (4,5- 4,7). Valores abaixo deste ponto apresentam-se com carga positiva e acima, carga negativa. Além disto, apresenta uma distribuição assimétrica de carga em sua estrutura primária, em pH

neutro, a carga total calculada é de -10, -8 e 0 para os domínios I, II e III. Desta maneira, apresenta uma carga negativa elevada no sítio N-terminal e menor no domínio C-terminal conferindo uma assimetria elétrica para esta macromolécula (ABBOT, 2007). Todavia a HSA apresenta um conteúdo elevado de aminoácidos com carga negativa, como ácido aspártico (36), ácido glutâmico (61), lisina (59) e arginina (23), tal achado confere a proteína uma carga negativa total elevada (SANTOS, 2009).

Na presente análise observou-se que após o processo de revestimento com o PS80 houve decréscimo da carga de superfície, variando de -20,50 para -12,01 mV. Considerando preliminarmente os resultados obtidos no presente estudo observou-se que a incorporação do surfactante PS80 como revestimento gera nanopartículas com modificação de superfície pelo método de nano *spray dryer*. Os resultados indicam que a presença do PS80 tem a propriedade de modificar a superfície das nanopartículas. Segundo Wu e colaboradores (2011) o potencial zeta relativamente mais baixo é decorrente da presença dos estabilizadores estéricos, como os tensoativos, o que justifica a queda do potencial. A diminuição é devido à incorporação do PS80 à superfície das partículas. O polissorbato apresenta como propriedades ser não iônico e hidrofílico, assim na superfície de sistemas particulados acaba neutralizando as cargas superficiais (VILA et al., 2002).

A técnica de revestir nanopartículas fazendo o uso de surfactantes hidrofílicos vem demonstrando ser uma estratégia promissora para a veiculação de fármacos à região cerebral. Devem-se considerar as características do tensoativo como a estrutura química, características físico-químicas e parâmetros biológicos (KREUTER, 2012).

Para Wilson e colaboradores (2008) o revestimento de nanopartículas de tacrina com PS80 reduziu ligeiramente o potencial zeta quando comparado com nanopartículas sem revestimento. Os autores atribuíram esta variação devido ao mascaramento de carga de superfície das nanopartículas com o polissorbato adsorvido. Resultados análogos são relatados na literatura, onde se observou diminuição do valor do potencial zeta de partículas poliméricas quando revestidas com o surfactante PS80 (GELPERINA et al., 2010; MA et al., 2011; TIAN et al., 2011).

Há diversos trabalhos análogos os quais relacionam a presença de tensoativos ou polímeros hidrofílicos na superfície das partículas com significativa melhora na biodistribuição da droga. Iium e colaboradores (1987) investigaram o efeito da cobertura de partículas coloidais com os copolímeros não iônicos polioxietileno e polioxipropileno. Como resultados obtiveram um menor tempo de depuração destas partículas no fígado e baço, bem

como um período de permanência prolongada na circulação sanguínea. Segundo os autores, esses tensoativos apresentam um grande grupo hidrofóbico que facilita o ancoramento do surfactante à superfície da partícula, e grupos hidrofílicos, os quais tem a propriedade de minimizar a incorporação das opsoninas e a adesão entre as partículas e os macrófagos pelo chamado efeito de repulsão estérica.

Muller e colaboradores (1997) ao recobrir nanopartículas lipídicas sólidas com o Poloxomer<sup>®</sup> 188, um tensoativo não-iônico, constataram que o surfactante gerou partículas estericamente estabilizadas e com queda da absorção de macrófagos além de um tempo maior de circulação destas partículas.

O PS80 também é empregado como revestimento em nanopartículas poliméricas, quando se tem o objetivo de transpor fármacos para o SNC (WOHLFART et al., 2011). Na literatura há relatos de vários fármacos transportados com êxito para a região cerebral, recobertos com esse tensoativo, incluindo metotrexato, doxorubicina, docetaxel, tacrina e neuropeptídeos (GAO & JIANG, 2006; GELPERINA et al., 2010; RUAN et al., 2011).

Kreuter e colaboradores (1995) constataram que nanopartículas do analgésico dalargina quando revestidas com o PS80 são de forma eficaz absorvidas na região cerebral. Estudo análogo realizado por Schroeder e colaboradores (1998) apresentou resultados satisfatórios quanto à entrega do fármaco no SNC. Gulyaev e colaboradores (1999) ao revestir com PS80 nanopartículas poliméricas contendo a droga doxorubicina, utilizada para o tratamento de câncer, obtiveram êxito em seus resultados. Estudos realizados por Wilson e colaboradores (2008) observaram que no cérebro de ratos tratados com tacrina, fármaco para tratamento da doença de Alzheimer pela via intravenosa, apresentou aumento significativo da concentração do fármaco quando utilizado na forma de nanopartículas revestidas com PS80, em comparação com nanopartículas não revestidas e o fármaco livre.

Várias são as explicações oferecidas a respeito da influência da cobertura de partículas coloidais com surfactante sobre o transporte da droga para o cérebro. Há vários mecanismos que podem mediar à veiculação destes sistemas nanoestruturados (KREUTER, 2001; KREUTER, 2002; MA et al., 2011; TIAN et al., 2011).

Há trabalhos na literatura que demonstram a ocorrência do processo de endocitose de nanopartículas pelas células endoteliais da BHE, seguido de difusão para o cérebro (BORCHARD et al., 1994; RAMGE et al., 2000; SUN et al., 2004). O processo de endocitose via receptores de nanopartículas revestidas com o PS80 é mediado pela adsorção de proteínas na superfície e interações com os receptores específicos na superfície das células luminais,

resultando em inclusão das partículas ao interior das células da BHE (SIMIONESCU, GAFENCU & ANTOHE, 2002; KREUTER, 2005).

Elementos como peptídeos (albumina, transferrina, insulina), fatores de crescimento e a LDL são transportados para o endotélio cerebral através da endocitose via receptores (VOINEIA et al., 2002). Possivelmente o PS80 na superfície das nanopartículas ancora as Apolipoproteínas B (Apo B) e E (Apo E), que desempenham um importante papel no transporte da LDL no cérebro (BLASI et al., 2007; BALES, 2010).

A presença de lipídeos no cérebro apresenta relevância por atuar nos processos de crescimento e reparo das células neuronais, transmissão de sinal elétrico e na formação das sinapses nervosas (DIETSCHY & TURLEY, 2004; VANCE, HAYASHI & KARTEN, 2005).

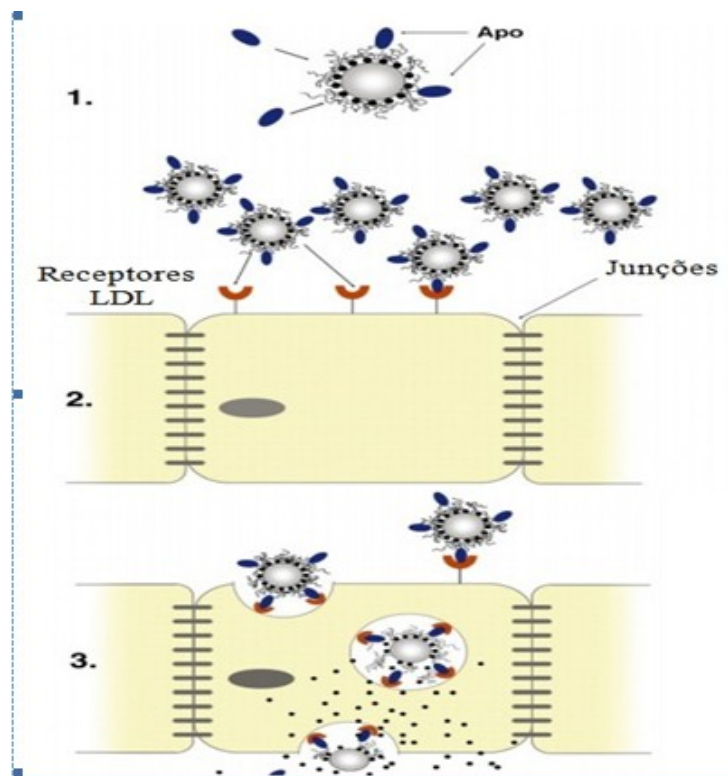
Uma apolipoproteína é uma proteína que liga lipídeos, formando uma lipoproteína, tendo por função a regulação do metabolismo de lipídeos. A entrega de lipídeos através das lipoproteínas e seu processo são regulados por receptores localizados na superfície, tais como o receptor LDL (LDRL) e LRP (GONG et al., 2002). A Apo E é uma apolipoproteína presente no plasma e abundantemente nos fluidos da região cerebral sendo majoritariamente expressa pelos astrócitos e células da glia e em menor proporção em neurônios (VANCE & HAYASHI, 2010). Além disto, desempenha papel fundamental no processo de reparação de nervos no SNC pós-lesão. Após a ligação da ApoE à superfície, as nanopartículas mimetizam as partículas de LDL interagindo com os receptores de LDL localizados na BHE, como por exemplo, o receptor LDLR, LRP-1, receptor de VLDL, Apo ER-2 e megalin/ GP 330 com posterior internalização das nanopartículas (DEHOUCK et al., 1997; BÉDUNEAU, SAULNIER & BENOT, 2007). Todavia, ao que parece as apolipoproteínas não são carregadas para o endotélio cerebral, mas sim atuam como facilitadores da interação com as células da região cerebral (KREUTER, 2002).

Infere-se um reconhecimento e interação da nanopartícula recoberta com o PS80 e, receptores de lipoproteínas de células dos capilares endoteliais da região cerebral, ocorrendo facilitação da captação do fármaco para o cérebro (**Figura 10**) (KREUTER, 2005; MICHAELIS et al., 2006; KREUTER et al., 2007).

Com a incorporação do PS80 à superfície das partículas coloidais há alteração nas propriedades físico-químicas e, além de estarem em escala nanométrica escapam da depuração do sistema fagocitário. Permanecendo por um tempo relativamente prolongado na circulação, alterando de forma significativa à farmacocinética e distribuição destas partículas

nanoestruturadas. Desta maneira, as condições de entrega terapêutica para órgãos específicos, como o SNC, são melhoradas (NOBS et al., 2004; PRINZEN et al., 2007).

**Figura 10-** Representação esquemática do mecanismo de endocitose de nanopartículas revestidas com PS80. 1: adsorção da Apo à superfície da nanopartícula. 2: ligação da nanopartícula aos receptores de LDL. 3: Liberação da droga das nanopartículas através através de endocitose para as células endoteliais da BHE.



(Adaptado: Blasi et al., 2007)

Há diversas possibilidades as quais justificariam qual o mecanismo de transporte até as células cerebrais: i) as nanopartículas podem ser responsáveis por causar a abertura das junções íntimas entre as células endoteliais. Isto permite maior permeação da droga através das junções na forma livre ou em conjunto com as nanopartículas em forma ligada; ii) as células endoteliais poderiam sofrer uma solubilização dos lipídeos de membrana, ocasionando uma fluidificação da membrana com aumento da permeabilidade através da BHE; iii) as nanopartículas poderiam sofrer endocitose pelas células endoteliais e consequente liberação do fármaco dentro das células com entrega para o cérebro; iiiii) o PS80, utilizado como agente

de revestimento pode causar a inibição do efluxo da P-glicoproteína (Pgp) (KREUTER, 2001; KREUTER, 2002).

