

JULIANA KOVALCZUK DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO APOCININA**

GUARAPUAVA

2014

JULIANA KOVALCZUK DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO APOCININA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, UNICENTRO-PR.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rubiana Mara Mainardes

GUARAPUAVA

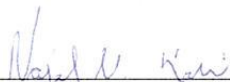
2014

TERMO DE APROVAÇÃO

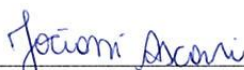
JULIANA KOVALCZUK DE OLIVEIRA

“DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO APOCININA”

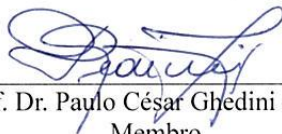
Dissertação aprovada em 05/05/2014 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração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



Prof. Dr. Najeh Maïssar Khalil – Orientador – UNICENTRO
Presidente



Dra. Joeciani Ascari – UNICENTRO
Membro



Prof. Dr. Paulo César Ghedini – UFG
Membro

Guarapuava- PR
2014

Catálogo na Publicação

Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

Oliveira, Juliana Kovalczuk de

O48d Desenvolvimento tecnológico e caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas contendo apocinina / Juliana Kovalczuk de Oliveira. -- Guarapuava, 2014

xv, 79 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2014

Orientadora: Najeh Maissar Khalil

Co-orientadora: Rubiana Mara Mainardes

Banca examinadora: Jociani Ascari, Paulo César Ghedini

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Apocinina. 3. NADPH oxidase. 4. Nanopartículas. 5. Albumina. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615.1

*Dedico este trabalho a Deus, a minha família e ao meu noivo,
que sempre estiveram comigo quando mais precisei,
incentivando-me a superar as dificuldades,
a tanta saudade!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente pelas oportunidades que tive durante esse período de estudos no grupo de pesquisa do Laboratório de Nanotecnologia. O meu aprendizado foi além do científico e do profissional. A boa convivência com todos me proporcionou grande crescimento pessoal, tenho orgulho dessa fase da minha vida.

Gostaria de agradecer:

À Universidade Estadual do Centro Oeste e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Najeh, e minha co-orientadora, Professora Dr^a. Rubiana, pelas oportunidades desde a realização de iniciação científica até a finalização do mestrado, por serem sempre solícitos, pelo estímulo, paciência e confiança durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Nanotecnologia, Thaysa, Lori, Luciana, Lu Camargo, Daniel, Aline, Leizi, Diani e todo pessoal da IC, pela ajuda e por todo apoio moral, principalmente durante esse período final tão desgastante. A amizade e as risadas da *hora do café* eu levarei sempre comigo! Em especial para as minhas companheiras Débora, Clescila, Silvana e Jô, por todo o conhecimento que compartilhamos, pela amizade que construímos e pelo bom humor nas noites e finais de semana que passamos realizando experimentos no laboratório. Impossível descrever a importância de vocês nessa caminhada. A todos vocês, minha admiração e gratidão!

Às minhas grandes amigas, recém-chegadas à vida de mestrandas, Dyeni e Isabela, por toda a amizade que permaneceu firme e forte durante esses sete anos de *Guarapuava*, e que se Deus permitir, será eterna. Obrigada pelo apoio, carinho e paciência, sem vocês comigo não seria a mesma coisa. Contem comigo para o que precisarem, sempre!

Às alunas do Laboratório do Professor Policiano, Nayane e Joslaine, pela disponibilidade e ajuda no preparo das amostras para o infravermelho e o potencial zeta.

Ao Professor Fauze, pelo auxílio com as amostras para a análise de difração de raios X.

Ao Professor Ricardo, pelo auxílio com as amostras para a análise de DSC.

Aos Professores Paulo César Ghedini, Tania Toyomi Tominaga e Jociani Ascari por todas as contribuições, pela gentileza e conhecimento transmitido na correção do trabalho e na arguição nas bancas de qualificação e defesa do mestrado. Obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus, por tão sabiamente me conduzir durante as decisões da minha vida e por me dar forças para que tudo fosse concretizado.

Aos meus pais, José Aureo e Alice, meu alicerce, por me apoiarem durante toda a vida acadêmica longe de casa, por não me permitirem desistir. Todo meu esforço foi por vocês. Minha gratidão, amor e admiração serão eternos.

Aos meus irmãos, que além dos laços de sangue que nos une, são meus amores e amigos queridos. Obrigada pela sinceridade, dedicação e carinho durante esse período de estudos.

À minha família, meus primos, tios, tias e avós, que entenderam o motivo da minha ausência em tantas datas importantes. Aos meus avós: Vó Cida, e aos avós que infelizmente não puderam ver daqui a conclusão do trabalho que eles também acompanharam. Vó Olga, Vô Tavico e Vô Bruno, jamais esquecerei todos os conselhos, as orações e o olhar de orgulho de vocês! Amarei para sempre!

Ao meu noivo, Bruno Aurélio, que sempre me apoiou e encheu meu coração de esperança e calma com seu otimismo irritante. Que apesar da distância, sempre foi meu companheiro, meu melhor amigo. Amo você, meu amor.

Obrigada a todos que contribuíram para o êxito deste trabalho.

*"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher."*

Cora Coralina

RESUMO

Apocinina, também conhecida como acetovanilona, é um metoxi-catecol descrito como produto originalmente extraído a partir de raízes de *Picrorhiza kurroa* Royle (Scrophulariaceae). Os estudos mais consistentes envolvendo apocinina estão relacionados com seus efeitos sobre os mecanismos fisiopatológicos de inibição da enzima NADPH oxidase, o qual representa um alvo terapêutico atraente para várias doenças. Entretanto, a apocinina tem como característica fraca solubilidade em meio aquoso, estreita relação dose-dependente e janela terapêutica, que provavelmente influenciam sua baixa biodisponibilidade por via oral. O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo apocinina a partir de polímeros PLA, PLA-PEG e albumina de soro bovino (BSA), com o intuito de melhorar suas características de biodisponibilidade oral. Para quantificação e determinação da eficiência de encapsulação (EE%) de apocinina em nanopartículas, foi desenvolvida e validada metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a caracterização morfológica e físico-química das nanopartículas, foram realizadas análises de diâmetro médio da partícula e índice de polidispersão (IP), potencial zeta (PZ), espectroscopia na região do infravermelho (IV), difração de raios X (DRX) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). Formulações de nanopartículas de BSA contendo apocinina foram as que apresentaram melhores resultados em relação à sua caracterização morfológica e físico-química, dos quais a composição ideal que apresentaram partículas com diâmetros reduzidos, inferiores à 300 nm, e índices de eficiências de encapsulação da droga $\geq 79,5\%$. De acordo com os testes de DRX e DSC, houve diminuição do grau de cristalinidade da apocinina após o processo de nanoencapsulação, gerando partículas de melhor dissolução em água. Portanto, pode-se concluir que as nanopartículas de BSA contendo apocinina desenvolvidas nesse estudo possuem características morfológicas e físico-químicas adequadas para sua finalidade como sistema de liberação controlada.

Palavras-Chave: Apocinina. NADPH oxidase. Nanopartículas. Albumina.

ABSTRACT

Apocynin, also known as acetovanillone, is a methoxy-catechol described as a product originally extracted from the roots of *Picrorhiza kurroa* Royle (Scrophulariaceae). The most consistent studies involving apocynin are related to their effect on the pathophysiological mechanisms of NADPH oxidase inhibition, which represents an attractive therapeutic target for many diseases. However, apocynin has low solubility in water, and small dose-dependent therapeutic window, which are likely to influence their low bioavailability by oral route. The aim of this study was the development of polymeric nanoparticles containing apocynin from polymers PLA, PLA - PEG and bovine serum albumin (BSA), in order to improve their oral bioavailability characteristics. For quantification and determination of apocynin on nanoparticles encapsulation efficiency (EE%), it was developed and validated an analytical methodology in high performance liquid chromatography (HPLC). For morphological and physicochemical characterization of the nanoparticles, analysis of particle diameter and polydispersity index (PI), zeta potential (ZP), infrared spectroscopy (IR), X-ray diffraction (XRD), and differential scanning calorimetry (DSC) were performed. BSA nanoparticle containing apocynin showed the best results in relation to their morphological and physicochemical characterization, especially in formulations with pH modification, in which the optimal composition had particles with reduced diameters, which were smaller than 300 nm, and rates of drug encapsulation efficiency ≥ 79.5 %. According to XRD and DSC, there was a decrease of crystallinity of apocynin after the nanoencapsulation process, thereby generating particles with better dissolution in water. Therefore, it can be concluded that BSA nanoparticles containing apocynin developed in this study have suitable morphological and physicochemical characteristics, which make them a potential drug delivery system.

Keywords: Apocynin. NADPH oxidase. Nanoparticle. Albumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura Apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona).....	4
Figura 2: Diagrama dos efeitos potenciais de apocinina em células fagocíticas (neutrófilos) e células não-fagocíticas (células vasculares).	7
Figura 3: Representação esquemática das categorias de nanopartículas: Nanoesferas e nanocápsulas	11
Figura 4: Rotas de polimerização e estrutura do ácido láctico para formação do PLA.	13
Figura 5: Nanopartículas do tipo nanoesfera com modificação superficial por cadeias de PEG	15
Figura 6: Representação estrutural da molécula de albumina de soro bovino (BSA).....	17
Figura 7: Estruturas moleculares dos principais aminoácidos presentes na molécula de albumina de soro bovino (BSA).	18
Figura 8: Método de obtenção de nanopartículas por emulsificação-evaporação do solvente..	20
Figura 9: Representação esquemática do processo de coacervação/dessolvatação.....	22
Figura 10: Cromatograma da solução-padrão de apocinina 50 µg/mL (Fase móvel: ACN:H ₂ O, AcOH 0,1% (60:40), 0,800 mL/min, 276nm).	36
Figura 11: Curva analítica da área <i>versus</i> as concentrações da apocinina, obtida CLAE (Fase móvel: ACN:H ₂ O, AcOH 0,1% (60:40), 0,800 mL/min, 276nm).	37
Figura 12: Cromatograma da amostra de PVA 1%, diluição 1:10. (Fase móvel: ACN:H ₂ O, AcOH 0,1% (60:40), 0,800 mL/min, 276nm).	38
Figura 13: Cromatograma da amostra de albumina derivada de nanopartícula branca, diluição 1:100. (Fase móvel: ACN:H ₂ O, AcOH 0,1% (60:40), 0,800 mL/min, 276nm).....	39
Figura 14: a) Cromatograma da solução de Apocinina 50 µg/mL sob estresse de oxidação por H ₂ O ₂ , por 1h. b) Cromatograma do H ₂ O ₂ sem presença de apocinina.	41
Figura 15: a) Cromatograma da solução de Apocinina 50 µg/mL sob estresse com HCl 0,5M, por 1h. b) Cromatograma da solução HCl 0,5M.	42
Figura 16: Cromatograma da solução de apocinina 50 µg/mL sob estresse com NaOH 0,5M, por 1h.....	43
Figura 17: Curva limite delineada para cálculo de limites de detecção e quantificação da apocinina.....	44
Figura 18: Espectros das amostras na região do infravermelho: (a) Apocinina; (b) Albumina soro bovino, BSA; (c) NP-Branca; (d) NP-BSA contendo apocinina.....	57
Figura 19: Difractogramas obtidos por DRX: (a) Apocinina, (b) BSA, (c) Mistura física de BSA e apocinina, (d) NP-BSA contendo apocinina.	60
Figura 20: Termogramas DSC: a) Apocinina, b) Albumina soro bovino, BSA, c) Mistura física BSA e apocinina (1,66:1 p/p), d) NP-BSA contendo apocinina.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros variáveis na formulação de NP-PLA e NP-PLA-PEG pelo método de emulsificação-evaporação O/A do solvente.	29
Tabela 2: Parâmetros das formulações de NP-PLA e NP-PLA-PEG obtidas pelo método de coacervação.	30
Tabela 3: Parâmetros preliminares de formulações de NP-BSA contendo apocinina pelo método de coacervação, sem modificação do pH ($\text{pH } 7,2 \pm 0,2$).	31
Tabela 4: Parâmetros empregados na formulação de NP-BSA contendo apocinina pelo método de coacervação, com variação do volume de glutaraldeído 8%.	31
Tabela 5: Condições cromatográficas para validação analítica da apocinina.	36
Tabela 6: Concentrações padrões de apocinina submetidas às condições de estresse.	40
Tabela 7: Análise das precisões intra e inter-corridas, e seus respectivos CV% e DP.	45
Tabela 8: Exatidão para os padrões de apocinina.	46
Tabela 9: Resultados das variações das condições cromatográficas para as diferentes concentrações de apocinina.	46
Tabela 10: Disposição dos parâmetros das formulações de NP-PLA e NP-PLA-PEG obtidas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente.	48
Tabela 11: Resultados da EE% da formulação de NP-PLA e NP-PLA-PEG obtidas pelo método de coacervação.	50
Tabela 12: Resultado da EE% da formulação teste de NP-BSA contendo apocinina pelo método de coacervação, sem modificação do pH ($\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$).	51
Tabela 13: Parâmetros empregados na formulação de NP-BSA contendo apocinina pelo método de coacervação, com variação do volume de glutaraldeído 8%.	52
Tabela 14: Resultados obtidos sobre parâmetros de diâmetro médio, IP e distribuição dos tamanhos das formulações obtidas pelo método de coacervação de NP-PLA e NP-PLA-PEG (C1-C2) e NP-BSA (A1 _{SB} , A1 _{CB} – A4 _{CB}).	54
Tabela 15: Resultado do potencial zeta (PZ) das formulações NP-BSA (A1 _{CB} – A4 _{CB}).	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a/o/a	Emulsão água em óleo em água
ACN	Acetonitrila
AcOH	Ácido Acético
AE	Acetato de etila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> – Albumina soro bovino
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLOR	Clorofórmio
CV%	Coefficiente de Variação
DCM	Diclorometano
DL50	Dose Letal Mediana
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DP	Desvio-padrão
DPR	Desvio-padrão Relativo
EE%	Eficiência de Encapsulação
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HEPT	Altura Equivalente do Prato Teórico
HEX	<i>n</i> -Hexano
HSA	<i>Human serum albumin</i>
IP	Índice de Polidispersão
LD	Limite de Detecção
Log P	Coefficiente de partição óleo-água
LQ	Limite de Quantificação
MF	Mistura Física
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NP- BSA	Nanopartículas de albumina
NP-PLA	Nanopartículas de Poli (ácido Lático)
NP-PLA-PEG	Nanopartículas de Poli (ácido Lático) e Polietileno glicol

o/a	Emulsão óleo em água
p^{phox}	<i>Phagocytic oxidase</i>
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PDA	<i>Photodiode Array</i>
PEG	Polietileno glicol
PLA	Poli (ácido Lático)
PLGA	Poli (ácido lático- <i>co</i> -glicólico)
PVA	Poli (álcool vinílico)
PZ	Potencial Zeta
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
T_M	Tempo de volume morto

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Apocinina.....	4
2.2 Nanotecnologia	9
2.2.1 Nanopartículas poliméricas	11
2.2.1.1 Nanopartículas poliméricas sintéticas: <i>poli (ácido láctico) e polietileno glicol</i> ...	12
2.2.1.2 Nanopartículas poliméricas naturais: <i>albumina bovina</i>	16
2.2.2 Métodos de obtenção e análise de sistemas nanoparticulados	19
2.2.2.1 Método de emulsificação- <i>evaporação do solvente</i>	19
2.2.2.2 Método por <i>coacervação</i>	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAIS	23
4.1 Substâncias e Reagentes	23
4.2 Equipamentos.....	24
5 MÉTODOS.....	24
5.1 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para determinação de Apocinina em nanopartículas	24
5.1.1 Condições cromatográficas	25
5.1.2 Linearidade.....	25
5.1.3 Seletividade e especificidade	26
5.1.4 Precisão	26
5.1.5 Exatidão.....	27
5.1.6 Limites de quantificação e detecção.....	27
5.1.7 Robustez	28
5.2 Metodologias de obtenção de Nanopartículas	28

5.2.1 Método de emulsificação-evaporação do solvente para obtenção de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo apocinina	28
5.2.2 Método de coacervação para obtenção de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo apocinina.....	30
5.2.3 Método de coacervação para obtenção de nanopartículas de albumina contendo apocinina	31
5.3 Caracterizações morfológica e físico-química das nanopartículas	32
5.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação.....	32
5.3.2 Análise da distribuição do diâmetro médio da partícula e índice de polidispersidade	33
5.3.3 Análise do potencial zeta – cargas de superfície.....	34
5.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	34
5.3.5 Difração de raios X (DRX)	34
5.3.6 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	35
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para determinação de Apocinina em nanopartículas – Resultado do procedimento de validação analítica.....	35
6.1.1 Linearidade.....	37
6.1.2 Especificidade	38
6.1.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	44
6.1.4 Precisão	44
6.1.5 Exatidão.....	45
6.1.6 Robustez.....	46
6.2 Caracterizações da formulação ótima de nanopartícula de apocinina	47
6.2.1 Determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo apocinina através dos métodos de emulsificação-evaporação do solvente e coacervação em meio não aquoso	47
6.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas de albumina de soro bovino (BSA) contendo apocinina	50
6.2.3 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	53
6.2.4 Espectros obtidos por espectroscopia na região do infravermelho	56
6.2.5 Difractogramas obtidos no teste de DRX	59
6.2.6 Termogramas obtidos pelo teste de DSC	61
7 CONCLUSÃO.....	63
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

Na última década houve rápido aumento no número de pesquisas e no desenvolvimento de novos materiais em escala nanométrica. Essa área de pesquisa é impulsionada pelo pressuposto de que quando uma substância é projetada para tamanho *nano*, suas propriedades podem ser melhoradas e melhor aproveitadas (THORLEY; TETLEY, 2013). Nanopartícula é um termo amplo aplicado a diversificadas estruturas nanométricas. As estratégias mais populares de produção de nanopartículas incluem nanopartículas poliméricas, micelas, dendrímeros, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, dentre outros. Tais dispositivos possuem propriedades físico-químicas diferenciadas quando comparadas ao produto original, tais como: maior área superficial, diâmetro reduzido e vetorização por adição de ligantes na superfície, que conduzem à liberação controlada, sustentada e direcionada entre barreiras biológicas (MAINARDES *et al.*, 2009; MEI *et al.*, 2013).

Sistemas de liberação controlada por sistemas nanoparticulados são abordagens que se destinam a aumentar a especificidade na entrega de compostos e do seu efeito terapêutico, reduzindo assim os efeitos colaterais relacionados ao acúmulo em órgãos ou compartimentos celulares inespecíficos. Essa estratégia permite a associação com local alvo específico durante um período de tempo suficiente para conferir o benefício terapêutico (MAHON *et al.*, 2012; THORLEY; TETLEY, 2013), e a possibilidade de modulação das características para melhorar os perfis farmacocinéticos e de biodisponibilidade (LI; HUANG, 2008; HUANG; YU; RU, 2010).

A administração oral de medicamentos é dependente da capacidade absorvente do intestino para a entrega eficiente para a circulação sistêmica. Dentre as estratégias para favorecer a administração oral de novas formulações, destaca-se a melhora da solubilidade de drogas insolúveis ou muito pouco solúveis. A biodisponibilidade, particularmente para drogas que possuem problemas em sua dissolução e absorção, é melhorada pelo aumento da área de superfície para a dissolução, e como resultado há aumento na bioadesão (BARRATT, 2003; FENICAL *et al.*, 2009). Assim, o emprego da nanotecnologia na distribuição de drogas por via oral é uma habilidade de modulação farmacocinética da droga.

Existe uma vasta variedade de polímeros que podem ser utilizados na formulação de sistemas nanoparticulados. Polímeros sintéticos e naturais de partículas têm sido aplicados como tecnologias para construir os transportadores ou como excipientes. Os polímeros naturais podem ser subdivididos em polímeros de base proteica, polissacarídeos e polihidroxialcanoatos, dos quais são popularmente utilizados: gelatina, albumina (soro

humano, soro bovino e clara de ovo), colágeno, dextrano, alginato etc (COIMBRA, 2010). Já os polímeros sintéticos largamente empregados na preparação de nanopartículas incluem poliésteres e seus copolímeros, tais como poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico *co*-glicólico) (PLGA) e poli (*ε*-caprolactona) (PCL), por apresentarem capacidade de reabsorção pelo organismo e terem a aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em humanos. A maioria das nanopartículas poliméricas proporciona biodisponibilidade melhorada do composto aprisionado através da degradação da partícula (BARRATT, 2003; ULBRICHT, 2006).

A pesquisa e o emprego de plantas e substâncias ativas advindas de produtos naturais no desenvolvimento de medicamentos são incontestáveis. Mas grande parte de produtos naturais, com potencial farmacológico, não seguem com avanço clínico pela indústria farmacêutica em função da sua baixa solubilidade em água e/ou serem pobremente absorvidos pelo corpo humano (CHEN *et al.*, 2011; HUANG; YU; RU, 2010).

A apocinina é um composto originalmente extraído a partir de raízes de *Picrorhiza kurroa* Royle (Scrophulariaceae), uma planta nativa do Himalaia e conhecida na medicina tradicional da Índia, Nepal, Tibet e Paquistão (VAN DEN WORM, 2001; HOUGEE *et al.*, 2006; XIMENES *et al.*, 2007; LUCHTEFELD *et al.*, 2008; STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008). Trata-se de é um metoxi-catecol que vem sendo extensamente estudado em função de suas ações potenciais antioxidantes e antiinflamatórias.

Quanto às suas propriedades biológicas, muitos pesquisadores defendem sua ação primordial como um inibidor de NADPH oxidase. O estudo dos seus efeitos sobre os mecanismos fisiopatológicos e inibição dessa enzima representa um alvo terapêutico atraente para várias doenças, como câncer (STOLK; HILTERMAN; DIJKMAN, 1994; KLESS *et al.*, 2006, SUZUKI *et al.*, 2013), diminuição da progressão da aterosclerose (KINOSHITA *et al.*, 2013), inibição de citocinas pró-inflamatórias (PATERNITI *et al.*, 2010; NAM *et al.*, 2013), derrame (TANG *et al.*, 2008), convulsões (KIM *et al.*, 2013), isquemia e reperfusão (WANG *et al.*, 2006, CONELL *et al.*, 2011) e doenças neurodegenerativas relacionadas a neuroinflamação, como Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica ou doença de Charcot (WU *et al.*, 2006; LAMBETH; KRAUSE; CLARK, 2008; HERNANDES, 2011).

Entretanto, o uso da apocinina apresenta alguns inconvenientes quanto as suas propriedades farmacocinéticas. O composto apresenta baixa solubilidade em água, mas é solúvel em alcoóis e solventes orgânicos (VAN DEN WORM, 2001). Sugere-se atenção e cuidado na utilização de apocinina quando se considera os benefícios terapêuticos, em função de ações opostas de acordo com a dose, caracterizando estreita relação entre dose-resposta

(CONNEL *et al.*, 2011). Além disso, sua biodisponibilidade por via oral absoluta ainda está longe da ideal, com recuperação de apenas 2,8% e meia vida de cerca de 6 minutos (WANG *et al.*, 2013).

A partir desses estudos, é notório que a apocinina apresenta uma vasta gama de atividades em potencial que são prejudicadas pelas suas características físico-químicas, como a fraca solubilidade em meio aquoso, que conseqüentemente influencia sua biodisponibilidade, e também a estreita relação dose-dependente. Assim, há necessidade de melhorar as características físico-químicas do composto a fim de encontrar uma melhor viabilidade para sua aplicação, tanto *in vitro* como *in vivo*.

O emprego dos conhecimentos em nanotecnologia abre novas oportunidades terapêuticas para vários agentes que não podem ser utilizados eficazmente como formulações orais convencionais, principalmente devido à sua fraca biodisponibilidade (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007), como é o caso da apocinina. A reformulação desse composto ativo para menor tamanho de partícula pode melhorar a sua biodisponibilidade oral.

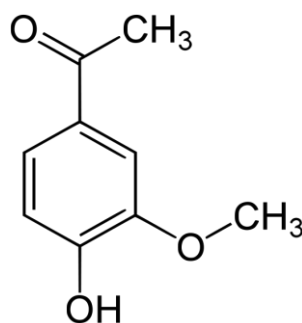
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Apocinina

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) foi descrita pela primeira vez por Schmiedeberg em 1883, isolada a partir das raízes de *Apocynum cannabinum* (cânhamo canadense), e seus extratos eram popularmente usados para tratar hidropisia e problemas cardíacos. Embora a apocinina tenha sido descoberta em *A. cannabinum*, sua ocorrência não se restringe exclusivamente à família Apocynaceae. Desde 1971, em estudo realizado por Basu e colaboradores, a apocinina, também chamada de acetovanilona, vem sendo descrita como produto originalmente extraído a partir de raízes de *Picrorhiza kurroa* Royle (Scrophulariaceae), uma planta nativa do Himalaia e conhecida na medicina tradicional da Índia, Nepal, Tibet e Paquistão (VAN DEN WORM, 2001; HOUGEE *et al.*, 2006; XIMENES *et al.*, 2007; LUCHTEFELD *et al.*, 2008; STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

Apocinina é um metoxi-catecol de peso molecular de 166,17 g/mol (Figura 1), de odor fraco de baunilha e ponto de fusão de 115 °C (VAN DEN WORM, 2001). Atualmente, pode ser obtida comercialmente a partir de várias empresas em função do seu baixo custo e por ser relativamente não-tóxico (PETRÔNIO *et al.*, 2013). Os efeitos colaterais da apocinina ainda não são conhecidos, entretanto, em estudo com ratos em 1981 de Gajewska e Grzybowski, mostrou que o composto tem toxicidade muito baixa (DL50: 9g/kg) após administração oral (VAN DEN WORM, 2001; STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008). Em estudos mais recentes, dosagens de apocinina de até 100mg/kg/dia não caracterizaram efeitos adversos (COTTER; CAMERON, 2003; HOUGEE *et al.*, 2006; XIONG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013).

