

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE
SUSPENSÕES E LIOFILIZADOS DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS PARA A VEICULAÇÃO DO
NEUROPROTETOR IDEBENONA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Martina Gehrke Brendle

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE
SUSPENSÕES E LIOFILIZADOS DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS PARA A VEICULAÇÃO DO
NEUROPROTETOR IDEBENONA**

Martina Gehrke Brendle

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Profa. Dra. Scheila Rezende Schaffazick

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gehrke Brendle, Martina

Desenvolvimento tecnológico de suspensões e liofilizados de nanocápsulas poliméricas para a veiculação do neuroprotetor idebenona / Martina Gehrke Brendle.-2013.

110 p.; 30cm

Orientadora: Scheila Rezende Schaffazick

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2013

1. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo idebenona 2. Estudos de estabilidade e fotoestabilidade 3. Análise de perfil de liberação 4. Liofilização das suspensões de nanocápsulas I. Rezende Schaffazick, Scheila II. Título.

**Universidade federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE
SUSPENSÕES E LIOFILIZADOS DE NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS PARA A VEICULAÇÃO DO
NEUROPROTETOR IDEBENONA**

elaborada por
Martina Gehrke Brendle

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Scheila Rezende Schaffazick, Prof^ª. Dr^ª
(Presidente/Orientadora)

Marta Palma Alves, Prof^ª. Dr^ª. (UNIFRA)

Andréa Inês Horn Adams, Prof^ª. Dr^ª. (UFSM)

Santa Maria, 30 de outubro de 2013.

*Dedico esta realização a Deus pela saúde, força e bem estar
proporcionados em toda a trajetória desse mestrado,
à minha família e amigos queridos
pela compreensão, atenção, carinho
e todas as palavras de motivação nos momentos difíceis.*

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus, através da fé tive força nos momentos difíceis e saúde para conseguir realizar as atividades de pesquisa de laboratório.
- A minha família, em especial, sempre foram muito atenciosos, proporcionando amor, carinho, compreensão, apoio e sustento para que eu pudesse realizar esse mestrado.
- Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de ensino e aprendizagem e conquista de mais um título.
- À professora Scheila Rezende Schaffazick pela oportunidade de trabalhar com pesquisa, pelo conhecimento transmitido, pelos conselhos, por me ajudar a trabalhar em equipe e por toda a atenção prestada durante esse trabalho.
- À Alessandra Lorenzoni, minha primeira IC, pela amizade, dedicação, pela paciência e comprometimento com o trabalho. Agradeço também a Maíra e ao Luiz Eduardo pela ajuda no laboratório.
- Aos amigos Aline, Dani, Isabel, Felipe, Letícia, Sabrina, Luana, Mônica, Juli, Náthi, e demais colegas de laboratório, pela amizade, companheirismo, conhecimento compartilhado e momentos de descontração.
- Aos amigos de Santa Maria como a Cristiane, Carine, Franciele e Juliane pela amizade, força, companheirismo e pelos conselhos nos momentos difíceis.
- Agradeço ao meu irmão Leandro pela convivência em Santa Maria, pela força, pelos conselhos e pela paciência.
- À professora Letícia pelas ideias e conversas em relação ao meu trabalho e apoio ao andamento das atividades no laboratório.
- À professora Cristine de Bona da Silva, Roseane Fagundes Ribeiro e Juliane Matiazzi pelas análises realizadas no equipamento Zetasizer.
- Aos demais professores, colegas e funcionários da Universidade que de alguma forma prestaram uma atenção ou auxílio para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE SUSPENSÕES E LIOFILIZADOS DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS PARA A VEICULAÇÃO DO NEUROPROTETOR IDEBENONA

AÚTORA: MARTINA GEHRKE BRENDLE

ORIENTADORA: SCHEILA REZENDE SCHAFFAZICK

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de outubro de 2013.

A idebenona é um antioxidante, derivado sintético da coenzima Q10, com várias aplicações, como em neuroproteção. No entanto, este fármaco possui baixa solubilidade em água, potencial irritativo e instabilidade química, fato que tem despertado o interesse em sua associação a sistemas nano-organizados. Dentre estes, destacam-se as nanocápsulas poliméricas (NC). Óleos vegetais, contendo compostos antioxidantes, como óleo de coco e de palma, podem ser interessantes para a composição destas partículas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver suspensões de NC contendo diferentes óleos como núcleo (palma, coco ou triglicerídeos de cadeia média), almejando à veiculação do neuroprotetor idebenona, de forma a comparar o comportamento dos sistemas quanto à estabilidade físico-química, fotoestabilidade, controle de liberação, além da conversão em formas farmacêuticas sólidas redispersíveis (liofilizados). As NC foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Conforme os resultados, foi possível preparar suspensões de NC de poli(ϵ -caprolactona) e óleo de palma (OP/PCL) ou de Eudragit[®] RS100 e óleo de coco (OC/EUD), contendo idebenona (1,0 mg/mL), com características físico-químicas adequadas, sendo que fatores como proporção das fases aquosa/orgânica, tipo de tensoativo de baixo EHL e de polímero influenciaram a otimização dos sistemas. Para fins comparativos, formulações correspondentes foram preparadas com triglicerídeos de cadeia média (TCM/PCL ou TCM/EUD), empregando as mesmas condições. As suspensões apresentaram diâmetros médios entre 166 e 216 nm, baixos índices de polidispersão (0,085-0,142), potencial zeta positivo ou negativo, dependendo das características do polímero e elevada eficiência de encapsulamento. Quando estas suspensões foram submetidas a estudo de estabilidade, à temperatura ambiente e expostas ou não à luz, durante 75 dias, verificou-se manutenção dos diâmetros médios de partículas e baixos índices de polidispersão. Entretanto, o teor de idebenona decaiu significativamente neste período, com influência significativa do tipo de polímero. Após, estudo de fotoestabilidade demonstrou que as suspensões de NC OP/PCL (UVC/UVA) e TCM/PCL (UVA) foram capazes de reduzir significativamente a degradação da idebenona (teor remanescente: 53,7-76,1%) em comparação a uma dispersão micelar aquosa contendo o fármaco (teor remanescente: 31,2-63,1%), além de promoverem liberação controlada da mesma ($t_{1/2}$ 26 h), sem efeito *burst*, com perfil ajustado ao modelo monoexponencial ($t_{1/2} < 3,0$ h para fármaco livre). A liofilização das suspensões, empregando trealose, um carboidrato solúvel, resultou em produtos adequados (teor entre 96-100 %; umidade inferior a 3,6 %), redispersíveis (índice de ressuspensão entre 0,8-1,2) e com a presença de inúmeras estruturas esféricas, inclusive na faixa coloidal, caracterizando a presença das NC nestes produtos secos. No estudo de estabilidade (temperatura ambiente/proteção da luz e da umidade), observou-se que os produtos liofilizados foram capazes de retardar ou diminuir significativamente a degradação da idebenona em comparação às suspensões de origem, independentemente do tipo de polímero (PCL/EUD) e de óleo (OP/OC/TCM). Sendo assim, os sistemas desenvolvidos são promissores para a liberação controlada do neuroprotetor idebenona.

Palavras-chave: Nanocápsulas. Idebenona. Óleo de palma. Óleo de coco. Triglicerídeos de cadeia média. Liofilização. Trealose. Estabilidade. Liberação controlada.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF POLYMERIC NANOCAPSULES SUSPENSIONS AND FREEZE-DRIED POWDERS FOR RELEASE OF NEUROPROTECTIVE IDEBENONE

AUTHOR: MARTINA GEHRKE BRENDLE

ADVIDOR: SCHEILA REZENDE SCHAFFAZICK

Place and Date of Defense: Santa Maria, October 30, 2013.

Idebeneone is an antioxidant, a synthetic derivative of coenzyme Q10, with several applications, such as neuroprotection. However, this drug has low solubility in water, besides is irritant substance and has chemical instability. Hence, idebenone-loaded nano-organized systems have been developed, such as polymeric nanocapsules (NC). Vegetable oils containing antioxidants such as coconut oil and palm oil can be interesting for the composition of these particles. In this way, the aim of this work was to develop NC suspensions containing different oils as core (palm, coconut or medium chain triglycerides) for delivery of neuroprotective agent idebenone in order to compare the behavior of these systems concerning physico-chemical stability, photostability, controlled release, and conversion to redispersible solid dosage forms (lyophilized products). The nanocapsules were prepared by interfacial deposition of preformed polymer. As the results, it was possible to prepare poly(ϵ -caprolactone) NC suspensions and palm oil (PO/PCL) or Eudragit[®] RS100 and coconut oil (OC/EUD) containing idebenone (1.0 mg/mL) with appropriate physico-chemical characteristics. Parameters such as the proportion of aqueous phase/organic phase, type of both surfactant (low HLB) and polymer influenced the optimization of these systems. For comparison, corresponding formulations were prepared with medium chain triglycerides (TCM/PCL or TCM/EUD), using the same conditions. The suspensions had an average diameter between 166 and 216nm, low polydispersity index (0.085 to 0.142), positive or negative zeta potential, depending on the characteristics of the polymer, and high encapsulation efficiency. The maintenance of average particle diameter and low polydispersity index have been verified during stability study (room temperature and exposed or not to light) for 75 days. However, the idebenone content significantly decreased in this period, with influence on the type of polymer. Thereafter, photostability study has shown that the suspensions NC OP/PCL (UVC/UVA) and TCM/PCL (UVA) were able to significantly reduce the degradation of idebenone (content: 53,7-76,1%) compared to an aqueous micellar (content: 31,2-63,1%) dispersion containing the drug. In addition, these systems were able to promote drug controlled release ($t_{1/2}$ 26 h), without burst effect, showing monoexponential profile ($t_{1/2} < 3.0$ h for free drug). The lyophilization of suspensions, employing trehalose as soluble carbohydrate, resulted in suitable and redispersible products (content of 96-100%, less than 3.6% moisture; 0.8-1.2 index), presenting several spherical structures, including in colloidal range, featuring the presence of NC in these dried products. In the stability study (room temperature/protection from light and moisture), it was observed that the lyophilized products were able to delay or decrease the degradation of idebenone compared to suspensions of origin, regardless of the both type of polymer (PCL/EUD) and oil (OP/OC/TCM). In conclusion, the developed systems are promising for the controlled release of neuroprotective drug idebenone.

Keywords: Nanocapsules. Idebenone. Palm oil. Coconut oil. Medium chain triglycerides. Freeze-drying. Trehalose. Stability. Controlled release.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura química do polímero Eudragit [®] RS100 e poli(ϵ -caprolactona).....	23
FIGURA 2 - Estrutura química da idebenona e da Coenzima Q10, com o núcleo benzoquinona e as cadeias laterais lipofílicas.....	31
FIGURA 3 - Gráfico indicando a distribuição de tamanho de partículas das nanocápsulas de PCL selecionadas, preparadas com óleo de palma 3% e idebenona.....	54
FIGURA 4 - Gráfico indicando o potencial zeta das nanocápsulas de PCL selecionadas, preparadas com óleo de palma 3% e idebenona.....	54
FIGURA 5 - Gráfico indicando a distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas de Eudragit [®] RS100 selecionadas, contendo óleo de coco 3% e idebenona.....	57
FIGURA 6 - Gráfico indicando o potencial zeta das nanocápsulas de PCL selecionadas, preparadas com óleo de coco 3% e idebenona.....	57
FIGURA 7 - Cromatograma indicando o ponto médio da curva padrão, para a quantificação de idebenona.....	62
FIGURA 8 - Diâmetros médios das suspensões de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) ou com Eudragit RS 100 [®] , armazenadas à temperatura ambiente e com proteção da luz, durante 75 dias.....	64
FIGURA 9 - Índices de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) ou com Eudragit RS100 [®] , armazenadas à temperatura ambiente e com proteção da luz, durante 75 dias.....	65
FIGURA 10 - Potenciais zeta das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) ou de Eudragit RS100 [®] , mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz, durante 75 dias.....	66
FIGURA 11 - Valores de pH das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) ou de Eudragit RS100 [®] , armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz, durante 75 dias.....	67
FIGURA 12 - Teor de idebenona nas suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) ou de Eudragit RS 100 [®] em relação ao teor inicial, durante 75 dias de armazenamento, à temperatura ambiente e com proteção da luz.....	68
FIGURA 13 - Diâmetros médios das suspensões de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) ou com Eudragit RS 100 [®] , armazenadas à temperatura ambiente e expostas à luz, durante 75 dias.....	69