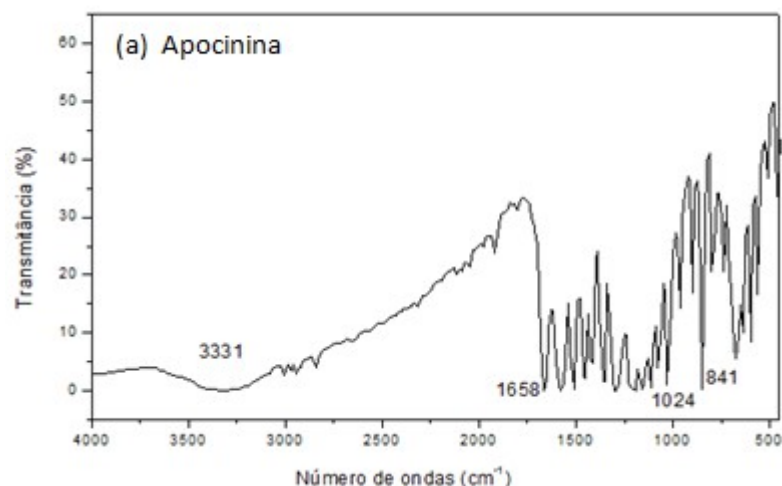
I

#### 16.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho

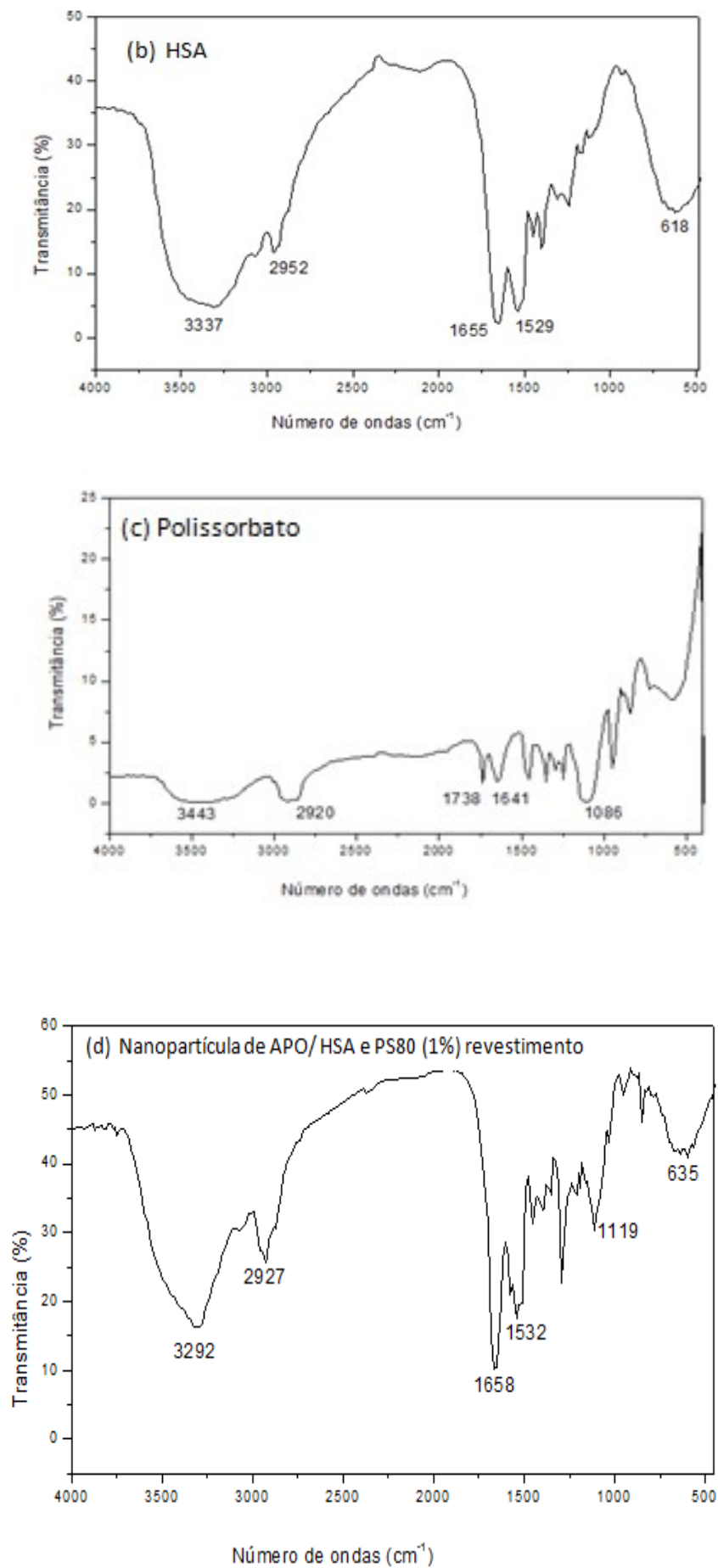
Com base nos ensaios anteriores observa-se que todas as formulações mostraram tamanho adequado para um sistema nanométrico, índice de polidispersão adequados, mas com variações na carga de superfície. As nanopartículas revestidas com o PS80 apresentaram alterações da carga de superfície indicando que tal sistema seria mais adequado para a direção do fármaco à região cerebral. Diante disto, para os outros ensaios de caracterização a formulação utilizada foi a que consistia do tensoativo como revestimento (F5).

A varredura na região do infravermelho foi realizada com a apocinina pura, da HSA, do PS80 e das nanopartículas revestidas com o tensoativo. Na **Figura 11** estão apresentados os espectros das nanopartículas e dos padrões obtidos no infravermelho.

**Figura 11-** Espectro das amostras no infravermelho: (a) Apocinina, (b) HSA, (c) Polissorbato, (d) Nanopartículas de APO/HSA/ PS80 (1%) revestimento.







O espectro de absorção na região do infravermelho da apocinina (**Figura 11 (a)**) apresentou bandas de absorção em  $1658\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial de C=O de cetona conjugada, em frequência mais baixa do que a observada para cetonas alifática,  $1714\text{ cm}^{-1}$ , devido à conjugação com o grupo fenila),  $1024\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial simétrica de ligação C-O referente ao éter) e em  $3331\text{ cm}^{-1}$  deformação axial de OH em ligação de hidrogênio referente ao grupo fenólico.

No espectro (**Figura 11 (b)**) é possível observar bandas de absorção da HSA sendo esta uma proteína formada através de ligações covalentes de diferentes aminoácidos, sugere-se em  $3337\text{ cm}^{-1}$  uma banda referente a deformação axial de N-H, de amida primária em ligação de hidrogênio. Bandas de superposição, em  $1655\text{ cm}^{-1}$  deformação axial de C=O referente a banda de amida I e em  $1529\text{ cm}^{-1}$  deformação angular de N-H de banda de amida II. Em  $618\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação angular fora simétrica fora do plano.

No espectro do PS80 (**Figura 11 (c)**), foi possível observar uma banda em  $3443\text{ cm}^{-1}$ , característico de deformação axial de O-H em ligação de hidrogênio intermolecular, em  $2920\text{ cm}^{-1}$  vibrações de deformação axial de C-H de hidrocarbonetos, em  $1738\text{ cm}^{-1}$  banda de deformação axial de C=O característico de ésteres alifáticos e próximo a esta em  $1641\text{ cm}^{-1}$  uma banda de deformação axial de C=C. Em  $1085\text{ cm}^{-1}$  observou-se uma banda de deformação axial assimétrica característica de éteres alifáticos.

As análises dos espectros das nanopartículas contendo polissorbato 1% como revestimento (**Figura 11 (d)**) pode-se observar uma banda de absorção em  $3292\text{ cm}^{-1}$ . Atribui-se este fato a deformação axial de OH referente ao grupo fenólico da apocinina, a deformação axial de N-H, de amida primária em ligação de hidrogênio da albumina e deformação axial de O-H em ligação de hidrogênio intermolecular do polissorbato. Já bandas em  $2927\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a vibrações de deformação axial de C-H de hidrocarbonetos referente ao PS80. Em  $1658\text{ cm}^{-1}$  o pico é referente à deformação axial de C=O devido à banda de amida I da albumina e de deformação axial de C=O de cetona conjugada, em frequência mais baixa do que a observada para cetonas alifática,  $1714\text{ cm}^{-1}$ , devido à conjugação com o grupo fenila da apocinina e banda de deformação axial de C=C do Polissorbato.

Bandas em  $1532\text{ cm}^{-1}$  são referentes à deformação angular de N-H de banda de amida II da albumina. Em  $1119\text{ cm}^{-1}$  condizem com bandas de deformação axial assimétrica característica de éteres alifáticos característico do PS80 e deformação axial simétrica de ligação C-O referente ao éter da apocinina.

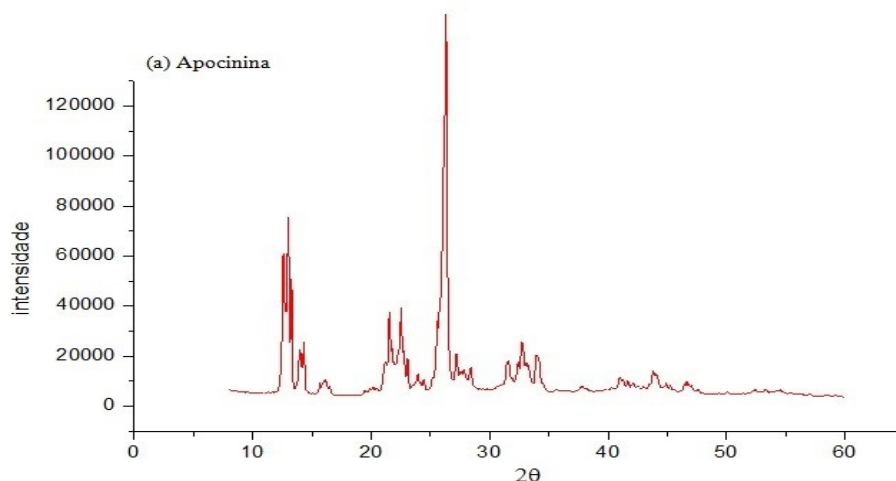
O espectrograma da nanopartícula de apocinina recoberta com o tensoativo apresentou comprimentos de onda um pouco acima do observado para os compostos quando puros devido a possíveis interações intermoleculares. Todavia, não houve mudanças bruscas tanto da estrutura química de qualquer um dos componentes durante o processo de produção.

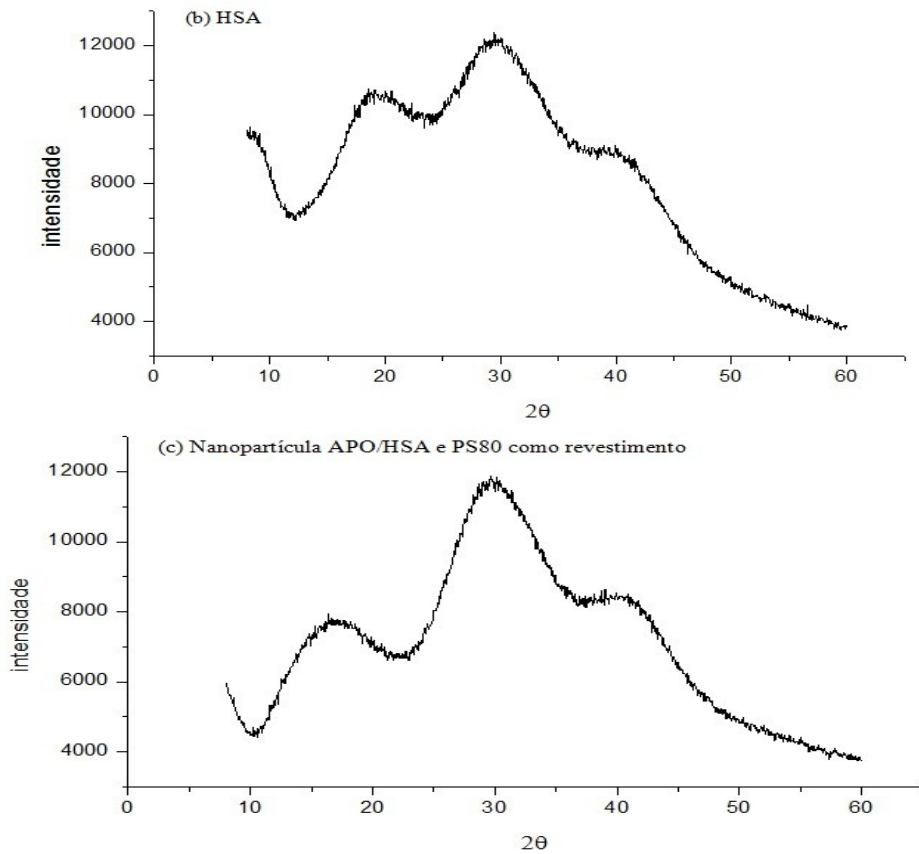
### 16.3.5 Ensaio de difração de raio-x (DRX)

Substâncias no estado sólido podem apresentar por característica amorfa ou cristalina. Geralmente, sólidos amorfos demonstram maior solubilidade do que formas cristalinas, tal fato decorre da energia livre envolvida no processo de dissolução. Sólidos com propriedade amorfa possuem moléculas dispersas aleatoriamente e assim, necessitam de pouca energia para separá-los, refletindo em uma dissolução mais rápida quando comparada com a forma cristalina (RIEKES et al., 2011).

Os padrões de DRX da apocinina, HSA e da nanopartícula com PS80 como revestimento estão apresentados na **Figura 12**.

**Figura 12-** Espectros de raio-x: (a) Apocinina, (b) HSA, (c) Nanopartículas de APO/HSA/PS80 revestimento.





**I** O difratograma da apocinina livre (**Figura 12, (a)**) exibiu intensos e numerosos picos distintos, indicando um grau de cristalinidade do fármaco. Já a HSA (**Figura 12 (b)**) apresenta halos alargados indicando que a proteína apresenta característica amorfa. A **Figura 12 (c)** refere-se às nanopartículas que receberam a adição do PS80 como revestimento observa-se ausência de picos de difração e presença de halos. Ao avaliar o difratograma das nanopartículas é possível observar que o processo de nanoencapsulação promoveu uma diminuição notável dos picos de difração característicos da apocinina levando a amorfização do fármaco.