Figura 1: Estrutura Apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona)



Em comum com outros compostos polifenólicos, apocinina tem várias ações biológicas, dentre elas as anti-inflamatórias e antioxidantes de alta relevância em estudos experimentais, o que é atribuído à sua capacidade de seletivamente impedir a formação de radicais livres, espécies reativas de oxigênio e peróxidos produzidos no organismo (SIMONS *et al.*, 1990; HOUGEE *et al.*, 2006; HEUMÜLLER *et al.*, 2008; HOUSER; JOHNSON; ISHMAEL, 2012). Os efeitos biológicos e mecanismos de ação da apocinina são desde então investigados, mas ainda existem poucas comprovações caracterizando a sua relação estrutural-atividade (LU *et al.*, 2011).

Apesar do mecanismo de ação da apocinina ainda não estar totalmente compreendido, a base em várias pesquisas está no estudo de Stolk e colaboradores (1994), o qual sugere que a apocinina é capaz de interromper cascata de ativação da NADPH oxidase. Nesse estudo, a apocinina mostrou capacidade de inibir a montagem de NADPH oxidase em fagócitos, por interferir com a translocação intracelular de dois componentes citosólicos p47^{phox} e p67^{phox} em leucócitos, monócitos e células endoteliais, essencial para a atividade da oxidase (STOLK; HILTERMAN; DIJKMAN, 1994; JOHNSON *et al.*, 2002).

A NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase) é uma enzima de múltiplas subunidades presente em muitos tipos de células. Sua forma melhor caracterizada é a fagocítica, presente em macrófagos e neutrófilos, em que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é utilizada como um mecanismo de defesa hospedeiro (GROEMPING; RITTINGER, 2005). É um complexo de membrana proteico multimérico formado por três subunidades citosólicas (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) e uma proteína G regulatória (Rac2), além de duas subunidades de membrana em neutrófilos (p22^{phox} e gp91^{phox}). É latente em células em repouso, mas se torna ativa quando as células são estimuladas (BABIOR, 1999; BEDARD; KRAUSE, 2007; RABÊLO *et al.*, 2009). Dois eventos acompanham esse mecanismo: a fosforilação de proteínas e a translocação de componentes citosólicos para a membrana plasmática (EL-BENNA *et al.*, 2005). A ativação da NADPH oxidase inicia-se pela fosforilação da subunidade citoplasmática p47^{phox}, desencadeando sua translocação para a membrana, onde juntamente com outras subunidades da enzima, associa-se ao citocromo b₅₅₈ para iniciar a atividade catalítica da enzima (BABIOR, 1999; RABÊLO *et al.*, 2009).

A família de NADPH oxidase inclui diferentes enzimas cuja principal função é a produção de EROs, as quais são geradas como um subproduto de vários elementos celulares (BEDARD; KRAUSE, 2007). Essas enzimas são expressas em vários tecidos e desempenham diferentes funções, incluindo a sinalização celular, regulação da expressão de genes,

diferenciação, crescimento e morte celular. A maioria de suas funções está relacionada com a transdução de sinal de receptores de membrana que, conseqüentemente, são ativados em resposta a sinais extracelulares, como de citocinas ou fatores de crescimento (BEDARD; KRAUSE, 2007; SANCHO; FABREGAT, 2011).

Segundo Kanegae e colaboradores (2007), a apocinina anteriormente identificada como um inibidor NADPH-oxidase humano, por si só exerce pouca ação sobre a enzima. Após ser convertida em metabolitos ativos por mieloperoxidases (MPO) presentes em neutrófilos, identificaram um dímero da apocinina como um inibidor mais eficaz da NADPH oxidase (KANEGAE *et al.*, 2007). Desse modo, apocinina precisaria ser ativada por oxidação na presença de H₂O₂ e MPO, resultando na dimerização em diapocinina, o composto metabolicamente ativo que fornece a capacidade de inibir a oxidase (KANEGAE *et al.*, 2007; XIMENES *et al.*, 2007; WANG Q. *et al.*, 2008).

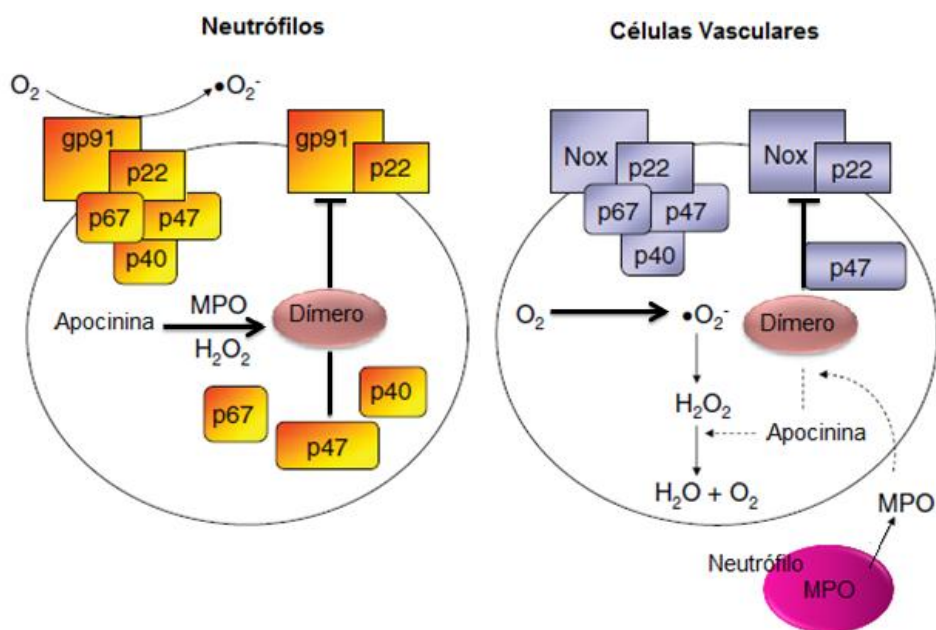
Nessa linha, a apocinina poderia ser classificada como um pró-fármaco, que é convertido no seu radical ativo formado pela atividade da (mielo) peroxidase. Por outro lado, mesmo que o dímero de apocinina não seja o composto ativo inibitório, sua formação é consequência da ativação da apocinina no meio leucocitário (JOHNSON *et al.*, 2002). E independentemente do produto ativo, se a apocinina ou seus metabólitos, é evidente que a inibição da NADPH oxidase por apocinina seja dependente ou sensivelmente melhorada na presença de peroxidases e H₂O₂ (JOHNSON *et al.*, 2002; SELEMIDIS *et al.*, 2008).

Em contraste com as células fagocíticas, em células não fagocíticas, a apocinina não foi capaz de inibir a ativação da NADPH oxidase por não haver MPO endógeno, mas foi capaz de reduzir a biodisponibilidade de EROs, H₂O₂ e formação de radical hidroxila sem inibir a NADPH oxidase. Com base nesses resultados, sugeriu-se a capacidade antioxidante da molécula e que a apocinina age como um *sequestrador* de radicais livres, além de concluir que as ações podem ser diferentes dependendo do tipo de célula estudada (Figura 2) (HEUMÜLLER *et al.*, 2008; TOUTZ, 2008). Apesar do estudo *in vitro* sugerir que a apocinina atua como um antioxidante em células vasculares sem estar relacionado com a atividade da NADPH oxidase (HEUMÜLLER *et al.*, 2008), vários estudos *in vivo* defendem sua ação primordial como um inibidor de NADPH oxidase.

A NADPH oxidase é uma das enzimas responsáveis pela produção do ânion superóxido, um precursor de microbicidas das EROs, desempenhando um papel na defesa do hospedeiro. Entretanto, o delicado equilíbrio entre os efeitos benéficos e prejudiciais dos radicais livres é um aspecto muito importante de organismos vivos. O envolvimento de EROs também gera grande influência na gênese e/ou progressão de uma infinidade de doenças, e

nesse sentido há grande estímulo no desenvolvimento de drogas que agem sobre NADPH oxidase (MUZAFFAR; SHUKLA; JEREMY, 2005, VALKO *et al.*, 2007).

Figura 2: Diagrama dos efeitos potenciais de apocinina em células fagocíticas (neutrófilos) e células não-fagocíticas (células vasculares).



(Adaptado de TOUTZ, 2008).

Sob condições fisiológicas, o excesso de ativação NADPH oxidase leva ao estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e expressão prejudicada de antioxidantes (TSAI *et al.*, 2013). Um grande número de antioxidantes de origem natural é capaz de agir como sequestrador de EROs, mas estes compostos são em sua maioria inespecíficos e incapazes de inibir a ativação da NADPH oxidase. A apocinina parece ser exceção dentre esses compostos, possui capacidade antioxidante menos potente em relação à outros de origem natural, como resveratrol e curcumina, mas se destaca pela capacidade em inibir o complexo NADPH oxidase (KANEGAE *et al.*, 2007).

Sendo a NADPH oxidase uma das fontes de EROs, foi analisada a produção de EROs pela via NADPH oxidase-dependente em relação à formação de placas de ateroma. Foi revelado que a apocinina suprimiu a geração de Ox-LDL induzida por EROs, a expressão de citocinas aterogênicas e proliferação de macrófagos. Esses resultados sugeriram que a supressão da proliferação de macrófagos e a supressão da NADPH-oxidase pode ser um dos mecanismos para os efeitos antiaterogênicos da apocinina (KINOSHITA *et al.*, 2013).

Quanto às doenças neurodegenerativas, sugere-se que o aumento da atividade da NADPH oxidase contribui para o quadro de estresse oxidativo característico dessas patologias (HERNANDES, 2011). Na doença de Alzheimer, a NADPH oxidase é ativada na microglia com translocação de p47^{phox} e p67^{phox}, os quais estão significativamente aumentados, resultando a formação de espécies reativas de oxigênio (SHIMOHAMA *et al.*, 2000). Nesse sentido, o tratamento com a apocinina pode inibir significativamente a geração de EROs e contribuir para o tratamento e impedir progressão da doença.

A apocinina demonstrou capacidade de supressão na migração de células do câncer *in vitro*, mesmo sem induzir a morte celular, de modo que o efeito antimigração observado nas condições de estudo foi independente da atividade citotóxica (KLEES *et al.*, 2006; LIRDPRAPAMONGKOL *et al.*, 2009). A apocinina e seus derivados têm capacidade em inibir a migração da linhagem de células de câncer de mama MDAMB-435 em concentrações subtóxicas, com significativa influência na diminuição dos níveis de Rac1 ativo. De acordo com esse estudo, a apocinina interfere na NADPH-oxidase e inibe a migração de linfócitos através de uma via de proteína G, sem afetar aderência celular. Os dados correlacionam a apocinina e inibição de Rac1, sendo o composto uma possível fonte para inibidores da Rac1 e influente na migração de células tumorais (KLEES *et al.*, 2006).

Já, em outro estudo, a apocinina inibiu significativamente a proliferação *in vitro* de células de câncer de próstata PLS10 na fase G1 do ciclo celular, sem afetar a produção de EROs, mas com inibição da fosforilação da Rac1. Em modelo *in vivo*, suprimiu o crescimento de tumores e metástases de modo dose-dependente, com a redução da proliferação celular e o número de vasos no tumor. Concentrações superiores a 100 µM inibiram significativamente o crescimento, entretanto a concentração inibidora IC₅₀ foi por volta de 500 µM (SUZUKI *et al.*, 2013).

A apocinina atua como um inibidor de EROs, de modo que a produção de espécies reativas via NADPH oxidase é eficientemente reduzida por esse sistema de defesa antioxidante. Por conseguinte, aumentos dependentes da dose de apocinina *in vitro* induzem a atividade pró-oxidante. Dessa forma, é notório que a utilização de apocinina, quando se considera os benefícios terapêuticos, pode desempenhar ações diferentes ou opostas de acordo com a dose (RIGANTI *et al.*, 2006; CASTOR; LOCATELLI; XIMENES, 2010; CONNEL *et al.*, 2011).

A apocinina administrada por vias intraperitoneal, intravenosa e oral parece ser relativamente pouco tóxica e geralmente bem tolerada *in vivo*. É capaz de atravessar a barreira cerebral, sendo detectável no cérebro, fígado e corrente sanguínea, com eficácia na prevenção

dos sintomas e danos nos tecidos em modelos experimentais (SELEMIDIS *et al.*, 2008; WANG Q. *et al.*, 2008).

Entretanto, a biodisponibilidade por via oral absoluta da apocinina ainda está longe da ideal, apresentando curta meia vida e com recuperação de apenas 2,8% da dose administrada (WANG *et al.*, 2013). Esse perfil foi justificado pelo autor graças à solubilidade e capacidade de permeação na membrana pela apocinina, parâmetros estes que são os principais determinantes da biodisponibilidade por via oral de um determinado composto (WANG *et al.*, 2013).

2.2 Nanotecnologia

Ciência e tecnologia andam lado a lado e dependem do desenvolvimento técnico dos instrumentos de medida, de observação, de análise e de produção, que são utilizados de maneira integrada para desenvolver novos produtos. O aperfeiçoamento e desenvolvimento constante da instrumentação e produção tornaram possível o estudo dos materiais em escalas cada vez menores, chegando à escala *nano* (ARAKI, 2007).

O desenvolvimento de novas formas de terapia medicamentosa tem por objetivo aumentar a ação dos fármacos tanto quanto possível, de modo que a resposta farmacológica esteja diretamente relacionada com sua concentração no local desejado. Como uma molécula livre distribui-se por todo o organismo para alcançar o local de ação, grandes quantidades muitas vezes, devem ser administradas, aumentando a probabilidade de toxicidade. Assim surgiu o propósito de associar moléculas ativas a um sistema de transporte (COUVREUR, 1999), e uma estratégia em ascensão é a associação à carreadores nanoparticulados, aplicando conhecimentos de nanotecnologia.

A história da nanotecnologia teve início em 1959, com a palestra *There's plenty of room at the bottom* dada pelo físico ganhador do Prêmio Nobel Richard Feynman, que descreveu uma visão tecnológica sobre miniaturização de materiais e forneceu a base para o conceito de *Nanotecnologia*. Entretanto, o termo propriamente dito e conceito básico de Nanotecnologia foi usado pela primeira vez pelo professor Norio Taniguchi, da Universidade de Ciência de Tóquio, apresentado em uma reunião da Sociedade Japonesa de Engenharia, em 1974. Mas somente na década de 1980, essa nova tecnologia se desenvolveu, e muitos acreditam que apenas a partir dos estudos de Eric Drexler a nanotecnologia foi criada. Em 1981, Drexler publicou seu primeiro artigo sobre o assunto, intitulado *Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation* e em

1986 seu livro, *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*, nos quais mostra o sentido da manipulação de átomos para aplicações na engenharia e produção de novos materiais (PATHAK; THASSU, 2009; SANTAMARIA, 2012).

A nanotecnologia na área farmacêutica, o conceito *magic bullet* ou bala mágica, proposto pelo imunologista Paul Ehrlich, favoreceu o surgimento de várias formas de sistemas de entrega de medicamentos. Dentre os primeiros estudos, estão as pesquisas desenvolvidas por Gregoriadis e colaboradores (1974), que iniciaram estudos a partir de lipossomas. Esses sistemas serviram de base para grande parte dos nanocarreadores de drogas, desenvolvidos em sua maioria a partir de lipídeos ou compostos poliméricos (COUVREUR; VAUTHIER, 2006).

A nanotecnologia não tem uma definição específica. É conhecida como uma área da ciência multidisciplinar que se dedica ao desenvolvimento ou manipulação de materiais de dimensão nanométrica (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012). A marca da nanotecnologia é a capacidade de manipular a matéria em nível atômico, o que permite controlar as propriedades físicas e químicas dos nanomateriais, aprimorando as propriedades iniciais e explorando as adquiridas. Assim, torna-se possível minimizar impactos biológicos prejudiciais, uma vez que as propriedades físico-químicas, que ditam as interações biológicas adversas, sejam identificadas (HARPER *et al.*, 2008).

Contrariamente ao conceito primário de materiais em nanoescala, que reporta a ideia de partículas de tamanho inferior a 1 μm de diâmetro, várias iniciativas encorajam o desenvolvimento de partículas menores que 300 nm por apresentarem perfis farmacocinéticos mais favoráveis, circulação sistêmica prolongada, cinética de liberação sustentada e direcionáveis aos locais de ação desejados (KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002; ZHANG *et al.*, 2008).

A aplicação desta nova tecnologia na área da saúde passa atualmente por avanços em diferentes áreas, com aplicações biomédicas, na imunologia molecular, como biomarcadores e biossensores. Nos últimos anos, o crescimento da nanotecnologia está em processo de revolucionar o fornecimento de compostos biologicamente ativos, graças aos rápidos avanços tecnológicos e extensos estudos nessa linha de pesquisa com ênfase na encapsulação (COUVREUR; VAUTHIER, 2006; GUPTA, 2011; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012).

Uma das vantagens do desenvolvimento das nanopartículas é o seu tamanho ajustável. No desenvolvimento de nanopartículas como sistema de transporte e liberação de fármacos, as principais características que devem ser controladas são o tamanho das partículas, as propriedades de superfície e a liberação de substâncias farmacologicamente ativas, a fim de

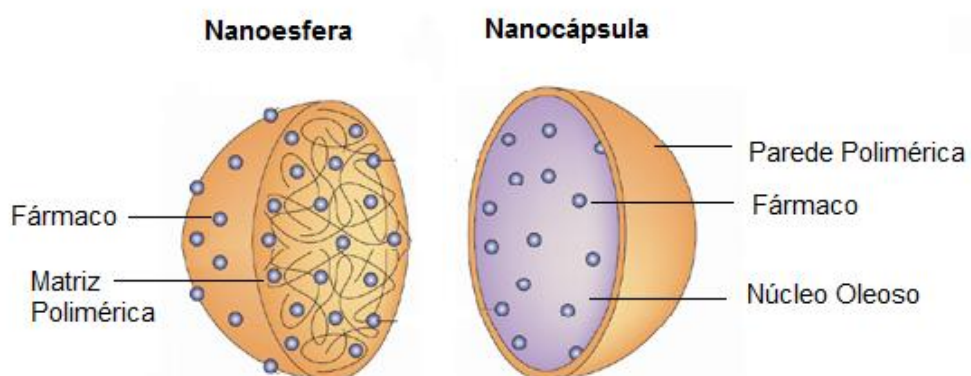
atingir a ação no local específico, com aprimoramento da posologia e da terapêutica (MOHANRAJ *et al.*, 2006).

Incontestavelmente, esses sistemas revolucionaram a terapêutica e estratégias de diagnóstico, levando à capacidade de progressão real de entrega local e temporal específicas (COUVREUR; VAUTHIER, 2006). Sistemas micro e nanoparticulados formulados com polímeros têm mostrado ampla aplicabilidade para administração oral, subcutânea ou intravenosa, tanto para transporte e entrega de fármacos lipofílicos e hidrofílicos (NAIR *et al.*, 2010).

2.2.1 Nanopartículas poliméricas

Nanopartícula é um nome coletivo para nanoesferas e nanocápsulas, diferenciadas de acordo com sua composição e organização estrutural (Figura 3). Nanosferas têm a estrutura do tipo matriz, na qual o componente ativo pode estar retido ou adsorvido em sua superfície e disperso na matriz. Nanocápsulas tem um invólucro polimérico e um núcleo interior onde as substâncias ativas estão normalmente dissolvidas, mas também podem estar adsorvidas na sua superfície (ALLÉMANN; LEROUX; GURNY, 1998; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SINGH; LILLARD JR., 2009).

Figura 3: Representação esquemática das categorias de nanopartículas: Nanoesferas e nanocápsulas



(Adaptado de GRIFFITHS *et al.*, 2010).

As nanopartículas poliméricas são mais atraentes quando comparadas às lipídicas, devido as suas potencialidades terapêuticas, maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os polímeros utilizados na

preparação de nano e micropartículas podem ser de origem natural ou sintética. Apesar de haver grande variedade de polímeros naturais, estes apresentam algumas desvantagens quanto aos aspectos econômicos, manipulação e reprodutibilidade de resultados quando comparadas à tecnologia dos polímeros sintéticos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Existe uma relação complexa entre as propriedades físico-químicas de um nanomaterial e sua interação dentro de um sistema biológico. Diversos compostos são pouco absorvidos pelo corpo humano e a versatilidade dos sistemas poliméricos permite a modulação de propriedades como hidrofobicidade, carga de superfície, perfil de liberação da droga e seu comportamento *in vivo*. Parâmetros estes, que influenciam diretamente no desempenho e na distribuição oral de drogas que se apresentavam insuficientemente ativas (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2005; HUANG; YU; RU, 2010; ZHANG *et al.*, 2012).

A baixa solubilidade é um dos aspectos levados em consideração para a seleção no desenvolvimento de medicamentos na indústria farmacêutica. Grande parte de produtos naturais com potencial farmacológico não seguiram para o avanço clínico em função da sua baixa solubilidade em água e, conseqüentemente, por serem pobremente absorvidos pelo corpo humano e de efeito terapêutico reduzido devido à sua baixa biodisponibilidade (CHEN *et al.*, 2011; HUANG; YU; RU, 2010). Se determinado fármaco é insolúvel ou muito pouco solúvel, geram-se problemas quanto a sua dissolução e absorção. Para que essa substância seja absorvida, ela deve estar presente no local de ação na forma de solução aquosa (FENICAL *et al.*, 2009).

Os sistemas nanoparticulados são usados para proteger uma droga lábil de degradação no trato gastrointestinal ou para proteger o organismo de toxicidade. A biodisponibilidade, particularmente para drogas altamente insolúveis em água, é melhorada pelo aumento da área de superfície para a dissolução, e como resultado há aumento na bioadesão (BARRATT, 2003). Dessa forma, a nanoencapsulação torna-se uma estratégia interessante por aumentar sua biodisponibilidade, alterando a farmacocinética e biodistribuição. O uso de materiais biodegradáveis para a preparação de nanopartículas permite a liberação sustentada de drogas no local alvo durante um período de dias ou mesmo semanas (SINGH; LILLARD JR, 2009).

2.2.1.1 Nanopartículas poliméricas sintéticas: *poli (ácido láctico) e polietileno glicol*

Do ponto de vista prático, os polímeros mais importantes, atualmente são os sintéticos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Formulações delineadas com polímeros

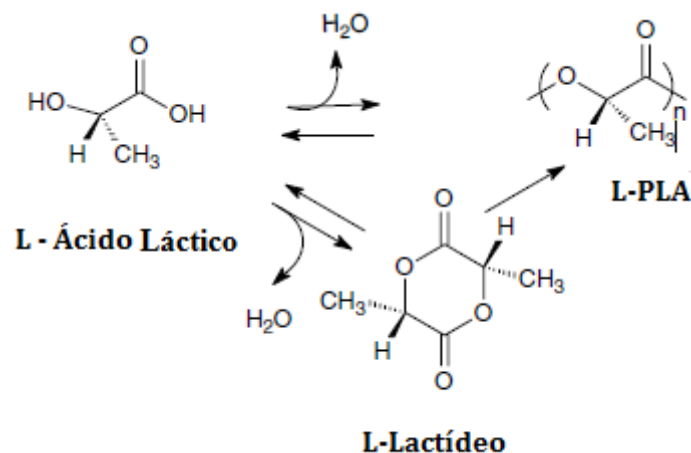
sintéticos biodegradáveis têm chamado a atenção de pesquisadores devido às suas vantagens terapêuticas, características de biocompatibilidade e estabilidade nos fluidos biológicos (SOPPIMATH *et al.*, 2001; VENTURINI *et al.*, 2011).

Polímeros sintéticos largamente empregados na preparação de nanopartículas incluem poliésteres e seus copolímeros, tais como poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico *co*-glicólico) (PLGA) e poli (ϵ -caprolactona) (PCL), por apresentarem capacidade de reabsorção pelo organismo e terem a aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em humanos (BARRATT, 2003; ULBRICHT, 2006).

A maioria dos polímeros biodegradáveis contém grupos hidrolisáveis como amida, éster e uréia ao longo da cadeia carbônica (CHANDRA; RUSTGI, 1998). Os polímeros derivados do ácido láctico e ácido glicólico estão entre os preferidos de escolha devido à sua elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e satisfatório perfil de liberação de substâncias internalizadas, desenvolvidos para a entrega sustentada de substâncias com um alvo intracelular (SINGH; LILLARD JR, 2009; RAO; GECKELER, 2011).