FIGURA 14 - Índices de polidispersão das suspensões de poli (ϵ -caprolactona) e de Eudragit RS 100 [®] , contendo idebenona, em função do tempo de armazenamento, à temperatura ambiente e com exposição à luz.....	70
FIGURA 15 - Potenciais zeta das suspensões de poli (ϵ -caprolactona) e de Eudragit RS 100 [®] , contendo idebenona, em função do tempo de armazenamento, à temperatura ambiente e com exposição à luz.....	71
FIGURA 16 - Valores de pH das suspensões de poli (ϵ -caprolactona) e de Eudragit RS 100 [®] , contendo idebenona, em função do tempo de armazenamento, à temperatura ambiente e com exposição à luz.....	72
FIGURA 17 - Teor de idebenona nas suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) ou de Eudragit RS 100 [®] em relação ao teor inicial, durante 75 dias de armazenamento, à temperatura ambiente e com exposição à luz.....	73
FIGURA 18 - Teor de idebenona nas suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), preparadas com óleo de palma (OP) ou triglicérides de cadeia média (TCM) (OP/PCL ou TCM/PCL), em comparação à dispersão micelar (D) contendo o fármaco, após 13 h de exposição à radiação UVC.....	75
FIGURA 19 - Teor de idebenona nas suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), preparadas com óleo de palma (OP) ou triglicérides de cadeia média (TCM) (OP/PCL ou TCM/PCL), em comparação à dispersão micelar (D) contendo o fármaco, após 23 h de exposição à radiação UVA.....	76
FIGURA 20 - Cromatogramas obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas OP/PCL, sendo (A) o tempo inicial e (B) após 13 horas de exposição à radiação UVC.....	78
FIGURA 21 - Cromatogramas obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas TCM/PCL, sendo (A) o tempo inicial e (B) após 13 horas de exposição à radiação UVC.....	78
FIGURA 22 - Perfil de liberação <i>in vitro</i> da idebenona a partir das suspensões de nanocápsulas de PCL (óleo de palma ou TCM) em comparação à difusão do fármaco livre em solução.....	79
FIGURA 23 - Gráficos indicando o melhor ajuste ao modelo monoexponencial para os dados da liberação de idebenona a partir das nanocápsulas OP/PCL e TCM/PCL	81
FIGURA 24 - Estrutura química da trealose.....	84
FIGURA 25 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura a partir das amostras de liofilizados contendo idebenona (aumento de 1.500X), em comparação ao crioprotetor trealose.....	85
FIGURA 26 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura a partir das amostras de liofilizados contendo idebenona (aumento de 7.500X), em comparação ao crioprotetor trealose.....	86

FIGURA 27 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura a partir das amostras de liofilizados contendo idebenona (aumento de 15.000X), em comparação ao crioprotetor trealose.....	87
FIGURA 28 – Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas contendo idebenona e das respectivas amostras liofilizadas, após a ressuspensão em água, além dos índices de ressuspensão correspondentes (S_f/S_i).....	89
FIGURA 29 – Teor de idebenona nos liofilizados, obtidos a partir de diferentes suspensões de nanocápsulas, em função do tempo, armazenados protegidos da luz e da umidade, em relação ao tempo inicial.....	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Estudos relativos à associação de nanopartículas poliméricas contendo substâncias com atividade antioxidante.....	27
TABELA 2 – Formulações preparadas com óleo de palma, e a respectiva formulação com TCM, para fins comparativos.....	40
TABELA 3 - Formulações preparadas com óleo de coco, e a respectiva formulação com TCM, para fins comparativos.....	41
TABELA 4 - Caracterização das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo óleo de palma (1,5% p/v) e idebenona (1 mg/mL).....	51
TABELA 5 - Caracterização das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo óleo de palma (3,0 % p/v) e idebenona (1 mg/mL).....	52
TABELA 6 - Caracterização das formulações preparadas com óleo de palma (3,0%) (p/v) e com Eudragit [®] RS 100, contendo idebenona (1mg/mL).....	53
TABELA 7 - Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo óleo coco (3,0 % p/v) e idebenona (1mg/mL).....	56
TABELA 8 - Estudo comparativo das características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas preparadas com diferentes polímeros e óleos, contendo idebenona.....	58
TABELA 9 - Análise de precisão na determinação de idebenona em suspensão de nanocápsulas de PCL com óleo de palma e idebenona.....	62
TABELA 10 - Análise de exatidão na determinação de idebenona em suspensão de nanocápsulas de PCL com óleo de palma e idebenona.....	62
TABELA 11 – Parâmetros calculados através dos modelos de primeira ordem e Lei da Potência para a idebenona a partir das suspensões de nanocápsulas e da solução orgânica.....	81
TABELA 12 - Diâmetro médio de partículas após a ressuspensão dos liofilizados, contendo as nanocápsulas, comparativamente à solução do crioprotetor liofilizada nas mesmas condições.....	88
TABELA 13 - Caracterização dos liofilizados contendo idebenona associada a nanocápsulas.....	90
TABELA 14 - Análise de precisão do liofilizado contendo a idebenona associada a nanocápsulas.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE	cromatografia a líquido de alta eficiência
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
EE	eficiência de encapsulamento
EROs	espécies reativas de oxigênio
EUD	Eudragit® RS100
FA	fase aquosa
FO	fase orgânica
LQ	limite de quantificação
NC	nanocápsulas
NS	nanoesferas
NLS	nanopartículas lipídicas sólidas
NLC	carreadores lipídicos nanoestruturados
NS	nanoesferas
OC	óleo de coco
OP	óleo de palma
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
PDI	índice de polidispersão
PLA	poli(ácido lático)
PLGA	poli(ácido lático-co ácido glicólico)
SEM	microscópio eletrônico de varredura
S_f/S_i	Índice de ressuspensão (S_f : diâmetro médio final; S_i : diâmetro médio inicial)
$t_{1/2}$	tempo necessário para liberar 50% da dose contida na forma farmacêutica
TCM	triglicerídeos de cadeia média (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
OBJETIVOS.....	19
1.1 Objetivo geral.....	20
1.2 Objetivos específicos.....	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1 Sistemas nanoestruturados poliméricos para liberação de substâncias ativas.....	22
1.2 Nanopartículas poliméricas e associação de substâncias antioxidantes.....	26
1.3 Óleo de palma e óleo de coco.....	28
1.4 Disfunções neurológicas e idebenona.....	30
1.5 Estudos relativos à idebenona associada a sistemas nanoestruturados.....	32
1.6 Estabilidade das suspensões nanoparticuladas e processo de desidratação a frio (liofilização).....	34
MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
1.1 Materiais.....	38
1.2 Preparação dos sistemas nanoestruturados.....	38
1.3 Determinação do diâmetro médio de partículas, do índice de polidispersão, do potencial zeta e do pH das formulações.....	41
1.4 Determinação do teor e da taxa de associação de idebenona às nanocápsulas em suspensão.....	42
1.5 Validação do método analítico para a determinação de idebenona nas suspensões de nanocápsulas.....	43
1.6 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas.....	43
1.7 Estudos de fotoestabilidade da idebenona associada às nanocápsulas.....	44
1.8 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da idebenona a partir das nanocápsulas.....	44
1.9 Preparação de liofilizados a partir das suspensões de nanocápsulas.....	46
1.10 Determinação do diâmetro médio de partículas após redispersão dos pós liofilizados em água.....	46

1.11 Determinação do teor de idebenona nos liofilizados e validação do método analítico.....	47
1.12 Análise morfológica dos liofilizados contendo as nanocápsulas.....	47
1.13 Determinação do teor de umidade das amostras liofilizadas.....	48
1.14 Estudo de estabilidade dos liofilizados contendo idebenona associada às nanocápsulas poliméricas.....	48
1.15 Análise estatística.....	48
RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	49
1.1 Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas poliméricas com óleo de palma, como núcleo oleoso, e idebenona.....	50
1.2 Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas poliméricas com óleo de coco, como núcleo oleoso, e idebenona.....	55
1.3 Estudo comparativo da influência do tipo de óleo e do polímero sobre as características físico-químicas de nanocápsulas contendo idebenona.....	57
1.4 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo idebenona, armazenadas em temperatura ambiente e protegidas da luz.....	63
1.5 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo idebenona, armazenadas em temperatura ambiente e expostas à luz.....	68
1.6 Estudo de fotoestabilidade da idebenona associada às nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) em suspensão.....	74
1.7 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> de idebenona a partir das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona).....	79
1.8 Liofilização das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e Eudragit RS [®] 100 contendo idebenona.....	83
1.9 Estudo de estabilidade das nanocápsulas liofilizadas contendo idebenona, em comparação às suspensões de origem.....	91
CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

INTRODUÇÃO

Compostos com propriedades antioxidantes têm sido estudados devido a potenciais efeitos profiláticos ou terapêuticos relacionados a diversas doenças. Com o aumento dos estudos demonstrando a função de radicais livres e/ou de espécies reativas de oxigênio (EROs) em enfermidades como doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, envelhecimento, diabetes, câncer, além de distúrbios neurodegenerativos, os antioxidantes têm recebido crescente destaque. No entanto, no desenvolvimento de formulações adequadas contendo antioxidantes, limitações podem ocorrer, uma vez que muitas destas substâncias possuem instabilidade físico-química e degradação no trato gastrointestinal, limitada solubilidade e baixa permeabilidade (RATNAM et al., 2006).

Óleos vegetais, com altas proporções de substâncias antioxidantes, tais como vitaminas A, C e E, são utilizados como excipientes em produtos cosméticos e farmacêuticos, apresentando adequadas propriedades emolientes, hidratantes, protetoras, sendo utilizados também como dispersantes/veículos de substâncias ativas (ALVAREZ; RODRÍGUEZ, 2000; SANTI, 2003; PACETTI *et al*, 2006; RIBEIRO, 2010). Dentre estes, incluem-se o óleo de palma e de coco. O óleo de coco contém ácidos graxos insaturados e é capaz de aumentar a quantidade de enzimas antioxidantes e diminuir a peroxidação lipídica. Por sua vez, o óleo de palma (*Elaeis guineenses*) tem se destacado devido a seu potente efeito antioxidante, uma vez que apresenta altas proporções de vitaminas em relação à maioria dos demais óleos, principalmente vitaminas E, tocotrienóis, tocoferóis e carotenoides os quais atuam como sequestradores de radicais livres (GANAFÁ et al., 2002; KAUSAR et al., 2003). A atividade antioxidante benéfica deste óleo tem sido descrita na proteção contra resposta de promoção de tumor cutâneo (KAUSAR et al., 2003), contra a hipertensão induzida por condições de estresse oxidativo (GANAFÁ et al., 2002), além da diminuição da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas em mitocôndrias cerebrais pelos tocotrienóis oriundos do óleo de palma (KAMAT; DEVASAGAYAM, 1995).

O desenvolvimento de nanoestruturas tem mostrado grande aplicação tanto em diagnóstico quanto em terapia, surgindo como novas alternativas para a administração de substâncias ativas. Dentre os vários nanocarreadores, incluem-se as nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) que são carreadores submicrométricos (< 1µm) de fármacos. As nanocápsulas são sistemas vesiculares, formados por um invólucro polimérico

disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso. Estes sistemas têm sido estudados para a liberação controlada de fármacos, na veiculação de substâncias pouco solúveis, no direcionamento de fármacos a sítios específicos de ação (vetorização), aumentando o índice terapêutico, na proteção de fármacos lábeis e no aumento da biodisponibilidade (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; LEGRAND et al., 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Nanopartículas poliméricas são também importantes estratégias para a liberação cerebral de fármacos, objetivando aplicações em enfermidades neurológicas, aumentando a concentração dos mesmos no local de ação (KREUTER, 2001; RONEY et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2008). Alguns estudos também têm evidenciado importantes vantagens no emprego de nanoestruturas poliméricas na veiculação de substâncias antioxidantes, tais como o aumento da capacidade antioxidante de substâncias (ex. melatonina), aumento da biodisponibilidade (ex. ácido elágico) e da estabilidade físico-química (ex. Coenzima Q₁₀) (KWON et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2005; BALA et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2008).

Outra substância que tem merecido destaque devido às suas propriedades antioxidantes, incluindo combate a danos cutâneos e ao envelhecimento, consiste na idebenona, um análogo sintético da coenzima Q₁₀ (AMORIM et al., 2010). Possui baixo peso molecular, atua como carreador de elétrons e pode impedir outras reações em cadeia e, ainda, remover radicais intermediários (IMADA et al., 1989; ZHAI et al., 2008). A idebenona protege a membrana mitocondrial da peroxidação lipídica (SEMSEI; NAGY; Zs-NAGY, 1990), podendo atuar inclusive como um neuroprotetor. No entanto, este fármaco possui baixa solubilidade em água, potencial irritativo e instabilidade química, fato que tem despertado o interesse em sua associação a sistemas nanoestruturados poliméricos (PALUMBO et al., 2002; AMORIM et al., 2010) ou lipídicos (MONTENEGRO et al., 2011; MONTENEGRO et al., 2012; LI; GE, 2012). Deve-se ressaltar que o aumento da atividade antioxidante da idebenona associada a nanocápsulas de poli(cianocrilato de etila), contendo triglicerídeos de cadeia média, foi reportado em fibroblastos humanos, comparativamente ao fármaco não associado (PALUMBO et al., 2002).