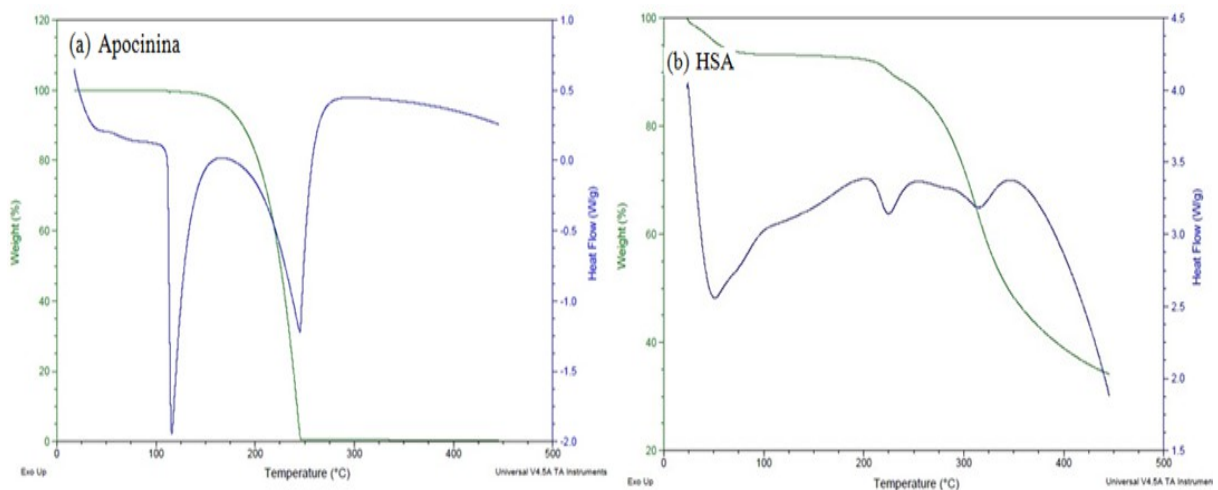
### 16.3.6 Análise térmica (DSC)

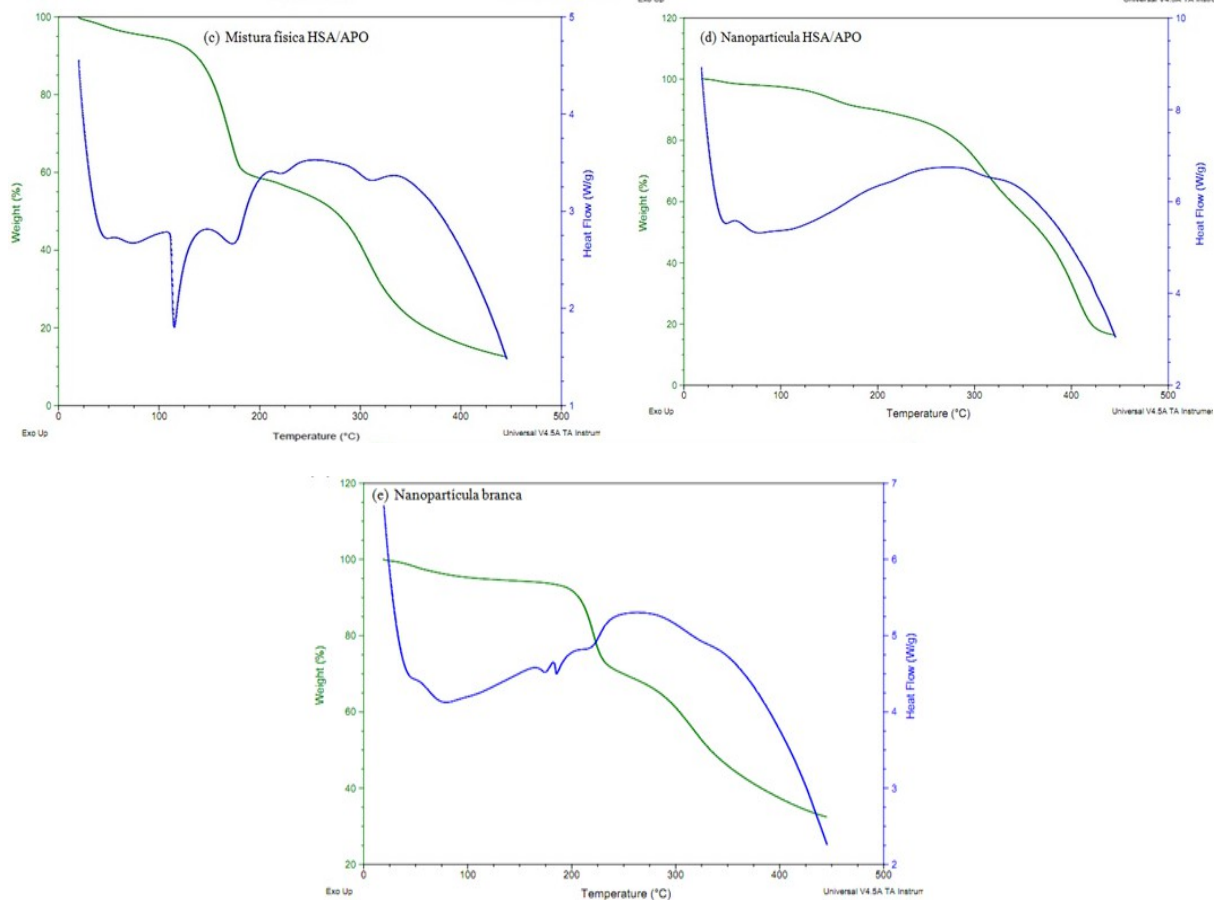
1

Através da calorimetria exploratória diferencial (DSC) realizou-se a verificação do estado físico da apocinina nanoestruturada. O método tem por função auxiliar a compreender a forma de associação do fármaco às nanopartículas, da mesma maneira a ocorrência de qualquer incompatibilidade ou interação química fármaco/polímero. Mudanças nos perfis termoanalíticos dos compostos, tais como deslocamentos, redução ou desaparecimento de picos na curva de DSC quando comparados aos perfis das espécies individualmente, pode ser indicativo de certa incompatibilidade fármaco/polímero ou polímero/polímero ou que houve interação química entre eles decorrente do aquecimento (BOGDANOVA et al., 1996).

Realizou-se a comparação dos perfis termoanalíticos da apocinina e albumina pura, das nanopartículas revestidas com PS80, nanopartículas de albumina vazias, bem como da mistura física (fármaco/polímero) nas mesmas proporções da obtenção das nanopartículas com resultados expressos na **Figura 13**.

**Figura 13-** Curvas de DSC: fluxo de calor X temperatura: a) Apocinina, b) HSA, c) Mistura física HSA/ APO, d) Nanopartícula HSA/APO/PS80 revestimento e e) Nanopartícula vazia.





A curva de DSC da apocinina pura mostra um pico endotérmico entre 100 e 110°C, faixa que corresponde ao ponto de fusão da droga (115°C). A HSA apresentou pico endotérmico característico da proteína em 230°C, com ausência de picos de decomposição, estando de acordo com o observado na literatura (LUPPI et al., 2011). Na curva de DSC da mistura física entre albumina e a droga observou-se pico endotérmico em 115°C relativo à fusão da apocinina e ausência de picos endotérmicos referentes à HSA.

A curva de DSC da nanopartícula de apocinina mostrou ausência de endoterma relativa à fusão cristalina do fármaco. Isto não é indicativo da ocorrência de incompatibilidade entre os materiais, o qual poderia ocasionar uma desestruturação da apocinina. Contudo se torna um indicativo de que posteriormente ao processo de encapsulação o fármaco apresentase em estado amorfo na matriz polimérica (MU & FENG, 2002).

Também se observou a ausência de endoterma relativa à HSA. Isto pode ser decorrente da perda da sua estrutura nativa, durante o processo de aquecimento. Altas temperaturas em que a amostra foi submetida causa destruição de pontes de hidrogênio da estrutura protéica resultando em sua desnaturação e ou, indicio de que a presença do PS80 como revestimento pode ter mascarado os picos característicos da proteína.

Já a nanopartícula branca, com ausência da droga, observou-se ausência do pico característico de fusão da HSA. Tal fato pode ser decorrente do processo de desnaturação da proteína a temperaturas elevadas.

#### **16.4 Estudo do potencial antioxidante**

Para averiguar se durante o processo de nanoencapsulação o perfil antioxidante da apocinina é mantido avaliou-se através do ensaio de inibição do HOCl e descoloração do radical catiônico ABTS<sup>•+</sup>.

Um antioxidante é toda substância que em baixas concentrações tem a propriedade de prevenir ou retardar a oxidação de um substrato (HALLIWEL, 1994). Quando seu mecanismo de ação ocorrer através de sua reação com o radical livre, o radical formado deve ter por característica a incapacidade de reação e ser estável (WANG et al., 2003).

Há uma gama de antioxidantes naturais os quais apresentam a capacidade de reagir com as ERO causando assim o retardo ou a prevenção da oxidação de lipídeos, bem como outras biomoléculas. Desta forma dificultam o início e a propagação de reações de oxidação em cadeia além de prevenir e ou, reparar os danos já causados às células pelo oxidante. (BORGUINI, 2006; LIMA, 2008).

Para Huang e colaboradores (2005) há dois grupos de métodos utilizados para determinar a capacidade antioxidante, diferindo quanto a princípios e condições experimentais. Há técnicas que se baseiam na reação de transferência de elétrons acompanhado de alterações na coloração a partir da redução oxidante e técnicas as quais há reações de transferência de átomos de hidrogênio, assim antioxidante e substrato competem pelos radicais livres.

##### **16.4.1 Ensaio de descoloração do ABTS<sup>•+</sup>**

O experimento teve como fundamento avaliar a capacidade sequestradora das nanopartículas contendo apocinina sobre o radical ABTS<sup>•+</sup>. Os resultados referentes à

porcentagem de inibição da apocinina livre e em nanopartícula nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas estão expressos na **Tabela 5** (os dados foram analisados por ANOVA seguido de pós teste Tukey, com  $\alpha$  de 0,05).

**Tabela 5-** Porcentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> sobre a apocinina livre e nanopartículas de apocinina.

|                 | Porcentagem de inibição (%)    |                             | Concentração (µg/mL)          |                             |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
|                 | Apocinina livre                | Nanopartículas de apocinina | Apocinina livre               | Nanopartículas de apocinina |
| <b>0 hora</b>   | 1,252,86 ± 0,02 <sup>a</sup>   | 16,05 ± 0,01 <sup>b</sup>   | 2,5021,78 ± 0,13 <sup>a</sup> | 17,48 ± 0,15 <sup>b</sup>   |
| <b>24 horas</b> | 1,2536,43 ± 0,00 <sup>a5</sup> | 5,71 ± 0,01 <sup>b2</sup>   | 5048,27 ± 0,00 <sup>a10</sup> | 23 ± 0,00 <sup>b5</sup>     |
| <b>48 horas</b> | 1,2536,26 ± 0,00 <sup>a1</sup> | 2,5 ± 0,03 <sup>b2</sup>    | 5045,83 ± 0,18 <sup>a2</sup>  | 2,51 ± 0,00 <sup>b5</sup>   |
| <b>72 horas</b> | 1,2519,08 ± 0,04 <sup>a7</sup> | 3,33 ± 0,01 <sup>b2</sup>   | 5027,66 ± 0,04 <sup>a12</sup> | 4,41 ± 0,01 <sup>b5</sup>   |

18,55 ± 0,05<sup>b10</sup> 0,0079,94 ± 0,02<sup>a</sup> 43,79 ± 0,05<sup>b a,b</sup>. médias da triplicata ± desvio padrão analisadas por linha, letras iguais indicam igualdade estatística e diferentes desigualdades estatísticas.

Dentre os diversos métodos químicos utilizados para avaliação da atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres, a avaliação da capacidade sequestrante do radical ABTS<sup>•+</sup> é uma metodologia rápida que oferece resultados reprodutíveis. Além disto, permite a análise de compostos de origem lipofílica e hidrofílica (AWIKA et al., 2003).