Entre os polímeros biodegradáveis, o poliéster alifático mais importante nos dias de hoje é o PLA. Pode ser sintetizado a partir do ácido láctico por reação de policondensação direta ou polimerização de um monômero de ácido láctico a partir da abertura de anel (Figura 4). O PLA de baixo peso molecular (< 3000 Da) é produzido por condensação direta do ácido láctico, enquanto que o de elevado peso molecular é normalmente obtido através da abertura do anel de lactídeo seguida de polimerização (SODERGARD; STOLT, 2002).

Figura 4: Rotas de polimerização e estrutura do ácido láctico para formação do PLA.



(Adaptado de HENTON *et al.*, 2005).

O PLA possui dois arranjos ópticos, dextrógira (D) e levógira (L), L-PLA e D-PLA, e sua mistura racêmica D,L-PLA (HENTON *et al.*, 2005). As propriedades físico-químicas de opticamente ativas D-PLA e L-PLA são muito semelhantes, diferentemente da mistura racêmica. Um exemplo é ordenação das moléculas, sendo a mistura racêmica D,L-PLA completamente amorfa, enquanto que o L-PLA é altamente cristalino. O L-PLA é considerado a forma mais biocompatível, pois o ácido láctico de ocorrência natural está na forma L (KULKARNI *et al.*, 1971; TONG *et al.*, 2012). Por causa da natureza cristalinidade e de alto ponto de fusão do poli (ácido L-láctico), pode ser menos solúvel no meio de cultura de tecidos e menos susceptível de degradação que o polímero da mistura racêmica D,L (KULKARNI *et al.*, 1971).

O PLA, depois que exposto aos fluidos aquosos do corpo, sofre hidratação e degrada-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos em formas solúveis e não tóxicas. A degradação é caracterizada pela perda de massa e de suas propriedades mecânicas iniciais até completa bioreabsorção pelo organismo, basicamente pela geração de subprodutos com características desses metabólitos naturais do corpo humano. Dessa forma, considera-se um processo de baixa toxicidade por formar subprodutos como ácido láctico, CO₂ e H₂O. A formação de metabólitos naturais é vantajosa uma vez que o organismo apresenta vias naturais para a sua eliminação, e nesse caso, são metabolizados por vias do ciclo de *Krebs*, posteriormente filtrados e excretados pela respiração e urina (HANS; LOWMAN, 2002; BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Os polímeros de PLA são solúveis em solventes orgânicos, como clorofórmio e diclorometano, mas são insolúveis em álcoois e em água. Apesar das favoráveis características como transportador, as nanopartículas ficam susceptíveis à interação com componentes sanguíneos devido à sua superfície hidrofóbica, resultando em rápida eliminação da droga pela opsonização e fagocitose (GREF *et al.*, 1994). Para melhorar o desempenho no transporte e entrega de substâncias, estratégias de modificação de superfície com revestimentos, ligação ou adsorção de polímeros apropriados sobre às partículas permitem minimizar a interação com componentes do sistema retículo-endotelial e também melhora o transporte desses sistemas através da mucosa intestinal, promovendo maior estabilidade às nanopartículas frente aos fluidos biológicos (GREF *et al.*, 1994; TOBÍO *et al.*, 2000; MOGHIMI; SZEBENI, 2003; GUPTA, 2011).

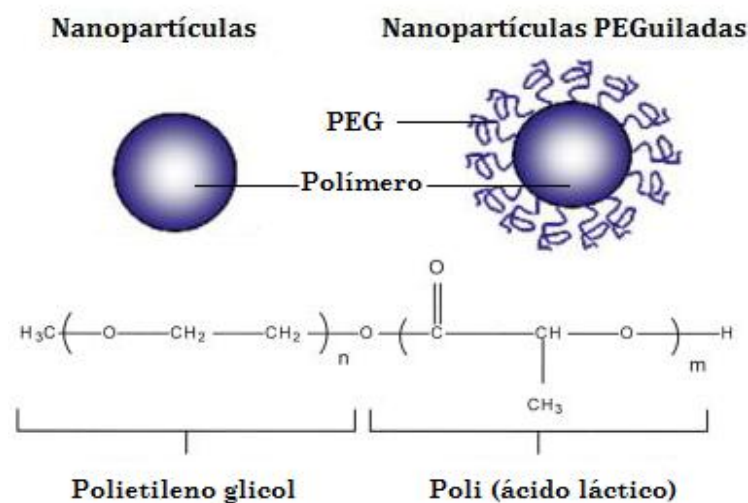
Idealmente, nanopartículas devem apresentar superfície hidrófila para escapar de captura de macrófagos (MOGHIMI; SZEBENI, 2003). O método comum para proteger nanopartículas desses processos de reconhecimento e promover sua estabilização biológica

consiste em revestir a superfície das partículas com polietileno glicol, o PEG. Através da criação de uma camada protetora hidrofílica em torno das nanopartículas, as forças de repulsão estéricas agem bloqueando ou retardando o processo de opsonização, além de estar relacionada com efeito promotor mucoadesão (GREF *et al.*, 1994; TOBÍO *et al.*, 2000; OWENS III; PEPPAS, 2006). Moléculas hidrófilas, tais como polietileno glicol (PEG), podem ser ligadas à superfície de nanopartículas para aumentar a solubilidade e biocompatibilidade (HARRIS; CHESS, 2003).

Polietileno glicol (PEG) é um polímero não-iônico usualmente utilizado para o segmento hidrófilo por sua característica biologicamente inerte, ou seja, não interfere de maneira adversa com os outros ingredientes da formulação (CHEN *et al.*, 2011). PEG são moléculas anfifílicas, de cadeia longa, produzidas por unidades de repetição de óxido de etileno (HARRIS; MARTIN; MODI, 2001). É frequentemente usado para modificação de superfície em partículas poliméricas, graças às características de polímeros hidrofílicos terem mostrado ser um sistema promissor (TOBÍO *et al.*, 2000; BARRATT, 2003).

A conjugação química do PEG em superfícies é denominada peguilação (Figura 5) (NAIR *et al.*, 2010). A ligação ao PEG aumenta o tamanho e o peso molecular de uma molécula, além de promover alterações nas propriedades físico-químicas da molécula inicial. As alterações mais comuns são na sua conformação, o impedimento estérico, mudanças na ligação eletrostática e nas propriedades de hidrofobicidade (HARRIS; MARTIN; MODI, 2001).

Figura 5: Nanopartículas do tipo nanoesfera com modificação superficial por cadeias de PEG



(Adaptado de AMELLER *et al.*, 2003 e DANHIER *et al.*, 2010).

Atualmente, a peguilação é considerada como uma das metodologias mais apropriadas para reduzir as interações não específicas com os vários componentes biológicos e na melhoria da circulação sanguínea de nanopartículas, graças à capacidade de estabilizá-las em meios aquosos, particularmente devido aos efeitos da repulsão estérica. Em função de sua capacidade de criar uma camada superficial em forma de escova, sua alta hidrofília, flexibilidade das cadeias, neutralidade elétrica e ausência de grupos funcionais, o PEG pode prevenir interações com componentes biológicos (GREF *et al.*, 1995; TOBÍO *et al.*, 2000; DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010).

Em nanopartículas biodegradáveis, cadeias de PEG podem ser incorporadas como copolímeros em toda a partícula (OWENS III; PEPPAS, 2006). Com essa modificação, a meia-vida da droga é prolongada graças ao melhoramento no tempo de permanência na circulação sanguínea, como no caso de pequenas nanopartículas (<100 nm) por não serem reconhecidas pelo sistema de defesa celular, persistindo por mais tempo no corpo (GREF *et al.*, 1995; OWENS III; PEPPAS, 2006). Percebe-se assim, que a primeira razão para o interesse em preparar partículas funcionalizadas com PEG é para melhorar o tempo de circulação sistêmica das nanopartículas (TOBÍO *et al.*, 2000).

2.2.1.2 Nanopartículas poliméricas naturais: *albumina bovina*

Moléculas biológicas têm atraído grande interesse para a aplicação na nanomedicina por sua biocompatibilidade e solubilidade em água (AHMAD *et al.*, 2014). Vários polímeros naturais e seus derivados são utilizados na preparação de nanopartículas, dentre eles estão os polímeros de base proteica: gelatina, albumina, colágeno; os polissacarídeos: quitosano, dextrano, alginato; e os polihidroxicanoatos: poli(3-hidroxi butirato), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (COIMBRA, 2010).

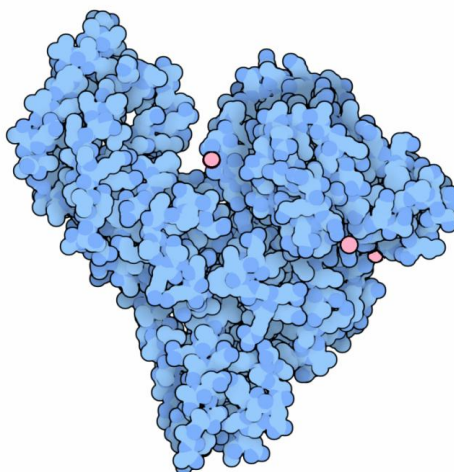
As proteínas são moléculas poliméricas de grande tamanho, e quando são dispersas em um solvente adequado, formam soluções coloidais que possuem características especiais, o que as distinguem das soluções de moléculas pequenas (GÓES FILHO, 2005). A albumina apresenta potencial afinidade com ácidos graxos, hematina, bilirrubina e ampla afinidade por pequenos compostos aromáticos com carga negativa (FRIEDLI, 1996).

Comercialmente, as albuminas são obtidas a partir de clara de ovo (ovalbumina), soro bovino (*Bovine Serum Albumin* BSA) e soro humano (*Human Serum Albumin*, HSA) (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). BSA e HSA têm sido amplamente utilizadas ao

longo dos últimos 30 anos para preparar micro e nanopartículas. Mais de 100 moléculas ativas ou de diagnóstico foram incorporadas em partículas de albumina para administração por diferentes vias, incluindo intravenosa, intramuscular, nasal, e oftálmica (KRATZ, 2008; YEDOMON; FESSI; CHARCOSSET, 2013).

Albumina de soro bovino (BSA) (Figura 6) é utilizada para a fabricação de nanopartículas para aplicações biológicas, tanto alimentares quanto farmacêuticas, por possuírem estrutura primária definida, não-antigenicidade e estabilidade. E assim como um polímero biodegradável, as nanopartículas geradas são não-tóxicas e aceitáveis pelo corpo humano (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; RAHIMNEJAD; NAJAFPOUR; BAKERI, 2012). Além disso, a albumina apresenta elevado tempo de meia vida plasmática e estabilidade *in vivo* (SCHECHTER *et al.*, 2005).

Figura 6: Representação estrutural da molécula de albumina de soro bovino (BSA)

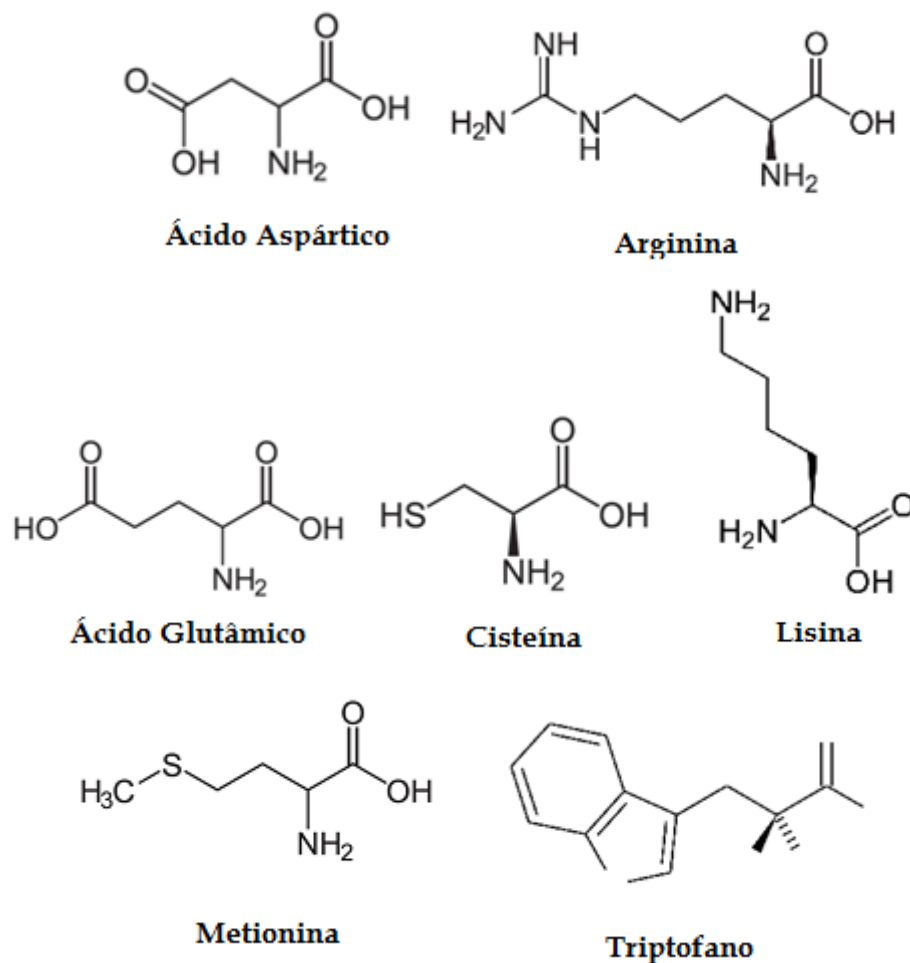


FONTE: (PSI Nature: SBKB)
(doi:10.3942/psi_sgkb/fm_2013_10)

A BSA é a proteína mais abundante no sangue bovino e possui estrutura similar à da HSA. As sequências primárias de ambas as albuminas foram propostas no mesmo ano, por Brown (1975-1976). É formada por 582 resíduos de aminoácidos, com percentagem de sequências idênticas de 76% ao HSA, e peso molecular é de 66,462 g/mol (\approx 66 kDa) (FERREIRA, 2009; SEZER *et al.*, 2011). Sua capacidade de ligar-se reversivelmente a uma grande variedade de ligantes torna-a ainda mais interessante. Forma ligações covalentes com fosfato piridoxil, cisteína, glutatona e metais como cobre, níquel, mercúrio, prata e ouro (GÓES FILHO, 2005).

Albuminas são caracterizadas por um baixo teor de triptofano e metionina, e elevado teor de cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina (Figura 7). A molécula de BSA é composta por três domínios homólogos (I, II, III), divididos em nove ciclos (L1 - L9) por 17 ligações dissulfeto, que não estão acessíveis em pH 5-7. Essas ligações tornam-se progressivamente disponíveis quando o pH é aumentado ou reduzido (PETERS, 1985; FRIEDLI, 1996).

Figura 7: Estruturas moleculares dos principais aminoácidos presentes na molécula de albumina de soro bovino (BSA)



Estruturalmente, quase todos os resíduos hidrofóbicos estão no interior e entre as hélices da proteína, e os resíduos polares estão na parede externa da estrutura. Os resíduos polares da albumina conferem-lhe alta solubilidade em água e favorecem a ligação com vários compostos orgânicos e inorgânicos (FERREIRA, 2009; SEZER *et al.*, 2011).

2.2.2 Métodos de obtenção e análise de sistemas nanoparticulados

Existem vários métodos para preparação de sistemas de entrega de nanopartículas poliméricas, classificados a partir de polímeros pré-formados ou macromoléculas e por polimerização *in situ* de monômeros dispersos. A substância ativa pode ser incorporada à partícula durante a produção ou após a formação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MOHANRAJ; CHEN, 2006; REIS *et al.*, 2006). Na comparação com desses métodos de produção de nanopartículas poliméricas, a preparação utilizando polímeros pré-formados ou macromoléculas é mais facilmente controlável e de maior rendimento (SOUTO *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de nanopartículas por polimerização de monômeros pode ser feita por técnicas como micro-emulsão, mini-emulsão, emulsão livre de tensoativo e polimerização interfacial. Por outro lado, são comumente utilizados para a preparação de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados métodos como coacervação/ dessolvatação, emulsificação-*evaporação do solvente*, diálise, *salting-out*, emulsificação-difusão do solvente e tecnologia de fluidos supercríticos (REIS *et al.*, 2006; RAO; GECKELER, 2011).

2.2.2.1 Método de emulsificação-*evaporação do solvente*

A técnica de emulsificação *evaporação do solvente* foi desenvolvida por Vanderhoff e colaboradores (1979) como a primeira técnica para produção de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados (VANDERHOFF; ELASSER; UGELSTAD, 1979). A técnica é simples e a mais amplamente empregada para preparar nanopartículas com essa classe de polímeros. A técnica envolve basicamente duas etapas: o primeiro passo requer a emulsificação, simples ou dupla, da solução de polímero para uma fase aquosa, seguido *evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida* (Figura 8), induzindo a precipitação do polímero e subsequente obtenção das nanopartículas (REIS *et al.*, 2006; RAO; GECKELER, 2011; ZHANG; CHAN; LEONG, 2013; MILADI *et al.*, 2013).

Mais precisamente, duas fases distintas são preparadas separadamente e posteriormente misturadas e homogeneizadas. A fase orgânica, na qual contém os polímeros e a droga solubilizados em solvente orgânico volátil, é dispersa em uma fase aquosa composta de tensoativos estabilizadores hidrofílicos (RAO; GECKELER, 2011; ZHANG; CHAN; LEONG, 2013). Por suas excelentes propriedades, o álcool polivinílico (PVA) tem sido utilizado em um grande número de aplicações industriais e como tensoativo de formulações

de sistemas nanoparticulados. Este polímero é um excelente adesivo, possui boa resistência a solventes e óleos, e sua resistência a passagem de oxigênio é superior a de qualquer polímero conhecido (ZHANG; SINGH, 2004).

Figura 8: Método de obtenção de nanopartículas por emulsificação-evaporação do solvente



(Adaptado de MILADI *et al.*, 2013).

Por conseguinte, essa mistura é vigorosamente agitada e homogeneizada em sonificador ultra-sônico para formar gotículas emulsionadas, promovendo a redução do tamanho das partículas em função de alta pressão do equipamento, o qual promove o cisalhamento dos glóbulos (GOTO, 2011). Uma vez que uma emulsão é obtida, a evaporação do solvente orgânico permite a sua difusão à fase exterior, levando à solidificação e formação das nanopartículas. As nanopartículas então são recuperadas por ultracentrifugação, lavadas e liofilizadas (RAO; GECKELER, 2011; ZHANG; CHAN; LEONG, 2013).

A emulsificação como emulsão simples (o/a) geralmente é utilizada para encapsular substâncias hidrofóbicas, em que uma fase externa à base de solvente orgânico é vertida numa fase aquosa (HALLIDAY *et al.*, 2012). Caso sejam substâncias hidrofílicas, a técnica de dupla emulsão (a/o/a) é mais adequada, criando uma emulsão de três fases em que o fármaco é solubilizado em um meio aquoso e emulsionado na solução de polímero para criar uma fase externa, que então é emulsionada novamente em uma segunda solução aquosa (HALLIDAY *et al.*, 2012).

2.2.2.2 Método por coacervação

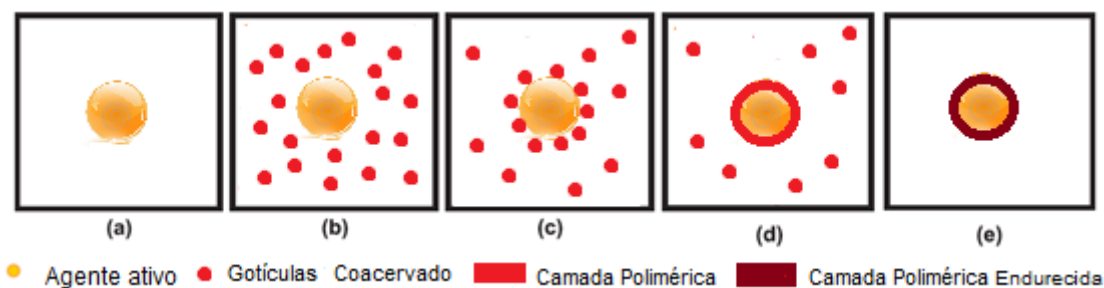
Dentre as técnicas de encapsulação mais antigas e talvez mais utilizadas, está a separação de fases por coacervação. O método de coacervação foi inicialmente introduzido por Bungenberg de Jong & Kruyt em 1929. Descreve o fenômeno de agregação macromolecular em que um sistema coloidal é formado por duas fases líquidas: uma rica em coloides, de maior viscosidade (coacervado), e a outra, pobre em coloides, com menor viscosidade (sobrenadante) (COIMBRA, 2010). De acordo com a definição da IUPAC, a coacervação, também conhecida como dessolvatação ou separação espontânea de fases, é a separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais. A fase mais concentrada no componente coloidal é o coacervado e a outra fase é a solução de equilíbrio (IUPAC, 2014).

A coacervação transforma substâncias inicialmente solúveis em materiais insolúveis no mesmo meio, e pode ser de dois tipos: simples ou complexa (FAYAD, 2010). O mecanismo de formação de partículas por ambos os processos são parecidos, exceto para a maneira que é promovida a separação de fases. Na coacervação simples, um agente de dessolvatação é adicionado para a separação de fases, enquanto a coacervação complexa envolve complexação entre dois polímeros de cargas opostas (GHOSH, 2006).

O método por coacervação induz a produção de nanopartículas através da deposição do polímero ao redor da substância ativa de interesse pela alteração das características físico-químicas do meio. Pode ser feita das seguintes maneiras: i.) Coacervação em meio não-aquoso, ii.) Coacervação por alteração da temperatura, iii.) Coacervação por adição de um *não-solvente*, iv.) Coacervação por adição de um polímero incompatível, v.) Coacervação por adição de um sal, e vi.) Coacervação por alteração do pH (FAYAD, 2010; SEVERINO *et al.*, 2011).

O processo geral do método de coacervação segue cinco etapas sob agitação contínua, conforme mostra a representação da Figura 9. Primeiramente, há a formação de uma emulsão o/a, com dispersão do agente ativo em uma solução polimérica (a), e a indução da dessolvatação do polímero formando pequenas partículas poliméricas (b). Em seguida, dá-se a formação do revestimento, com deposição das partículas poliméricas (gotículas de coacervado) em torno da substância ativa (c) e coalescência das gotículas de coacervado para formar a camada polimérica (d). O último passo é a estabilização do revestimento por endurecimento da camada polimérica por meio de adição de um agente reticulante (e), com formação de micro ou nanopartículas (SUAVE *et al.*, 2006; SEVERINO *et al.*, 2011).

Figura 9: Representação esquemática do processo de coacervação/dessolvatação



(Adaptado de SUAVE *et al.*, 2006).

Dentre as metodologias de indução de coacervação, a adição de um *não-solvente* está entre as mais utilizadas (HUANG; CHUNG; TZENG, 1997; WEBER *et al.*, 2000; LANGER *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2008). O princípio é baseado nas alterações na solubilidade do polímero em solução. O processo envolve a adição de um solvente miscível com a fase contínua à suspensão do polímero, solvente este que seja pouco ou imiscível com o polímero. Para isso, há adição vagarosa de um solvente orgânico, o qual contém a substância ativa, à solução polimérica, provocando a dessolvatação do polímero. Dentre os *não-solventes* comumente empregados estão a acetona, o éter dietílico, o etanol, o metanol e o *n*-hexano. Ao final do processo de dessolvatação, os agregados insolúveis do polímero deixam a suspensão opalescente (FLORENCE; ATTWOOD, 2003; SEVERINO *et al.*, 2011).

A reticulação pode ser conseguida de forma física ou química. Na reticulação física os polímeros são submetidos a tratamento térmico. Já na reticulação química a base é o uso de agentes reticulantes, como carbodiimidas, formaldeído e glutaraldeído (FAYAD, 2010). Com glutaraldeído, as porções amino das cadeias laterais de albumina são solidificadas por uma reação de condensação com o grupo aldeído de glutaraldeído (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012).

No final, as partículas são separadas por centrifugação e lavadas com água deionizada ou solução salina tamponada. A secagem pode realizar-se por liofilização, em estufa ou temperatura ambiente. Esta técnica é complexa em termos operacionais e necessita de controle minucioso das condições experimentais. Uma das principais limitações na produção de nanopartículas é a produção de lotes em grande escala (SILVA *et al.*, 2003; YEDOMON; FESSI; CHARCOSSET, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho consiste no desenvolvimento tecnológico e caracterização físico-química de nanopartículas de polímeros sintéticos PLA e PLA-PEG contendo apocinina, e nanopartículas de polímero natural BSA contendo apocinina.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para determinação e quantificação de apocinina em nanopartículas;
- Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas PLA, PLA-PEG e BSA contendo apocinina;
- Determinação da eficiência de encapsulação da apocinina;
- Caracterização das nanopartículas desenvolvidas - aspectos morfológicos: diâmetro médio, índice de polidispersão, distribuição do tamanho e potencial zeta;
- Caracterização das nanopartículas desenvolvidas - aspectos físico-químicos: interações fármaco-polímero, estado físico do fármaco na partícula.