Entretanto, os sistemas nanoestruturados, em meio aquoso, podem apresentar problemas de estabilidade quando armazenados a longo prazo, limitando sua aplicação industrial. Desta forma, pesquisas têm sido direcionadas para aumentar a estabilidade desses sistemas através de processos de desidratação como liofilização ou secagem por aspersão,

empregando adjuvantes solúveis, como carboidratos, ou insolúveis, como dióxido de silício coloidal (ABDELWAHED et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003a,b).

Conforme o que foi relatado acima, a proposta geral do presente trabalho baseou-se no desenvolvimento tecnológico de nanocápsulas poliméricas contendo óleos naturais orgânicos, com potenciais propriedades antioxidantes, capazes de veicular fármacos neuroprotetores. A base do estudo foi o emprego do óleo de palma ou de coco como núcleos oleosos, em comparação aos triglicerídeos de cadeia média, para a associação da idebenona, substância lipofílica neuroprotetora, escolhida em função de suas inúmeras potencialidades terapêuticas, principalmente quando associada a nanoestruturas. O foco do trabalho foi a avaliação da capacidade destes sistemas na veiculação, na estabilização, no controle da liberação *in vitro* e na fotoproteção da idebenona, vislumbrando a futuras aplicações em neuroproteção, além da possibilidade da conversão destas suspensões nanoestruturadas em formas farmacêuticas sólidas redispersíveis, visando ao aumento de estabilidade. Cabe ressaltar que o presente trabalho propôs o uso, pela primeira vez, do óleo de palma como núcleo oleoso de nanocápsulas, que, apesar de ser tratado como óleo, é sólido ou semissólido à temperatura ambiente. Além disto, também não foram encontrados relatos na literatura da associação de idebenona a nanocápsulas com os polímeros usados neste estudo (poliéster ou polimetacrilato).

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O presente trabalho almejou preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo diferentes óleos como núcleo (palma, coco ou triglicerídeos de cadeia média), visando à veiculação do neuroprotetor idebenona, de maneira a comparar o comportamento dos sistemas quanto à estabilidade físico-química, fotoestabilidade, controle de liberação e conversão em formas farmacêuticas sólidas redispersíveis (liofilizados).

1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo idebenona, empregando o óleo de palma ou de coco, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (policaprolactona ou Eudragit[®] RS100);
- Preparar suspensões de nanocápsulas com triglicerídeos de cadeia média, em substituição aos óleos de palma ou de coco, para fins comparativos;
- Caracterizar as formulações coloidais quanto ao tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas, potencial zeta, pH, teor total e eficiência de encapsulamento da idebenona;
- Realizar um estudo de estabilidade comparativo das formulações, durante 75 dias com ou sem exposição à luz e em temperatura ambiente.
- Efetuar estudos de fotodegradação (UVA/UVC) da idebenona associada às nanocápsulas selecionadas como as mais promissoras, em comparação ao fármaco em dispersão micelar;
- Realizar estudos de liberação *in vitro* da substância ativa a partir das formulações selecionadas, em comparação ao fármaco livre;
- Liofilizar as diferentes suspensões de nanocápsulas, empregando um crioprotetor solúvel como adjuvante, e caracterizar os produtos secos obtidos quanto ao teor de fármaco, teor de umidade, análise morfológica e tamanho médio de partículas após a redispersão;
- Avaliar a estabilidade dos liofilizados, em comparação às suspensões de origem, durante 75 dias, ao abrigo da luz/umidade e em temperatura ambiente.

•

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Sistemas nanoestruturados poliméricos para liberação de substâncias ativas

A nanobiotecnologia é um importante campo de pesquisa e com potencial aplicação, tanto em diagnóstico quanto em terapia, tendo sido proposta como uma nova estratégia para a liberação de substâncias a sítios específicos de ação. As primeiras nanopartículas foram desenvolvidas em 1970 e foram inicialmente utilizadas como carreadores de vacinas e de fármacos para o tratamento de câncer (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Existem vários sistemas nanoestruturados, destacando-se as nanopartículas poliméricas, que são carreadores submicrométricos ($< 1\mu\text{m}$) de substâncias ativas e podem ser classificados como nanocápsulas (sistemas reservatórios) ou nanoesferas (sistemas matriciais). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso. Estas nanoestruturas apresentam tensoativos na interface partícula/fase aquosa (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Em caráter mais geral, as nanocápsulas podem ser denominadas sistemas nanovesiculares, apresentando uma estrutura típica núcleo-parede, em que um fármaco pode ficar confinado a um reservatório ou no interior de uma cavidade envolta por uma membrana polimérica ou revestimento (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). No entanto, também existe a possibilidade de a substância ativa ficar sobre a superfície das partículas (adsorvida) ou retida na parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003a; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A seleção do núcleo oleoso é muito importante no desenvolvimento de nanocápsulas, já que, dependendo de suas propriedades e concentração, pode influenciar o tamanho das partículas formadas, além de influenciar a capacidade de encapsulamento de substâncias. Os requisitos para a escolha dos óleos para a preparação de nanocápsulas são ausência de toxicidade, boa capacidade de dissolução dos fármacos a serem associados e não serem capazes de solubilizar o polímero formador das vesículas (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

Os polímeros usados para a preparação de nanopartículas podem ser biodegradáveis como poliésteres [poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL)] e polimetacrilatos, que podem apresentar grupamentos ácidos ou

alcalinos promovendo liberação do fármaco de maneira pH-dependente (polimetacrilatos: Eudragit[®] S100 ou Eudragit[®] RL100, Eudragit E[®]), ou ainda, podem não apresentar solubilidade dependente do pH (Eudragit[®] RS100, Eudragit[®] RL100) promovendo liberação sustentada (figura 1). Os poliésteres são muito utilizados na formulação devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (COUVREUR et al., 2002; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; NIKAM et al., 2011).

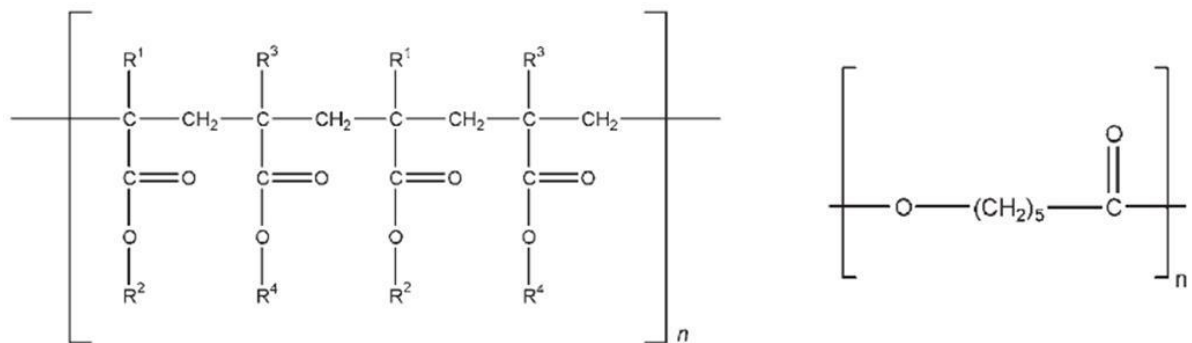


Figura 1 – Estrutura química do polímero Eudragit[®] RS 100 (esquerda)* e poli(ε-caprolactona) (direita);
 *R¹=H, CH₃; R²= CH₃, C₂H₅; R³=CH₃, R⁴= CH₂CH₂N(CH₃)₃⁺ Cl⁻ (adaptado de ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; NIKAM et al., 2011).

Há vários métodos de preparação de nanocápsulas poliméricas como emulsificação-difusão, dupla emulsificação (óleo/água/óleo ou água/óleo/água), emulsão-coacervação, polimerização *in situ* e deslocamento de solvente (nanoprecipitação/deposição interfacial de polímero pré-formado). Este último apresenta a vantagem de simplicidade e reprodutibilidade (FESSI et al., 1989; LETCHFORD; BURT; 2007; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

O método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989) consiste em verter uma fase orgânica (contendo um solvente miscível com a água, um polímero, um óleo, um tensoativo opcional de baixa hidrofília e o fármaco) na fase aquosa com tensoativo de alta hidrofília. A formação instantânea das vesículas se dá por emulsificação espontânea, enquanto o solvente difunde para a fase aquosa (não-solvente). O polímero, o qual é insolúvel tanto no óleo quanto na fase aquosa, precipita na interface dos dois componentes imiscíveis. As nanocápsulas, formadas por esse método, usualmente apresentam diâmetros entre 200 e 500 nm (COUVREUR et al. 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). Sob condições apropriadas, esta técnica favorece a

uma dispersão de partículas poliméricas em uma maneira reprodutível (LEGRAND et al., 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

As suspensões nanoparticuladas obtidas podem ser caracterizadas conforme o diâmetro médio de partículas e distribuição de tamanho (espectroscopia de correlação de fótons ou espalhamento de luz dinâmico), morfologia (microscopia eletrônica de varredura ou de transmissão, microscopia de força atômica), características de superfície (potencial zeta: mobilidade eletroforética), eficiência de encapsulamento do princípio ativo (ultrafiltração-centrifugação ou ultracentrifugação), dentre outros parâmetros, como pH (COUVREUR et al., 2002; KANG et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007;).

Estes sistemas estão sendo estudados para a liberação controlada de fármacos (COUVREUR et al., 2002; AMORIM et al., 2010; KULKAMP et al., 2011), na veiculação de substâncias pouco solúveis (MOSQUEIRA et al., 2000; ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005), na vetorização de fármacos a alvos específicos (KREUTER, 2001; SCHAFFAZICK et al., 2008), aumentando o índice terapêutico, aumento de atividade da substância ativa (PALUMBO et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2008), na proteção de fármacos lábeis no trato gastrointestinal (BALA et al., 2006) e aumento da biodisponibilidade (KREUTER, 2001), além da proteção da mucosa gastrointestinal de fármacos agressores (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003b; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007) e na estabilização físico-química de princípios ativos (KWON et al., 2002; SCHAFFAZICK; POHLMANN; GUTERRES, 2007; KULKAMP et al., 2009; OURIQUE et al., 2011). As nanocápsulas poliméricas podem modificar a distribuição da substância ativa e aumentar a concentração no tecido alvo, aumentando a eficácia e diminuindo a toxicidade. Além disto, nanopartículas têm sido bastante exploradas como carreadores para a liberação cerebral de fármacos, objetivando aplicações em doenças neurológicas, aumentando a concentração dos mesmos no tecido cerebral ou proporcionando o transporte de fármacos considerados não transponíveis à barreira hematoencefálica. Esta barreira limita o acesso de vários fármacos ao cérebro devido às junções justapostas entre as células endoteliais dos vasos sanguíneos cerebrais e à existência de sistemas de transporte ativo. Para estas aplicações, além de serem constituídas por um polímero biocompatível/biodegradável, as nanopartículas precisam apresentar diâmetro controlado, principalmente para administração intravenosa, já que, dependendo do tamanho das partículas, poderão ser removidas da circulação (AMORIM et al., 2010; LEGRAND et al.,

2007; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). O tipo de carga que a superfície das nanopartículas reflete pode ser importante para ocorrência de afinidade do carreador com as células. Nanopartículas com superfície com carga positiva apresentam afinidade com células epiteliais, de modo a facilitar a adsorção das nanoestruturas a essas células (PINTO REIS et al., 2006). Outra questão importante é que a superfície das nanopartículas deve ser revestida por moléculas hidrofílicas para que as mesmas não sejam fagocitadas rapidamente pelos macrófagos do fígado e baço, e possam atingir órgãos como o cérebro ou um tumor. Dessa forma, nanopartículas poliméricas podem ser cobertas com um tensoativo hidrofílico como o polissorbato 80 ou poli(etileno glicol), para vetorização cerebral efetiva, como uma maneira de controlar a opsonização de proteínas (KREUTER, 2001; RONEY et al., 2005; PINTO REIS et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2008; GUTERRES; SCHAFFAZICK, POHLMANN, 2007).