Observa-se que a apocinina tanto livre como nanoparticulada demonstrou um perfil de inibição concentração-dependente. Em todos os tempos do experimento a apocinina livre apresentou maior capacidade sequestrante em todas as concentrações quando comparada com a apocinina nanoencapsulada. No tempo de 48 horas a apocinina livre mostrou o maior perfil de inibição (99,84 µg/mL), já a apocinina nanoparticulada demonstrou a maior capacidade sequestrante no tempo 0 (73,60 µg/mL) .

Diante dos resultados, observa-se que na faixa de concentração estudada a apocinina livre e em nanopartículas apresentaram variações na capacidade antioxidante, já o potencial antioxidante da nanopartículas vazias (dados não apresentados) foi considerado insignificante.



Torna-se relevante considerar que o processo de *spray dryer* influência não somente características tecnológicas, físicas e químicas sobre o produto final, mas também pode interferir em sua atividade biológica (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010). Couto e colaboradores (2012) ao avaliar parâmetros do processo de *spray dryer* para a obtenção de extratos secos de alecrim constatam que a seleção de condições corretas de atomização são necessárias para garantir a qualidade físico-química e funcional do produto.

Georgetti e colaboradores (2008) ao avaliar os efeitos da técnica de *spray dryer* sobre as propriedades biológicas de extrato de soja através do ensaio antioxidante DPPH obtiveram como resultado uma baixa redução da atividade antioxidante quando comparada com o controle. Estudos de Langrish & Premarajah (2013) ao avaliar a atividade antioxidante de extratos de *Hibiscus sabdariffa L.* através do ensaio da Capacidade Antioxidante de Redução do Oxigênio (ORAC) observaram que o potencial de inibição manteve-se sem alterações significativas. Fu e colaboradores (2011) ao investigar a produção de micropartículas de catequina por *spray dryer* observaram que a atividade antioxidante destas partículas foram mantidas.

#### 6.4.2 Potencial de inibição do HOCl

O ácido hipocloroso (HOCl) é uma espécie reativa não radicalar gerado por leucócitos polimorfonucleares (LPMN) com função protetora no organismo por atuar na destruição de micro-organismos. Porém concomitantemente é agente de agressão aos tecidos, devido à ausência de mecanismos que possam realizar sua detoxicação. É um oxidante excessivamente forte além de atacar biomoléculas de importância biológica como proteínas, aminoácidos, fenóis, aminas e tióis. (VASCONCELOS et al., 2007).

Para Masuda e colaboradores (2001) a ação bactericida de LPMN está relacionada com a geração do HOCl o qual tem ação benéfica como microbicida, todavia por se tratar de uma espécie reativa não radicalar pode contribuir para o desenvolvimento de estágios deletérios e nocivos ao organismo.

Avaliou-se a ação antioxidante das nanopartículas de apocinina sobre o HOCl, este ácido tem a propriedade de oxidar o TMB levando a formação de um cromóforo com absorção máxima em 652 nm.. Na **Tabela 6** está expressa a porcentagem de inibição do fármaco livre e das nanopartículas de apocinina.

**Tabela 6-** Potencial de inibição da apocinina livre e em nanopartículas na inibição do HOCl.

| % Inibição                | Concentração (µg/mL)      | Apocinina livre              | Nanopartícula de apocinina |
|---------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 64,42 ± 0,04 <sup>a</sup> | 26,35 ± 0,07 <sup>b</sup> | [0,30]                       | 61,58 ± 0,03 <sup>a</sup>  |
| 31,09 ± 0,03 <sup>b</sup> | [0,60]                    | 65,54 ± 0,02 <sup>a</sup>    | 22,04 ± 0,04 <sup>b</sup>  |
| [1,25]                    | 71,23 ± 0,05 <sup>a</sup> | 50,64 ± 0,05 <sup>ba,b</sup> |                            |

médias da triplicata ± desvio padrão analisadas por linha, letras iguais indicam igualdade estatística e diferentes desigualdades estatísticas.

Com base nos resultados pode-se observar que o percentual de inibição da apocinina livre foi maior quando comparado com o fármaco nanoencapsulado. A nanopartícula vazia (dados não apresentados) mostrou-se sem grandes variações de inibição, tal fato já era esperado uma vez que esse sistema nanoparticulado é inerte de substâncias que possam apresentar supressão da oxidação. O ensaio de inibição do HOCl das nanopartículas obtidas pelo processo de nanoencapsulação por *spray dryer* resultou em diferenças mais significativas do poder antioxidante das nanopartículas de apocinina quando comparado com o ensaio do radical ABTS<sup>•+</sup>.

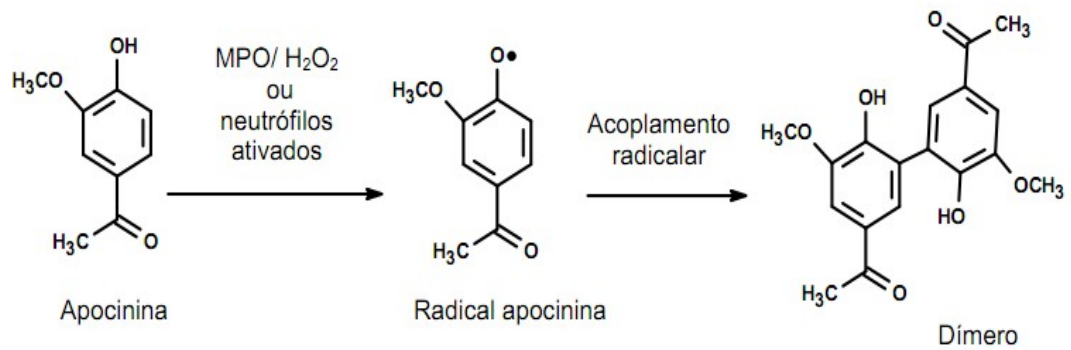
A apocinina é estruturalmente composta por um anel aromático com um grupamento aceptor de ânions exercendo influência sobre a ação antioxidante. A reação entre o fármaco e íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) é assim favorável resultando na estabilidade do produto final. O fármaco possui baixo poder inibitório quando comparado com outros antioxidantes de origem natural como a quercetina, resveratrol e a curcumina. Todavia, possui um diferencial, a eficaz capacidade de inibir o complexo NOX (KANEGAE et al., 2007).

Há diversos trabalhos que investigam tal capacidade em modelos experimentais que fazem uso de células fagocitárias e não fagocitárias (LAFEBER et al., 1999).

Como ocorre este mecanismo de inibição não está totalmente elucidado, todavia sabe-se que o metoxi-catecol está envolvido no impedimento de agregação dos componentes da enzima (BARBIERI et al., 2004). Estudos de Ximenes e colaboradores (2007) ao investigar a oxidação da apocinina catalisada pela MPO obtiveram como produto radicais de apocinina. Estes radicais após acoplamento radicalar formaram dímeros de apocinina, os quais segundo os autores são os detentores da capacidade de oxidar grupos tíóis conforme representado na **Figura 14**.

Com base nesses resultados, foi proposto que este poderia ser o modo de interação da apocinina com resíduos tíóis da subunidade citosólica da NOX, resultando em inativação da montagem desse complexo enzimático.

**Figura 14-** Representação esquemática da formação da diapocinina após processo de oxidação.



(Ximenes et al., 2007).

Trabalho semelhante foi realizado por Kanegae e colaboradores (2009) ao investigar a capacidade da apocinina após oxidação em reagir com compostos tiólicos, representado pela glutathione, como resultado observou-se que o metoxi-catecol tem capacidade de oxidar grupamentos sulfidrilas da glutathione. Desta maneira, concluem que o poder da apocinina em inibir a agregação da NOX deve estar relacionado à oxidação de grupos tióis presentes na fração citosólica do complexo enzimático, tal propriedade torna-se dependente de um meio que propicie a oxidação da molécula de apocinina.

## 7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos para a produção de nanopartículas de albumina humana incorporadas com polissorbató contendo apocinina pelo método de *spray dryer* para direcionamento cerebral pode-se concluir:

- Nanopartículas poliméricas de albumina humana contendo apocinina com ou sem modificação superficial por polissorbató 80 em diferentes concentrações foram obtidas com êxito através do método *spray dryer*;
- A caracterização físico-química demonstrou que este método apresentou eficiência de encapsulação do fármaco com valores entre 28,23 e 64,39 %, com obtenção de partículas de tamanho reduzido em uma faixa de 136,33 a 237,03 nm, com baixo índice de polidispersão e alterações de carga de superfície. As nanopartículas que receberam a incorporação do polissorbató como revestimento apresentaram alterações mais significativas, sendo esta formulação escolhida como a adequada para os ensaios de infravermelho, raio-x e DSC. O ensaio de varredura na região do infravermelho indicou ausência de interações intermoleculares entre os compostos da nanopartícula, o raio-x e DSC mostram que a apocinina estava presente na nanopartícula e houve alteração de seu estado cristalino para amorfo;
- O potencial de inibição frente ao radical ABTS<sup>•+</sup> e ao HOCl do fármaco livre e nanoencapsulado apresentou variações na capacidade antioxidante.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, M. P. **Modificações oxidativas em proteínas em presença de complexos de Cobre (II)**. 2007. (Tese de doutorado). Programa de pós-graduação de química, Universidade de São Paulo. São Paulo.

ABDERRAHIM, F.; ARRIBAS, S. M.; GONZALEZ, C. M.; CONDEZO-HOYOS, L. Rapid high-throughput assay to assess scavenging capacity index using DPPH. **Food chemistry**.v. 141, p. 788-794, 2013.

ABRAMOV, A. Y.; CANEVARI, L.; DUCHEN, M. R. Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidase stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. **Journal of Neuroscience**. v.24, p.565-575, 2004.

ANVISA: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: [www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br).

AJMARA, A.; SCHERLIE, R. Stabilisation of protein via mixtures of amino acids during spray drying. **International journal of pharmaceutics**. v. 463, p. 98-107, 2014.

ALLEMANN, E.; LEROUX, J. C.; GURNY, R.; DOELKER, E. In vitro extended-properties of drug-loaded poly (DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. **Pharmacological Research**. v.10, p.1732-1737, 1993.

ALEXIS, F.; WHA-RHEE, J.; RICHIE, J. P.; RADOVIC-MORENO, A. F.; LANGER, R.; FAROKHAZAD, O. C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. **Urologic oncology: seminars and original investigations**. v. 26, p. 74-85, 2008.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHAZAD, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**. v.5, n.5, p.505-515, 2008.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation research**.v.350, p. 103-108, 1996.

ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.64, p.72–82, 2012.

ANHORN, M. G.; MAHLER, H. C.; LANGER, K. Freeze drying of serum human albumin (HSA) nanoparticles with different excipients. **International journal of pharmaceutics**. v.363, p. 162-169, 2008.

ANSARI, M. A.; SCHEFF, S. Oxidative stress in the progression of the Alzheimer disease in the frontal cortex. **Journal neuropathological experiments**. v.69, p.155-167, 2010.

ANKOLA, D. D.; VISWANAD, B.; BHARDAWAJ, V.; RAMARAO, P.; RAVI KUMAR, M. N. V. Development of potent oral nanoparticulate formulation of coenzyme Q10 for treatment of hypertension: Can the simple nutritional supplements be used as first line therapeutic agents for prophylaxis/therapy?. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.67, p.361–369, 2007.

ARMENTANO, I.; DOTTORI, M.; FORTUNATI, E.; MATTIOLI, S.; KENNY, J. M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. **Polymer Degradation and Stability**. v.95, p.2126-2146, 2010.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in food science & technology**. v. 11, p. 419-421, 2000.

ARSHADY, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: Polyactides and related polyesters. **Journal of Controlled Release**. v.17, p.1-22, 1991.

AWASTHI, H.; TOTA, S.; HANIF, K.; NATH, C.; SHUKLA, R. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. **Life Science**. v.86, p.87-94, 2010.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; ZEVALLOS, L. C. Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum products. **Journal of agricultural and food chemistry**.v.51, p. 6657-6662, 2003.

BABA, K.; NISHIDA, K. Steroid nanocrystals prepared using the Nano Spray Dryer B-90. **Pharmaceutics**.v.5, p. 107- 114, 2013.

BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSSEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.39,p.342-344, 2002.

BALES, K. R. Brain lipid metabolism, apolipoprotein E and the pathophysiology of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**. v.59, p.295-302, 2010.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. v.78,p.431 – 441, 2005.

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, S. S.; CAVALCA, V.; ELIGINI, S.; BRAMBILLA, M.; CAIANI, A.; TREMOLI, E.; COLLI, S. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 37, n.2, p.156 – 165, 2004.

BARRATT,G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Research focus**. v.3, p.163-169, 2000.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**.v.29, p.113-123, 2006.

BAO, J.; POTTS, B. D. Quantitative determination of olanzapine in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**. v.752, p. 61–67, 2001.