4 MATERIAIS

4.1 Substâncias e Reagentes

- Acetato de etila (Química Moderna);
- Acetonitrila e Metanol - grau analítico CLAE (J.T. Baker);
- Ácido Acético (Grau HPLC - Vetec);
- Água ultrapura;
- Albumina de soro bovino ($\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich);
- Álcool polivinílico (PVA), 31000 MW, grau hidrólise 98-99% (Sigma-Aldrich);
- Apocinina (Acetovanilona 98%) (Sigma-Aldrich);
- Clorofórmio P.A. (Biotec);
- D (+) Sacarose P.A. (Vetec);

- Diclorometano (Fmaia);
- Etanol (95%) (Fmaia);
- Glutaraldeído 25% (Vetec);
- *N* - Hexano PA (Fmaia);
- Poli (ácido L-láctico), PLA (85,000 – 160,000 MW) (Sigma-Aldrich);
- Polietileno glicol (PEG) – 10 Kda (Sigma-Aldrich).

4.2 Equipamentos

- Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters® Alliance) equipado com detector PDA (*photodiode array*);
- Coluna LiChrospher® 100 RP-18 encapada, C18 (125 mm x 4 mm) tamanho de partícula 5 µm – Merk Millipore®;
- Pré-coluna *LiChroCART*® 125-4 – Merk Millipore®;
- Desruptor de células ultrasônico (Unique®);
- Difractômetro de Raios X (Bruker – Mod. D2 PHASER);
- Espectrofotômetro de infravermelho Nicolet IR200 FT-IR (Thermo Scientific);
- Incubadora com agitação orbital - *shaker de bancada* (Quimis®);
- Membranas filtrantes - acetato de celulose 0,22 µm e PTFE 0,45 µm – (Millipore®);
- Nanosizer Nano-ZS90 (Malvern).
- TGA-DSC - Analisador de termogravimetria e calorimetria diferencial exploratória (TA Instruments - Mod. SDT Q600).

5 MÉTODOS

5.1 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para determinação de Apocinina em nanopartículas

A metodologia analítica por CLAE foi desenvolvida a fim de padronizar e validar um método analítico para a quantificação de apocinina presente nas nanopartículas. O procedimento de validação garante, através de estudos experimentais, que o método proposto atenda às exigências das determinações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Os parâmetros analíticos analisados na validação do método seguiram as exigências preconizadas nas diretrizes da ANVISA, Resolução nº 899 de 2003 e do ICH, *ICH topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* de 2005. Dentre os parâmetros analisados estão: linearidade, seletividade e especificidade, precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção e robustez.

As condições cromatográficas foram estabelecidas através de testes preliminares e auxílio da literatura sobre apocinina (XIMENES *et al.*, 2007) e outros compostos de semelhança estrutural e analítica com a droga em estudo, como a vanilina (JEON *et al.*, 2008; GU *et al.*, 2012). Os padrões utilizados nas análises foram preparados em triplicata, dissolvidos em acetonitrila a partir de uma solução padrão de apocinina na concentração de 1,0 mg/mL, também preparada em acetonitrila.

5.1.1 Condições cromatográficas

Níveis de apocinina foram pesquisados por análises cromatográficas em sistema de CLAE (Waters® Alliance) no modo isocrático. As separações foram realizadas com coluna fase reversa C18 (125mm x 4mm, 5µm - LiChrospher® 100 RP-18, Merk Millipore®), operando a 25 °C. A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila, água e ácido acético a 0,1% (60:40, v/v), a qual foi eluída a um fluxo de 0,800 mL/min com tempo de corrida de 3 min. O volume de injeção de amostra foi de 20 µL, com detector PDA (*photodiode array*) operando sob comprimento de onda de detecção de 276 nm.

5.1.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A linearidade foi determinada através da construção de curva analítica com concentrações de apocinina de 0,5, 10, 20, 40, 50, 60, 80 e 100 µg/mL, analisadas em triplicata. Os valores correspondentes a área do cromatograma e as concentrações da apocinina serviram para o cálculo da equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) da curva analítica da apocinina, o qual deve ser $\geq 0,99$.

5.1.3 Seletividade e especificidade

O parâmetro de seletividade e especificidade são os primeiros passos no desenvolvimento e validação de um método instrumental (RIBANI *et al.*, 2004). A especificidade do método cromatográfico foi avaliada através da análise de componentes da formulação das nanopartículas, a fim de verificar possível interferência de algum deles em análises posteriores. A finalidade dessa análise é verificar se componentes da formulação das nanopartículas de apocinina interferem na sua produção, pelo grau de interferência dos componentes utilizados na preparação através da quantificação de apocinina, levando em consideração a possibilidade da amostra sofrer algum tipo de degradação e gerar outros compostos que não foram observados inicialmente, interferindo no resultado final dos testes. É a competência de um método de não permitir que componentes da formulação interfiram na determinação do analito (MATTOS, 2013).

No procedimento experimental, réplicas dos padrões de apocinina 10, 50 e 100 µg/mL foram submetidas às condições de estresse, tais como: i.) congelamento por 24h; ii.) exposição à luz visível por 24h; iii.) variação de pH, pela adição de NaOH e HCl (0,5M) aos padrões por cerca de 90 min. Os resultados foram avaliados através da presença de picos inesperados e pela percentagem de recuperação na leitura das amostras em CLAE. Já visando analisar se existe interferência dos componentes da formulação das nanopartículas na quantificação da droga, foi realizado um ensaio com álcool polivinílico PVA 1% (v/v) e albumina (BSA).

Os dados obtidos foram avaliados pela análise de possíveis picos inesperados, tempo de retenção, e percentagem de recuperação, comparando-se os resultados da apocinina livre.

5.1.4 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Neste ensaio, o parâmetro para precisão foi avaliado por meio de ensaios de repetibilidade (intra-corrída) e de precisão intermediária (inter-corrída), através das determinações de réplicas de três concentrações conhecidas, sendo uma baixa, uma média e uma alta (10, 50 e 100 µg/mL, respectivamente), avaliando o intervalo linear da curva analítica, expressas pelo desvio padrão relativo (DPR) e coeficiente de variação percentual (CV%):

Eq. (1)

$$CV\% = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração Média Determinada}} \times 100$$

5.1.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão foi avaliada através da análise das amostras de concentrações conhecidas em relação ao valor teórico verdadeiro, através das determinações de réplicas de três concentrações conhecidas, sendo uma baixa, uma média e uma alta (10, 50 e 100 µg/mL, respectivamente). Os resultados foram expressos pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, na forma de porcentagem de recuperação:

Eq.(2)

$$\% \text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100$$

5.1.6 Limites de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, já o limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada.

Para a análise dos limites LQ e LD foram utilizados padrões com concentrações de 0,10, 0,50, 0,80, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 µg/mL, e a partir dos resultados das áreas dos picos foi construída uma curva padrão. Através dos desvios padrão do intercepto e da inclinação da curva analítica, foi possível determinar os limites de quantificação e detecção. Os limites de quantificação e detecção foram determinados pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, a partir das equações:

Eq. (3)

$$LQ = \frac{\sigma}{b} \times 10$$

Eq. (4)

$$LD = \frac{\sigma}{b} \times 3,3$$

Onde:

σ = desvio padrão médio do intercepto y, ou coeficiente linear

b = inclinação da curva analítica, ou coeficiente angular

Para o cálculo das equações, os dados obtidos foram empregados no software Microcal Origin[®] para determinação das equações de LQ e LD. Utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica para o cálculo de LQ e LD é estatisticamente mais confiável (RIBANI *et al.*, 2004).

5.1.7 Robustez

Robustez mede a sensibilidade que o método em análise apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando o método permanece constante a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A fim de se obter esses resultados, alguns parâmetros da análise padrão foram alterados para verificar a influência de cada um desses fatores sobre a eluição do fármaco: i.) fluxo do aparelho de CLAE (0,700 e 0,900 mL/min); ii.) variação da temperatura da coluna (20 °C a 30 °C); iii.) proporção da fase móvel (59:41 e 61:39). Para essas análises, foram avaliados três réplicas dos padrões em três concentrações diferentes: baixa (10 µg/mL), média (50 µg/mL) e alta (100 µg/mL). O resultado da análise foi determinado pelo valor da porcentagem de recuperação, calculada pela seguinte equação:

Eq. (5)

$$\% \text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100$$

5.2 Metodologias de obtenção de Nanopartículas

5.2.1 Método de emulsificação-evaporação do solvente para obtenção de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo apocinina

As nanopartículas poliméricas foram preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente, a partir de uma emulsão simples óleo em água (O/A)

(VANDERHOFF; ELASSER; UGELSTAD, 1979; MAINARDES; EVANGELISTA, 2005; REIS *et al.*, 2006, RAO; GECKELER, 2011).

Partindo desse princípio, duas soluções foram preparadas e posteriormente misturadas, fase oleosa composta por solventes orgânicos e polímeros, e fase aquosa contendo apocinina e tensoativo a base de água. Os parâmetros fixos foram as quantidades de polímeros de PLA – PEG, tempo e potência de sonicação, 6 minutos à 50W. Já os parâmetros variáveis foram relacionados à escolha do solvente orgânico e porcentagem da solução de PVA, conforme mostra a Tabela 1 a seguir.

Tabela 1: Parâmetros variáveis na formulação de NP-PLA e NP-PLA-PEG pelo método de emulsificação-*evaporação O/A* do solvente.

Parâmetros	Variáveis	
	Solvente Orgânico	Tensoativo
	Diclorometano	PVA 1%
	Diclorometano + Acetato de etila	PVA 2%
	Diclorometano + Clorofórmio	---
	Clorofórmio	---
	Diclorometano + <i>n</i> -Hexano	---

Para a preparação de nanopartículas de polímeros sintéticos, 50 mg PLA (50 mg) ou PLA-PEG (50-10mg) foram primeiramente dissolvidos em 1,0 mL de diclorometano. Em seguida, 5 mg de apocinina em 1,0 mL de diferentes solventes orgânicos, em proporção 1:1 v/v. Para a formação de emulsão do tipo (O/A), a fase oleosa foi lentamente vertida à fase aquosa, de 10 mL de solução de PVA (1 ou 2% p/v), durante sonicação contínua por meio de sonificador ultrassônico acoplado a microponeta, a potência pré-estabelecida de 50W por 6 min.

Finalizado o processo de emulsificação, a emulsão resultante foi submetida à *evaporação* por meio de evaporador rotatório à pressão negativa durante cerca de 20 minutos a 37 °C, para remoção rápida do solvente orgânico da formulação e, conseqüentemente, solidificar o polímero, formando as nanopartículas contendo apocinina. Em seguida, o produto resultante da *rotaevaporação* foi submetido à ultracentrifugação (14.000 × g, 30 min, 4 °C) para separação da apocinina encapsulada

presente no precipitado da apocinina livre presente no sobrenadante. O sobrenadante foi separado e reservado. O precipitado foi lavado e ultracentrifugado uma vez com água ultrapura para remoção do tensoativo remanescente, e o sobrenadante das lavagens armazenado junto com o sobrenadante inicial. As nanopartículas presentes no precipitado foram ressuspensas em solução de sacarose 5%, congeladas por 24h, liofilizadas e mantidas em dessecador.

5.2.2 Método de coacervação para obtenção de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo apocinina

A preparação de nanopartículas de PLA e PLA-PEG por meio de coacervação foi realizada como descrita por Huang e colaboradores (1997), por técnica de coacervação em meio não aquoso, com adição de *não-solvente* (HUANG; CHUNG; TZENG, 1997). As formulações testadas estão representadas na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2: Parâmetros das formulações de NP-PLA e NP-PLA-PEG obtidas pelo método de coacervação.

Formulação*	Variáveis			
	PLA	PEG	Apocinina	DCM
C1	100 mg	--	20 mg	4,8 mL
C2	100 mg	20 mg	20 mg	5,6 mL

*n=3

Inicialmente, o PLA ou PLA-PEG foram dissolvidos em diclorometano, a fim de produzir uma solução 2,5% p/v. Usando um agitador magnético sob uma taxa de agitação de cerca de 500 rpm, 20 mg de apocinina foram suspensas na solução do polímero. Para induzir coacervação, um excesso de hexano foi adicionado gota a gota, cerca de 10-12 mL, o qual é um *não-solvente* do PLA, até a suspensão turvar. As partículas permaneceram sob agitação durante 90 min a fim de promover o endurecimento, em seguida ultracentrifugada ($14.000 \times g$, 30 min, 4 °C), o precipitado lavado com hexano e ultracentrifugado novamente. Após a separação final, as

micropartículas foram secas em estufa durante 12 h a 35 °C e mantidas em dessecador para as análises posteriores.

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

Nanopartículas BSA foram preparadas por técnica de coacervação por adição de *não-solvente* (WEBER *et al.*, 2000; LANGER *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2008). Nesta metodologia, testes preliminares foram realizados sem a modificação do pH (A_{SB} – *albumina sem base*), e em seguida em pH 9,0 (A_{CB} – *albumina com base*). As concentrações de albumina bovina (BSA) e apocinina foram constantes, e o volume de glutaraldeído 8% foi variado, conforme mostra a Tabela 3 e 4 abaixo:

Tabela 3: Parâmetros preliminares de formulações de NP-BSA contendo apocinina pelo método de coacervação, sem modificação do pH (pH 7,2 ± 0,2).

Parâmetros	Variáveis			
	Formulação*	BSA	Apocinina	Glutaraldeído 8%
	A1 _{SB}	100 mg	50 mg	0,2 µL/mg BSA

*n=3.

Tabela 4: Parâmetros empregados na formulação de NP-BSA contendo apocinina pelo método de coacervação, com variação do volume de glutaraldeído 8%.

Parâmetros	Variáveis			
	Formulação*	BSA	Apocinina	Glutaraldeído 8%
	A1 _{CB}	125 mg	75 mg	0,2 µL/mg BSA
	A2 _{CB}	125 mg	75 mg	0,4 µL/mg BSA
	A3 _{CB}	125 mg	75 mg	0,8 µL/mg BSA
	A4 _{CB}	125 mg	75 mg	1,6 µL/mg BSA

*n=3.

Primeiramente, 125 mg de BSA foram solubilizadas em 4,0 mL de água ultrapura, e 75 mg de apocinina foram solubilizadas em 2,0 mL de etanol. A dessolvatação foi conseguida após adição gota a gota da solução etanólica de apocinina mais cerca de 4 a 8 mL de etanol até a solução se tornar opalescente, sob agitação a 500 rpm com auxílio de agitador magnético em temperatura ambiente. Em seguida, para as formulações (A_{CB}), o pH foi modificado para cerca de 9,0 com solução de NaOH 0,1M. Depois do processo de dessolvatação, volumes predeterminados de glutaraldeído 8% foram adicionados para induzir a reticulação das partículas. O processo de reticulação foi efetuada sob agitação da suspensão por 24h em shaker (200 rpm) a 30 °C ± 1,0.

Para a preparação das nanopartículas vazias (NP-Branças), foi feita a dissolução de BSA em 4,0 mL de água e dessolvatação apenas com etanol (sem incorporação de apocinina), seguida de modificação do pH para 9,0 com solução de NaOH 0,1M e reticulação com glutaraldeído 8%. Os demais parâmetros foram iguais ao procedimento supracitado.

Em seguida, o produto resultante foi submetido à ultracentrifugação (14.000 × g, 30 min, 4 °C) para separação da apocinina encapsulada da apocinina livre. O sobrenadante foi separado e reservado. O precipitado foi lavado com água ultrapura e ultracentrifugado para remoção de glutaraldeído remanescente, e o sobrenadante da lavagem armazenado junto com o sobrenadante inicial. As nanopartículas presentes no precipitado foram ressuspensas em solução de sacarose 5%, congeladas por 24h e posteriormente liofilizadas. As nanopartículas liofilizadas ficaram mantidas em dessecador para as análises posteriores.

5.3 Caracterizações morfológica e físico-química das nanopartículas

5.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação

Uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação, na qual é determinada a concentração de droga livre presente na suspensão (CASTANHEIRAS, 2012). Desse modo, a quantidade de apocinina incorporada às nanopartículas foi verificada por análises indiretas, analisando o sobrenadante resultante do processo de ultracentrifugação do preparo das amostras, método pelo qual se determina a concentração de droga não-encapsulada às nanopartículas. O sobrenadante foi diluído em componente da fase móvel, acetonitrila na proporção 1:10 (NP-PLA e NP-PLA-

PEG) ou 1:100 (NP-BSA), filtrado em filtro de membrana de PVDF (0,22 μm , Millipore) e analisado utilizando CLAE. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de apocinina calculada a partir da equação da reta da curva analítica previamente determinada. A eficiência de encapsulação ($EE\%_{\text{ind}}$) foi determinada a partir da seguinte equação:

Eq. (6)

$$EE\%_{\text{ind}} = \frac{\text{Quantidade teórica de apocinina} - \text{Quantidade prática de apocinina}}{\text{Quantidade teórica de apocinina}} \times 100$$

5.3.2 Análise da distribuição do diâmetro médio da partícula e índice de polidispersidade

O diâmetro médio das nanopartículas, bem como seu índice de polidispersão, foram determinados por técnica de espectroscopia de correlação de fótons, conhecida também como *Dynamic light scattering* (DLS). Para isso, o liofilizado resultante das nanopartículas de apocinina foram diluídas em água ultrapurificada, com análises realizadas em triplicata. As análises foram realizadas com ângulo de espalhamento de 90°, temperatura em torno de 20 °C e comprimento de onda do laser igual a 532 nm, utilizando o equipamento Nanosizer Nano-ZS90 (Malvern). O diâmetro hidrodinâmico médio foi calculado a partir da intensidade de luz dispersa (r_h), com base na teoria movimento Browniano das partículas, através da equação de Einstein-Stokes:

Eq. (7)

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_h}$$

onde: K = constante de Boltzmann

T = temperatura absoluta

η = viscosidade do meio

r_h = raio hidrodinâmico

Partículas em meio líquido movem-se desordenadamente devido a colisões com as moléculas do meio disperso (movimento Browniano). Partículas menores tendem a

se movimentar mais rapidamente que partículas grandes, apresentando assim maior constante de difusão na equação de Einstein-Stokes (D). A medida da intensidade da luz espalhada por uma dispersão permite detectar e analisar esse movimento browniano das partículas (CASTANHEIRA, 2012).

5.3.3 Análise do potencial zeta – cargas de superfície

O potencial zeta (PZ) foi mensurado por espalhamento de luz eletroforético, *Electrophoretic Light Scattering*, utilizando o equipamento Nanosizer Nano-ZS90 (Malvern) com ângulo de 90° à temperatura de 20°C. As amostras dispersas em solução KCl e os valores potenciais foram calculados com média e DP das triplicatas, com valores de leituras de no mínimo 12 e máximo de 100 repetições.

5.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho (IV) fornece evidências de grupos funcionais dos compostos a serem analisados, auxiliando na caracterização dos compostos presentes nas nanopartículas, como a droga e polímero. Amostras de apocinina livre, polímero albumina, NP-Branças e NP-BSA contendo apocinina foram compactadas com brometo de potássio (KBr) através de compressão em prensa hidráulica para a formação das pastilhas, e submetidas à análise no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , em equipamento de espectrofotômetro de infravermelho Nicolet IR200 FT-IR (Thermo Scientific).

5.3.5 Difração de raios X (DRX)

A difração de raios X fornece informações importantes sobre composição de fase e cristalinidade (BEDÊ, 2010). As amostras de apocinina, albumina (BSA), a mistura física de ambas (MF-BSA-Apocinina) e NP-BSA carregadas com apocinina (NP-BSA-Apocinina) foram analisadas, utilizando radiação de $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, com corrente de 10 mA e tensão de 30 kV à temperatura ambiente. Os dados foram digitalizados por um detector que se move de 2θ com passo angular partir de 5° para 60°.

5.3.6 Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Neste ensaio é mensurada a alteração de energia fornecida às substâncias em teste em função da temperatura. Amostras de apocinina, albumina (BSA), mistura física (MF-BSA-Apocinina) e NP-BSA carregadas com apocinina (NP-BSA-Apocinina) foram pesadas em cadinho de alumínio (5 mg), seladas e submetidas a aquecimento sob atmosfera de nitrogênio, a temperatura entre 30 a 450 °C, razão de aquecimento de 10°C/min e com vazão de gás de arraste de 100mL/min. A temperatura de fusão foi determinada através do pico do sinal formado. A célula de DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrões de zinco e safira.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para determinação de Apocinina em nanopartículas – Resultado do procedimento de validação analítica

Apocinina tem espectro de absorção no UV-Vis na gama de 200-375nm, com evidências de picos em 203, 224, 275 e 304 nm (GONTER; TAKÁCS; WOJNÁROVITS, 2012; PETRÔNIO *et al.*, 2013). Deste modo, foi realizada leitura de solução padrão de apocinina em espectrofotômetro UV-Vis (Jasco), em varredura, para determinação do melhor pico de absorção. O comprimento de onda com melhor absorção foi determinado em 276 nm.

Em testes preliminares para determinação da fase móvel, foram utilizadas diferentes proporções de acetonitrila, metanol, água, e água com adição de ácido fosfórico 0,1% ou ácido acético 0,1%. Com a adição dos ácidos, houve melhora no alargamento da banda cromatográfica, de modo que sua apresentação tornou-se mais estreita e diminuição de caudamento. Conforme a troca de coluna de fase estacionária – C18 de 250 mm para C18 de 125 mm, de marcas distintas – a mesma fase móvel não manteve a eficiência e os picos de apocinina apresentaram-se diferentes. Dessa forma, fez-se uso da coluna de menor tamanho, e a fase móvel que formou o melhor cromatograma foi a combinação de acetonitrila: água e ácido acético à 0,1%.

Das proporções testadas da fase móvel escolhida, a proporção 60:40 (v/v) de acetonitrila:água e ácido acético à 0,1%, foi a que apresentou pico mais estreito e

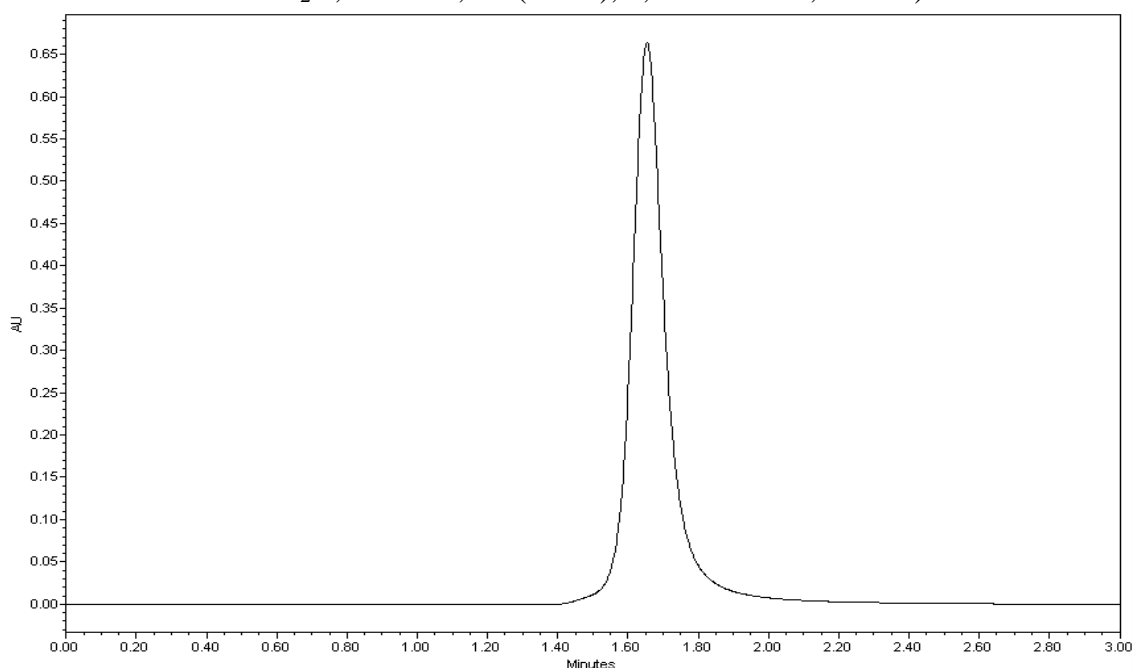
simétrico. Assim, as condições cromatográficas e a fase móvel foram os primeiros parâmetros a serem definidos, conforme mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Condições cromatográficas para validação analítica da apocinina.

Características	Condições
Absorvância	PDA, UV-Vis ($\lambda = 276 \text{ nm}$)
Fase Móvel	ACN: H ₂ O, AcOH 0,1% (60:40)
Fluxo	0,800 mL/min
Volume de injeção	20 μ L
Coluna Cromatográfica	C18 (125mm x 4mm, 5 μ m)

A fase móvel mostrou-se eficaz na quantificação da apocinina, uma vez que resultou em picos com alta absorção, simétricos e praticamente sem ruídos de base, conforme demonstra a Figura 10. O tempo de retenção do pico cromatográfico de apocinina foi de aproximadamente 1,638 minutos, com um tempo total de corrida de 3 minutos. O tempo de corrida reduzido é vantajoso para esta validação e posteriores leituras do sobrenadante das nanopartículas de apocinina.

Figura 10: Cromatograma da solução-padrão de apocinina 50 μ g/mL (Fase móvel: ACN:H₂O, AcOH 0,1% (60:40), 0,800 mL/min, 276nm).



O tempo de volume morto (T_M) foi calculado pela equação eq. (8) abaixo, o qual indica o tempo que o solvente leva para chegar ao detector. O T_M encontrado foi de 0,98 min. Neste caso, com tempo de retenção igual a 1,638 min, há diferença de 0,66 min entre tempo de retenção e T_M . Nota-se que não houve interferência deste parâmetro na corrida cromatográfica.