Como anteriormente mencionado, as nanopartículas podem controlar a liberação do princípio ativo associado. A liberação do fármaco a partir de sistemas nanoestruturados depende de mecanismos de desorção, difusão e processo de erosão da partícula ou a combinação desses fatores. A modelagem matemática pode ser útil para o entendimento de como este processo ocorre e como o fármaco está associado (CRUZ et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2006). No trabalho de Santos e colaboradores (2013) foi realizado um estudo de liberação *in vitro* do clotrimazol associado a nanocápsulas de Eudragit® RS100 e TCM. O perfil de liberação observado correspondeu a uma cinética de primeira ordem, havendo uma única etapa de liberação, sem a ocorrência de liberação rápida inicial de fármaco (efeito *burst*). Os autores, aplicando o modelo de Lei da Potência, verificaram que o mecanismo de liberação do clotrimazol a partir das nanocápsulas ocorreu segundo transporte anômalo. Dessa forma, a liberação do fármaco, a partir das nanocápsulas, dependeu do relaxamento do polímero seguido da difusão do fármaco.

Em outro estudo, Lamprecht e colaboradores (2002) avaliaram o perfil de liberação *in vitro* de amiodarona a partir de nanoestruturas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e TCM, mostrando-se ocorrer em duas fases. A primeira fase correspondeu a uma liberação rápida do fármaco (efeito *burst*), indicando que 40% do total de fármaco encapsulado foram liberados nas primeiras duas horas. Após esse período, ocorreu uma liberação sustentada do fármaco durante dois dias. A liberação do fármaco, na primeira fase, pode ter ocorrido através da dissolução imediata do princípio ativo adsorvido à superfície das partículas.

1.2 Nanopartículas poliméricas e associação de substâncias antioxidantes

Substâncias antioxidantes têm sido pesquisadas devido a potenciais propriedades profiláticas ou terapêuticas relacionadas a diversas patologias. Em função do aumento dos estudos relativos à ação de radicais livres e/ou de espécies reativas de oxigênio (EROs) em doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, diabetes, câncer, além de distúrbios neurodegenerativos e envelhecimento, os compostos antioxidantes têm alcançado crescente interesse. Entretanto, no desenvolvimento de formulações adequadas contendo antioxidantes, limitações podem ocorrer, pois muitas destas moléculas apresentam instabilidade físico-química e degradação no trato gastrointestinal, limitada solubilidade e baixa permeabilidade (RATNAM et al., 2006). Neste caminho, sistemas nanoestruturados poliméricos têm merecido destaque, como carreadores de substâncias antioxidantes com diversos propósitos, como se pode observar nos trabalhos apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Estudos relativos à associação de nanopartículas poliméricas contendo substâncias com atividade antioxidante (NC: nanocápsulas; NS: nanoesferas)

Sistema	Substância Ativa	-Eficiência de encapsulamento -Diâmetro (nm) -Potencial Zeta (mV)	Resultados obtidos	Referências
NS	Coenzima Q ₁₀	Acima de 95% 40 a 260 nm	Aumento da estabilidade da coenzima Q ₁₀ frente à radiação UV e altas temperaturas.	Kwon et al., 2002
NS	Vitamina E	----	Facilita a liberação da vitamina E no interior das células combatendo EROs.	Shea et al., 2005
NC, NS	Melatonina	33 a 56%; 126 a 246 nm; -33 a -43,5 mV	Redução da peroxidação lipídica <i>in vitro</i> induzida pelo radical ascorbil, comparada com a solução controle.	Schaffazick et al., 2005
NS	Ácido elágico	41,7% a 55,2% 149 a 359 nm -3,57 a 75,38 mV	Aumento da permeabilidade intestinal comparado ao fármaco livre.	Bala et al., 2006
NC	Melatonina	33 a 50% 135 a 325 nm	Aumento da estabilidade frente à luz.	Schaffazick et al., 2007
NC	Melatonina	50%; 241± 55 nm -33 ± 0,3 mV	Aumento da atividade antioxidante <i>in vivo</i> contra a lipoperoxidação de estruturas cerebrais.	Schaffazick et al., 2008
NS	Quercetina	94,8 a 99,9% 81,9 a 472,9 nm	Aumento da atividade antioxidante através de sequestro do radical DPPH e ânion superóxido e contra a peroxidação lipídica, comparado ao fármaco livre.	Wu et al., 2008
NC	Ácido lipoico	77 a 99% 313 a 378 nm -5,43 a -9,06 mV	Aumento da estabilidade.	Kulkamp et al., 2009
NC	Ácido lipoico	72% 245 a 249 nm -13,4 a -14,0 mV	Diminuição significativa da lipoperoxidação <i>in vitro</i> em comparação ao fármaco livre.	Kulkamp et al., 2011

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a associação de fármacos antioxidantes a nanocápsulas poliméricas tem resultado em aumento da atividade contra a lipoperoxidação,

induzida pelo radical ascorbil, gerado pela reação entre Fe^{2+} e ascorbato (SCHAFFAZICK et al., 2005; KULKAMP et al., 2011). Desta forma, Schaffazick e colaboradores (2005) avaliaram o efeito protetor da melatonina associada a nanocápsulas e a nanoesferas comparativamente a uma solução aquosa de melatonina contra a peroxidação lipídica *in vitro*, em que verificou-se que os lipídios foram protegidos de 8 a 51% devido à presença da melatonina (200 a 400 μM) e que os sistemas nanoestruturados proporcionaram importante aumento no efeito antioxidante da mesma. Estes resultados foram confirmados *in vivo*, quando nanocápsulas foram administradas por via intraperitoneal em camundongos, pois estes sistemas foram capazes de reduzir significativamente a peroxidação lipídica em estruturas cerebrais (córtex e hipocampo) (SCHAFFAZICK et al., 2008). Recentemente, Kulkamp e colaboradores (2011) apresentaram resultados da atividade antioxidante, referentes ao ensaio de lipoperoxidação *in vitro*, que comparou formulações com ácido alfa lipoico contido em nanocápsulas (triglicérides de cadeia média), de diferentes concentrações de poli(ϵ -caprolactona), com solução do fármaco (forma livre, 240 a 480 μM), onde observou-se um significativo aumento na atividade antioxidante devido ao nanoencapsulamento do fármaco.

1.3 Óleo de palma e óleo de coco

O óleo de palma é encontrado em altas concentrações (73,1%) na polpa do fruto (*Elaeis guineenses*) e em menores concentrações (32,6%) na semente (BORA et al., 2003). Ele pode apresentar atividade antioxidante devido ao conteúdo de substâncias como tocotrienóis e tocoferóis (vitamina E). Estudos realizados com tocotrienóis indicaram que o composto pode prevenir dano oxidativo em lipídios, pois a vitamina E se distribui pela membrana celular e está localizada na fração mitocondrial e no retículo endoplasmático (KAMAT; DEVASAGAYAM, 1995; REGO; SANTOS; OLIVEIRA, 1999).

Este óleo possui alta concentração de ácidos graxos saturados, cerca de 50%, e esterificação com glicerol (ácido esteárico 4,6%; mirístico 1,0%). Apresenta uma alta proporção de ácido palmítico (44,3%), o que fornece o nome a este ácido graxo de 16 carbonos saturados, e tem quantidades consideráveis de ácido linoleico (10%, ômega-6) e oleico (38%). O óleo de palma é muito empregado na indústria de alimentos, mas também tem sido utilizado na indústria farmacêutica e de cosméticos (EDEM, 2002; MUKHERJEE;

MITRA, 2009), sendo grande fonte natural de tocotrienóis. Também apresenta uma pequena quantidade de escaleno, o qual, em hipótese, pode reduzir o colesterol e apresentar atividade anticancerígena, além de ubiquinona e carotenoides (MUKHERJEE; MITRA 2009).

O óleo de palma pode apresentar atividade antioxidante em hipertensão induzida por estresse oxidativo (GANAFI et al., 2002). Um estudo evidenciou que o óleo de palma pode inibir a formação de tumor cutâneo, pois os componentes contidos no óleo inibem o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA-dependente) que promove tumor na pele e diminuem níveis de glutathiona reduzida (GSH). Segundo Perchellet e colaboradores (1987), o componente α -tocoferol realça a atividade de GSH-dependente protegendo as células durante o estágio mais avançado do tumor. O composto pode inibir também a produção de prostaglandinas, desacetilação de lipídio celular e ativação de proteína quinase C que podem influenciar a formação de tumor (KAUSAR et al., 2003).

Frações do óleo de palma que possuem compostos como tocotrienóis podem ter atuação importante na membrana cerebral, já que a mesma é altamente susceptível à peroxidação lipídica. Os tocotrienóis inibiram significativamente a peroxidação lipídica induzida por ascorbato- Fe^{2+} e a oxidação de proteínas em função do tempo. A peroxidação induzida por AAPH, radical peroxila e fotossensibilização também foi inibida pelos tocotrienóis oriundos do óleo de palma (KAMAT; DEVASAGAYAM, 1995).

O óleo de coco é obtido da semente ou do fruto da planta *Cocos nucifera* (Família Palmae) e este produto (óleo virgem) apresenta um ponto de fusão próximo a 24°C (FOSTER; WILLIAMSON; LUNN, 2009), sendo que o índice de oxidação do óleo virgem é inferior devido ao conteúdo de ácidos graxos insaturados existentes que reagem facilmente com o oxigênio para formar peróxidos (MARINA et al., 2009a). Além disso, o óleo apresenta atividade antimicrobiana (SANTOS, 2012). Os ácidos graxos presentes no óleo são ácido láurico, ácido cáprico e ácido caprílico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e ácido linoleico. Cerca de 50% dos ácidos graxos presentes no óleo apresentam cadeias médias de 6 a 12 carbonos, sendo o ácido láurico (C_{12}) o componente presente em maior proporção (LAURELES et al., 2002; PARFENE et al., 2013).

Estudos vêm demonstrando que o óleo de coco pode ser capaz de prevenir a oxidação de lipídios (lipoperoxidação), melhorar o status antioxidante *in vivo*, aumentando a capacidade de enzimas antioxidantes, e aumentar níveis de vitaminas antioxidantes devido à administração do mesmo (NEVIN; RAJAMOHAN, 2006; MARINA et al., 2009b;c).

1.4 Disfunções neurológicas e idebenona

Células do tecido cerebral apresentam um alto consumo de oxigênio e tornam-se extremamente suscetíveis a danos oxidativos. A mitocôndria consome 85 a 90% do oxigênio utilizado pela célula, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) na cadeia de transporte de elétrons. Principalmente próximo à ubiquinona do complexo III da cadeia respiratória, as moléculas de oxigênio e ânions superóxidos originados podem formar outras EROs, através dos elétrons originados nesta cadeia. As membranas celulares, ricas em lipídios, podem sofrer oxidação, o que pode levar à perda de componentes celulares (KAMAT; DEVASAGAYAM, 1995; CARDOSO; PEREIRA; OLIVEIRA, 1998). Dessa forma, a presença de oxigênio, em maiores concentrações na célula, e a diminuição de enzimas com atividade antioxidante (como superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase) podem promover a formação de moléculas reativas como os radicais livres. Estes, por sua vez, são estruturas instáveis que apresentam elétrons desemparelhados, podendo reagir com outros componentes da célula (como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos), promovendo danos nas funções celulares (CHAUHAN, 2006). O dano causado por essas EROs pode comprometer a funcionalidade da cadeia de transporte de elétrons, conduzindo a uma diminuição da produção de ATP e causando dano celular (CARDOSO; PEREIRA; OLIVEIRA, 1998). Como o tecido nervoso é muito suscetível ao estresse oxidativo, várias doenças do sistema nervoso estão associadas a distúrbios neurodegenerativos, como doenças de Parkinson, Alzheimer, ataxia de Friedreich e esclerose múltipla (CHAUHAN, 2006).

Neste sentido, antioxidantes, como a idebenona, um análogo sintético da coenzima Q10, são importantes para prevenir os danos oxidativos (RATNAM et al., 2006; ZHAI et al., 2008).

A idebenona foi desenvolvida inicialmente pelo Laboratório Takeda para tratamento de pacientes com distúrbios cognitivos e doença de Alzheimer e foi aprovada no Japão, em 1986, para distúrbios associados a doenças cerebrovasculares, sendo introduzida no mercado sob o nome de Avan (ZS-NAGY, 1990; MEIER; BUYSE, 2009). Desde 1999, a idebenona tem sido avaliada como possível tratamento para ataxia de Friedreich (MEIER; BUYSE, 2009; PARKINSON; SCHULZ; GIUNTI, 2013). Atualmente, a idebenona também é comercializada como cosmético antienvhecimento, oferecida principalmente em formulações lipossomadas (AMORIM et al., 2010). Como medicamento por via oral, é encontrada em formas farmacêuticas sólidas (ex: Cerestabon 30 mg), com indicação para

tratamento de sintomas associados a patologia cerebral de etiologia vascular ou degenerativa.