BAZIELE, D.; PRUD'HOMME, C.; BASSOULLET, M. T.; MARLAND, M.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M. Steath PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. **Pharmaceutics science**.v. 84, p. 493-498, 1995.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiology Reviews**. v.87, p.245-313, 2007.

BEDUNEAU, A.; SAULNIER, P.; BENOIT, J. P. Active tergenting of brain tumors using nanocarriers. **Biomaterials**. v.28, p.4947-4967, 2007.

BEN-SHAUL, V.; LOMNITSKI, L.; NYSCA, A.; ZUROVSKY, Y.; BERGAMAN, M.; GROSS-MAN, S. The effect of natural antiozidants, NAO and apocynin on oxidative stress in the rat heart following PLS challenge. **Toxicology Letters**. v.123,p.1-10, 2001.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURAEKOVA, Z.; FERENEIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**. v. 65, n.18, p.1865-1874, 1999.

BERNABEU, E.; ELGUERRA, G.; LEGASPI, M. J.; GONZALEZB, L.; HOCHTD, C., TAIRAB, C.; CHIAPPETTAA, D. A. Paclitaxel-loaded PLC-TPGS nanoparticles: In vitro and in vivo performance compared with Abraxane®. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.113, p.43-50, 2013.

BEYERLEIN, K. R.; SOLLA-GULLON, J.; HERRERO, E.; GARNIER, E.; PAILLOUX, F., LEONI, M. Characterization of (111) surface tailored Pt nanoparticles by electrochemistry and X-ray powder diffraction. **Materials science and engineering**.v. 528, p. 83-90, 2010.

BIANCHI, M.; ANTUNES, L .M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição**.v.12, p. 123-130, 1999.

BIEWENGA, G.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A.The pharmacology of the antioxidant lipoic acid.**General Pharmacology**. v.29, p.315-331, 1997.

BHARDWAJ, V.; ANKOLA, D. D.; GUPTA, S. C.; SCHEIDER, M.; LEHR, C. M.; RAVI KUMAR, M. N. V. PLGA nanoparticles stabilized with cationic surfactant:safety studies and application in oral delivery of paclitaxel to treat chemical-induced breast cancer in rat. **Pharmaceutical Research**. v.26, n.11, p.2495-2503, 2009.

BLASI, P.; GIOVAGNOLI, S.; SCHOUBBEN, A.; RICCI, M.; ROSSI, C. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.59, p. 454-477, 2007.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity:uncovering the molecular mechanisms. **Neuroscience**. v.8, p.57-69, 2007.

BLOKHINA O.; VIROLAINEN, E.; FAGERTEDT, K. V. Antioxidants, oxidage damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annal of Botany**. v.91, p.179-194, 2003.

BOGDANOVA, S., SIDZHAKOVA, D., KARAIIVANOVA, V., GEORGIEVA, S. Aspects of the interactions between indomethacin and nicotinamide in solid dispersions. **International journal of pharmaceutics**.v.163, p. 1-10, 1996.

BOLLAND, B. J. R. F.; KANCZLER, J. M.; GINTY, P. J.; HOWDLE, S. M.; SHAKESHEFF, K. M.; DUNLOP, D. G.; OREFFO, R. O. C. The application of human bone

marrow stromal cells and poly (DL-lactic acid) as a biological bone graft extender in impaction bone grafting. **Biomaterials**. v.29, p.3221–3227, 2008.

BORCHARD, G.; AUDUS, K. L.; SHI, F.; KREUTER, J. Uptake of surfactant-coated poly(methyl methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**. v.110, p.29-35, 1994.

BORGUINI, R. G. Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. 2006. (Tese de doutorado). Programa de pós-graduação em saúde pública. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública.

BORREGUEIRO, A. M.; VALVERDE, J. L.; RODRIGUEZ, J. F.; BARBER, A. H., CUBILLO, J. J.; CARMONA, M. Synthesis and characterization of microparticles containing Rubitherm® RT27. **Chemical engineering journal**. v. 166, p. 384-390, 2011.

BOSTMAN, O.; HIRVENSALO, E.; ROKKANEN. Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v.72, p.592-596, 1990.

BUTTERFIELD, D. A.; PERLUIGI, M.; SULTANA, R. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: New insights from redox proteomics. **European Journal of Pharmacology**. v.545, p.39-50, 2006.

BUTERA, D.; TESORIERE, L.; Di GAUDIO, F.; BONGIORNO, A.; ALLEGRA, M.; PINTAUDI, A. M.; KOHEN, R.; LIVREA, M. A. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. **Journal of agricultural and food chemistry**.v. 50, p. 6895-6901, 2002.

BRAVO, L. Polyphenols chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Review nutraceuticals**.v. 11, p. 317-333, 1998.

BROICHSITTER, M. B.; SCHMEHL, T.; GESSLER, T.; SEEGER, W.; KISSEL, T. Development of a biodegradable nanoparticle platform for sildenafil: Formulation optimization by factorial design analysis combined with application of charge-modified branched polyesters. **Journal of controlled release**.v. 157, p. 469-477, 2012.

BROADHEAD, J., ROUAN, S. K., HAU, I., RHODES, C. T. The effect of process and formulation variables on the properties of spray-dried beta-galactosidase. **The journal of pharmacy and pharmacology**.v.46, p. 458-467, 1994.

BRZOSKA, M.; LANGER, K.; COESTER, C.; LOITSCH, S.; WAGNER, T. O.; MALLINCKRODT, C. Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells-in vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. **Biochemical and biophysical research communications**.v. 318, p. 562-570, 2004.



CADENAS, E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. **Molecular aspect of medicine**.v.25, p. 17-26, 2004.

CAL, K., SOLLHUB, KRYSZTOF. Spray drying technique I: Hardware and process parameters. **Journal of pharmaceutical sciences**. v. 99,n.2, p.575-586,2010.

CALVO, P.; GOURITIN, B.; BRIGGER, I.; LASMEZAS, C.; DESLYES; W; ANDREUX, J. P.; DORMONT, D.; COUVREUR, P. PEGylated polyanoacrylate nanoparticles as vector for drug delivery in prior diseases. **Journal of Neuroscience Methods**. v.111, p.151-155, 2001.

CARACENI, P.; DOMENICALI, M.; TOVOLI, A.; NAPOLI, L.; RICCI, C. S.; TUFONI, M.; BERNARDI, M. Clinical indications for the albumin use: Still a controversial tissue. **European Journal of Internal Medicine**.v. 24, p. 721-728, 2013.

CAO, X. Q.; VASSEN, R.; SCHWARTZ, S.; JUNGEN, W.; TIETZ, F. Spray-drying of ceramics for plasma-spray coating. **Journal of the european ceramic society**.v. 20, p. 2433-2439, 2000.

CHATTERJEE, A.; BHATTACHARJEE, P.; ROY, N. K.; KUMBHAKAR, P. Usage of nanotechnology based gas sensor for health assessment and maintenance of transformers by DGA method. v. 45, p.137-141, 2013.

CHEN, H.; SONG, Y. S.; CHAN, P. H. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. **Journal Cerebral Flow Metabolism**.v.29, p.1262-1272, 2009.

CHEN, K.; WACKER, M.; HACKBARTH, S.; LUDWIG, C.; LANGER, K.; RODER, B. Photophysical evaluation of *m*THPC -loaded HSA nanoparticles as novel PDT delivery systems. **Journal of photochemistry and photobiology**. v.101, p. 340-347, 2010.

CHEN, Y.; LIU, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.64, p.640-665, 2012.

CHU, C. F. L.; LU, A.; LISZKOWSKI, M.; SIPEHIA, R. Enhanced growth of animal and human endothelial cells on biodegradable polymers. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1472, p.485-485, 1999.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2010. (Tese de doutorado). Universidade de Coimbra, Faculdade de ciências e tecnologia, Coimbra.

CONNELL, B. J.; SALEH, M. C.; KHAN, B. V.; SALEH, T. M. Apocynin may limit total cell death following cerebral ischemia and reperfusion by enhancing apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**. v.49, p.3063-3069, 2011.

COUTO, R. O.; CONCEIÇÃO, E. C.; CHAUL, L. T.; OLIVEIRA, E. M. Z.; MARTINS, F. S.; BARA, M. T. F.; REZENDE, K. R.; ALVES, S. F.; PAULA, J. R. Spray-dried Rosemary extracts: physicochemical and antioxidant properties. **Food chemistry**. v.131, p. 99-105, 2012.

DAMGÉ, C.; MAINCENT, P.; UBRICH, N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. **Journal of Controlled Release**. v.117, p.163–170, 2007.

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M.; GAN, W. B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature Neuroscience**. v.8, n.6, p.752-758, 2005.

De JONG, W.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**. v.2, p.133-149, 2008.

DEHOUC, B.; FENART, L.; DEHOUC, M. P.; PIERCE, A.; TORPIER, G.; CECHELLI, R.. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. **The Journal of Cell Biology**. v.138, n.4, p.877–889, 1997.

DILLEN, K.; VANDERVOOT, J.; van den MOOTER, G.; VERHEYDEN, L.; LUDWIG, A. Factorial design, physicochemical characterization and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 275, p. 171–187, 2004.

DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. **Journal of Lipid Research**. v.45, p.1350-1375, 2004.

DODD-O, J. M.; WELSH, L. E.; SALAZAR, J. D.; WALINSKY, P. L.; PECK, E. A.; SHAKE, J. G.; CAPARELLI, D. J.; ZIEGELSTEIN, R. C.; ZWEIER, J. L.; BAUMAGARTENER, W. A.; PEARSE, D. B. Effect of NADPH oxidase inhibition on cardiopulmonary bypass-induced lung injury. **Journal physiology heart**. v. 287, p. H927-936, 2004.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIERA, P.; POPINEAUC, Y.; BOURY, F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: Application to the microencapsulation of oil droplets. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**. v. 232, p. 239-247, 2006.

DREIS, S.; ROTHWEILER, F.; MICHAELIS, M.; CINATL, J. JR.; LANGER, K. Preparation, characterization and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**. v.341, p. 207-214, 2007.

ELVERSSON, J., MILLQVIST-FUREBY, A. Particle size and density in spray drying-Effects of carbohydrate properties. **Journal of pharmaceutical sciences**.v. 94, p. 2049-2060, 2005.

ENGELS, F.; RENIERIE, F. B.; HART, A.; HART, T.; LABADIE, R. P.; NIJKAMP, F. P. **Federation of European Biochemical Societies**. v.305, n.3, p.254-256, 1992.

ESPÓSITO, B, P. **Interações de complexos de Ródio (II) com albumina humana**. 2000. (Tese de doutorado). Instituto de química, Universidade de São Paulo.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN. Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NP's): Effect of poly(ethylene glycol) grafting density. **International Journal Pharmaceutics**. v.411, p.178-187, 2011.

ELZOGHBY, A. O., SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of controlled release**.v. 157, p. 168-182, 2012.

FARACI, F. M. Reactive oxygen species:influence on cerebral vascular tone. **Journal Applied Physiology**. v.100, p.739–743, 2006.

FANALI, G.; MASI, A.; TREZZA, V.; MARINO, M.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Human serum albumin: From bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**. .v. 33, p. 209-290, 2012.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; SANTANA, A. S.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TRINDADE, M. A.; NETTO, F. M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food hydrocolloids**.v. 24, p. 336-340, 2010.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. **Nature Reviews**. v.5, p.161-169, 2005.

FORMAN, H., J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione:Overviex of its protective roles, measurement and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**. v.30, p 1–12, 2009.

FU, N.; ZHAOU, Z.; JONES, T. B.; TAN, T. T. Y.; WU, W. D.; LIN, S. X.; CHEN, X. D.; CHAN, P. P. Y. Production of monodisperse epigallocatechin (EGCG) microparticles by spray drying of high antioxidant activity retention. **International journal of pharmaceutics**.v.413, p. 155-166, 2011.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; HOPPE, J. B.; MENEGHETTI, A. B.; MATTÉ, A.; BATTÀ-STINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Neuroprotective effects of resveratrol against A $\beta$  administration in rats are improved by lipid-core nanocapsules. **Molecular Neurobiology**. v.47, p.1066-1080, 2013.

GAO, K.; JIANG, X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v.310, p.213-219, 2006.

GARCIA, E.; ANDRIEUX, K.; GIL, S.; COUVREUR, P. Colloidal carriers and blood-barrier (BBB) translocation: A way to deliver drug to the brain? **International Journal of Pharmaceutics**. v. 298, p. 274–292, 2005.

GAUMET, M.; VARGA, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.69, p.1–9, 2008.