Eq. (8)

$$T_M = (r^2/1000) \times (3,1416/2) \times (C/\text{Fluxo})$$

Onde: r^2 = Raio da coluna elevado ao quadrado

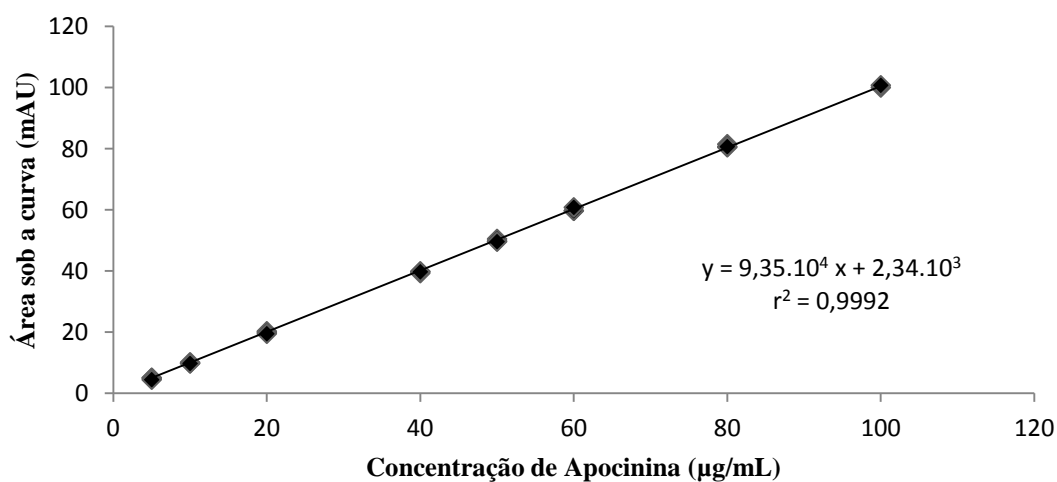
C = Comprimento da coluna em mm

Fluxo = Fluxo da análise em questão em mL/min

6.1.1 Linearidade

A linearidade do método analítico em CLAE foi confirmada através da obtenção da curva analítica, a partir dos oito níveis de concentração formadas por 5, 10, 20, 40, 50, 60, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta $y = 9,35.10^4 x + 2,34.10^3$ e o coeficiente de correlação (r^2) obtido foi de 0,9992, conforme mostra a Figura 11.

Figura 11: Curva analítica da área *versus* as concentrações da apocinina, obtida CLAE (Fase móvel: ACN:H₂O, AcOH 0,1% (60:40), 0,800 mL/min, 276nm).

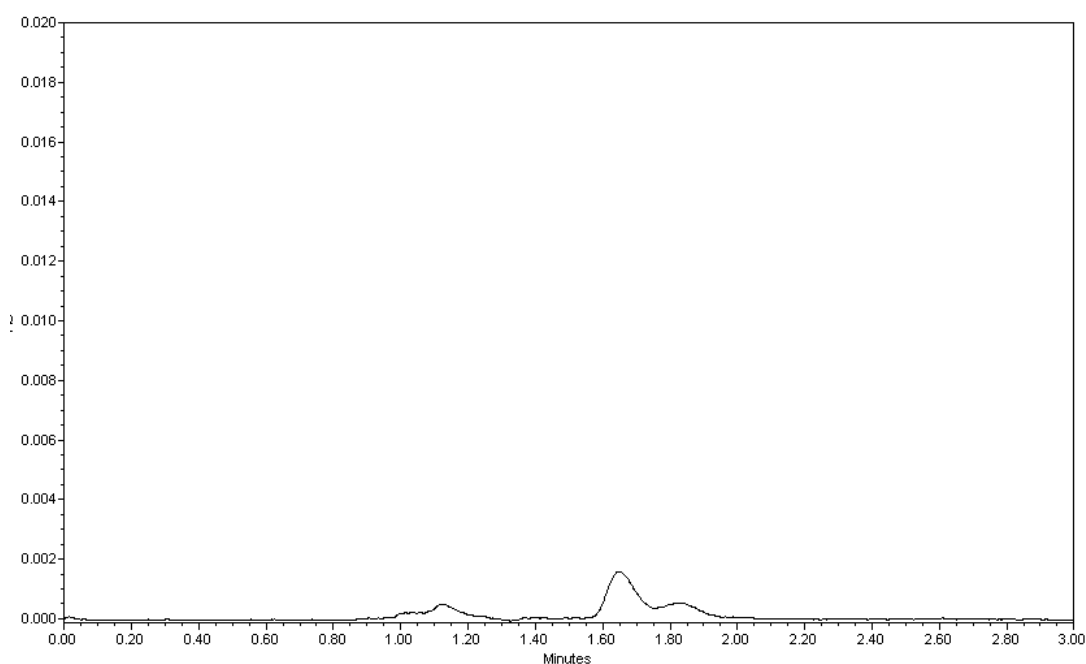


O resultado do coeficiente de correlação (r^2) é um parâmetro de grande valia por indicar a qualidade da curva analítica, sendo que quanto mais próximo a 1,0 menor a dispersão dos pontos experimentais e mais confiável será a determinação das concentrações da amostra no método cromatográfico já estabelecido (RIBANI *et al.*, 2004).

6.1.2 Especificidade

Para avaliar a especificidade e a seletividade, analisou-se se houve interferência dos componentes da formulação das nanopartículas no pico cromatográfico da apocinina, partindo do sobrenadante resultante do processo de separação das nanopartículas do fármaco livre. Para este fim, foram analisados o PVA, componente da formulação de NP-PLA e NP-PLA-PEG obtidas por emulsificação-*evaporação* do solvente, e albumina (BSA) para as NP-BSA obtidas por *coacervação*. A análise do sinal produzido pelo componente PVA (1%), em diluição 1:10, foi realizada comparando seu cromatograma (Figura 12) com os obtidos com a solução-padrão de apocinina.

Figura 12: Cromatograma da amostra de PVA 1%, diluição 1:10. (Fase móvel: ACN:H₂O, AcOH 0,1% (60:40), 0,800 mL/min, 276nm).

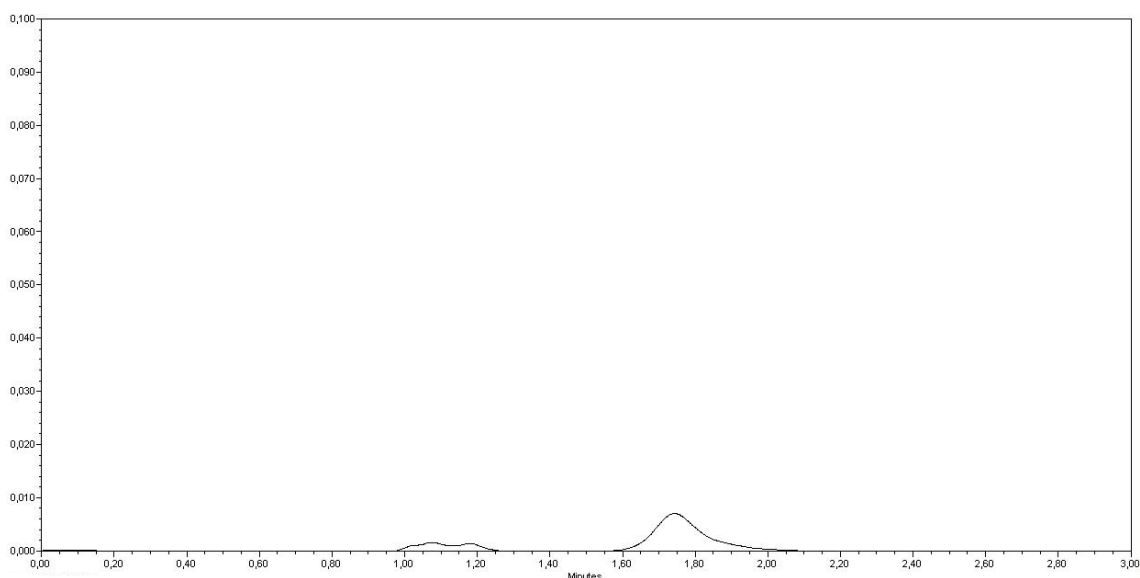


O pico da solução aquosa de PVA apareceu no mesmo tempo de retenção do pico da apocinina, analisados nas mesmas condições. Entretanto, para a determinação quantitativa da apocinina esse dado não foi considerado interferente da formulação, pois sua absorvância em comparação com a solução de 5 µg/mL de apocinina livre (ponto mais baixo da curva analítica), foi mínimo e não alterou quantitativamente a análise.

Para avaliar interferentes da formulação de NP-BSA por coacervação, o componente analisado foi a própria albumina de soro bovino, a partir de sobrenadante de nanopartículas brancas (sem apocinina) em diluição 1:100, a mesma diluição para quantificação de apocinina para cálculo da EE%. Assim como no teste do interferente PVA, a albumina também foi detectada durante as análises, como mostra a Figura 13.

A albumina bovina absorve na região de 190 a 200 nm devido às suas ligações peptídicas, em 280 a 300 nm por causa dos triptofanos e com absorção máxima em 276 nm, que se origina a partir da tirosina, as ligações dissulfeto e dos resíduos aromáticos do triptofano (FERREIRA, 2009; SINGH *et al.*, 2013). O máximo de absorção é comum ao da apocinina. Entretanto, a BSA é comumente submetida à fluorescência para sua detecção/quantificação, e contém dois resíduos de triptofano como fluoróforos (Trp-212 e Trp-134). Quando outras moléculas interagem com BSA, a fluorescência triptofano pode mudar dependendo do impacto dessa interação (ANIRUDHAN; REJEENA; THARUN, 2012), resultando em baixo nível de detecção. Assim, esse dado não foi considerado interferente quantitativo da formulação.

Figura 13: Cromatograma da amostra de albumina derivada de nanopartícula branca, diluição 1:100. (Fase móvel: ACN:H₂O, AcOH 0,1% (60:40), 0,800 mL/min, 276nm).



Quanto às condições de estresse, os padrões de apocinina (10, 50 e 100 µg/mL) foram analisados a fim de detectar eventuais picos interferentes, resultantes de possível degradação ou modificação estrutural da droga. Estes resultados foram dispostos na Tabela 6 e os respectivos cromatogramas nas Figuras 14, 15 e 16.

Tabela 6: Concentrações padrões de apocinina submetidas às condições de estresse.

Condições de Estresse	Recuperação (%) ± DPR*			
	10µg/mL	50µg/mL	100µg/mL	Média
Luz Visível	101,1 % ± 0,52	101,1% ± 0,59	100,79 % ± 0,53	100,99 %
Congelamento	103,4 % ± 1,19	102,1 % ± 0,19	100,7 % ± 0,34	102,06 %
NaOH	-	-	-	-
HCl	96,53 % ± 0,25	95,91 % ± 1,43	95,62 % ± 3,13	96,02 %
H ₂ O ₂	97,08 % ± 0,20	97,18 % ± 0,98	96,04 % ± 2,85	96,76 %

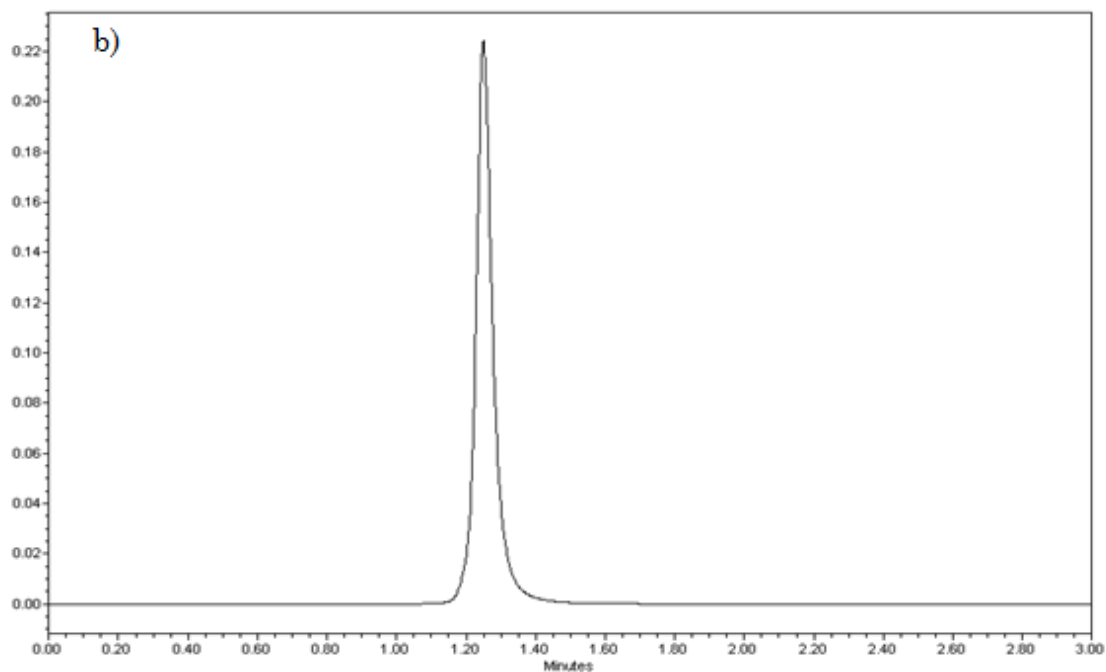
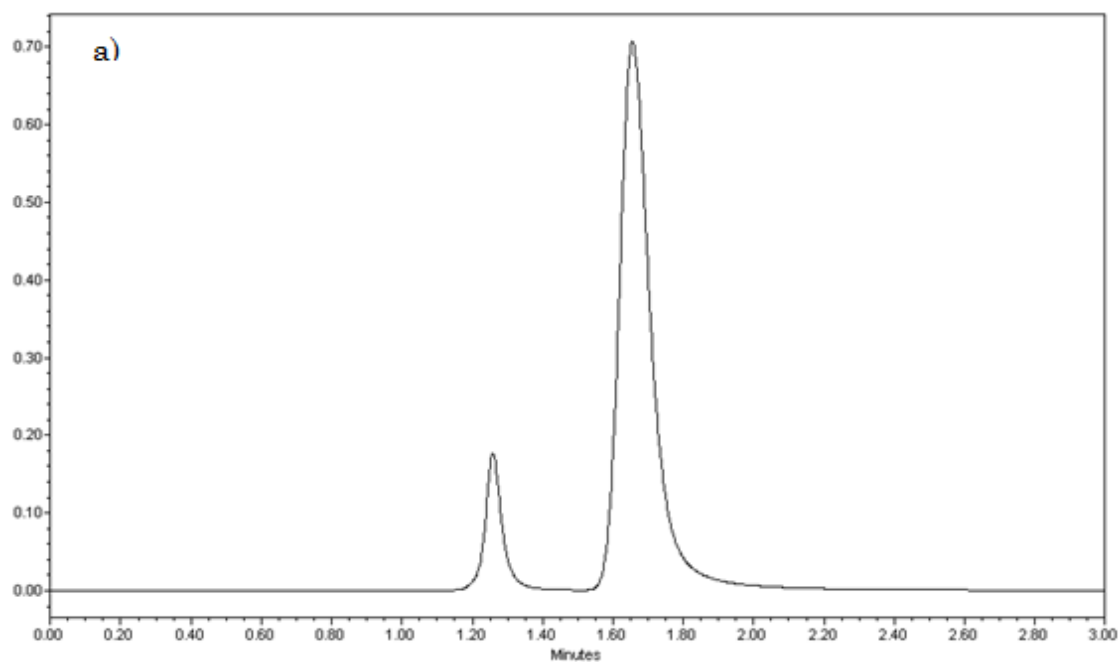
* DPR = Desvio Padrão Relativo (n = 3).

Dentre as condições analisadas, maior parte demonstrou baixa interferência na porcentagem de recuperação das amostras. Condições de estresse de exposição à luz visível e congelamento por 24 horas não afetaram o cromatograma da apocinina, confirmadas com porcentagem de recuperação próximas à 100%. Conclui-se assim, que estes parâmetros de estresse não causaram degradação detectável.

As amostras tratadas com H₂O₂ e HCl geraram mudanças mais significativas porcentagem de recuperação. Entretanto, ainda mantiveram-se dentro dos limites preconizados pela legislação regulatória (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

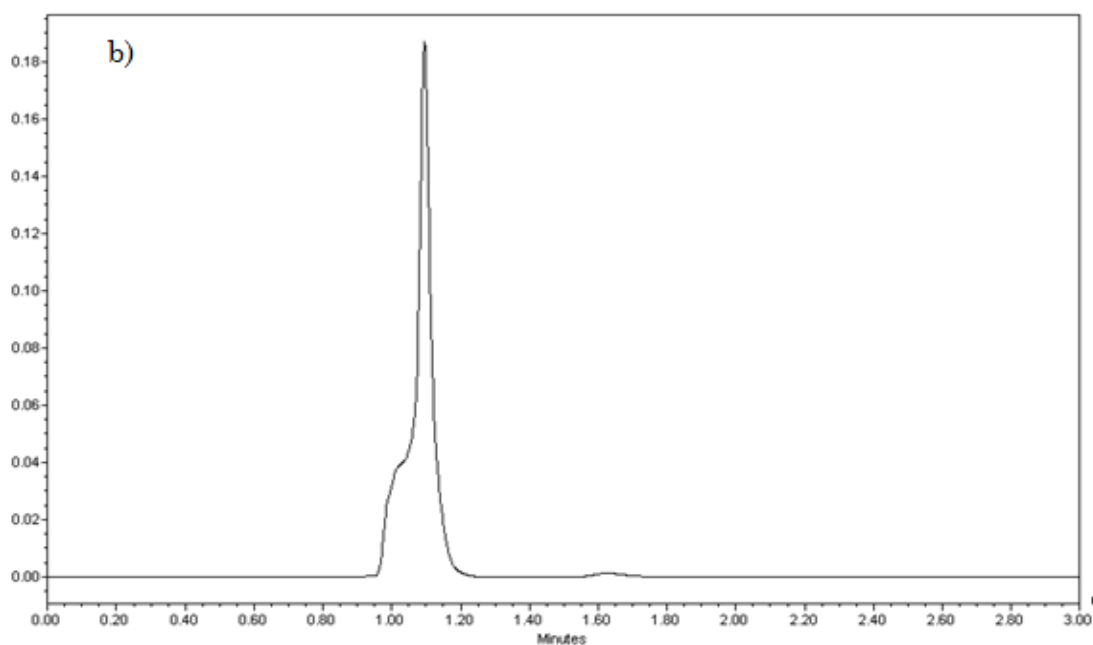
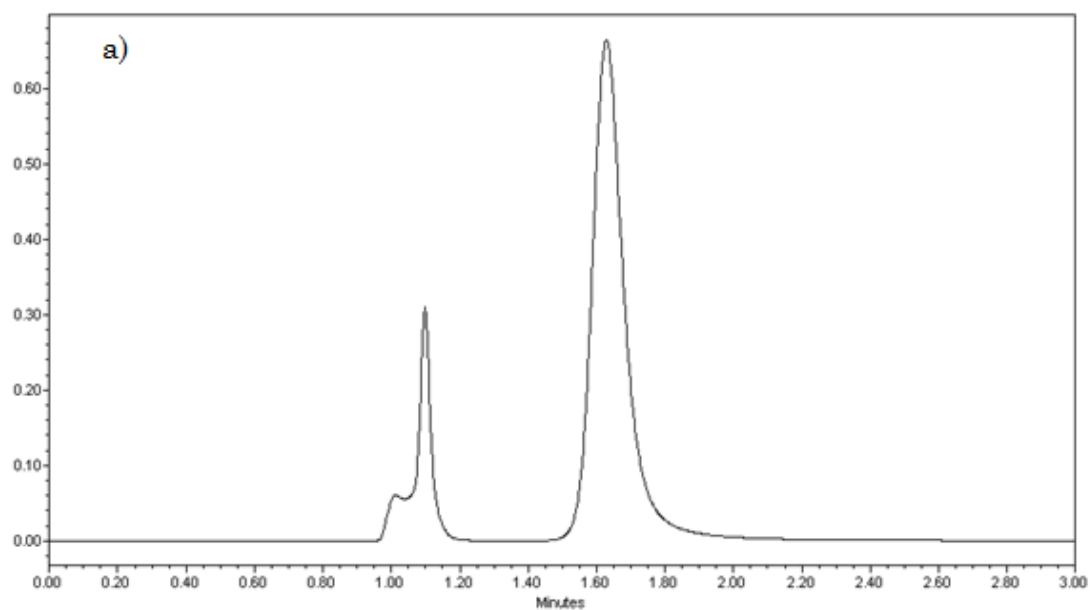
No cromatograma do padrão de apocinina sob estresse de oxidação por H₂O₂ (Figura 14 a) foi detectado outro pico no tempo de retenção, cerca 1,25 min. Entretanto, o mesmo foi caracterizado como o próprio peróxido quando feita a corrida deste livre do padrão de apocinina (Figura 14 b). Dado confirmado por ambos os picos apresentarem o mesmo tempo de retenção.

Figura 14: a) Cromatograma da solução de Apocinina 50 $\mu\text{g/mL}$ sob estresse de oxidação por H_2O_2 , por 1h. b): Cromatograma do H_2O_2 sem presença de apocinina.



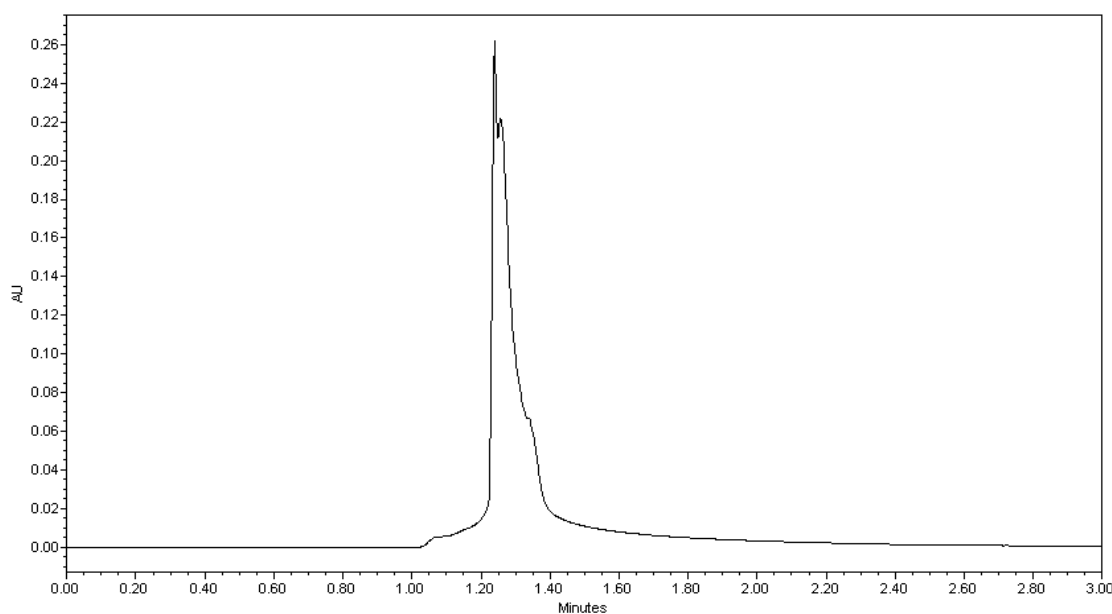
O mesmo foi observado quando as amostras foram submetidas a teste de modificação do pH com HCl 0,5M (Figura 15 a). O aparecimento de um pico adicional foi detectado na corrida cromatográfica, com tempo de retenção em aproximadamente 1,10 min o que corresponde ao próprio HCl , como demonstrando na Figura 15-b.

Figura 15: a) Cromatograma da solução de Apocinina 50 $\mu\text{g/mL}$ sob estresse com HCl 0,5M, por 1h. b) Cromatograma da solução HCl 0,5M.



Na leitura da amostra de apocinina submetida ao teste de pH envolvendo NaOH, não foi possível a detecção do padrão de apocinina, e houve o surgimento de pico inesperado (Figura 16).

Figura 16: Cromatograma da solução de apocinina 50 µg/mL sob estresse com NaOH 0,5M, por 1h



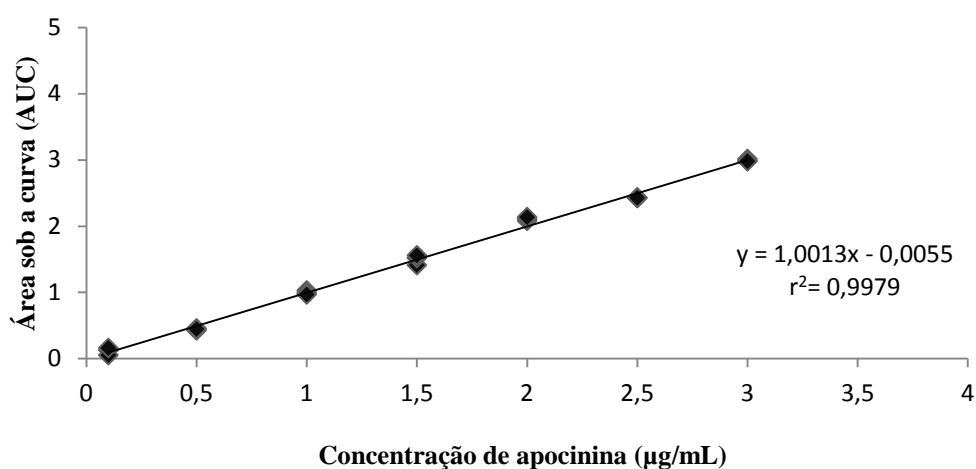
Quando adicionado hidróxido de sódio (NaOH) observa-se uma alteração do pico da droga, fato que pode ser atribuído a capacidade do NaOH em se dissociar em Na^+ e OH^- em meio aquoso. Dessa forma, possivelmente ocorre uma interação intermolecular do tipo ligação de pontes de hidrogênio entre a carbonila ($\text{O}=\text{C}$) da apocinina e o hidrogênio do grupamento hidroxila ($-\text{OH}$), modificando assim a estrutura e o cromatograma inicial da apocinina.