As funções da idebenona estão associadas ao grupo benzoquinona (figura 2), presente na molécula e na coenzima Q10, que pode sofrer reações reversíveis de redução/oxidação (redox), influenciando o balanço eletrônico dentro da mitocôndria, ou seja, este grupo melhora a circulação de elétrons no interior desta organela. Desta forma, o mecanismo de ação da idebenona é baseado no aumento do metabolismo cerebral através do sistema de transferência de elétrons mitocondrial, facilitando a produção de ATP. A coenzima Q10, um composto químico naturalmente existente, é um intermediário vital do sistema de transporte de elétrons na mitocôndria, possuindo baixa biodisponibilidade devido a sua pobre solubilidade e alto peso molecular. Por sua vez, quando comparada à coenzima Q10, a idebenona possui uma cadeia lateral menor (10 carbonos) e mais saturada e, ainda, apresenta um grupo hidroxila terminal. Estas características a tornam menos hidrofóbica do que a Coenzima Q10, influenciando em sua partição e difusão pelas membranas biológicas. Acredita-se que a cadeia lateral da idebenona (hidroxidecila) tenha comprimento ideal para restaurar a função mitocondrial (NAGY; ZS-NAGY, 1990; CARDOSO; PEREIRA; OLIVEIRA, 1998; GEROMEL et al., 2002; RATNAM et al., 2006; MEIER; BUYSE, 2009; PARKINSON, SCHULZ, GIUNTI, 2013).

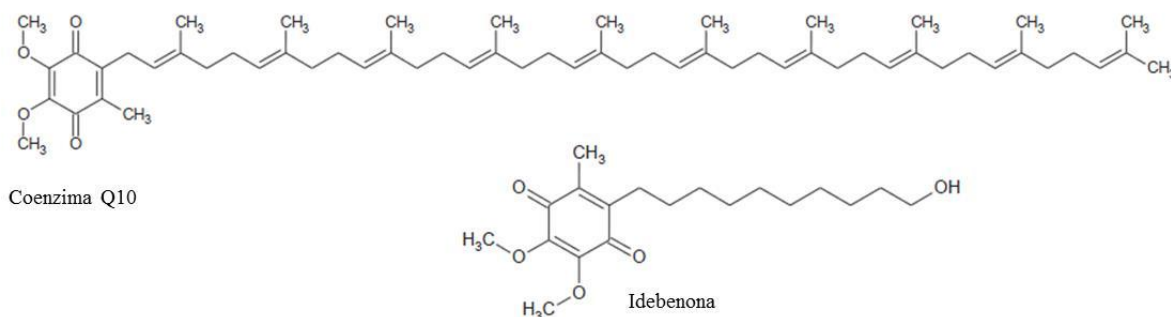


Figura 2 - Estrutura química da idebenona* e da Coenzima Q10, com o núcleo benzoquinona e as cadeias laterais lipofílicas (adaptado de PARKINSON, SCHULZ, GIUNTI, 2013).

*CAS 58186-27-9; 2,3-dimetoxi-5-metil-6-(10-hidroxidecil)-1,4-benzoquinona; C₁₉H₃₀O₅; massa molecular 338,44; praticamente insolúvel em água; ponto de fusão entre 46 e 53° C (THE MERCK INDEX, 2006); pka de 15,19; coeficiente de partição octanol/água de 3,49 (LI; GE, 2012).

Estudos têm demonstrado a capacidade antioxidante da idebenona e sua atuação na proteção das células. Neste contexto, esta molécula pode inibir a peroxidação lipídica e proteger a membrana celular e a mitocôndria de danos oxidativos (SUNO; NAGAOKA, 1989;

ZS-NAGY, 1990; BECKER; BRAY-FRENCH; DREWE, 2010). Esta molécula pode apresentar também atividade antioxidante contra danos causados por radicais livres como ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS) (AMORIM et al., 2010, MORDENTE et al., 1998), radical 2,2-azobis (2-amidinopropano) diidrocloreto (APPH) (PIGNATELLO et al., 2011) e contra danos em culturas de células causados por moléculas como dietilmaleato ou peróxido de hidrogênio (PALUMBO et al., 2002).

Em um estudo realizado por Suno e Nagaoka (1989), verificou-se que a idebenona inibiu a peroxidação lipídica, em um experimento *in vitro* com células do tecido cerebral de rato, empregando succinato ou FeCl₃. Foi observado que ocorreu inibição de 50% da peroxidação lipídica induzida, quando a idebenona (37 µM) foi adicionada ao meio.

1.5 Estudos relativos à idebenona associada a sistemas nanoestruturados

Palumbo e colaboradores (2002) prepararam nanocápsulas poliméricas de poli(etil-2-cianocrilato) e triglicerídeos de cadeia média, através de polimerização *in situ* (177 a 312 nm; 97% de eficiência de encapsulamento; -13 mV), e compararam a efetividade da idebenona presente nas nanoestruturas com a mesma na forma livre. No estudo, foram utilizadas células (fibroblastos) que sofreram dano oxidativo e foram tratadas com nanocápsulas poliméricas contendo idebenona. De acordo com os resultados, atividade antioxidante efetiva da idebenona associada a estas nanoestruturas (0,5 µM) foi observada por uma redução na liberação de LDH (enzima citosólica estável) em aproximadamente 50%, que foi liberada com o rompimento da membrana citoplasmática celular, através de lesões promovidas por dietilmaleato e peróxido de hidrogênio. Já a idebenona livre não foi capaz de reduzir significativamente a liberação de LDH. Foi sugerido que a provável diferença da ação biológica entre a substância ativa livre e associada a nanocápsulas é o mecanismo baseado na aderência das nanopartículas às células e, dessa forma, facilitaria a difusão do fármaco lipofílico associado para o interior da célula.

Amorim e colaboradores (2010), objetivando aumentar a estabilidade e diminuir a irritabilidade em mucosa provocada pela idebenona, prepararam nanopartículas com os polímeros quitosana ou *N*-carboximetilquitosana reticulados com tripolifosfato por co-secagem com a mesma por aspersão, empregando 20% de dióxido de silício coloidal. As nanoestruturas apresentam vantagens como proteger o fármaco da degradação (40°C/75% UR

por 90 dias) dez vezes mais do que o fármaco livre, além de promover menor irritação em membrana mucosa e manutenção do efeito antioxidante *in vitro* (10 nM; ensaio de sequestro de ABTS). Nesses estudos foi verificado que quando se utilizou a idebenona livre ou as nanopartículas, após o preparo, não houve diferença significativa na atividade antioxidante no experimento realizado com ABTS. Por outro lado, quando foi realizado o mesmo ensaio após 45 dias de armazenamento, o fármaco livre apresentou perda de atividade antioxidante em torno de 30%, comparativamente à idebenona contida nas nanopartículas.

Em uma análise com sonda fluorescente (DCFH-DA 100) e com lipossomas de carga neutra (SUVET⁰) ou de carga negativa (SUVET⁻), contendo ou não idebenona, ou com o fármaco livre, utilizando cultura de células (astrócitos), Pignatello e colaboradores (2011) observaram que o fármaco livre não foi capaz de reduzir espécies oxidantes induzidas por APPH. Já o tratamento realizado com o fármaco contido em SUVET⁰ ou SUVET⁻ apresentou um efeito protetor contra a citotoxicidade causada pelo radical APPH.

Para melhorar a liberação da idebenona no tecido cerebral, Montenegro e colaboradores (2011) avaliaram a possibilidade de preparar nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) contendo este fármaco (0,5-1,1% m/m). Estas partículas foram aplicadas em culturas primárias de células (astrócitos obtidas do córtex cerebral de rato) para avaliação da atividade antioxidante, já que as células sofreram estresse oxidativo induzido pelo radical APPH. O dano na cultura celular foi avaliado através da liberação da enzima LDH, que não foi liberada em quantidade significativa nas células que foram tratadas com as nanoestruturas. Verificou-se que a NLS com idebenona (0,7% m/m) exerceram efeito protetor contra EROs.

MONTENEGRO e colaboradores, em 2012, também prepararam nanopartículas lipídicas sólidas, para liberação tópica de idebenona, utilizando o palmitado de cetila como lipídio (30 a 49 nm; pH entre 4,78 a 5,10), e observaram que a penetração das nanoestruturas, contendo idebenona, nas diferentes camadas na pele dependeu da concentração do fármaco e da composição da formulação. Estas nanopartículas se acumulam no estrato córneo e epiderme, podendo ser interessantes estratégias para a administração tópica da idebenona.

Bei Li e Zhi-Qiang Ge (2012) prepararam carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) contendo idebenona (0,5%), utilizando homogeneização à alta velocidade/ultrassonificação (65°C). Esses sistemas foram desenvolvidos com a finalidade de comparar a permeação cutânea de idebenona e a estabilidade em diferentes sistemas (nanoemulsão, solução oleosa e NLCs). O estudo da capacidade de penetração desses

sistemas foi realizado em ensaio *ex vivo*, utilizando pele suína como modelo de membrana. A quantidade acumulada de idebenona na epiderme, derme e meio acceptor da célula de difusão foi três vezes maior para NLCs do que para nanoemulsão e solução oleosa, no final de 24 h. O teor de idebenona foi de 90,1 %, 65,4 % e 51,3%, respectivamente para NLC, nanoemulsão e solução oleosa após 180 dias de estudo de estabilidade (40°C/75% UR e 3.000 lx). Os NLCs apresentaram diâmetro de 86,9 nm (0,21 de polidispersão), potencial zeta de -29,6 mV e 99,4% de eficiência de encapsulamento do fármaco, sendo preparados com palmitato/estearato de glicerila e triglicerídeos de cadeia média.

1.6 Estabilidade das suspensões nanoparticuladas e processo de desidratação a frio (liofilização)

Os sistemas nanoestruturados, durante longo período de armazenamento, podem sofrer instabilidade físico-química, devido à possibilidade de ocorrência de agregação das partículas e sedimentação, degradação química do polímero, do fármaco ou de outras matérias-primas, ou ainda, liberação da substância ativa para a fase aquosa havendo precipitação do mesmo ou formação de nanocristais (SCHAFFAZICK et al., 2003a; ABDELWAHED et al., 2006a,b; SCHAFFAZICK et al., 2006). O tipo de polímero utilizado na composição dos sistemas tem influência na estabilidade do mesmo, pois pode sofrer degradação hidrolítica. Por sua vez, fosfolípidios e triglicerídeos quando usados também podem sofrer hidrólise de ligações éster, causando alterações nas nanoestruturas. A degradação por hidrólise em meio ácido pode produzir separação ao longo da cadeia polimérica, formando oligômeros insolúveis e uma pequena produção de grupos carboxílicos livres. Por outro lado, o meio alcalino favorece a clivagem de ligação éster no final da cadeia polimérica com produção de compostos solúveis como o ácido láctico, dependendo do tipo de polímero usado (ABDELWAHED et al., 2006).

Dessa forma, para minimizar esses problemas, é necessário promover a retirada de água do meio, já que este veículo pode facilitar processos de reação entre os componentes, além da facilidade de proliferação de micro-organismos. Nesta direção, vários estudos têm focalizado o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas contendo os sistemas nanoparticulados poliméricos, empregando a liofilização ou *freeze-drying* (SCHAFFAZICK et al., 2003a,b; ABDELWAHED et al., 2006), secagem por aspersão ou *spray-drying* (MÜLLER et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003a; SCHAFFAZICK et al., 2006) ou a

preparação de granulados/comprimidos (FRIEDRICH et al., 2010a,b).