GELPERINA, S. E.; KHALANSKY, A. S.; SKIDAN, I. N.; SMIRNOVA, Z. S.; BOBRUSKIN, A. I.; SEVERIN, S. E.; TUROWSKI, B.; ZANELLA, F. E.; KREUTER, J. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80- coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. **Toxicology letters**. v. 126, p. 131-141, 2002.

GELPERINA, S.; MAKSIMENKO, O.; KHALANSKY, A.; VANCHUGOVA, L.; SHIPULO, E.; ABBASOVA, K.; BERDIEV, R.; WOHLFART, S.; CHEPURNOVA, N.; KREUTER, J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.74, p.157-163, 2010.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; FONSECA, M. J. V. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT**. v.41, p. 1521-1527, 2008.

GREEN, S. P.; CAIRNS, B.; RAE, J.; BARONCINI, C.; HONGO, J. A.; ERICSON, R. W.; CURNUTTE, J. T. Induction of gp-91-phox, a component of the phagocyte NADPH oxidase, in microglial cells during central nervous system inflammation. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**. v.21, p.374-384, 2001.

GRAF, R.; MINAMITAKE, Y.; PERACCHIA, M. T.; TRUBTSKOY, V.; TORCHILIN, V.; LANGERLL, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**. v. 263, p1600-1602, 1994.

GÓMES-GAET, C.; FATTAL, E.; SILVA, L.; BESNARD, M.; TSAPIS, N. Dexamethasone acetate encapsulation into Trojan particles. **Journal of Controlled Release**. v.128, p.41-49, 2008.

GONG, J. S.; KOBAYASHI, M.; HAYASHI, H.; ZOU, K.; SAWAMURA, N.; FUJITA, S. C.; YANAGISAWA, K.; MICHIKAWA, M. Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipide release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 knock-in mice. **The journal of biological chemistry**. v.277, p.299919-29926, 2002.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; IIIUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v.199, p.95-110, 2000.

GULYAEV, A. E.; GELPERINA, S. E.; SKIDAN, I. N.; ANTROPOV, A. S.; KIVMAN, G. Y.; KREUTER, J. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80 coated nanoparticles. **Pharmaceutical Research**. v.16, n.10, p.1564-1569, 1999.

GURIN-FAKIM, A. Medical plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspects of Medicine**. v.27, p.1-93, 2006.

GURUNATH, S.; KUMAR, S. P.; BASAVARAJ, N. K.; PATIL, P. A. Amorphous solid dispersion method for improving oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Journal of pharmacy research**. v.6, p. 476-480, 2013.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**.v. 52, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. **Biochemical Pharmacology**. v.49, n.10, p.1341-1348, 1995.

HALLIVEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in enzymology**. v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**. v.18, p.685-716, 2001.

HALLIWELL, B.; WITERMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **Brazilian journal pharmacology**.v.142, p. 231-255, 2004.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting.**Current Opinion in Solid State and Materials Science**. v.6, p.319-327, 2002.

HASAN, A. S.; SOCHA, M.; LAMPRECHT, A.; GHAZOUANI, F. E.; SAPIN, A.; HOFFMAN. M.; MAINCENT, P.; UBRICH, N. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. **International Journal of Pharmaceutics**. v.344, p.53–61, 2007.

HAO, J.; WANG, X.; BI, Y.; TENG, Y.; WANG, J.; LI, F.; ,LI. Q.; SHANG, J.; GUO, F.; LIU. J. Fabrication of a composite system combining solid lipid nanoparticles and thermosensitive hydrogel for challenging ophthalmic drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**.p.1-14, 2013.

HEYWORTH, P. G.; CUMUTTE, J. T.; NAUSSEF, W. M.; VOLPP, B. D.; PEARSON, D. W.; ROSEN, H.; CLARKT, R. A. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. **The Journal of Clinical Investigation**. v.87, p.352-236, 1991.

HESS, D. C.; ABE, T.; HILL, W. D.; STUDDARD, A. M.; CAROTHERS, J.; MASUVA, M.; FLEMING, M.; FLEMING. P. A.; DRAKE, C. J.; OGAWA, M.. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. **Experimental Neurology**. v.186, p.134– 144, 2004.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery.**Cellular and Molecular Life Sciences**. v.66, p.2876-2896, 2009.

HIRAGI, C. O. **Análise da variação de marcadores genéticos associados ao estresse oxidativo em grupos populacionais brasileiros**. 2010. (Tese de doutorado). Programa de pós-graduação em biologia animal, Universidade de Brasília.

HIROSE, M.; TACHIBANA, A.; TANABE, T. Recombinant human serum albumin hydrogel as a novel drug delivery vehicle. **Materials Science and Engineering**. V.v. 30, p. 664-669, 2010.

HOUGEE, S.; HARTOG, A.; SANDERS, A.; GRAUS, Y. M. F.; HOIJER, M. A.; GARSSEN, J.; van den BERG, W. B.; van BEUNINGEN, H. M.; SMIT, H. F. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**. v.531, p.264-269, 2006.

HORTON, M. A.; KHAN, A. Medical nanotechnology in the UK: a perspective from the London Centre for Nanotechnology. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v.2, p.42-48, 2006.

HOFFART, V.; LAMPRECHT, A.; MAINCENT, P.; LECOMPTE, T.; VIGNERON, C.; UBRICH, N. Oral bioavailability of a low molecular weight using a polymeric delivery system. **Journal of Controlled Release**. v.13, p.38–42, 2006.

HUA, S.; CABOT, P. J. Targeted nanoparticles that mimic immune cells in pain control inducing analgesic and anti-inflammatory actions: a potential novel treatment of acute and chronic pain conditions. **Pain Physician**. v.16, p.199-216, 2013.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 23, p. 1841-1856, 2005.

IBRAHIM, N., K.; SAMUELS, B.; PAGE, R.; DOVAL, D.; PATEL, K., M.; RAO, S. C.; NAIR, M., K.; BHAR, P.; DESAI, N.; HORTOBAGYI, G. N. Multicenter phase II trial of ABI-007, an albumin bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer. **Journal of clinical oncology**. v. 23, p. 6019- 6026, 2005.

ICH-International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2B- **Validation of Analytical producers: methodology**, 2005.

IIIUM, L., JACOBSEN, L.O., MULLER, R.H., MAK, E., DAVIS, S.S. Surface characteristics and the interaction of colloidal particles with mouse peritoneal macrophages. **Biomaterials**. v.8, p.113-117, 1987.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**. v.21, p.2475-2490, 2000.

JAIN, D., BANERJEE, R. Comparison of ciprofloxacin hydrochloride-loaded protein, lipid and chitosan nanoparticles for drug delivery. **Journal of biomedical material research**. v. 86, p. 105-112, 2008.

JAIN, S.; SARAF, S. Influence of processing variables and in vitro characterization of glipizide loaded biodegradable nanoparticles. **Diabetes & metabolic syndrome: clinical research & review**. v.3, p.113-117, 2009.

JAMEKHORSHID, A.; SADRAMELI, S. M.; FARID, M. A review of microencapsulation methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) medium. **Renewable and sustainable energy reviews**. v.31, p. 531-542, 2014.

JONES, D. P.; KAGAN, V. E.; AUST, S. D.; REED, D. J.; OMAYE, S. T. Impact of nutrients on cellular lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Fundamental and applied toxicology**. v.26, p.1-7, 1995.

JOHNSON, D.K.; SCHILLINGER, K.J.; KWAIT, D.M.; HUGHES, C.V.; McNAMARA, E.J.; ISHMAEL, F.; O'DONNELL, R.W.; CHANG, M.M.; HOGG, M.G.; DORDICK, J.S.; SANTHANAM, L.; ZIEGLER, L.M.; HOLLAND, J. A. Inhibition of NADPH-oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium: Journal of endothelial cell research**. v.9, p. 191-203, 2002.

KANNAN, S. Dendrimer-based postnatal therapy for neuroinflammation and cerebral palsy in a rabbit model. **Science Translational Medicine**. v.4, p.130-146, 2012.

KANEGAE, M. P. P. **Apocinina e metoxi-catecóis correlatos: relação entre estrutura molecular e inibição da ativação do complexo NADPH oxidase**. 2009. (Tese de doutorado). Programa de pós-graduação em biociências e biotecnologia aplicadas a farmácia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

KAUR, I. P.; BHANDARI, R.; BHANDARI, S.; KAKKAR, V. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. **Journal of Controlled Release**. v.127, p.97-109, 2008.

KECK, C. M.; MULLER, R. H. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. **European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics**. v. 65, p. 3-16, 2006.

KELLER, J. N. Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**. v.5, p.1-13, 2006.

KELLY, K. A.; LI, X.; TAN, Z.; Van GILDER, R. L.; ROSEN, C. L.; HUBER, J. D. NOX2 inhibition with apocynin worsens stroke outcome in aged rats. **Brain Research**. v.1292, p. 165 – 172, 2009.

KIM, D. J.; JUNG, J. Y. Granule performance of zirconia/alumina composite powders spray-dried using polyvinyl pyrrolidone binder. **Journal of the European Ceramic Society**. v. 27, p. 3177-3182, 2007.

KIM, H.; ROBINSON, S. B.; CSAKY, K. G. Investigating the movement of intravitreal human serum albumin nanoparticles in the vitreous and retina. **Pharmaceutical research**. v. 26, p. 329-337, 2009.

KHAN, M. N.; KEMPURAJ, D.; THANGAVEL, R.; ZAHEER, A. Protection of MPTP-induced neuroinflammation and neurodegeneration by Pycnogenol. **Neurochemistry international**. v. 1328, p. 139-151, 2010.

KUFLEITNER, J.; WAGNER, S.; WOREK, F.; von BRIESEN, H.; KREUTER, J. Adsorption of obidoxime onto human serum albumin nanoparticles: drug loading, particle size and drug release. **Journal of microencapsulation**. v. 27, p. 506-513, 2010.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.75, p.1-18, 2010.

KRANCE, S. M.; KENG, P.; PALIS, J.; BALLATORI, N. Transient glutathione depletion determines terminal differentiation in HL-60 cells. **Oxidative Medicine and cellular Longevity**. v.3, p. 53-60, 2010.

KRATZ, F. MULLER-DRIVER, R., DREVS, J., UNGER, C. A novel macromolecular prodrug concept exploiting endogenous serum albumin as a drug carrier for cancer chemotherapy. **Journal of medicinal chemistry**.v.6, p. 1253-1256, 2000.

KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. v. 132, p. 171-183, 2008.

KRATZ, F. A clinical update of using albumin as a drug vehicle- A commentary. **Journal of controlled release**.(COREL -07070), 2014.

KREUTER, J.; ALYAUTDIN, R. N.; KHARKEVICH, D. A.; IVANOV, A. A. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). **Brain Research**. v.674, p.171-174, 1995.

KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.47, p.65-81, 2001.

KREUTER, J.; SHAMENKOV, D.; RAMGE, P.; CYCHUTEK, K.; KOCH-BRANDT, C.; ALYAUTDIN. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood- brain barrier. **Journal of Drug Targeting**. v.10, p. 317–325, 2002.

KREUTER, J. Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. **International Congress Series**. v.1277, p.85– 94, 2005.

KREUTER, J.; HEKMATARA, T.; DREIS, S.; VOGEL, T.; GELPERINA, S.; LANGER, K. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. **Journal of Controlled Release**. v.118, p.54–58, 2007.

KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p.213–222, 2012.

KRUIF, C., G.; WEINBRECK, F.; VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current opinion in colloid & interface science**. v.9, p.340-349, 2004.

LAFEBER, F. P. J. G.; BEUKELMAN, C. J.; van den WORM; E., van ROY, J. L. A. M.; VIANEN, M. E.; van ROON, J. A. G.; van DIJK, H.; BIJLSMA, J. W. J. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**. v.38, p.1088-1093, 1999.



LAMBETH, D. J.; KRAUSE, K. H.; CLARK, R. A. Nox enzymes as novel targets for drug development. **Seminary Immunopathology**. v.30, p.339-363, 2008.

LANGER, K.; BALTHASAR, S.; VOGEL, V.; DINAUER, N.; von BRIESER, H.; SCHUBERT, D. Optimization of the preparation process of human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**. v.257, p. 169-180, 2003.

LANGER, K.; ANHORN, M.G.; STEINHAUSER, I.; DREIS, S.; CELEBI, D., SCHRICKEL, N.; FAUST, S.; VOGEL, V. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. **International journal of pharmaceutics**. v.347, p. 109-117, 2008.

LANGRISH, T. A. G.; PREMARAJAH, R. Antioxidant capacity of spray-dried plant extracts: Experiments and simulations. **Advanced powder technology**.v.24, p.771-779, 2013.

LE, S., H.; HENG, D.; NG, W.W.; CHAN, H., K.; TAN, R. B. H. Nano spray drying: A novel methods for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International journal of pharmaceutics**. v. 403, p. 192-200, 2011.