Os resultados da especificidade e seletividade atenderam às exigências preconizadas pela legislação vigente (ANVISA, 2003), com porcentagem recuperação próximas a 100%. Demonstraram que mesmo quando submetida ao processo de oxidação e hidrólise ácida a apocinina pôde ser quantificada mesmo com o surgimento de picos inesperados. A seletividade de um método instrumental visa avaliar as substâncias em estudo de forma inequívoca, mesmo na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação (RIBANI *et al.*, 2004). Dessa forma, pode-se observar que os componentes utilizados para verificação da estabilidade não interferiram na quantificação da apocinina.

6.1.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e LQ foram calculados a partir dos valores obtidos da regressão linear da curva de calibração (Figura 17), com os dados do desvio padrão médio do intercepto y (σ) e a inclinação da curva analítica (b), empregando as equações eq.3 e eq.4 do item 5.1.6. Os valores de LD e LQ foram de 78ng/mL e 238ng/mL, respectivamente.

Figura 17: Curva limite delineada para cálculo de limites de detecção e quantificação da apocinina.



LD e LQ correspondem à sensibilidade do método e confiabilidade para análises de baixas concentrações, Os valores encontrados foram considerados adequados visto sua finalidade, os testes de quantificação de apocinina no sobrenadante das nanopartículas.

6.1.4 Precisão

Os resultados da precisão são provenientes de dois níveis de avaliação: precisão intra-corrída e inter-corrída. Ambas as precisões foram estabelecidas a partir de nove determinações presentes na curva analítica padrão, réplicas de três concentrações diferentes: baixa (10 µg/mL), média (50 µg/mL) e alta (100 µg/mL). Os resultados estão dispostos na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7: Análise das precisões intra e inter-corridas, e seus respectivos CV% e DP.

Sol. Padrão µg/mL	Média da concentração	DP	CV%
Análise Intracorrida (n=3)			
10	10,447	0,018	0,17
50	51,117	0,117	0,23
100	100,575	0,174	0,17
Análise Intercorrida (n=3)			
1º Dia			
10	10,755	0,244	2,27
50	50,615	0,803	1,58
100	100,270	1,845	1,84
2º Dia			
10	10,420	0,039	0,38
50	50,560	0,756	1,49
100	100,491	1,217	1,21
3º Dia			
10	10,155	0,015	0,15
50	50,657	0,453	0,89
100	100,366	0,638	0,63

A precisão foi confirmada através dos valores do coeficiente de variação (CV%), que corresponderam ao requisito da resolução da ANVISA e guia ICH com CV inferior a 5% nos dois níveis de precisão avaliados.

6.1.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada, assim como no teste de precisão, através das determinações de réplicas de três concentrações conhecidas, sendo uma baixa, uma média e uma alta (10, 50 e 100 µg/mL, respectivamente). A exatidão pôde ser confirmada devido à proximidade dos valores obtidos em comparação aos valores teóricos, expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, com critério de aceitação em porcentagem de recuperação máximo de 5% (ANVISA, 2003). De acordo com a

legislação, os resultados mostram concordância entre os valores experimentais e teóricos, sendo assim um método exato, como demonstra a Tabela 8.

Tabela 8: Exatidão para os padrões de apocinina.

Solução Padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR*
10	104,43	2,86
50	101,22	1,32
100	100,37	1,22

* DPR = Desvio Padrão Relativo (n = 3).

6.1.6 Robustez

O método cromatográfico analítico foi submetido à pequenas alterações em seus parâmetros originais a fim de testar sua capacidade em resistir a essas variações sem grandes interferências na determinação e quantificação da droga estudada. As variações foram: alterações de proporções da fase móvel, no fluxo de vazão do aparelho e na temperatura da coluna. O resultado deste ensaio foi expresso por meio da percentagem de recuperação e desvio padrão relativo (DPR), como mostra a Tabela 9.

Tabela 9: Resultados das variações das condições cromatográficas para as diferentes concentrações de apocinina.

Variações	Recuperação (%) \pm DPR*		
	10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Fase Móvel (59:41)	99,9% \pm 0,3	99,1% \pm 0,3	99,7% \pm 0,3
Fase Móvel (61:39)	105,4% \pm 0,3	99,4% \pm 0,4	100,0% \pm 0,1
Fluxo 0,700 mL/mim	113,1% \pm 0,1**	107,2 % \pm 0,7**	108,3 % \pm 0,8**
Fluxo 0,900 mL/mim	90,2% \pm 0,1**	89,4 % \pm 0,2**	90,1 % \pm 0,1**
Temperatura forno 20 °C	101,3% \pm 2,0	100,1% \pm 2,0	100,9% \pm 1,0
Temperatura forno 30 °C	99,5% \pm 0,6	98,8% \pm 0,6	99,9% \pm 0,2

*DPR = Desvio Padrão Relativo (n = 3); ** *Data missing* durante análise cromatográfica, quantificação calculada através da área do pico.

As condições cromatográficas originais da metodologia analítica estão listadas na Tabela 1, e a partir desta, foram variados o fluxo, a temperatura e a proporção da fase móvel. Para fase móvel, a variação efetuada foi de 1% para as duas fases, acetonitrila e água (59:41 e 61:39), que resultou numa recuperação média de 99,6% e 101,6%, respectivamente. A temperatura foi alterada em 5 °C para mais e para menos, e resultou em percentagem de recuperação média das três concentrações de 100,76% para 20 °C e de 99,39% para 30 °C. Já o fluxo de corrida da fase móvel sofreu variação de 0,1 mL para mais e para menos, e apesar de uma pequena variação, o pico cromatográfico não foi encontrado para quantificação na curva analítica (*data missing*), sendo sua quantificação possível calculando-se a área do pico.

Quando usadas colunas de diâmetro mais estreito, a performance do sistema de distribuição de solvente em CLAE torna-se mais rigorosa graças as taxas de fluxo reduzidos. Nota-se assim, que pequenas alterações no fluxo são mais significativas no desempenho de colunas menores (WATERS, 2003).

Confirmou-se que o método analítico desenvolvido em CLAE pode ser considerado robusto, visto que foi capaz de manter sua resposta quantitativa da maior parte dos testes em relação aos dados originais, mesmo depois de pequenas e deliberadas alterações de análise.

6.2 Caracterizações da formulação ótima de nanopartícula de apocinina

6.2.1 Determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo apocinina através dos métodos de emulsificação-evaporação do solvente e coacervação em meio não aquoso

Os processos de obtenção de partículas de PLA e PLA-PEG foram realizados por duas formas distintas: método físico-mecânico e método físico-químico, por emulsificação-evaporação do solvente e coacervação, respectivamente (JYOTH *et al.*, 2010). Inicialmente, para o método de emulsificação-evaporação do solvente, as variáveis foram os solventes, o tensoativo e sua percentagem, conforme representado na Tabela 10. Foram quantificados os sobrenadantes das formulações F1 a F12 em CLAE. A eficiência de encapsulação (EE%) foi calculado conforme a eq. (6) da sessão 5.4.

Tabela 10: Disposição dos parâmetros das formulações de NP-PLA e NP-PLA-PEG obtidas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente.

Formulações*	Solventes (μL)				Tensoativo (%)
	DCM**	AE**	CLOR**	HEX**	PVA
F1	1000 μL	1000 μL	-	-	1%
F2	1000 μL	1000 μL	-	-	2%
F3	2000 μL	-	-	-	1%
F4	2000 μL	-	-	-	2%
F5	1000 μL	-	1000 μL	-	1%
F6	1000 μL	-	1000 μL	-	2%
F7	-	-	2000 μL	-	1%
F8	-	-	2000 μL	-	2%
F9	1000 μL	-	-	1000 μL	1%
F10	1000 μL	-	-	1000 μL	2%
F11	-	-	1000 μL	1000 μL	1%
F12	-	-	1000 μL	1000 μL	2%

* n=3, ** DCM: Diclorometano; AE: Acetato de Etila; CLOR: Clorofórmio; HEX: *n*-Hexano.

As formulações do método de emulsificação-evaporação do solvente foram desprezadas nesse primeiro momento, pois nenhuma das formulações apresentaram eficiência de encapsulação satisfatória, com EE% inferiores a 2% (dados não mostrados). Vários fatores podem ter influenciado no resultado final, dentre as possibilidades estão: a solubilidade do solvente orgânico em água, velocidade de evaporação do solvente, afinidade da droga com o polímero e solubilidade da droga na fase contínua (YEO; PARK, 2004).

Os polímeros que têm solubilidade relativamente elevadas em diclorometano levam mais tempo para solidificar, o que pode influenciar na baixa eficiência de encapsulação. Uma vez que os polímeros que têm maior solubilidade em diclorometano permaneceram mais tempo no estado semi-sólido, dessa forma a fase dispersa, no caso a água, pode se tornar mais concentrada antes de ser completamente solidificada (MEHTA *et al.*, 1996; JYOTH *et al.*, 2010). Quando a solidificação da fase dispersa é

lenta, a eficiência de encapsulação torna-se baixa, porque mais drogas difundem-se para a fase contínua (YEO; PARK, 2004). Da mesma forma, também foram testadas formulações com a dissolução do polímero em clorofórmio, mas o resultado, da mesma forma, foi de baixa eficiência. Solventes com menos afinidade pela água, como o caso do clorofórmio, necessitam de grande quantidade de água para a precipitação do polímero, e a droga pode ter sido perdido devida ao processo de solidificação (YEO; PARK, 2004).

Além disso, a apocinina é livremente solúvel nos solventes orgânicos testados (diclorometano, acetato de etila e clorofórmio), e apresenta um grau de polaridade que reduz a possibilidade da sua interação com o PLA. Com isso, mesmo que a apocinina tenha maior afinidade com a fase orgânica ($\log P 1,01 \pm 0,06$), é provável que ocorra a rápida saída do solvente para a fase aquosa no processo de emulsificação (SMITH; LUCHTEFELD, 2008; ALSHAMSAN, 2013). Com uso de um solvente miscível, a chance de difusão para a fase aquosa é ainda maior (JYOTH *et al.*, 2010).

A partir desses resultados, foi realizada então uma tentativa de formulação de emulsão composta a/o/a, sendo a fase oleosa de solvente orgânico o diclorometano. Entretanto, essas formulações são adequadas para compostos hidrofílicos, que não é o caso da apocinina. Visto isso, o método de emulsificação-*evaporação* com dupla emulsão também teve resultado insatisfatório para eficiência de encapsulação.

Foram realizados testes pelo método *coacervação* de PLA e PLA-PEG. Baseando-se no princípio de adição de um *não-solvente*, a promoção da formação do coacervado pela precipitação do polímero foi conseguindo pela adição de *n*-hexano, solvente este no qual o PLA não é solúvel, conforme metodologia de Huang e colaboradores (1997). A separação de fases em óleo pode ser utilizada na preparação de partículas de PLA/PLGA. Fármacos hidrossolúveis são dissolvidos em água e dispersos na solução orgânica do polímero e fármacos hidrofóbicos podem ser dissolvidos ou dispersos na mesma solução orgânica do polímero. Nesse último, para haver a separação de fases, é adicionado um *não-solvente* orgânico (JAIN, 2000).

Neste estudo, tratando-se da apocinina uma droga de baixa solubilidade em água, a apocinina e o polímero PLA ou PLA-PEG foram dissolvidas na mesma solução de diclorometano, e como *não-solvente* utilizou-se *n*-hexano. Os parâmetros de formulação e da EE% estão dispostos na Tabela 11. Foram quantificados os sobrenadantes das formulações C1 e C2 em CLAE. A eficiência de encapsulação (EE%) foi calculado conforme a eq. (6) da sessão 5.4.

Tabela 11: Resultados da EE% da formulação de NP-PLA e NP-PLA-PEG obtidas pelo método de coacervação.

Formulação*	Variáveis			EE%±DP
	PLA	PEG	Apocinina	
C1	100 mg	--	20 mg	31,1 ± 8,2
C2	100 mg	20 mg	20 mg	14,8 ± 4,8

*n=3; C1: NP-PLA contendo apocinina; C2: NP-PLA-PEG contendo apocinina.

As eficiências obtidas das formulações foram razoáveis quando comparadas a metodologia anterior, na qual a EE% foi desprezível. Esse aumento da EE% é possivelmente decorrente por esta metodologia de coacervação ser desenvolvida em meio não-aquoso e não haver processo mecânico, favorecendo assim o maior aprisionamento da droga no interior das partículas ou adsorvidas à sua superfície.

6.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas de albumina de soro bovino (BSA) contendo apocinina

Polímeros naturais geralmente são utilizados para produção de micro e nanopartículas pelos métodos de coacervação, gelificação iônica e *nano spray drying* (REIS *et al.*, 2006; ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). A coacervação é a técnica mais comumente utilizada para a produção de nanopartículas à base de albumina. A vantagem do método de coacervação em comparação a outras produções técnicas é o fácil processo de produção de nanopartículas com propriedades de liberação controlável da substância ativa (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012).

A escolha por coacervação induzida por etanol é comumente aplicada pela possibilidade de reduzir a toxicidade potencial de partículas devido à permanência de solventes (LUPPI *et al.*, 2011). A solubilidade do polímero natural albumina bovina (BSA) em água é elevada, ao passo que a solubilidade em etanol é relativamente baixa, o que favorece a formação dos coacervados (PAIK *et al.*, 2013). O agente coacervante muda progressivamente a estrutura terciária da proteína para gerar um material cada vez mais hidrofóbico, o que tende a formar os agregados de albumina pela dessolvatação. Estes coacervados são considerados instáveis e necessitam ser endurecidos por reticulação. A reticulação consiste na formação de ligações covalentes estáveis entre

segmentos de cadeias polipeptídicas dentro da proteína ou entre cadeias poliméricas - vizinhas, por ligações intermoleculares, formando uma estrutura em rede tridimensional, normalmente mais rígida que o material não reticulado (FAYAD, 2010; YEDOMON; FESSI; CHARCOSSET, 2013).

O processo de dessolvatação de albumina com solventes orgânicos, seguida pela reticulação com glutaraldeído é comumente utilizado para montar as nanopartículas de proteínas. A formação da película do coacervado é impulsionado pela diferença da tensão superficial entre a fase de coacervado, a água e o material hidrófobo (MARTINS *et al.*, 2014), promovendo assim maior estabilidade das partículas. Em estudo de Li e colaboradores (2008) a variação estudada do agente reticulante foi 0,54-1,16 μL de glutaraldeído 8% por mg de BSA (LI *et al.*, 2008). No presente estudo, foi avaliada a variação de 0,2-1,6 μL de glutaraldeído 8% por mg de BSA.

A obtenção de nanopartículas de BSA contendo apocinina foram realizados por coacervação por adição de *não-solvente*. Nesta metodologia, para um teste inicial foi elaborada uma formulação sem a modificação do pH ($A1_{SB}$), com massa total de 150 mg (100 mg BSA e 50 mg apocinina). O resultado de EE% está apresentado na Tabela 12.

Tabela 12: Resultado da EE% da formulação teste de NP-BSA contendo apocinina pelo método de coacervação, sem modificação do pH ($\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$).

Parâmetros	Variáveis				
	Formulação*	BSA	Apocinina	Glut. 8%	EE% \pm DP
	$A1_{SB}$	100 mg	50 mg	0,2 μL /mg BSA	17,9 \pm 7,8

n=3.

A eficiência de encapsulação obtida no modelo $A1_{SB}$ teve média de 17,9%. Tal resultado demonstrou a capacidade de internalização do composto nas nanopartículas de BSA por coacervação. Esse teste inicial foi realizado sem a modificação do pH pois a apocinina apresentou alteração no cromatograma ao teste de estresse referente à adição de NaOH, com formação de um subproduto (Figura 16, página 43).

Diante deste resultado, foram feitas novas formulações seguindo a metodologia original, com modificação do pH do meio aquoso para verificar se haveria ou não interferência do NaOH na quantificação do sobrenadante em CLAE e melhoramento na EE% (WEBER *et al.*, 2000; LANGER *et al.*, 2003). Os novos testes foram realizados à temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0$. As concentrações de albumina bovina e apocinina foram constantes, totalizando massa de 200mg (125mg BSA e 75mg apocinina) conforme especificado na sessão 5.2.3. Os resultados das EE% estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13: Parâmetros empregados na formulação de NP-BSA contendo apocinina pelo método de coacervação, com variação do volume de glutaraldeído 8%.

Parâmetros	Variáveis				
	Formulação*	BSA	Apocinina	Glut. 8%	EE% \pm DP
	A1 _{CB}	125 mg	75 mg	0,2 $\mu\text{L}/\text{mg}$ BSA	82,9 \pm 4,1
	A2 _{CB}	125 mg	75 mg	0,4 $\mu\text{L}/\text{mg}$ BSA	85,5 \pm 6,9
	A3 _{CB}	125 mg	75 mg	0,8 $\mu\text{L}/\text{mg}$ BSA	79,5 \pm 1,6
	A4 _{CB}	125 mg	75 mg	1,6 $\mu\text{L}/\text{mg}$ BSA	87,9 \pm 4,5

*n=3.

A leitura do sobrenadante das formulações A1_{CB} à A4_{CB} por CLAE não detectaram detecção deste subproduto, pois apesar da adição de NaOH 0,1M, a quantidade necessária para a modificação para pH 9,0 foi pequena e não foi capaz de influenciar na estrutura da apocinina.

Os valores de EE% encontrados no estudo pelo método da coacervação com albumina sofreram variações dependentes da combinação da modificação de alguns fatores: pH de 7,2 para 9,0 e aumento da massa total da suspensão de 150 mg para 200 mg. Nestas condições, os valores apresentaram EE% mínima de 17,9% e a máxima de 87,9%. Pode-se então perceber que a taxa de encapsulação das formulações A_{CB} foram maiores quando comparadas a formulação A_{SB}. As formulações A1_{CB} a A4_{CB}, nas quais foi variado o volume de glutaraldeído, não apresentaram diferença estatística entre elas referentes ao parâmetro de eficiência de encapsulação ($p > 0,05$).

O efeito do glutaraldeído foi estudado em outros trabalhos para avaliar sua influência sobre o tamanho da partícula e EE% em NP-HSA e NP-BSA (LANGER *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2008; RAHIMNEJAD; NAJAFPOUR; BAKERI, 2012). No estudo

de Li e colaboradores (2008), o aumento da quantidade de glutaraldeído reduziu a EE% de partículas de BSA. A diminuição da EE% foi atribuída à ligação acelerada por haver maior quantidade de glutaraldeído em solução. Desse modo, concluíram que o processo de dessolvatação deve ser realizado sob condições de neutralidade do meio, e somente depois disso o pH é modificado e adicionado o agente reticulante (LI *et al.*, 2008).

Através dos resultados apresentados na Tabela 13 nota-se que não houve interferência da concentração final de glutaraldeído no meio na EE% das partículas, justamente porque a metodologia aplicada obedeceu à ordem de adição dos componentes da formulação com modificação do pH para cerca de 9,0 apenas após finalizada o processo de dessolvatação.

A diferença de encapsulação encontrada entre os diferentes polímeros testados pode ser atribuída às propriedades físico-químicas e estruturais de cada um. A albumina é uma molécula polimérica de grande tamanho, e quando dispersa em um solvente adequado, forma solução coloidal que possui características especiais que as distinguem das soluções de moléculas pequenas (GÓES FILHO, 2005). Nanopartículas de albumina ganharam uma atenção considerável devido principalmente à sua elevada capacidade de ligar-se reversivelmente a uma grande variedade de substâncias ativas em função dos múltiplos sítios de ligação presentes na molécula de albumina. O elevado teor de aminoácidos, como lisina, arginina, aspartato e glutamato, faz das nanopartículas à base de albumina capazes de uma maior adsorção eletrostática de moléculas carregadas tanto positiva ou negativamente (KRATZ, 2008; JYOTH *et al.*, 2010; ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). E essa capacidade ligação favorece a melhor internalização de substância ativa ou sua adsorção à superfície das partículas.

6.2.3 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

Os testes de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta foram realizados nas formulações da metodologia de coacervação em função dos resultados satisfatórios do processo de EE% em comparação à metodologia de emulsificação-
evaporação do solvente. Os resultados estão discriminados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados obtidos sobre parâmetros de diâmetro médio, IP e distribuição dos tamanhos das formulações obtidas pelo método de coacervação de NP-PLA e NP-PLA-PEG (C1-C2) e NP-BSA (A1_{SB}, A1_{CB} – A4_{CB}).

Formulações	Diâmetro médio (nm) ± DP*	IP ± DP*	Distribuição do tamanho (nm)
C1	> 10.000	---	---
C2	> 10.000	---	---
A1 _{SB}	286,6 ± 41,0	0,371 ± 0,262	96,1% (253,2- 332,2); 3,9% (4.400)
A1 _{CB}	274,1 ± 95,1	0,370 ± 0,275	95,6% (200,3-381,3); 3,0% (66,9); 1,4% (5.010)
A2 _{CB}	185,9 ± 32,0	0,258 ± 0,171	97,3% (155,0-219,0); 2,7% (5.100-5.400)
A3 _{CB}	216,2 ± 79,1	0,226 ± 0,108	100% (125,8-272,7)
A4 _{CB}	159,3 ± 61,5	0,267 ± 0,052	96,0% (117,0-229,9); 2,2% (5.500); 1,8% (24,4)

* Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Os diâmetros médios obtidos para as formulações (C1) e (C2), NP-PLA e NP-PLA-PEG, foram superiores à 10µm. Os dados obtidos através do programa Zetasizer Software (Malvern®) não forneceram informações exatas sobre tamanho, IP e distribuição de tamanho destas partículas, pois a leitura exata de diâmetro médio é limitada a 10.000 nm. Para dados mais confiáveis quanto ao tamanho das partículas obtidas, outro método deverá ser utilizado, como microscopia eletrônica de varredura (MEV). Dessa forma, o tamanho das formulações C1 e C2 inviabiliza o objetivo do trabalho, que propõe o desenvolvimento de partículas em tamanho nanométrico. Já as formulações de NP-BSA (A1_{SB}, A1_{CB} – A4_{CB}) mantiveram-se dentro dos padrões pré-estabelecidos, com tamanho médio menor que 300 nm. As melhores formulações NP-BSA (A1_{CB} – A4_{CB}), com melhores EE% e diâmetro médio não apresentaram diferença estatística entre elas (p > 0,05).

O desenvolvimento de partículas menores que 300nm são preferencialmente produzidas por apresentarem perfis farmacocinéticos mais favoráveis, circulação sistêmica prolongada, cinética de liberação sustentada e direcionáveis aos locais de ação

desejados (KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002; ZHANG *et al.*, 2008). Dessa forma, os tamanhos das formulações testadas estão dentro dos padrões considerados ideais para seu desempenho farmacocinético.

Os fatores mais importantes que influenciam a estabilidade do sistema nanoparticulado por coacervação são o pH do meio e a velocidade de adição do agente de dessolvatação. O pH alcalino combinado com velocidades de adição de etanol entre 0,5 e 2,0 ml/min, são recomendadas para dessolvatação (LANGER *et al.*, 2003; KUFLEITNER; WOREK; KREUTER, 2010; ZHAPAROVA, 2012), de modo que o processo de dessolvatação em $\text{pH} \geq 8,0$ é capaz de gerar uma distribuição de tamanho quase monodispersas (LANGER *et al.*, 2003).

O índice de polidispersão reflete a homogeneidade do tamanho das nanopartículas presentes na suspensão, mostrando a formação de populações de partículas da amostra, de modo que se caracteriza como monodispersa quando o índice de polidispersão encontra-se em menor que 0,3, o que é considerada uma faixa estreita de tamanhos (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

As formulações A1_{SB} e A1_{CB} apresentaram tamanhos maiores que A2_{CB}, A3_{CB} e A4_{CB}, mais ainda permaneceram dentro dos padrões nanométricos. Com IP médio pouco superior a 0,3, entretanto com alta variação neste parâmetro ($DP = 0,262$ e $0,275$, respectivamente). Já as formulações com maior quantidade de glutaraldeído (A3_{CB} e A4_{CB}) mantiveram o IP médio menor que 0,3, demonstrando sua monodispersidade, além de resultar em menor tamanho médio, com valores entre 216,2 nm à 159,3 nm. Estes resultados estão de acordo com Li e colaboradores (2008), o qual atribuiu a redução no diâmetro das partículas ao grau de reticulação melhorado.