Dentre estes processos, destaca-se a liofilização, que ocorre sem uso de altas temperaturas, a qual é baseada na remoção da água no estado sólido (gelo) através de sublimação sob vácuo. A liofilização ocorre em três etapas: congelamento (solidificação), secagem primária (sublimação do gelo) e secagem secundária (dessorção da água). Na etapa de congelamento, os cristais de água se formam no líquido solidificado, mas uma pequena quantidade de água permanece no estado líquido, conhecida como água ligante. Na etapa de secagem primária, ocorre a sublimação da água no estado sólido ao de vapor de água, que passa direto da porção seca do produto para a superfície da amostra e ainda o vapor é transferido da superfície da amostra para a câmara do condensador. Ao final da sublimação, vários poros são formados correspondentes aos espaços que foram antes ocupados por cristais de gelo, favorecendo a ressuspensão posterior do produto com veículo. A secagem secundária consiste na remoção da água adsorvida ao produto (TANG; PIKAL, 2004; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

A liofilização pode causar problemas aos sistemas nanoparticulados, especialmente em função do processo de congelamento e desidratação. Durante a etapa de congelamento da amostra, há a formação de um concentrado de nanopartículas que pode conduzir a um estado de agregação das mesmas e, em alguns casos, pode ocorrer a formação de uma agregação irreversível das partículas. Por esta razão, excipientes especiais como agentes crioprotetores/lioprotetores devem ser adicionados às suspensões de nanopartículas antes da etapa de congelamento. Os crioprotetores mais utilizados são: trealose, sacarose, glicose e manitol. A trealose parece ser o agente crioprotetor mais favorável por apresentar vantagens como menor efeito higroscópico e baixa reatividade química (ABDELWAHED et al., 2006). A concentração de crioprotetor a ser acrescentado nas suspensões de nanopartículas é importante para garantir a proteção das mesmas durante a liofilização (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Selecionar o crioprotetor mais adequado para ser utilizado no processo de liofilização pode ser feito através do índice de ressuspensão (df/di), que é obtido pela relação entre os diâmetros médios das partículas após a ressuspensão da amostra liofilizada (df) e os diâmetros médios das partículas (di) antes da desidratação. A função de manter as características essenciais das nanopartículas ocorre devido à formação de uma matriz amorfa em torno das estruturas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando a agregação e facilitando a ressuspensão das mesmas. Além disso, a cristalização da água contida na suspensão pode promover um estresse mecânico sobre as nanopartículas

conduzindo à desestabilização (ABDELWAHED et al., 2006; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; CHUNG; LEE; LEE, 2012).

No trabalho de Khayata e colaboradores (2012) foi realizada a liofilização de nanocápsulas de PCL com vitamina E (preparadas pelo método de nanoprecipitação), empregando PVP, manitol, sacarose ou glicose (na concentração 5%) como crioprotetores. Dentre os crioprotetores utilizados, o que apresentou melhor desempenho na manutenção parcial das características das nanocápsulas foi a sacarose e apresentou um índice de ressuspensão d_f/d_i satisfatório, segundo os autores (1,5).

Em outro trabalho, Swarnakar e colaboradores (2011) utilizaram crioprotetores como trealose, dextrose, manitol e sacarose para liofilizar nanopartículas de PLGA com coenzima Q10. As nanopartículas liofilizadas com trealose apresentaram um aumento não significativo de tamanho, sendo obtidos os seguintes índices de ressuspensão no estudo: 1,04, 1,22, 1,16 e 1,35, respectivamente, para trealose, dextrose, manitol e sacarose.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Materiais

O tensoativo polissorbato 80 (Tween 80[®]) foi obtido da Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos (São Paulo, Brasil). O mono-oleato de sorbitano (Span 80[®]), o monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) e a poli(ε-caprolactona) [Mn = 70.000 – 90.000] foram obtidos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil) e o Eudragit RS[®]100 (Röhm GmbH, Pharma Polymers, Alemanha) foi gentilmente fornecido pela Almapal (São Paulo, Brasil). O óleo de palma refinado orgânico e o óleo de coco virgem orgânico (TheraHerb VCO, Filipinas) foram gentilmente doados pela Agropalma (Belém, Brasil) e pela Fignelli Comércio Importação e Exportação (Niterói, Brasil), respectivamente, e os triglicerídeos de cadeia média empregados são da AlphaQuímica (Porto Alegre, Brasil). A idebenona foi obtida da Attivos Magistrais (São Paulo, Brasil). O metanol grau cromatográfico foi adquirido pela Tedia (São Paulo, Brasil) e os demais solventes e reagentes empregados apresentaram grau analítico.

1.2 Preparação dos sistemas nanoestruturados

As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). Dessa maneira, a fase orgânica, constituída de um tensoativo (mono-oleato de sorbitano ou monoestearato de sorbitano; 0,5 %, 0,77 % ou 1,0 % p/v), polímero [poli(ε-caprolactona) (PCL) ou Eudragit RS100[®] (EUD); 1,0 % p/v] e um óleo [palma (OP) e coco (OC) ou triglicerídeos de cadeia média (TCM); 1,5 % ou 3,0 % p/v], em acetona, foi mantida sob agitação a 35-38°C até a dissolução total dos componentes (cerca de 50 minutos). Após, o fármaco (0,1 % p/v – concentração teórica) foi acrescentado à fase orgânica e dissolvido sob agitação. Em seguida, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa, contendo polissorbato 80 (1,0 % p/v), permanecendo sob agitação moderada durante 10 minutos. No final do processo, a acetona e parte da água foram evaporadas empregando-se evaporador rotativo (Fisatom modelo 804), até o volume final de 10 mL ou 25 mL. As concentrações dos componentes informadas referem-se à formulação final, após a etapa de

evaporação. As formulações foram preparadas em triplicata e com proteção da luz.

Além da influência do tipo e da proporção dos componentes, também foi avaliada a proporção entre as fases aquosa e orgânica (FO/FA) sobre as características físico-químicas das nanoestruturas, as formulações preparadas conforme os componentes utilizados podem ser visualizados nas tabelas 2 e 3. A proporção 34:66 (FO/FA) refere-se à utilização de 27 mL de acetona e 53 mL de água e a proporção 50:50 corresponde a 53 mL de acetona e 53 mL de água, para a preparação de 10 mL finais de formulação, após a etapa de evaporação.

Tabela 2 – Formulações preparadas com óleo de palma, e a respectiva formulação com TCM, para fins comparativos

Formulação	Polímero* (%)	Óleo* (%)	Tensoativo de baixo EHL (%)*	Tensoativo de alto** EHL (%)*	Idebenona (%)*	Água/ Acetona	Volume final (mL)
PCL/OP	1,0	1,5	1,0 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 mL / 27 mL	10 mL
PCL/OP	1,0	1,5	0,5 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 ml / 27 mL	10 mL
PCL/OP	1,0	1,5	1,0 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 mL/ 53 mL	10 mL
PCL/OP	1,0	1,5	0,5 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 mL/ 53 mL	10 mL
PCL/OP	1,0	3,0	1,0 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 ml / 27 mL	10 mL
PCL/OP	1,0	3,0	0,5 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 ml / 27 mL	10 mL
PCL/OP	1,0	3,0	1,0 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 mL/ 53 mL	10 mL
PCL/OP	1,0	3,0	0,5 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 mL/ 53 mL	10 mL
PCL/TCM	1,0	3,0	0,5 (Span [®] 60)	1,0	0,1	133 mL/ 133 mL	25 mL
EUD/OP	1,0	3,0	1,0 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 ml / 27 mL	10 mL
EUD/OP	1,0	3,0	0,5 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 mL/ 53 mL	10 mL

*Concentrações das matérias-primas baseadas na formulação final, após a evaporação do solvente orgânico e parte da água (volume final de 10 mL ou 25 mL). **Polissorbato 80.

Tabela 3 – Formulações preparadas com óleo de coco, e a respectiva formulação com TCM, para fins comparativos

Formulação	Polímero (%) [*]	Óleo (%) [*]	Tensoativo de baixo EHL (%) [*]	Tensoativo de alto ^{**} EHL (%) [*]	Idebenona (%) [*]	Água/ Acetona	Volume final (mL)
PCL/OC	1,0	3,0	0,77 (Span [®] 80)	0,77	0,1	53 mL / 27 mL	10 mL
EUD/OC	1,0	3,0	0,77 (Span [®] 80)	0,77	0,1	53 ml / 27 mL	10 mL
PCL/OC	1,0	3,0	0,5 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 mL/ 53 mL	10 mL
EUD/OC	1,0	3,0	0,5 (Span [®] 60)	1,0	0,1	53 mL/ 53 mL	10 mL
PCL/OC	1,0	3,0	0,5 (Span [®] 80)	1,0	0,1	53 ml / 53 mL	10 mL
EUD/OC	1,0	3,0	0,5 (Span [®] 80)	1,0	0,1	53 ml / 53 mL	10 mL
EUD/TCM	1,0	3,0	0,5 (Span [®] 80)	1,0	0,1	133 mL/ 133 mL	25 mL

* Concentrações das matérias-primas baseadas na formulação final, após a evaporação do solvente orgânico e parte da água (volume final de 10 mL ou 25 mL). **Polissorbato 80.

Para fins comparativos, uma dispersão micelar aquosa contendo idebenona (0,1 % p/v) foi preparada da mesma maneira como acima descrito, para as suspensões de nanocápsulas, entretanto, apenas os tensoativos mono-oleato de sorbitano (0,5% p/v) e polissorbato 80 (1,0 % p/v) foram utilizados para a composição das fases, além do fármaco.

1.3 Determinação do diâmetro médio de partículas, do índice de polidispersão, do potencial zeta e do pH das formulações

Os diâmetros médios, os índices de polidispersão (espalhamento de luz dinâmico) e os potenciais zeta (mobilidade eletrofética) das partículas, em suspensão, foram determinados através do equipamento Zetasizer[®] Nano Series (modelo Zen 3600; Malvern Instruments),

após diluição das amostras (500 vezes) com água ultrapura (diâmetro e polidispersão) ou com solução aquosa de NaCl 10mM (potencial zeta).

Os valores de pH foram determinados diretamente nas suspensões, empregando potenciômetro (modelo pH 21; HANNA) previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0.

1.4 Determinação do teor e da taxa de associação da idebenona às nanocápsulas em suspensão

O doseamento da idebenona foi realizado com base no método de Amorim e colaboradores (2009; 2010), empregando cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE-UV) em fase reversa, utilizando o cromatógrafo Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japan), equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A (arranjo de diodos –PDA) e sistema controlador CBM-20A e com injeção manual (*loop* de 20 μ L). A separação foi obtida empregando uma coluna C_{18} (Nano Separation Technologies-NST- C_{18} ; 250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) à temperatura ambiente, fase móvel metanol:água (80:20% v/v), fluxo de 1,0 mL/min e 279 nm de comprimento de onda de detecção. Empregou-se também uma pré-coluna (Phenomenex Security Guard C_{18} , 4,0 x 3,0 mm) para proteção da coluna cromatográfica. Para a determinação do teor total de idebenona, uma alíquota das suspensões foi diluída em metanol, sonicada por 10 minutos, e, após, o volume foi aferido a 10 mL (concentração teórica de 15 μ g/mL), seguindo-se de centrifugação (10 minutos). O sobrenadante foi filtrado em membrana de celulose regenerada (0,45 μ m) e injetado no cromatógrafo. A curva padrão foi preparada a partir de uma solução estoque de 1,0 mg/mL de idebenona em metanol, para obter as concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 μ g/mL de fármaco no mesmo solvente.

A concentração da substância ativa associada às nanocápsulas (eficiência de encapsulamento: EE%) foi determinada através da diferença entre as concentrações total (C_{total}) e livre do fármaco ($C_{ultrafiltrado}$) presentes nas formulações (Equação 1), empregando ultrafiltração-centrifugação (Amicon[®] 10.000 MW, Millipore). Dessa forma, 200 μ L das suspensões foram pipetados para os dispositivos Amicon[®] e centrifugados por 10 minutos a 2.200 xg (Sigma, 1-14), para obtenção do ultrafiltrado. No ultrafiltrado, determinou-se a concentração de fármaco livre através de CLAE, conforme acima descrito.

$$EE \% = \frac{C_{total} - C_{ultrafiltrado}}{C_{total}} \times 100$$

Equação (1)

1.5 Validação do método analítico para a determinação de idebenona nas suspensões de nanocápsulas

O método para a determinação da idebenona a partir das suspensões de nanocápsulas desenvolvidas foi validado seguindo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

A especificidade do método analítico foi conduzida a partir das suspensões de nanocápsulas sem o fármaco e pela análise da pureza do pico cromatográfico. A linearidade foi verificada na faixa de concentração de 5 a 25 µg/mL, através de três curvas analíticas independentes construídas conforme acima descrito, realizando-se estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e Análise de Variância (ANOVA). O ensaio de repetibilidade foi feito com a preparação de seis amostras independentes, na mesma concentração (15 µg/mL de idebenona), no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. Por sua vez, a precisão intermediária foi analisada em dois dias diferentes (n=6/dia) na concentração de 15 µg/mL. Os resultados foram expressos na forma de desvio padrão relativo (DPR%). A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação, a partir de uma alíquota de suspensão de nanocápsulas de concentração conhecida e da adição de três diferentes concentrações de solução padrão (2, 10 e 18 µg/mL), correspondendo a concentrações finais de idebenona de 7, 15 e 23 µg/mL. A análise foi realizada em triplicata.