LEE, S. H.; HENG, D.; KIONG NG, W.; CHAN, H. K.; TAN, R. B. H. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International journal of pharmaceutics**. v. 403, p. 192-200, 2011.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREU, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.58, p.327-341, 2004.

LEMARCHAND, C.; GRE, R.; PASSIRANI, C.; GARCION, E.; PETRI, B.; MULLER, R., COSTANTINI, D.; COUVREUR, P. Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems. **Biomaterials**. v.27, p.108-118, 2006.

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAUS, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Buchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of controlled release**. v. 147, p. 304-310, 2010.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb).** 2008. (Tese de doutorado). Programa de pós-graduação em ciência dos alimentos area de bromatologia. Universidade de São Paulo.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**. v.674, p.137-147, 2009.

LIN, A. S. P.; BARROWS, T. H.; CARTMELL, S. H.; GULDBERG, R. E. Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. **Biomaterials**. v. 24, p.481-489, 2003.

LIU, H.; WEBSTER, T. J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**. v.28. p.354-369, 2007.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química nova**.v.27, p. 670-673, 2004.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**.v.1830, p.3143–3153, 2013.

LU, Z.; CHENG, B.; HU, Y.; ZHANG, Y.; ZOU, G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. **Food chemistry**.v. 113, p. 17-20, 2009.

LUCHTEFELD, R.; LUO, R.; STINE, K.; ALT, M. L.; CHERNOVITZ, P. A.; SMITH, R. E. Dose formulation and analysis of diapocynin. **Journal of agricultural and food chemistry**. v.56, p.301-306, 2008.

LUPPI, B.; BIGUCCI, F.; CORACE, G.; DELUCCA, A.; CERCHIARA, T.; SORRENTI, M.; CATENACCI, L.; Di PIETRA, A. M.; ZECCHI, V. Albumin nanoparticles carrying cyclodextrins for nasal delivery of the anti-Alzheimer drug tacrine. **European journal of pharmaceutical sciences**.v.44, p. 559-565, 2011.

Manual BUCHI. **Operation manual nano spray dryer B-90**. 2014.

MA, Y.; ZHENG, Y.; ZENG, X.; CHEN, LIU, R., HUANG, L.; MEI, L. Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on PLC-Tween 80 copolymer for cancer treatment. **International Journal of Nanomedicine**. v.6. p.2679-2688, 2011.

MAA, Y., F., NGUYEN, P., A., HSU, S, W. Spray-drying of air-liquid interface sensitive recombinant human growth hormone. **Journal of pharmaceutical sciences**.v. 87, p. 152-159, 1998.

MAJETI, N.; KUMAR, R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal pharmaceutical science**. v.3, p. 234-258, 2000.

MALM, T. M.; KOISTINAHO, M. M.; PAREPALO, M.; VATANEN, T.; OOKA, A.; KARLSSON, S.; KOISTINAHO, J. Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to  $\beta$ -amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. **Neurobiology of Disease**. v.18, p.134– 142, 2005.

MANTHA, A. K.; MOORTHY, K.; COWSIK, S. M.; BAQUER, N. Z. Neuroprotective role of Neurokinin B (NKB) on  $\beta$ -amyloid (25-35) induced toxicity in aging rat brain synaptosomes: involvement in oxidative stress. **Biogerontology**. v.7, p.1–17, 2006.

MARTINS, I. M.; BARREIRO, M. F.; COELHO, M.; RODRIGUES, A. L. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical engineering journal**. v. 245, p. 191-200, 2014.

MASUDA, M.; SUZUKI, T.; FRIESEN, M. D.; RAVANT, J. L.; CADET, J.; PIGNATELLI, B.; NISHIDO, H., OHSHIMA, H. Chlorination of guanoside and other myeloperoxidase of activated human neutrophils: catalysis by nicotine and trimethylamine. **The journal of biological chemistry**.v.276, p. 40486-40496, 2001.

MATHIOWITZ, E.; JACOB, J. S.; JONG, Y. S.; CARINO, G. P.; CHICKERING, D.; E., CHATURVEDI, P.; SANTOS, C.; A.; VIJAYARAGHAVAN, K.; MONTGOMERY, S.; BASSET, M.; MORRELL, C. Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. **Nature**. v.386, p.410-414, 1997.

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

MICHAELIS, K.; HOFFMANN, M. M.; DREIS, S.; HEBERT, E.; ALYAUTDIN, R. N., MICHAELIS, M.; KREUTER, J.; LANGER, K. Covalent linkage of Apolipoprotein E to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v.317, n.3, p.1246-1253, 2006.

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.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Materials Science**. v.57, p.875-910, 2012.

MIJUSERS, R. B. R.; van ARK, I.; FOLKERTS, G.; KOSTER, A. S.; van OOTERHOUT, A. J. M.; POSTMAN, D.S.; NIJKAMP, F. P. Apocynin and 1400W prevents airway hyperresponsiveness during allergic reactions in mice. **British Journal of Pharmacology**. v.134, p.434-440, 2001.

MOURA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal pharmaceuticals**. v. 385, p. 113-142, 2010.

MOSQUEIRA, V. C.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H., PUISIEUX, F., BARRATT, G. Poly (D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of pharmaceutical science**. v.89, p. 614-626, 2000.

MU, L.; FENG, S. S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>). **Journal of controlled release**. v.80, p. 129-144, 2002.

MULLER, R. H.; MAASSEN, S.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. **Journal of Controlled Release**. v.47, p.261-269, 1997.

MUMENTHALER, M.; HSU, C. C.; PEARLMAN, R. Feasibility study on spray-drying protein pharmaceuticals: recombinant human growth hormone and tissue-type plasminogen activator. **Pharmaceutical research**. v. 11, p. 12-20, 1994.

MUNDARGI, R., C.; BABU, R. V.; RANGASWAMY, V.; PATEL, P.; AMINABHAVI, T. M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-

lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**. v.125, p.193–209, 2008.

NANDIYANTO, A. B. D.; OKUYAMA, K. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. **Advanced Powder Technology**. v. 22, p. 1-19, 2011.

NOBS, L.; BUCHEGGER, F.; GURNY, R.; ALLEMAN, E. Poly(lactic acid) nanoparticles labeled with biologically active Neutravidin for active targeting. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.58, p.483–490, 2004.

NORIS, E. H.; GIASSON, B. Role of oxidative damage in protein aggregation associated with Parkinson's disease and related disorders. **Antioxidants & Redox Signaling**.v.7,. n.5 e 6 ,p.673-684, 2005.

OLIVEIRA, O. W., PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista brasileira de farmacognosia**.v.20, p. 641, 2010.

OLIVEIRA, A., R. **Micropartículas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) obtidas por spray drying para a liberação prolongada de metroxilato**. 2011. (Dissertação de mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.

OLIVEIRA, J. K. **Desenvolvimento tecnológico e caracterização físico-química de nanoaprtículas poliméricas contendo apocinina**. 2013. (Trabalho de qualificação de mestrado)- Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Estadual do Centro-Oeste.

PAINO, I. M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; KANEGAE, M. P. P; KHALIL, N. M., BRUNETTI, I. L. Effect of therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by activated rat neutrophils. **Brazilian journal of medical and biological research**.v.38, p. 543-551, 2005.

PANYAM, J.; LABHASETWAR,V. Biodegradabel nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.64, p.61–71, 2012.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A., KULKARNI, R. M. Nanosuspensions : a promising drug delivery strategy. **Journal of pharmacy and pharmacology**. v.56, p. 827-840, 2003.

PERACCHIA, M. T.; VAUTHIER, C.; DESMAELE, D.; GULIK, A.; DEDIEU, J. C.; DEMOY, M.; d'ANGELO, J; COUVREUR, P. Pegylated nanoparticles from a novel methoxypolyethylene glycol cyanoacrylate-hexadecyl cyanoacrylate amphiphilic copolymer. **Pharmaceutical Research**. v.15, n.4., p.550-556, 1998.

PERACCHIA. M. T.; FATTAL, E.; DESMAELE, D.; BESNARD, M.; NOEL ,J. P.; GOMIS, J. M.; APPEL, M., d'ANGELO, J.; COUVREUR, P. Stealth® PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targentig. **Journal of Controlled Release**. v.60, p.121–128, 1999.

PEREIRA, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with Technetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. *European journal of pharmaceutical sciences*. v.33,42–51, 2008.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resistance Updates**. v.7, p.97–110, 2004.

PETERS, E.A.; HILTERMANN, J. T. N.; STOLK. J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. **Free Radical Biology & Medicine**.v.31,n.11,p.1442–1447, 2001.

PETRÔNIO, M. S.; ZERAIK, M. L.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH-oxidase inhibitor. **Molecules**. v.18, p. 2821-2839, 2013.

PERVERZEVA, E.; TRESCHALIN, I.; BODYAGIN, D.; MAKSIMENKO, O.; LANGER, K.; DREIS, S.; ASMUSSEN, B.; KREUTER, J.; GELPERINA, S. Influence of the formulation on the tolerance profile of nanoparticles –bound doxorubicin in healthy rats: Focus on cardio-and testicular toxicity. **International journal of pharmaceutics**.v. 337, p. 346-356, 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DIAZ-RUBIO, E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food research international**. v.41, p. 274-285, 2008.

PÉREZ, M. W.; GÓMEZ, A. T.; RUÍZ, G.; MARTÍN-RODRÍGUEZ. Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. **Food hydrocolloids**.v.23, p. 1096-1102, 2009.

PLAPIED, L.; DUHEM, N.; RIEUX, A.; PREAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v.16, p.228–237, 2011.

PRABHA, S.; ZHOU, W.; PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Size-dependency of nanoparticles-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v.244, p.105–115, 2002.

PRINZEN, L.; MISERUS, R. J. H. M.; DIRKSEN, A.; HACKENG, T. M.; DECKERS, N.; BITSCH, N. J.; MEGENS, R. T. A.; DOUMA, K.; HEEMSKERRK, J. W.; KOOL, M. E.; FREDERIK. P. M.; SLAAF, D. W.; van ZANDVOORT, M. A. M. J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Optical and magnetic resonance imaging of cell death and platelet activation using annexin A5-functionalized quantum dots. **Nano letters**. v.7, n.1, p.93-100, 2007.

RAMGE, P.; UNGER, R. E.; OLTROGGE, J. B.; ZENKER, D.; BEGLEY, D.; KREUTER, J.; von BRIESEN, H. Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate

(PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells. **European Journal of Neuroscience**. v.12, p.1931-1940, 2000.

RATES, S. M. K Plants a source of drugs. **Toxicon**. v.39, p.603–613, 2001.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; RAVI KUMAR, M. N. V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**. v.113, p.189–207, 2006.

RAVAL, J. A.; PATEL, J. K.; PATEL, M. M. Formulation and *in vitro* characterization of spray dried microspheres of amoxicillin. **Acta pharmacology**. v.60, p.455-465, 2010.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*.v.26, p. 1231-1237, 1999.

REES, M .D.; NENNETT. E. C.; WHITELOCK, J. M.; DAVIES, M. J. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. **Free Radical Biology & Medicine**. v.44, p.1973–2001, 2008.

REBELO, M. J.; REGO, R.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA, M. C. Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods. **Food chemistry**.v.141, p. 566-573, 2013.

REDDY, R., S.; RAMACHANDRA, C. T.; HIREGOUDAR, S.; NIDONI, U.; RAM, J.; KAMMAR, M. Influence of processing conditions on functional and reconstitution properties of milk powder made from Osmanabadi goat milk by spray drying. **Small ruminant research**.RUMIN-4680, n. páginas: 8, 2014

REIS, C. P. R.; NEUFELD, R. J; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v.2, p.8-21, 2006.

REIS, A. C. B. P. **Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna**. 2007 (Tese de Doutorado)- Faculdade de Farmácia. Universidade de Coimbra, 2007.

RIEKES, M. K.; BARBOZA, F. M.; DALLA VECCHIA, D.; BOHATCH, M.Jr., FARAGO, P. V.; FERNANDES, D.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate –co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials science and engineering**. v.31, p. 962-968, 2011.

RUAN, Y.; YAO, L.; ZHANG, B.; ZHANG, S.; GUO, J. Antinociceptive properties of nasal delivery of neurotoxin-loaded nanoparticles coated with polysorbate-80. **Peptides**.v.32, p.1526–1529, 2011.

RUPIN, A.; PAYSANT, J.; SANSILVESTRI-MOREL, P.; LEMBREZ, N.; LACOSTE, J. M.; CORDI, A.; VERBEUREN, T. J. Role of NADPH oxidase-mediated superoxide

production in the regulation of E-selectin expression by endothelial cells subjected to anoxia/reoxygenation. **Cardiovascular research**.v. 63, p. 323-330, 2004.