Por conseguinte, analisou-se o potencial zeta das formulações A1_{CB} à A4_{CB} (Tabela 15). O potencial zeta refere-se às interações eletrostáticas entre a partícula e o seu meio aquoso de dispersão, que adquirem uma carga elétrica em sua superfície. O PZ mede indiretamente a magnitude das forças de repulsão necessária para evitar a formação de aglomerados. O alto potencial zeta (>30 mV, em módulo) favorece a repulsão das partículas, o que ajuda a manter a monodispersidade. Quanto mais longe de zero, mais estável é considerada a substância na dispersão (HANS; LOWMAN, 2002; TRIERWEILER, 2009; CASTANHEIRA, 2012).

A média do PZ de todas as formulações testadas foi de $-22,5 \text{ mV} \pm 2,0$, semelhante aos trabalhos de Weber e colaboradores (2000) e Li e colaboradores (2008),

que obtiveram resultados de potencial zeta médio de -25 mV. Este resultado favorece a maior estabilidade das nanopartículas, reduzindo a chance de aglomeração entre elas.

Tabela 15: Resultado do pontencial zeta (PZ) das formulações NP-BSA (A1_{CB} – A4_{CB}).

Parâmetros	Variáveis		
	Formulação	Glut. 8%	PZ (mV) ± DP*
	A1 _{CB}	0,2 µL/mg BSA	22,5 ± 5,8
	A2 _{CB}	0,4 µL/mg BSA	21,3 ± 0,5
	A3 _{CB}	0,8 µL/mg BSA	22,9 ± 0,4
	A4 _{CB}	1,6 µL/mg BSA	23,2 ± 1,3

* Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n=3).

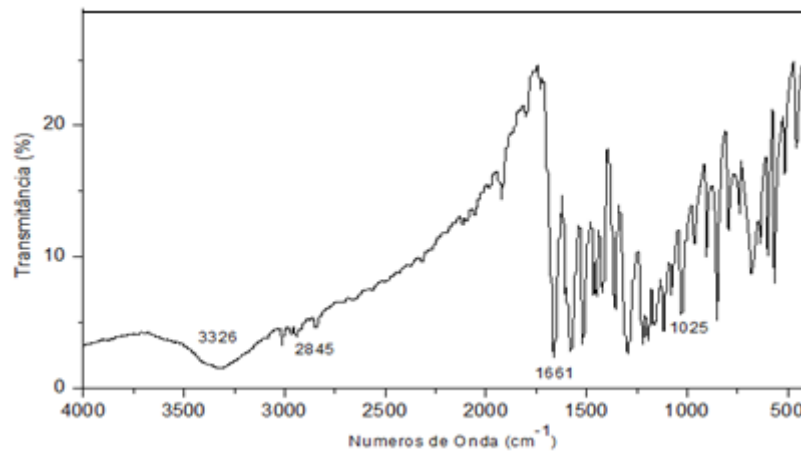
O valor do PZ das NP-BSA podem ser atribuídos ao valor do pH da suspensão de albumina, que também gera influência sobre a carga superficial das partículas. Em meio ácido o potencial zeta tende a ser positivo, e negativo em solução básica. Além disso, esta modificação de pH é necessária, pois nanopartículas de albumina tornam-se instáveis próximas do seu ponto isoelétrico (KUFLEITNER; WOREK; KREUTER, 2010; ZHAPAROVA, 2012). O ponto isoelétrico (pI) de 4,7 em água a 25 °C e, por isso, esperava-se que tenha carga negativa sob as condições experimentais (FERREIRA, 2009; SEZER *et al.*, 2011). A característica negativa da superfície das nanopartículas pode proporcionar maior tempo de permanência no sangue, já que partículas carregadas positivamente, muitas vezes exibem uma rápida depuração do sangue juntamente com uma elevada acumulação no pulmão e no fígado (LI; HUANG, 2008).

6.2.4 Espectros obtidos por espectroscopia na região do infravermelho

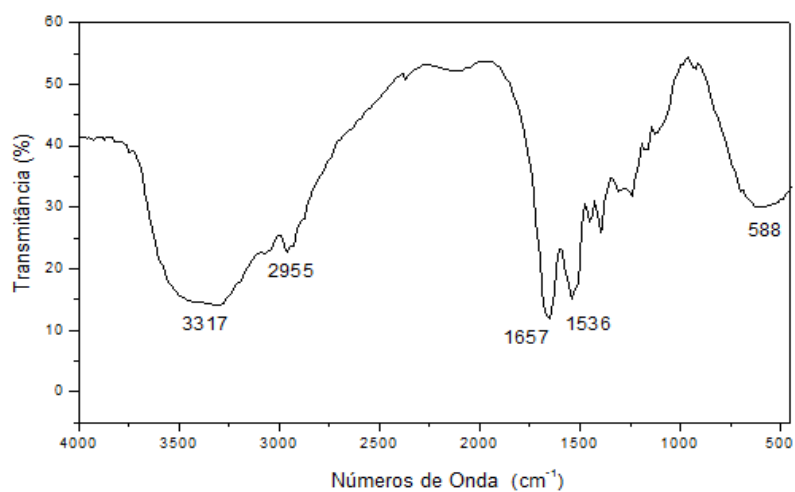
Os espectros no infravermelho (IV) fornecem evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. Esta técnica avaliou se o processo de nanoencapsulação modificou as características dos componentes da formulação, comparando-os quando puros, além da integridade do fármaco (MAINARDES, 2007). A Figura 18 apresenta os resultados do teste de IV da apocinina (a), BSA (b), da NP-Branca (c) e NP-BSA contendo apocinina (d).

Figura 18: Espectros das amostras na região do infravermelho: (a) Apocinina; (b) Albumina soro bovino, BSA; (c) NP-Branca; (d) NP-BSA contendo apocinina

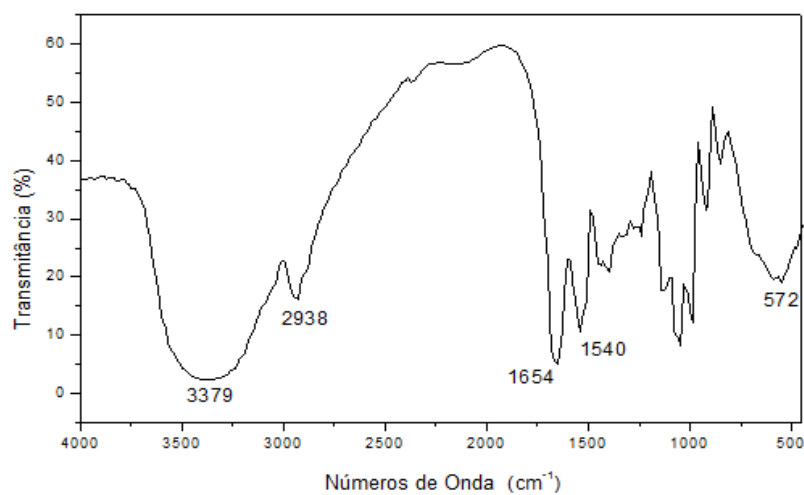
a) Apocinina



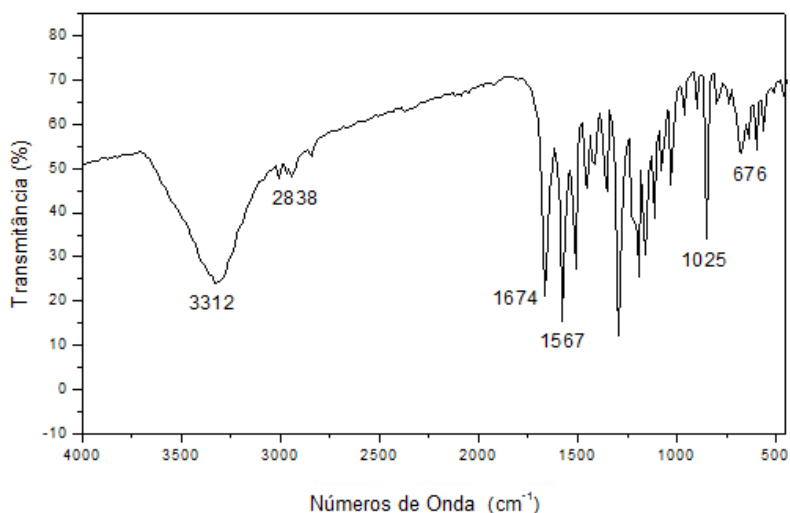
b) Albumina soro bovino, BSA



c) NP-Branca (sem apocinina)



d) NP-BSA contendo apocinina



O espectro de absorção na região do IV da apocinina (Figura 18 a) apresentou bandas de absorção em 1661 cm^{-1} , deformação axial de C=O de cetona conjugada, em frequência mais baixa do que a observada para cetonas alifática, 1714 cm^{-1} , devido à conjugação com o grupo fenila, outra banda em 1025 cm^{-1} por deformação axial simétrica de ligação C-O referente ao éter, e em 3326 cm^{-1} por deformação axial de -OH em ligação de hidrogênio referente ao grupo fenólico.

Na Figura 18 - (b) estão representadas as bandas de absorção da albumina (BSA). Tratando-se de uma proteína formada através de ligações covalentes de diversificados aminoácidos, sugere-se em 3317 cm^{-1} uma banda referente à deformação axial de N-H, de amida primária em ligação de hidrogênio. Bandas de superposição, em 1657 cm^{-1} deformação axial de C=O da banda de amida I e em 1536 cm^{-1} deformação angular de N-H de banda de amida II. Em 588 cm^{-1} há ocorrência de deformação angular simétrica fora do plano.

No espectro de NP-Branca, livre de apocinina (Figura 18 c), nota-se apenas a presença das bandas características da BSA. Já na análise do espectro da NP-BSA contendo apocinina (Figura 18 d), pode-se observar banda de absorção em 3312 cm^{-1} podendo ser atribuída a deformação axial de -OH referente ao grupo fenólico da apocinina e a deformação axial de N-H, de amida primária em ligação de hidrogênio da albumina. Em 1674 cm^{-1} referente deformação axial de C=O referente à banda de amida I da albumina e de deformação axial de C=O de cetona conjugada da apocinina. Em 1567 cm^{-1} deformação angular de N-H de banda de amida II da albumina. Em 1025 cm^{-1}

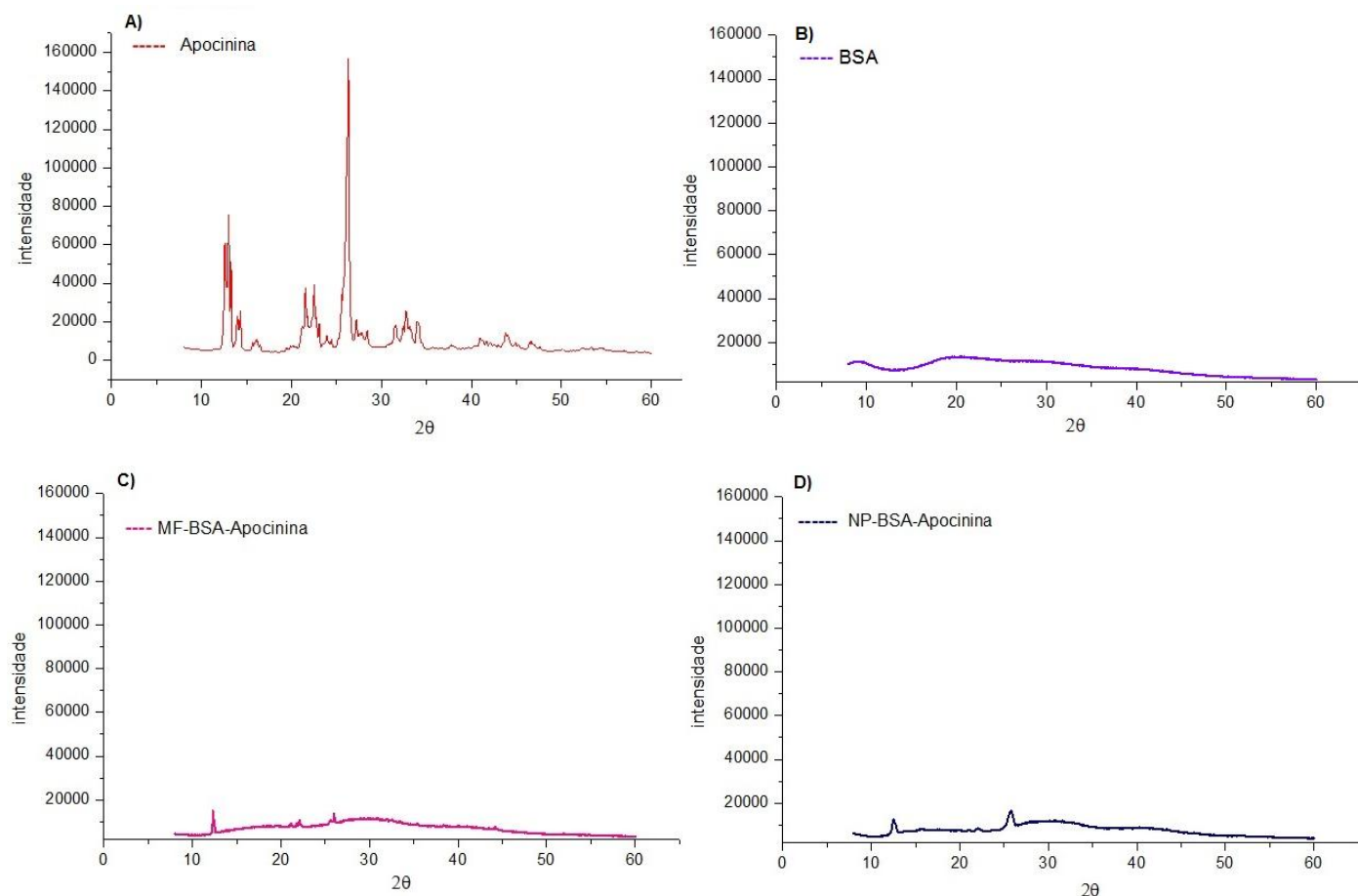
deformação axial simétrica de ligação C-O referente ao éter da apocinina. Em 676 cm^{-1} referente deformação angular fora simétrica fora do plano presente na albumina.

6.2.5 Difractogramas obtidos no teste de DRX

A difração de raios X é um método eficaz para o estudo de materiais de tamanho nanométrico. Difractogramas de nanomateriais fornecem informações importantes referentes às interações entre o polímero e a substância ativa, bem como o estado físico da formulação. Identifica e fornece informações quanto ao estado de ordenação da matéria sólida, se é cristalina ou amorfa (BEDÊ, 2010; ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2010). A Figura 19 mostra os difratogramas de DRX das amostras de apocinina livre (a); Albumina soro bovino, BSA (b); Mistura física de BSA e apocinina (MF-BSA-Apocinina) em proporção 1,66:1 p/p; (c); NP-BSA contendo apocinina (d).

A apocinina apresenta estrutura altamente cristalina, caracterizada pelos intensos picos pontiagudos em seu difratograma (Figura 19 a). Já a BSA (Figura 19 b) mostrou bandas sem picos pontiagudos, devido à sua natureza amorfa. A MF (Figura 19 c) demonstrou ambos os padrões, cristalino e amorfo, com as bandas de característica amorfa da BSA mantendo os picos menos definidos da droga. A intensidade dos picos pontiagudos de apocinina diminuiu drasticamente no difratograma da MF e NP (Figura 19 c,d). Há notável mudança no perfil de difração devido à característica da rede cristalina da apocinina livre para a presença de material mais amorfo das nanopartículas, que nesse caso, é consequência do complexo BSA-apocinina, gerado pela formação das nanopartículas. Também há pequeno grau de cristalização caracterizada pela interação fármaco-fármaco, presente no pico correspondente $2\theta = 12,6^\circ$ e $25,9^\circ$, a qual a imagem comprova a também presença da apocinina no polímero (Figura 19 c) e (Figura 19 d). Dessa forma, conclui-se que houve diminuição do grau de cristalinidade do composto ativo, com maior tendência ao estado amorfo do sistema nanoparticulado.

Figura 19: Difratogramas obtidos por DRX: (a) Apocinina, (b) BSA, (c) Mistura física de BSA e apocinina, (d) NP-BSA contendo apocinina.



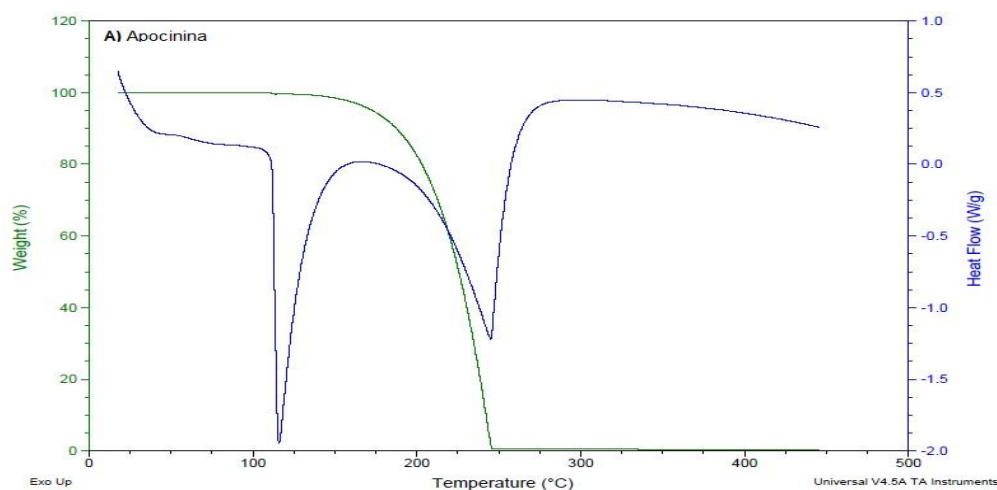
Materiais em estado sólido podem apresentar características cristalinas, amorfas ou ambas. Um cristal tem um ordenado arranjo de moléculas e átomos, mantido em contato através interações não-covalentes, enquanto nos sólidos amorfos estão ordenados aleatoriamente. Estas características influenciam diretamente no processo de absorção das substâncias ativas, de modo que os sólidos amorfos apresentam melhor solubilidade quando comparados à forma cristalina, graças à baixa energia necessária para separá-los (STULZER *et al.*, 2009). Portanto, a droga em estado amorfo é teoricamente a preferido ao estado cristalino em termos de propriedades de dissolução. No presente estudo, é possível observar a tendência de amorficidade do material nanoparticulado, com notória diminuição do estado cristalino da apocinina quando no estado livre. E para manter-se nesse estado, a nanopartícula em pó seco, quando obtida por liofilização, ajuda a formulação a permanecer-se estável por mais tempo (GAO *et al.*, 2008).

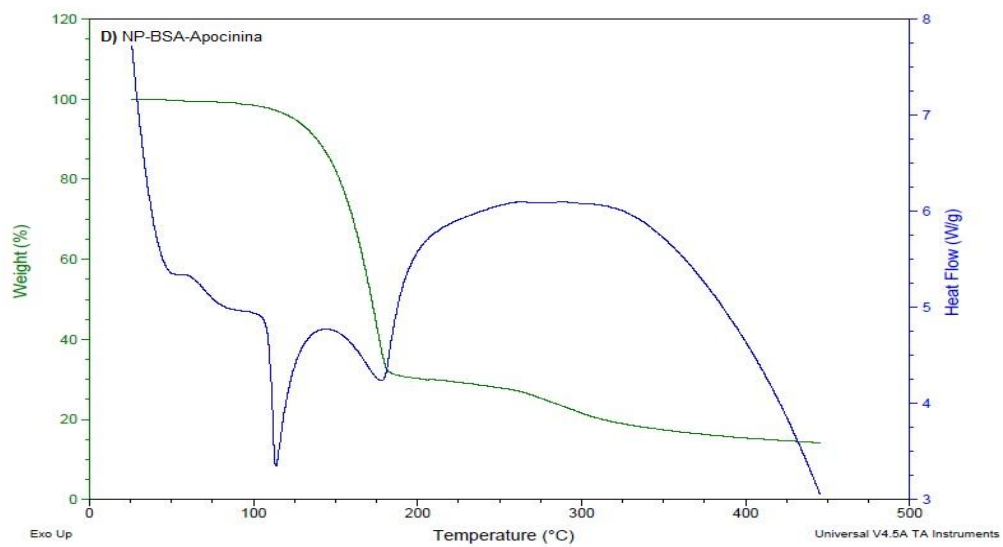
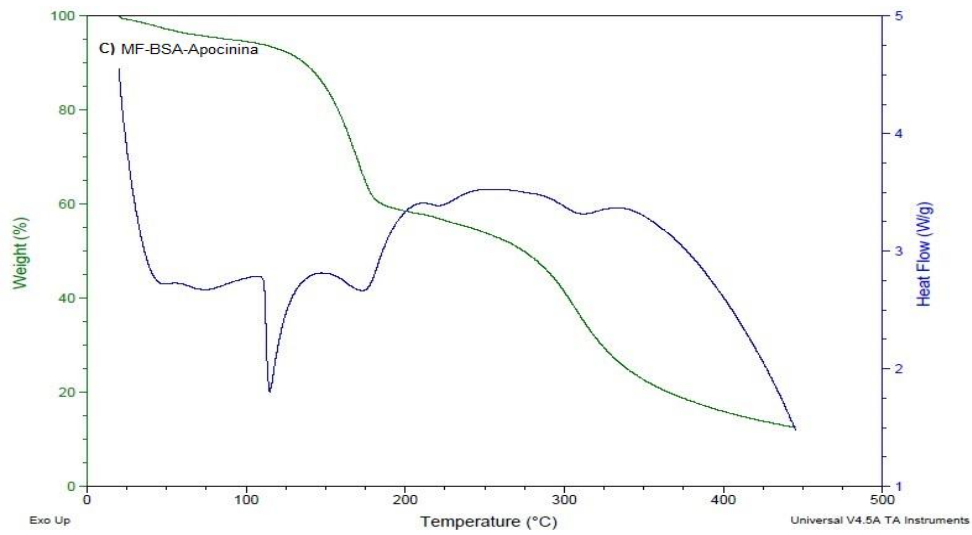
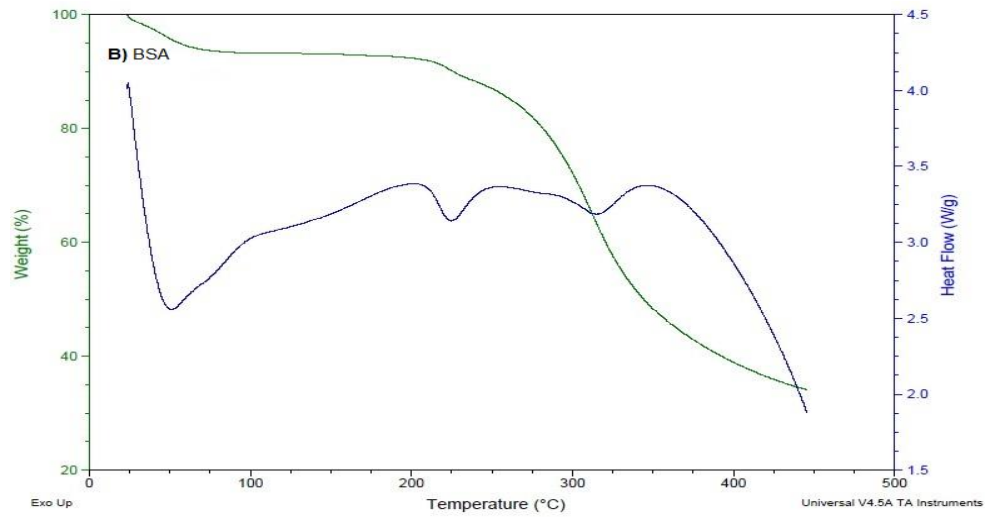
6.2.6 Termogramas obtidos pelo teste de DSC

O método termo-analítico de calorimetria exploratória diferencial (DSC - *Differential Scanning Calorimetry*) é de grande utilidade para a análise de polímeros utilizados no processo de nanoencapsulação (VERGER *et al.*, 1998), o qual acompanha a variação da entalpia, envolvido em transições endotérmicas ou exotérmicas, entre a amostra e a referência durante o processo de aquecimento/resfriamento simultâneo (BERNAL *et al.*, 2002; GIRON, 2002). Essa variação das transições de calor fornece informações quanto às propriedades físicas e energéticas do material.

As principais aplicações estão em medições e avaliações de mudanças físicas ou reações químicas, como a determinação da faixa de fusão, mudanças de fase cristalina e transições vítreas, ou decomposição e oxidação (GIRON, 2002). A análise por DSC foi usada para detectar alterações no estado físico da apocinina nas nanopartículas. A Figura 20 mostra os termogramas obtidos.

Figura 20: Termogramas DSC: a) Apocinina, b) Albumina soro bovino, BSA, c) Mistura física BSA e apocinina (1,66:1 p/p), d) NP-BSA contendo apocinina.





Como mostrado na Figura 20 - (a), o pico de fusão endotérmico característico da apocinina foi gravado em 117 °C e em 252 °C, enquanto BSA (Figura 20 b) o pico de fusão surgiu em 226 °C e em 318 °C. A mistura física (MF) mostrou ambas as características, com picos menos marcantes de apocinina e BSA. Do mesmo modo, na curva de DSC das nanopartículas permaneceram os picos da apocinina, entretanto os picos de fusão da BSA não estavam mais presentes. O que indica que o processo de nanoencapsulação não muda totalmente o estado físico da droga, mas diminui seu grau de cristalinidade. O deslocamento da curva de DSC da NP indicou uma perda de organização estrutural da proteína, provavelmente devido à formação de novas ligações entre as moléculas de albumina durante o processo de produção ou mesmo pela desnaturação durante o processo de análise por submissão ao calor (LUPPI *et al.*, 2011).