1.6 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas

Vinte e cinco mililitros (25 mL) das suspensões de nanocápsulas otimizadas, contendo idebenona (1,0 mg/mL), foram preparados em triplicata (OP/PCL; TCM/PCL; OC/EUD; TCM/EUD), da mesma forma como descrito no item 1.2. Estas formulações foram fracionadas e armazenadas à temperatura ambiente e avaliadas após a preparação, 25, 45 e 75

dias. Os parâmetros monitorados foram o teor de fármaco, o diâmetro médio de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. Algumas amostras das formulações estudadas foram armazenadas protegidas da luz (frascos de vidro âmbar) e outras foram armazenadas expostas à luz (frascos de vidro transparente), visando à seleção das formulações mais promissoras e a avaliação da influência da composição dos sistemas.

1.7 Estudos de fotoestabilidade da idebenona associada às nanocápsulas

A degradação da idebenona associada às nanocápsulas de PCL, preparadas com OP ou TCM, foi estudada através da exposição à radiação UVC artificial (T8 32W PG02), durante o período de 13 horas, ou à radiação UVA artificial (Phillips T8 30W BL) durante 13 e 23 horas. Para fins comparativos, uma dispersão micelar aquosa contendo o fármaco foi empregada (item 1.2). As amostras (700 µL das suspensões de nanocápsulas ou da dispersão micelar), em triplicata, foram colocadas em cubetas de plástico com tampa (UV-Cuvette micro, Brand[®]; 12,5 x 12,5 x 45 mm), que permaneceram equidistantes no interior de câmaras espelhadas (1 m x 25 cm x 25 cm) contendo as lâmpadas UVA ou UVC durante os períodos citados acima. Nos tempos pré-determinados, alíquotas de 150 µL foram retiradas das cubetas e tratadas conforme descrito no item 1.4 para a quantificação do teor de idebenona através de CLAE. Desta forma, a proteção de idebenona contra a fotodegradação nos diferentes sistemas foi avaliada por quantificar a quantidade de fármaco remanescente após o período de exposição. Durante os experimentos, cubetas contendo a dispersão do fármaco foram também cobertas com papel alumínio e incluídas na câmara, para refutar a hipótese de degradação térmica. Os experimentos foram realizados em triplicata de lote, sendo um lote de cada formulação, em cada dia de experimento, disposto em 3 cubetas (n=3/formulação).

1.8 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da idebenona a partir das nanocápsulas

A avaliação da liberação *in vitro* da idebenona (n=3), a partir das suspensões de nanocápsulas de PCL (OP ou TCM), foi efetuada pela técnica de difusão em sacos de diálise (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA), em condição *sink*,

utilizando como meio de liberação água:etanol (70:30, v/v). Para fins comparativos, uma solução metanólica do fármaco foi empregada (1 mg/mL). Os sacos de diálise foram preenchidos com 1,0 mL das amostras em estudo (1000 µg de fármaco) e colocados em béqueres contendo 125 mL de meio de liberação, mantidos sob agitação magnética à temperatura de 37 °C. Alíquotas de 1,0 mL de meio foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, repondo-se o mesmo volume de meio fresco, aquecido à mesma temperatura.

As coletas das amostras obtidas a partir das suspensões de nanocápsulas foram realizadas durante 60 h e durante 12 h para a solução orgânica. As amostras coletadas foram quantificadas diretamente por CLAE (cromatógrafo SHIMADZU, Kyoto, Japão, LC-10A, equipado com uma bomba modelo LC-10AD, com detector UV SPD-10A, sistema controlador SCL-10A e injetor manual Rheodyne (*loop* de 50 µL), empregando a mesma coluna descrita na determinação do teor. A curva padrão (0,125 a 16 µg/mL) foi feita no mesmo meio empregado para liberação (água:etanol 70:30, v/v), a partir de uma solução mãe de idebenona em metanol (1 mg/mL).

Os perfis de liberação *in vitro* da idebenona, a partir das formulações, foram analisados através de modelagem matemática (Scientist 2.0 software - MicroMath[®], USA), empregando modelos dependentes (ordem zero, monoexponencial, biexponencial e Lei da Potência/Korsmeyer-Peppas). O modelo mais adequado (equações 2-4), para descrever os dados gerados de liberação, foi selecionado baseado no maior coeficiente de correlação (r), maior critério de seleção do modelo (MSC) e melhor ajuste gráfico.

$$(2) \quad C=C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (\text{monoexponencial})$$

$$(3) \quad t_{1/2}=0,693/k \quad (\text{tempo de meia-vida})$$

$$(4) \quad f_t=a \cdot t^n \quad (\text{modelo de Korsmeyer-Peppas})$$

Onde, C_0 é a concentração inicial do fármaco, k é a constante de velocidade de liberação, $t_{1/2}$ é o tempo para liberar 50% do fármaco presente, f_t é a fração de fármaco liberada no tempo t (horas), a é a constante que incorpora características estruturais e geométricas do sistema de liberação e n é o expoente que indica o mecanismo de liberação do fármaco.

1.9 Preparação de liofilizados a partir das suspensões de nanocápsulas

As diferentes suspensões de nanocápsulas (OP/PCL, TCM/PCL, OC/EUD e TCM/EUD), contendo idebenona (1,0 mg/mL), foram fracionadas (5 mL) em frascos de vidro de boca larga. Após, acrescentou-se trealose a 10% (p/v) em cada frasco contendo as suspensões de nanocápsulas. Após a dissolução do carboidrato, sob agitação magnética durante 10 minutos, as amostras foram congeladas em freezer, por 24 horas, à temperatura de cerca de -35 °C. Após, foram submetidas à desidratação em liofilizador (LIOTOP L 101, Liobras, São Paulo, Brasil) para obtenção dos produtos secos, durante 24 horas, à temperatura de cerca de -55°C. Uma solução do adjuvante (trealose a 10 %) também foi liofilizada, para fins comparativos. Os liofilizados foram preparados em triplicata e armazenados em dessecador, em frascos de vidro e ao abrigo da luz.

1.10 Determinação do diâmetro médio de partículas após redispersão dos pós liofilizados em água

O diâmetro médio das partículas foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer[®] Nano Series modelo ZEN 3600, Malvern Instruments), a 25 ± 2 °C. Os liofilizados foram pesados (0,156 g) e redispersos em água ultrapura (1,0 mL) a fim de se obter a mesma concentração dos componentes do que a suspensão original. As amostras de cada lote (n=3) foram submetidas à agitação magnética durante 15 minutos e, após, uma alíquota foi retirada e diluída em água purificada (1:500 v/v). Após, as amostras foram filtradas em membrana hidrofílica (0,45 µm).

O índice de ressuspensão das partículas, que representa a recuperação do tamanho médio de partículas em relação às formulações de origem, foi calculado através da relação entre o tamanho médio das partículas dos pós após a redispersão em água (tamanho final) e o tamanho médio das suspensões (tamanho inicial), conforme a equação 5.

$$(5) \quad \text{Índice de ressuspensão} = S_f / S_i$$

Onde, S_f é o diâmetro médio das partículas dos liofilizados após a redispersão em água e S_i é o diâmetro médio das partículas das suspensões coloidais originais.

1.11 Determinação do teor de idebenona nos liofilizados e validação do método analítico

Amostras dos liofilizados foram pesadas exatamente, correspondendo à quantidade teórica de 150 µg de idebenona, transferidas para um balão volumétrico de 10 mL e dispersas em metanol, sob sonicação durante 15 minutos. Seguindo-se a este tratamento, o volume do balão volumétrico foi completado, esta amostra foi centrifugada por 10 minutos, obtendo-se uma concentração teórica de 15 µg/mL de fármaco. Após filtração do sobrenadante em membrana de celulose regenerada (0,45 µm), as amostras foram injetadas no cromatógrafo, segundo a metodologia descrita anteriormente para as suspensões (item 1.4).

O método analítico foi validado para a quantificação de idebenona nos liofilizados contendo as nanocápsulas e trealose, segundo os parâmetros de especificidade e precisão (repetibilidade e precisão intermediária). A especificidade dos liofilizados foi realizada utilizando amostras de suspensões de nanocápsulas liofilizadas sem fármaco e a análise da pureza de pico, para averiguar se outros componentes da formulação que não sejam o fármaco pudessem interferir na detecção do mesmo. O ensaio de precisão também foi feito com a análise de teor de seis amostras com concentração teórica de 15 µg/mL de idebenona (repetibilidade), em metanol, conforme acima descrito, em dois dias consecutivos (precisão intermediária).

1.12 Análise morfológica dos liofilizados contendo as nanocápsulas

Amostras dos liofilizados de cada grupo de formulação e amostras da solução aquosa de trealose liofilizada foram colocadas em um suporte metálico e metalizadas com ouro por 30 segundos (metalizador Desk II, Denton Vacuum), para posterior análise morfológica empregando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV, Jeol JSM-6360), localizado no Departamento de Engenharia Mecânica da UFSM. Empregou-se a voltagem de 10 KV, obtendo-se imagens referentes aos seguintes aumentos: 1.500X, 7.500X e 15.000X.

1.13 Determinação do teor de umidade das amostras liofilizadas

O teor de água nos pós liofilizados (%) foi determinado através de perda por dessecação (Brasil, 2010). Desta forma, as amostras foram colocadas em um medidor de umidade por infravermelho (GEHAKA, IV 2500), sendo que 2 g de cada amostra foram distribuídos em um prato de alumínio, inseridos na balança e submetidos à temperatura de 120°C.

1.14 Estudo de estabilidade dos liofilizados contendo idebenona associada às nanocápsulas poliméricas

Os produtos liofilizados (OP/PCL, TCM/PCL, OC/EUD e TCM/EUD) foram mantidos à temperatura ambiente e protegidos da luz e da umidade durante o período de 75 dias, determinando-se o teor de fármaco após tempos pré-estabelecidos, de maneira comparativa às suspensões de origem.

1.15 Análise estatística

Os resultados foram expressos com média \pm SD (desvio padrão) e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e teste *t* de Student em nível de significância de 5%, através do software Sigma Stat versão 3.0 ou Excel®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.1 Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas poliméricas com óleo de palma, como núcleo oleoso, e idebenona

A primeira parte do trabalho foi dedicada ao desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas contendo óleo de palma (OP) como núcleo, para verificar a viabilidade da preparação de formulações com características físico-químicas adequadas para a veiculação da idebenona. Desta forma, diferentes parâmetros foram estudados, como a concentração de óleo de palma, a concentração do tensoativo de baixo EHL e a proporção das fases aquosa e orgânica (FA/FO), visando à otimização das formulações. Foram utilizadas concentrações dos componentes (óleo, polímero, tensoativos) dentro da faixa usual para a preparação de nanocápsulas, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010), conforme nosso grupo de pesquisa vem também empregando.

Conforme a tabela 4, as formulações preparadas, inicialmente, preparadas com 1,5 % de OP apresentaram diâmetros médios na faixa de 212 a 292 nm, índice de polidispersão inferior a 0,23 e potencial zeta negativo (cerca de -13 mV), além de valores ligeiramente ácidos de pH. Inicialmente, empregou-se a proporção de fases 34:66 (FO:FA) para a preparação dos sistemas. Entretanto, o índice de polidispersão foi superior a 0,2, mesmo aumentando a concentração de tensoativo (Span[®] 60), além de haver população micrométrica em todos os lotes. Por outro lado, aumentando-se a proporção de acetona (50:50 v/v FO/FA), houve uma tendência à diminuição do diâmetro médio de partículas e do índice de polidispersão, além de haver exclusão da população micrométrica quando se empregou a menor concentração de tensoativo (0,5%), a qual anteriormente foi observada. Este fato pode ser atribuído, provavelmente, à redução da viscosidade da fase orgânica, fato que pode levar à redução do diâmetro médio de partículas, quando as mesmas são formadas através do método de deslocamento de solvente (LEGRAND et al., 2007), o que facilita a difusão entre as fases. Por sua vez, o potencial zeta não foi influenciado pela concentração do tensoativo de baixo EHL e pela proporção das fases, sendo negativo, condizente com a natureza química do polímero, um poliéster alifático, contendo grupamentos ácidos carboxílicos terminais, conforme descrito para nanocápsulas preparadas com o mesmo (CHACÓN et al., 1999; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Tabela 4 – Caracterização das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo óleo de palma (1,5% p/v) e idebenona (1 mg/mL) (n=3)

Formulação (Proporção FO:FA)*	Diâmetro médio (nm)	PDI**	Potencial zeta (mV)	pH
Span [®] 60 1,0% (34:66)	261 ± 18	0,228 ± 0,04	-12,8 ± 0,6	6,4 ± 0,3
Span [®] 60 0,5% (34:66)	292 ± 80	0,218 ± 0,03	-13,5 ± 1,6	5,8 ± 0,4
Span [®] 60 1,0% (50:50)	221 ± 25	0,155 ± 0,08	-13,0 ± 1,2	6,1 ± 0,4
Span60 [®] 0,5% (50:50)	212 ± 13	0,113 ± 0,02	-12,7 ± 2,1	6,5 ± 1,0

*Volume final da formulação: 10 mL; **PDI: polidispersão

Quando a concentração de óleo foi aumentada para 3,0 % (p/v; Tabela 5), também houve uma tendência à redução do diâmetro médio de partículas (361-364 nm) e do índice de polidispersão (0,321-0,432) com o aumento da proporção de acetona (258-272 nm; PDI 0,162-0,189). Entretanto, diferenças significativas entre estes parâmetros foram observadas apenas quando se empregou menor concentração de tensoativo de baixo EHL ($p < 0,05$). O potencial zeta apresentou-se negativo (-20 a -11 mV), conforme esperado, e foi significativamente influenciado pela proporção das fases aquosa/orgânica ($p < 0,05$), sendo maior, em módulo, quando se utilizou menor proporção de acetona. Este fato pode ser atribuído a uma diferente estruturação das partículas e/ou no número de partículas, conduzindo a diferenças nas características de superfície.