SAHOO, S. K.; PANYAM, J.; PRABHA, S.; LABHASETWAR, V. Residual polyvinyl alcohol associated poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. **Journal of Controlled Release**. v. 82, p.105–114, 2002.

SANTOS, R. R. P. **Metalofármacos de rutênio: síntese, caracterização, atividade frente a linhagem celular K562 e estudos de interação com albumina humana (HSA)**. 2009. (Tese de doutorado). Programa de pós-graduação em química, Universidade de São Paulo Instituto de Química.

SANTOS, C. X. C.; ANILKUMAR, N.; ZHANG, M.; BREWER, A. C.; SHAH, A .M. Redox signaling in cardiac myocytes. **Free Radical Biology & Medicine**.v.50, p.777–793, 2011.

SARDI, F.; FASSINA, L.; VENTURINI, L.; INGUSTIO, M.; GUERRIERO, F.; ROLFO, E.; RICEVUTI, G. Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly. **Autoimmunity Reviews**. v.11, p.149-153, 2011.

SERRANO, F.; KOLLUR, N. S.; WIENTJES, F. B.; CARD, J. P.; KLANN, E. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. **Brain Research**.v.988,p.193–198, 2003.

SEZER, A. D.; KAZAK, H.; ONER, E.T.; AKBUGA, J. Levan-based carrier system for peptide and protein drug delivery: optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characterization. **Carbohydrate polymers**.v.84, p. 358-363, 2011.

SIMONS, J. M.; HART, B. A. T.; CHING, T.; DIJK, H. V.; LABADIE, R. P. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. **Free Radical Biology e Medicine**. v.8, p.251-258, 1990.

SIMARD, A. R.; RIVEST, S. Bone marrow stemcells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated paranchymal microglia. **The Journal Faseb**.v.18, p.998-1000, 2004.

SIMARD, A. R.; SOULET, D.; GOWING, G.; JULIEN, J. P.; RIVEST,S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. **Neuron**.v.49, p.489–502, 2006.

SIMIOMESCU, M.; GAFENCU, A.; ANTOHE, F. Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey. **Microscopy research and technique**.v.57, p.269-288,2002.

SINGH, R.; LILLARD, Jr. J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**.v.86, p.215-223, 2009.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. Crystal struture of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering**. v. 12, p. 439-446, 1999.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. **Journal of pharmaceutical sciences**. v.99, n. 2, p. 587-597, 2010.

SONAJE, K.; ITALIA, J. L.; SHARMA, G.; BHARDWAJ, V.; TIKOO, K.; RAVI KUMAR, M. N. V. Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine A- induced nephrotoxicity in rats. **Pharmaceutical Research**.v.24, n.5, p.899-905, 2007.

SORG,O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus biologies**.v.327,p.649-662,2004.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARRNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**.v.70, p.1-20, 2001.

SOUTO, E. B.; MULLER, R. H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLC<sup>®</sup>, NLC<sup>®</sup>). **International Journal of Cosmetic Science**. v. 30, p. 157-165, 2008.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? **Comptes rendus biologies**.v.327, p. 649-662, 2004.

SCHMID, K., ARPAGAUS, C., FRIESS, W. Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications. **Pharmaceutical development and technology**.v. 16, p. 287-294, 2011.

SCHMITT, C.; SANCHES, C.; DESOBRY-BANOS, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.38, p.689-753, 1998.

SHAIKH ,J.; ANKOLAB, D, D.; BENIWAL, V.; SINGHA, D.; RAVI KUMARB, M. N. V. Nanoparticles encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhncer. **European Journal of Pharmaceutical Science**. v.37, p.223-230, 2009.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SCHROEDER, U.; SOMMERFELD, U.; SABEL, B. A. Efficacy of oral dalargin-loaded nanoparticle delivery across the blood-brain barrier. **Peptides**. v.19, n.4, p.777-780, 1998.

SUN, W.; XIE, C.; WANG, H.; HU, Y. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. **Biomaterials**. v.25, p.3065–3071, 2004.

SUN, A. Y.; WANG, E. Q.; SIMONYI, E. A; SUN, G. Y. Botanical phenolics and brain health. **Neurological medicine**. v.10, p.259-274, 2008.



SORCE, S.; KRAUSE, K. H. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. **Antioxidants e Redox Signaling**. v.11, n.10, p.2481-2485, 2009.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados. **Polímeros**. v.12, n.1, p.101-106, 2012.

SNIPER, G. J.; Mc Guire, NORDEN, J. J.; FREEMAN, J. A. Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by non neuronal cells. **Neurobiology**. v.83, p. 1130-1134, 1986.

STEFANSKA, J.; SOKOLOWSKA, M.; SARNIAK, A.; WLODARCZYK, A.; DONIEC, Z.; NO-WAK, D.; PAWLICZAK, R. Apocynin decreases hydrogen peroxide and nitrate concentrations in exhaled breath un healthy subjects. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. v.23, p.48-54, 2010.

STOLK, J.; HILTERMANN, J. N.; DIJKMAN, J. H.; VERHHOEVEN, A. J. Characteristics of the inhibition of NADPH Oxidase activation in neutrophils by apocynin a methoxy-substituted catechol. **American Journal of Respiratory cell and molecular biology**. v.11, p.96-102, 1994.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro. Editora: Guanabara Koogan, p.44-46, 2011.

TAVARES, G. D. **Nanopartículas de poli (n-butyl-cianocrilato) revestidas com N,N,N-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade *in vitro***.2013 (Tese de Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

TANG, X. N.; CAIRNS, B.; YENARI, M. A. Apocynin improves outcome in experimental stroke with a narrow dose range. **Neuroscience**. v.154, p.556-562, 2008. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. v.457, p.134-141, 2008.

TIAN, X. H.; LIN, X. N.; WEI, F.; HUANG, Z. C.; WANG, P.; REN, L.; DIAO, Y. Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**. v.6., p.445-452, 2011

TRIERWEILER, L. C. **Nanopartículas: como produzi-las em escala industrial**.2009 (Tese de Doutorado)- Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of food engineering**. v.88, p. 411-418, 2008.

TOSI, G.; COSTANTINO, L.; RUOZI, B.; FORNI, F.; VANDELLI, M. A. Polymeric nanoaprticles for the drug delivery to the central nervous system. **Experting Opinion Drug Delivery**. v.5, p.155-174, 2008.

TROSTER, S. D.; MILLER, U.; KREUTER, J. Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. **International Journal of Pharmaceutics**.v.61,p.85-100,1990.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.39, p.44–84, 2007.

VANCE, J. E.; HAYASHI, H.; KARTEN, B. Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**.v.16,p.193–212, 2005.

VANCE, J. E.; HAYASHI, H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1801, p.806–818, 2010.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, M. S.; MANDREFFI, V.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio, antioxidante e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química nova**. v.30, p.1323-1338, 2007.

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via Spray Drying. **Pharmaceutical Research**.v.25, p. 999-1022, 2007.

VERGONI ,A. V.; TOSI, G.; TACCHI, R.; VANDELLI, M. A.; BERTOLINI, A.; CONSTAN-TINO, L. Nanoparticles as drug delivery agents specific for CNS: in vivo biodistribution. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v.5, p.369–377, 2009.

VICENTE, J.; PINTO, J.; MENEZES, J.; GASPAR, F. Fundamental analysis of particle formation in spray drying. **Powder Techonology**. v. 247, p. 1-7, 2013.

VILA, A.; SÁNCHEZ. A.; TOBIO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Desing of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**. v.78, p.15–24, 2002.

VINOGRADOV, S. V.; BRONICH, T. K.; KABANOV, A.V. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. **Advanced drug delivery reviews**. v.54, p.135-147, 2002.

VOINEA, M.; DRAGOMIR, E.; MANDUTERANU, I.; SIMIONESCU, M. Binding and uptake of transferring-bound lipossomes targeted to transferring receptors of endothelial cells. **Vascular Pharmacology**. v.39, p.13– 20, 2002.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization sizing and zeta potential measurement. **Particuology**. v.6, p.112–115, 2008.

XIMENES, V. F.; KANEGAE, M. P. P.; RISSATO, S. R.; ALHIANE, M. S. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.457, p.134-141, 2007.

YAN, F.; ZHANG, C.; ZHENG, Y.; MEI, L.; SONG, C.; SUN, H.; HUANG, L. The effect of poloxamer 188 on nanoparticles morphology size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v.6, p.170–178, 2010.

ZHAO, L.; LIU, A.; YU, S.; WANG, Z.; LIN, X.; ZHAI, G.; HANG. The permeability of puerarin loaded poly(butycyanoacrylate) nanoaprticles coated polysorbate 80 on the blood-brain barrier and its protective effect agains cerebral ischemia/reperfusion injury. **Biology Pharmaceutical**. v.36, p.1263-1270, 2013.

WACKER, M.; CHEN, K.; PREUSS, A.; POSSEMEYER, K.; ROEDER, B.; LANGER, K. Photosensitizer loaded HSA nanoparticles. I: Preparation and photophysical properties. **International journal of pharmaceutics**. v.393, p. 253-262, 2010.

WANG, M.; SIMOM, J. E.; AVILES, I. F.; HE, K.; ZHENG, Q. Y.; TADMOR, Y. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus L.*). **Journal of agricultural and food chemistry**. v.51, p. 601-608, 2003.

WANG, S. Y.; FENG, R. T.; LU, Y. J.; BOWMAN, L.; DING, M. Inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kappaB, and cell transformation by extracts of strawberries (*Fragraria x ananassa Duch.*). **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 53, p. 4187-4193, 2005.

WANG, Q.; TOMPKINS, K. D.; SIMONYI, A.; KORTHUIS, R. J.; SUN, A. Y.; SUN, G. Y. Apocynin protects against global cerebral ischemia-reperfusion –induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus. **Brain Research**.v.1090, p.182-189, 2006.

WANG, Q.; SMITH, R. E.; LUCHTEFELD, R.; SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; LUO, R.; SUN, G.Y. Bioavailability of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not to diapocynin. **Phytomedicine**. v.15, p.496-503, 2008.

WANG, C. X.; HUANG, L. S.; HOU, L. B.; JIANG, L.; YAN, Z. L; WANG, Y. L.; CHEN, Z. L. Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain. **Brain Research**. v.1261, p.91-99, 2009.

WANG, K.; LI, L.; SONG, Y.; YE, X.; FU, S.; JIANG, J.; LI, S. Improvement of pharmacokinetics behavior of apocynin by nitrone derivation: comparative pharmacokinetics of nitrone-apocynin and its parent apocynin rats. **Plos one**. v.8, p. 1-6, 2013.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: An overview of techniques and applications. **Critical reviews in therapeutic drug carrier system**. v. 3, p. 235-259, 1990.

WATERHOUSE, D. S., WADHWA, S.S., WATERHOUSE, G.I.N. Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: a comparative study using different natural fibre polymers as encapsulats. **Food bioprocess technology**.v. 6, p. 2376-2388, 2013.

WARTLICK, H., MICHAELIS, K., BALTHASAR, S., STREBHARDT, K., KREUTER, J., LANGER, K. Highly specific HER2- mediated cellula uptake of antibody-modified nanoparticles. **Journal of drug targenting**.v. 12, p. 461-471, 2004.

WARTLICK, H.; MICHAELIS, K.; BALTHSAR, S.; STREBHARDT, K.; KREUTER, J.; LANGER, K. Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumor cells. **Journal of drug targeting**. v.12, p. 461-471, 2012.

WEI, G.; MAA, P. X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials** .v.25, p.4749-4757, 2004.

WEISS, N.; MILLER, F.; CAZAUBON, S; OLIVIER-COURAUD, P. The blood- brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1788, p.842–857, 2009.

WILSON,B.;SAMANT,M.K.,SANTHI,K.,KUMAR,K.P.S.,PARAMAKRISHNAN,N.,SURE SH,B.Poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into te brain to treat Alzheimer’s disease. **Brain Research**. v.1200, p.159 – 168, 2008.

WOHLFART, S.; KHALANSKY, A.S.; GELPERINA, S.; BEGLEY, D.; KREUTER, J. Kinetics of transport of doxorubicin bound to nanoparticles across the blood-brain barrier. **Journal of controlled release**. v. 154, p. 103-107, 2011.

WONG,H. L.; WU, X. Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.64, p.686–700, 2012.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.63, p.456–469, 2011.

WU, Y., ZOU, L., MAO, J., HUANG, J., LIU, S. Stability and encapsulation efficiency os sulforaphane microencapsulated by spray dryer. **Carbohydrate polymers**.v.102. p. 497-502, 2014.