7 CONCLUSÃO

Do ponto de vista tecnológico, as nanopartículas de albumina ganharam atenção considerável como veículos de entrega de droga por apresentarem elevada capacidade de ligação aos múltiplos sítios presentes na molécula (KRATZ, 2008). Na área de micro e nanoencapsulação, a albumina é usada tanto como polímero principal para encapsulação ou revestimento para vetorização quanto para fármaco a ser encapsulado (REIS, 2007). Em função destas importantes propriedades, a albumina é um veículo para transporte de moléculas pouco solúveis no organismo, favorecendo assim, o uso como polímero para sistemas nanoparticulados.

Diante dos resultados apresentados quanto ao desenvolvimento de metodologias, produção de formulações e caracterizações das nanopartículas de PLA, PLA-PEG e BSA, é possível concluir que:

- O desenvolvimento de metodologia confiável e aplicável de validação analítica por CLAE com detector PDA para quantificação do composto apocinina nas nanopartículas, por mostrar-se específico, sensível, preciso e exato para os devidos fins;
- O desenvolvimento de protocolos de obtenção de nanopartículas poliméricas contendo apocinina, com a otimização das formulações por mudanças de polímeros e métodos de obtenção. Nanopartículas preparadas com polímeros sintéticos PLA e PLA-PEG pelo método de emulsificação-evaporação do solvente não mostraram boa

capacidade de encapsulação e aprisionamento do composto, com EE% inferiores à 2%. Este resultado possivelmente está relacionado com a baixa afinidade entre a droga e o polímero, além do possível escape da droga para a fase aquosa. Partículas preparadas com os mesmos polímeros pelo método de coacervação em meio não aquoso com adição de *n*-hexano como *não-solvente*, mostrou maior efetividade de encapsulação quando comparada com o método usualmente utilizado de emulsificação-evaporação do solvente, com média de encapsulação de partículas de PLA de 31,1% e PLA-PEG de 14,8%. Entretanto, as partículas não apresentaram tamanhos nanométricos, mas sim micrométricos (>10.000nm);

- Obtenção de nanopartículas poliméricas de BSA contendo apocinina através do método de coacervação por adição de etanol como *não-solvente*, com distribuições de tamanho e eficiência de encapsulação satisfatórios. É provável que os melhores resultados obtidos de EE% por esta metodologia esteja relacionado com a capacidade de ligação da albumina (BSA) com grande variedade de ligantes, por tratar-se de uma molécula polimérica de grande tamanho e conter vários sítios passíveis de realizar ligações intermoleculares;

- As nanopartículas poliméricas de BSA contendo apocinina apresentaram tamanho adequado, dentro dos padrões favoráveis para a melhor farmacocinética e absorção da droga, com tamanhos inferiores a 300 nm, média das melhores formulações de 159,3 nm à 216,2 nm (entre A2_{CB} e A4_{CB});

- As nanopartículas poliméricas de BSA contendo apocinina mostraram-se sensíveis a mudança de pH, com melhora dos seus parâmetros iniciais em pH \cong 9,0;

- Os testes de caracterização das nanopartículas (IV, DRX e DSC) mostraram que a apocinina estava presente nas NP-BSA, além estar representada a diminuição de sua característica cristalina original após o processo de encapsulação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLÉMANN, E.; LEROUX J. C.; GURNY, R. Polymeric nano-microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 171-189, 1998.

AHMAD, M. W.; KIM, C. R.; BAECK, J. S.; CHANG, Y.; KIM, T. J.; BAE, J. E.; CHAE, K. S.; LEE, G. H. Bovine serum albumin (BSA) and cleaved-BSA conjugated ultrasmall Gd₂O₃ nanoparticles: Synthesis, characterization, and application to MRI contrast agents. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 450, p. 67–75, 2014.

ALSHAMSAN, A. Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, *no prelo*, 2013.

AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; RENOIR, J.M. *In vitro* and *in vivo* biologic evaluation of long-circulating biodegradable drug carriers loaded with the pure antiestrogen RU 58668. **Internacional Journal of Cancer**, v. 106, p. 446-54, 2003.

ANIRUDHAN, T. S.; REJEENA, S. R.; THARUN, A. R. Preparation, characterization and adsorption behavior of tannin-modified poly(glycidylmethacrylate)-grafted zirconium oxide-densified cellulose for the selective separation of bovine serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 49– 58, 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasil. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Química nova**, v.30, p.1484-1490, 2007.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464– 1476, 1999.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 13-21, 2005.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **CMLS Celular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 21-37, 2003.

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

BEDÊ, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas**. 2010. 61f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2010.

BERNAL, C., COUTO, A. B., BREVIGLIERI, S. T., CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.

BUNGENBERG DE JONG, H. G.; KRUYT, H. R. Coacervation (partial miscibility in colloid systems), **Proceedings Royal Academy Amsterdam**, v. 32, p. 849–856, 1929.

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

CASTOR, L. R. G.; LOCATELLI, K. A.; XIMENES, V. F. Pro-oxidant activity of apocynin radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 1636–1643, 2010.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273–1335, 1998.

CHEN, H.; KHEMTONG, C.; YANG, X.; CHANG, X.; GAO, J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 7/8, 2011.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. 2010, Tese (Doutorado) - Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Coimbra, 2010.

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.

COTTER, M. A.; CAMERON, N.E. Effect of the NADPH oxidase inhibitor, apocynin, on peripheral nerve perfusion and function in diabetic rats. **Life Sciences**, v.73, p. 1813–1824, 2003.

COUVREUR, P. Targeting of drug and innovation in drug administration. **Biology of the Cell**, v. 91, p. 227-280, 1999.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, 2006.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, p. 135–146, 2010.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 53, p. 199–206, 2005.

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.

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

FAYAD, S. J. **Obtenção de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R.; PALLADINO, M. A.; LAM, K. S.; LLOYD, G. K.; POTTS, B. C. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.17, p. 2175–2180, 2009.

FERREIRA, E. S. **Interação da proteína albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. 2009. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2009.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. São Paulo: EDUSP, p. 479, 2003.

FRIEDLI, G-L. **Interaction of Deamidated Soluble Wheat Protein (SWP) With Other Food Proteins and Metals**. 1996. Tese (doutorado), University of Surrey, Guildford, Inglaterra, 1996.

GALINDO-RODRIGUEZ, S. A.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Polymeric Nanoparticles for Oral Delivery of Drugs and Vaccines: A Critical Evaluation of In Vivo Studies. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 22, n.5, p. 419–463, 2005.

GAO, L.; ZHANG, D.; CHAN, M. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. **J. Nanopart. Res.** v. 10, 845–862, 2008.

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

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, p. 335 - 357, 2002.

GÓES FILHO, L. S. **Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência**. 2005. 84p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica, PUC, Rio de Janeiro, 2005.

GONTER, K.; TAKÁCS, E.; WOJNÁROVITS, L. High-energy ionising radiation initiated decomposition of acetovanillone. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p. 1495–1498, 2012.

GOTO, P. L. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por polimerização *in situ* a partir de nanoemulsões produzidas por inversão de fases**. 2011. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, 2011.

GHOSH, S. K. Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective. In: _____ **Functional coatings: by polymer microencapsulation**, Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, p. 1-28, 2006.

GRAF, R.; DOMB, A.; QUELLEC, P.; BLUNK, T.; MÜLLER, R. H.; VERBAVATZ, J. M.; LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 215–223, 1995.

GRAF, R.; MINATAKE, Y.; PERACCHIA, M. T.; TRUBETSKOY, V.; TORCHILIM, V.; LANGER, R. Biodegradable long-circulation polymeric nanospheres. **Science**, v. 263, p. 1600-1603, 1994.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochemical Journal**, v. 386, p. 401–416, 2005.

GU, F.; XU, F.; TAN, L.; WU, H.; CHU, Z.; WANG, Q. Optimization of Enzymatic Process for Vanillin Extraction Using Response Surface Methodology. **Molecules**, v. 17, p. 8753-8761, 2012.

GUPTA, A. S. Nanomedicine approaches in vascular disease: a review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, p. 763–779, 2011.

GRIFFITHS, G.; NYSTRÖM, B.; SABLE, S. B.; KHULLER, G. K. Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 827-834, 2010.

HALLIDAY, A. J.; MOULTON, S. E.; WALLACE, G. G.; COOK, M. J. Novel methods of antiepileptic drug delivery — Polymer-based implants. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 953–964, 2012.

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.

HARPER, S.; USENKO, C.; HUTCHISON, J. E.; MADDUX, B. L. S.; TANGUAY, R. L. In vivo biodistribution and toxicity depends on nanomaterial composition, size, surface functionalisation and route of exposure. **Journal of Experimental Nanoscience**, v.3, n.3, p.195-206, 2008.

HARRIS, J. M.; MARTIN, N. E.; MODI, M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**, v.40, p. 539-551, 2001.

HARRIS, J. M.; CHESS R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 214-221, 2003.

HENTON, D. E.; GRUBER, P.; LUNT, J.; RANDALL, J. Polylactic acid technology. In:_____. **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites**, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, p. 527-577, 2005.

HERNANDES, M. S. **Geração de espécies reativas de oxigênio e neuroinflamação induzidas por enucleação ocular no sistema visual de ratos**. 2011. 155p. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

HEUMÜLLER, S.; WILD, S.; BARBOSA-SICARD, E.; SCHMIDT, H. H. H. W.; BUSSE, R.; SCHRÖDER, K.; BRANDES, R. P. Apocynin is not an inhibitor of vascular reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 5, p. 1-7, 2008.

HOUGEE, S.; HARTOG, A.; SANDERS, A.; GRAUS, Y. M. F.; HOIJER, M. A.; GARSSSEN, 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, n. 1–3, p. 264–269, 2006.

HOUSER, K. R.; JOHNSON, D. K.; ISHMAEL, F. T. Anti-inflammatory effects of methoxyphenolic compounds on human airway cells. **Journal of Inflammation**, v.9, n.6, 2012.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, v.75, p. R50–57, 2010.

HUANG, Y-Y.; CHUNG, T-W., TZENG, T-W. Drug release from PLA:PEG microparticulates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 156, p. 9–15, 1997.

HURYN, D. M.; WIPF, P. Natural product chemistry and anticancer drug discovery. In: Stephen Neidle. **Cancer drug design and discovery**. p. 107-130, 2008.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **Q2B – validation of Analytical procedures: methodology**, 2005.

IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry. **Compendium of Chemical Terminology** - Gold Book, version 2.3.3, p.282, 2014.

JAIN, J. P., KUMAR, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)3-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, p.456-465, 2010.

JEON, J. R.; MURUGESAN, K.; KIM, Y. M.; KIM, E. J.; CHANG, Y. S. Synergistic effect of laccase mediators on pentachlorophenol removal by *Ganoderma lucidum* laccase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 783–790, 2008.

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-methoxysubstituted catechols. **Endothelium**, v. 9, p. 191-203, 2002.

JYOTHI, N. V. N.; PRASANNA, P. M.; SAKARKAR, S. N.; PRABHA, K. S.; RAMAIAH, P.S.; SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, p. 187–197, 2010.

KANEGAE, M. P. P.; FONSECA, L. M.; BRUNETTI, I. L.; SILVA, S. O.; XIMENES, V. F. The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: Contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 457-464, 2007.

KIM, J. H.; JANG, B. G.; CHOI, B. Y.; KIM, Y. S.; SOHN, M.; CHUNG, T. N.; CHOI, H. C.; SONG, H. K.; SUH, S. W. Post-treatment of an NADPH oxidase inhibitor prevents seizure-induced neuronal death. **Brain Research**, v. 1499, p. 163-172, 2013.

KINOSHITA, H.; MATSUMURA, T.; ISHII, N.; FUKUDA, K.; SENOKUCHI, T.; MOTOSHIMA, H.; KONDO. T.; TAKETA. K.; KAWASAKI, S.; HANATANI, S.; TAKEYA, M.; NISHIKAWA, T.; ARAKI, E. Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by inactivation of macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 431, p. 124–130, 2013.

KLEES, R. F.; DE MARCO, P. C.; SALASZNYK, R. M.; AHUJA, D.; HOGG, M.; ANTONIOTTI, S.; KAMATH, L.; DORDICK, J. S.; PLOPPER, G. E. Apocynin Derivatives Interrupt Intracellular Signaling Resulting in Decreased Migration in Breast Cancer Cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2006, p. 1–10, 2006.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 239-252, 2002.

KUFLEITNER, J.; WOREK, F.; KREUTER, J. Incorporation of obidoxime into human serum albumin nanoparticles: optimization of preparation parameters for the development of a stable formulation. **Journal Microencapsulation**, v. 27, p. 594-601, 2010.

KULKARNI, R. K.; MOORE, E. G.; HEGYELI, A. F.; LEONARD, F. Biodegradable Poly(lactic acid) Polymers. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 5, p. 169-181, 1971.

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

LAMBETH, J. D.; KRAUSE, K. H.; CLARK, R. A. NOX enzymes as novel targets for drug development. **Seminars in Immunopathology**, v. 30, p. 339–363, 2008.

LANGER, K.; BALTHASAR, S.; VOGEL, V.; DINAUER, N.; VON BRIESEN, H.; SCHUBERT, D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, p. 169–180, 2003.

LI, F-G.; SU, H.; WANG, J.; LIU, J-Y.; ZHU, Q-G.; FEI, Y-B.; PAN, T-H.; HU, J-H. Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for liver targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, p. 274–282, 2008.

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

LIRDPRAPAMONGKOL, K.; KRAMB, J. P.; SUTHIPHONGCHAI, T.; SURARIT, R.; SRISOMSAP, C.; DANNHARDT, G.; SVASTI, J. Vanillin Suppresses Metastatic Potential of Human Cancer Cells through PI3K Inhibition and Decreases Angiogenesis *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3055–3063, 2009.

LU, X.; WAN, S.; JIANG, J.; JIANG, X.; YANG, W.; YU, P.; XU, L.; ZHANG, Z.; ZHANG, G.; SHAN, L.; WANG, Y. Synthesis and biological evaluations of novel apocynin analogues, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2691-2698, 2011.

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, n. 2, 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.

MAHON, E.; SALVATI, A.; BOMBELLI, F. B.; LYNCH, I.; DAWSON, K. A. Designing the nanoparticle– biomolecule interface for “targeting and therapeutic delivery”. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 164–174, 2012.

MAINARDES, R. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. 2007. 133 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C.; Praziquantel-loaded PLGA nanoparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, p. 13-24, 2005.

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

MARTINS, I. M.; BARREIRO, M. F.; COELHO, M.; RODRIGUES, A. E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p. 191–200, 2014.

MATTOS, A. C. **Desenvolvimento tecnológico de nanopartículas de pla e pla-peg contendo 5-fluorouracil, avaliação da citotoxicidade sobre células tumorais e farmacocinética pré-clínica**. 2013. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2013.

MEHTA, R.C.; THANOO, B. C.; DELUCA, P. P. Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly (D,L-lactide-co-glycolide). **Journal Controlled Release**, v. 41, p. 249–257, 1996.

MEI, L.; ZHANG, Z.; ZHAO, L.; HUANG, L.; YANG, X. L.; TANG, J.; FENG, S. S. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 15, p. 880–890, 2013.

MILADI, K.; SFAR, S.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Drug carriers in osteoporosis: Preparation, drug encapsulation and applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 445, p.181– 195, 2013.

MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research*, v. 42, p. 463-478, 2003.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.5, n.1, p. 561-573, 2006.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MUZAFFAR, S.; SHUKLA, N.; JEREMY, J. Y. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase: a promiscuous therapeutic target for cardiovascular drugs?. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 15, p. 278–282, 2005.

NAIR, H. B.; SUNG, B.; YADAV, V. R.; KANNAPPAN, R.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1833-1843, 2010.

NAM, S-J.; SOO OH, I. YOON, Y. H.; KWON, B. I.; KANG, W.; KIM, H. J.; NAHM, S. H.; CHOI, Y-H.; LEE, S-H.; RACANELLI, V.; SHIN, E-C. Apocynin regulates cytokine production of CD8+ T cells. **Clinical and Experimental Medicine**, 2013.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quimica Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

OWENS III, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonizations, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 93-102, 2006.

PAIK, S-Y-R.; NGUYEN, H. H.; RYU, J.; CHE, J-H.; KANG, T. S.; LEE, J. K.; SONG, C. W.; KO, S. Robust size control of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by intermittent addition of a desolvating agent and the particle formation mechanism. **Food Chemistry**, v.141, p. 695–701, 2013.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, p. 147-166, 2012.

PATERNITI, I.; GALUPPO, M.; MAZZON, E.; IMPELLIZZERI, D.; ESPOSITO, E.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. Protective effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase activity, in splanchnic artery occlusion and reperfusion. **Journal of Leukocyte Biology**, v.88, p. 993–1003, 2010.

PATHAK, Y.; THASSU, D. Drug Delivery Nanoparticles – Formulation and Characterization. **Informa Healthcare**: New York, v. 191, 2009.

PETERS, T., Jr. Serum Albumin. **Advances in Protein Chemistry**. v. 37, p. 161-245, 1985.

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.

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

RABÊLO, L. A.; SOUZA, V. N.; DA FONSECA, L. J. S.; SAMPAIO, W. O. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 94, p. 684-693, 2009.

RAHIMNEJAD, M.; NAJAFPOUR, G.; BAKERI, G. Investigation and modeling effective parameters influencing the size of BSA protein nanoparticles as colloidal carrier. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 412, p. 96– 100, 2012.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.

REIS, A. C. B. P. **Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/geleificação interna**. 2007. 620p. Dissertação (Doutorado) – Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia, Coimbra, 2007.

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

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIGANTI, C.; COSTAMAGNA, C.; BOSIA, A.; GHIGO, D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, p. 179–187, 2006.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SANCHO, P.; FABREGAT, I. The NADPH oxidase inhibitor VAS2870 impairs cell growth and enhances TGF- β -induced apoptosis of liver tumor cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, p. 917–924, 2011.

SANTAMARIA, A. Historical Overview of Nanotechnology and Nanotoxicology. In: _____. **Nanotoxicity: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, USA, v. 926, Cap.1, p. 1-12, 2012.

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

SCHECHTER, Y.; MIRONCHIK, M.; RUBINRAUT, S.; SAUL, A., TSUBERY, H.; FRIDKIN, M. Albumin-Insulin conjugate releasing insulin slowly under physiological conditions: a new concept for long- acting insulin. **Bioconjugate Chemistry**, v.16. p. 913-920, 2005.

SELEMIDIS, S., SOBEY, C. G.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H. H. H. W.; DRUMMOND, G. R. NADPH oxidases in the vasculature: Molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. **Pharmacology & Therapeutics**, v.120, p. 254–291, 2008.

SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B. Polímeros Sintéticos Biodegradáveis: Matérias-primas e Métodos de Produção de Micropartículas para uso em *Drug Delivery* e Liberação Controlada. **Polímeros**, v. 21, n. 4, p. 286-292, 2011.

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

SHIMOHAMA, S.; TANINO, H.; KAWAKAMI, N.; OKAMURA, N.; KODAMA, H.; YAMAGUCHI, T.; HAYAKAWA, T.; NUNOMURA, A.; CHIBA, S.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; FUJIMOTO, S. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, n. 1, p. 5-9, 2000.

SILVA, C; RIBEIRO, A; FERREIRA, D; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**.v.39, p. 1-30, 2003.

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

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

SINGH, S.; KAUR, R.; CHAHAL, J.; DEVI, P.; JAIN, D.V.S.; SINGLA, M. L. Conjugation of nano and quantum materials with bovine serum albumin (BSA) to study their biological potential. **Journal of Luminescence**, v.141, p. 53–59, 2013.

SMITH, R. E.; UCHTEFELD, R. An Evaluation of the Determination of the Lipophilicity of Apocynin and Diapocynin using HPLC. **LC GC Europe**, v. 21, 2008.

SODERGARD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science**, v. 27 p. 1123-1163, 2002.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, 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.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. **Apocynin: molecular aptitudes. Mediators of Inflammation**, v. 2008, p.1-10, 2008.

STOLK, J.; HILTERMAN, T. J.; DIJKMAN, J. H. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. **The American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.11, p. 95–102, 1994.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; PARIZE, A.L.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M.C.M. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, p. 387–392, 2009.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SUZUKI, S.; PITCHAKARN, P.; SATO S.; SHIRAI, T.; TAKAHASHI, S. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses progression of prostate cancer via Rac1 dephosphorylation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, p. 1035–1041, 2013.

TANG, X. N.; CAIRNS, B.; CAIRNS, N.; YENARI, M. A. Apocynin improves outcome in experimental stroke with a narrow dose range. **Neuroscience**, v.154, n.2, p.556-562, 2008.

THORLEY, A. J.; TETLEY, T. D. New perspectives in nanomedicine. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 140, p. 176–185, 2013.

TOBÍO, M.; SÁNCHEZ, A.; VILA, A.; SORIANO, I. I.; EVORA C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO MJ. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 18: p. 315-323, 2000.

TONG, R.; GABRIELSON, N. P.; FAN, T. M.; CHENG, J. Polymeric nanomedicines based on poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v.16, p. 323–332, 2012.

TOUYZ, R. M. Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. **Hypertension**, v. 51, p.172-174, 2008.

TRIERWEILER, L. F. **Nanopartículas: Como produzi-las em escala industrial**. 2009. Tese (Doutorado). 178 p. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

TSAI, C. Y.; WANG, C. C.; LAI, T. Y.; WAY, C. L.; TSU, H. N.; WANG, C. H.; KUO, W. W. Antioxidant effects of diallyl trisulfide on high glucose- induced apoptosis are mediated by the PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2 in cardiomyocytes. **International Journal of Cardiology**, v. 168, p. 1286-1297, 2013.

ULBRICHT, M. Advanced functional polymer membranes. **Polymer**, v. 47, p. 2217–2262, 2006.

US-FDA, United States Food and Drug Administration. **Guidance for industry, Analytical Procedures and Methods Validation**, 2000.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VAN DEN WORM, E. **Investigation of apocynin, a potent NADPH oxidase inhibitor**. 2001 (Dissertação PhD), Utrecht University, 2001.

VANDERHOFF. J. W.; ELASSER, M. S.; UGELSTAD, J. Polymer emulsification process. US Patent 4, 177, 1979.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200–208, 2011.

VERGER, M. L. L.; FLUCKIGER, L.; KIM, Y. I.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 46, p. 137-143, 1998.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.20, p.51-64, 2010.

WANG, K.; LI, L.; SONG, Y.; YE, X.; FU, S.; JIANG, J.; LI, S. Improvement of Pharmacokinetics Behavior of Apocynin by Nitron Derivatization: Comparative Pharmacokinetics of Nitron-Apocynin and its Parent Apocynin in Rats. **Plos one**, v. 8, n.7, p. 1-6, 2013.

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, Q.; TOMPKINS, K. D.; SIMONYIA, 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, Y-Y.; LAI, S. K.; SUK, J. S.; PACE, A.; CONE, R.; HANES, J. Addressing the PEG Mucoadhesivity Paradox to Engineer Nanoparticles that “Slip” through the Human Mucus Barrier. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, p. 9726–9729, 2008.

WATERS, Waters Corporation. Column Dimensions and Related HPLC Parameters: Flow rate reduction, solvent savings. Performances perspectives, USA, 2003. Disponível em: <<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wpp207.pdf>>. Acesso em 30 out 2013.

WEBER, C.; COESTER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 194, p. 91–102, 2000.

WU, D-C; RÉ, D. B.; NAGAI, M.; ISCHIROPOULOS, H.; PRZEDBORSKI, S. The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (PNAS)**, v. 103, n. 32, p. 12132-12137, 2006.

XIMENES, V. F.; KANEGAE, M. P.; RISSATO, S. R.; GALHIANE, 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.

XIONG, W.; MACTAGGART, J.; KNISPEN, R.; WORTH, J.; ZHU, Z.; LI, Y.; SUN, Y.; BAXTER, B. T.; JOHANNING, J. Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. **Atherosclerosis**, v. 202, p. 128–134, 2009.

YEDOMON, B.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C. Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: A new tool for large

scale production. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 398–405, 2013.

YEO, Y.; PARK, K. Control of Encapsulation Efficiency and Initial Burst in Polymeric Microparticle Systems. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2004.

ZHANG, L.; GU, F.X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clinical Pharmacology and Therapeutic**, v. 83, p. 761–769, 2008.

ZHANG, M.; SINGH, R. Mechanical Reinforcement of Unsaturated Polyester by Al_2O_3 Nanoparticles. **Materials Letters**, v.58, p. 408-412, 2004.

ZHANG, X. Q.; XU, X.; BERTRAND, N.; PRIDGEN, E.; SWAMI, A.; FAROKHZAD, O. C. Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 1363–1384, 2012.

ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p.104-120, 2013.

ZHAPAROVA, L. **Synthesis of nanoparticles and nanocapsules for controlled release of the antitumor drug “Arglabin” and antituberculosis drugs**. 2012. Tese (Doutorado), Eindhoven University of Technology, Eindhoven, 2012.