Tabela 5 – Caracterização das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo óleo de palma (3,0 % p/v) e idebenona (1 mg/mL) (n=3)

Formulação (Proporção FO:FA)*	Diâmetro médio (nm)	PDI**	Potencial zeta (mV)	pH
Span [®] 60 1,0% (34:66)	361 \pm 64	0,321 \pm 0,11	-20,1 \pm 3,8	6,66 \pm 0,2
Span [®] 60 0,5% (34:66)	364 \pm 54	0,432 \pm 0,08	-14,0 \pm 1,8	6,00 \pm 0,2
Span [®] 60 1,0% (50:50)	272 \pm 86	0,189 \pm 0,12	-12,2 \pm 1,6	5,90 \pm 0,1
Span [®] 60 0,5% (50:50)	258 \pm 8	0,162 \pm 0,00	-10,9 \pm 0,4	6,00 \pm 0,2

*Volume final da formulação: 10 mL; **PDI: polidispersão

Comparando-se as formulações preparadas com 1,5 % e com 3,0 % de OP (Tabelas 4 e 5), evidencia-se uma tendência ao aumento do diâmetro médio de partículas e do índice de polidispersão com o incremento da concentração do óleo. Entretanto, diferenças significativas quanto ao diâmetro médio e PDI foram observadas apenas para as formulações preparadas com 0,5 % de Span[®] 60 e proporção 50:50 (FO/FA) e no valor de PDI para as suspensões preparadas com Span[®] 60 (0,5%) e 34:66 FO/FA.

Sabe-se que para a preparação das nanocápsulas poliméricas utiliza-se a polimerização *in situ* ou polímeros pré-formados (MORA-HUERTAS et al., 2010), os quais se auto-organizam (*self-assembly*), pelas técnicas de deposição interfacial ou emulsificação-difusão por exemplo. Nestes casos, é necessária uma fase orgânica e outra aquosa para estruturar as suspensões coloidais supramoleculares (JORNADA et al. 2012). Cabe ressaltar que o modo de preparação usual das nanocápsulas poliméricas, através do método de deslocamento de solvente/deposição interfacial de polímero pré-formado, é baseado no emprego de concentração de água equivalente a cerca do dobro da concentração de solvente orgânico miscível (MORA-HUERETAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Entretanto, para as formulações com OP e idebenona, o aumento da proporção de acetona reduziu o tamanho médio de partículas e aumentou a homogeneidade de distribuição de tamanho (menor PDI), sendo a condição selecionada neste estudo, provavelmente por reduzir a concentração dos componentes na fase orgânica, o que afetaria a viscosidade desta fase e, portanto, o tamanho final das nanocápsulas. Jornada e colaboradores (2012) verificaram que a viscosidade da fase

aquosa não influenciou o tamanho final de nanocápsulas de PCL, preparadas com TCM e Span[®] 60. Entretanto, a concentração das matérias-primas influenciou a viscosidade da fase orgânica, sendo que o diâmetro médio final das partículas (em 10 mL) e a distribuição de tamanho foram diretamente proporcionais à viscosidade desta fase (PDI menor que 0,2 para concentrações mais baixas; PDI entre 0,26 e 0,44 para concentrações mais altas). Estes resultados corroboram com o presente trabalho, entretanto, neste caso, o volume da fase orgânica foi aumentado para reduzir, provavelmente, a viscosidade da fase orgânica e diminuir o diâmetro médio e o índice de polidispersão das nanocápsulas, sem alterar a quantidade dos componentes na formulação final.

Buscou-se também testar um polímero com características catiônicas, como o Eudragit[®] RS100 (GAIKWAD et al., 2010; SANTOS et al., 2013), para fins comparativos, verificando a viabilidade de utilizar OP também com este tipo de polímero, empregando as condições selecionadas nos estudos com PCL (concentração de tensoativo e proporção das fases). Os resultados apresentados na tabela 6 indicaram que as nanocápsulas de EUD e com OP não apresentaram características físico-químicas adequadas, independentemente da proporção das fases aquosa/orgânica e da concentração de tensoativo de baixo EHL, obtendo-se diâmetros médios micrométricos com ampla distribuição de tamanho de partículas. O potencial zeta das suspensões apresentou um valor positivo devido à existência de grupamentos amônio quaternário (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), indicando que o óleo foi encapsulado pelo polímero, o qual está na interface óleo/água.

Tabela 6 – Caracterização das formulações preparadas com óleo de palma (3,0%) (p/v) e com Eudragit[®] RS 100, contendo idebenona (1mg/mL) (n=3)

Formulações*		Diâmetro médio (nm)	PDI**	Potencial zeta (mV)	pH
Span [®] 60 1,0%	FO:FA (34:66)	1518 ± 831	0,349 ± 0,18	7,8 ± 1,7	5,6 ± 0,1
Span [®] 60 0,5%	FO:FA (50:50)	1315 ± 1237	0,619 ± 0,13	1,9 ± 0,1	5,60 ± 0,1

*Volume final da formulação: 10 mL; **PDI: polidispersão

Uma dispersão aquosa preparada somente com OP (3,0 %) e com os tensoativos (Tween[®] 80/Span[®] 60) apresentou potencial zeta negativo ($-15,5 \pm 4,1$ mV) e tamanho médio de partículas adequado (232 ± 6 nm; PDI $0,187 \pm 0,00$), indicando que a presença do EUD gerou uma agregação supramolecular maior e não reproduzível com este óleo, fato que não ocorreu com o polímero PCL, submetido às mesmas condições de preparação, o qual fornece potencial zeta também negativo. De fato, a natureza do polímero pode influenciar o tamanho das partículas formadas, através do método de nanoprecipitação (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

De acordo com os resultados, as suspensões selecionadas como as mais promissoras foram aquelas preparadas com PCL, com menor concentração de tensoativo de baixo EHL (0,5 %) e com proporção mais equilibrada das fases orgânica e aquosa (50:50 FO/FA), além de maior quantidade de OP, visando a futuros benefícios dos componentes do mesmo (figura 3).

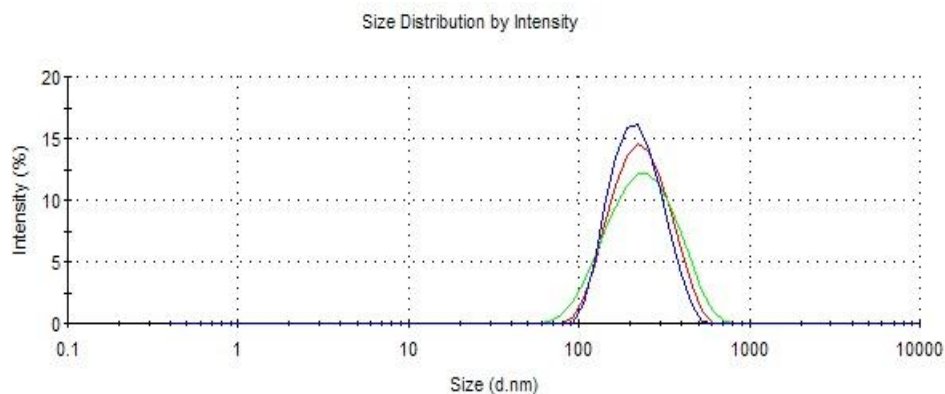


Figura 3 – Gráfico indicando a distribuição de tamanho de partículas das nanocápsulas de PCL selecionadas, preparadas com óleo de palma 3% (p/v) e idebenona.

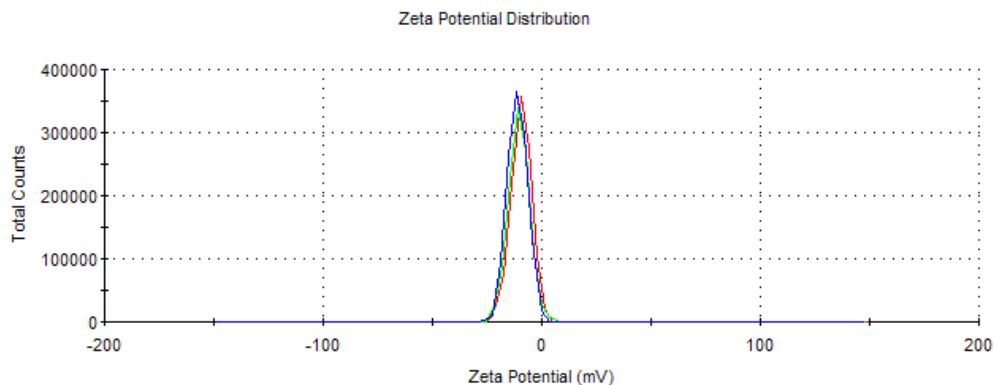


Figura 4 – Gráfico indicando o potencial zeta das nanocápsulas de PCL selecionadas, preparadas com óleo de palma 3% (p/v) e idebenona.

1.2 Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas poliméricas com óleo de coco, como núcleo oleoso, e idebenona

Tendo como base o potencial terapêutico, sobretudo antioxidante, do óleo de coco (OC), para fins comparativos, buscou-se desenvolver formulações de nanocápsulas contendo este óleo para a veiculação de idebenona. O óleo de coco foi proposto, pela primeira vez, como núcleo oleoso (3,0 % p/v) de nanocápsulas poliméricas pelo nosso grupo de pesquisa (SANTOS, 2012), para a liberação do antifúngico clotrimazol, empregando Eudragit[®] RS100 (1,0 %) como polímero catiônico mucoadesivo, objetivando a aplicação vaginal.

Neste sentido, nanocápsulas contendo óleo de coco a 3,0 % (p/v) foram preparadas e caracterizadas, tanto com PCL quanto com EUD para a associação da idebenona (tabela 7). Inicialmente, empregaram-se as mesmas condições dos trabalhos prévios do grupo de pesquisa (SANTOS, 2012), utilizando EUD, Span[®] 80 (0,77 %) e a proporção 34:66 FO/FA. As partículas obtidas apresentaram altos índices de polidispersão (0,25), principalmente quando o polímero foi substituído pelo PCL (0,5), além de elevado tamanho médio de partículas (447 nm). Após, utilizando as mesmas condições otimizadas para as formulações contendo óleo de palma (0,5% de Span[®] 60 e 50:50 FO/FA; item 1.1), tanto com PCL quanto com EUD, as formulações apresentaram índices de polidispersão (> 0,36) e diâmetro médio de partículas elevados (303-628 nm). Quando se utilizou Span[®] 80 em substituição ao Span[®] 60, nas mesmas concentrações (0,5 %), apenas as suspensões de nanocápsulas de EUD apresentaram diâmetro médio (172 nm) e índice de polidispersão (0,09) adequados. Além disto, os valores de potencial zeta foram positivos, conforme esperado (9 mV) e evidenciado para outras nanopartículas, segundo a literatura (GAIKWAD et al., 2010; SANTOS et al., 2013).

Tabela 7 – Caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo óleo coco (3,0 % p/v) e idebenona (1 mg/mL) (n=3)

Formulações*		Diâmetro médio (nm)	PDI**	Potencial zeta (mV)	pH
PCL	Span [®] 80 0,77% (34:66)	447 ± 111	0,5 ± 0,17	-10,5 ± 2,1	7,1 ± 0,1
EUD	Span [®] 80 0,77% (34:66)	204 ± 12	0,245 ± 0,04	9,9 ± 1,9	6,3 ± 0,2
PCL	Span [®] 60 0,5% (50:50)	303 ± 97	0,377 ± 0,29	-12,4 ± 0,4	6,3 ± 0,2
EUD	Span [®] 60 0,5% (50:50)	628 ± 176	0,362 ± 0,10	3,5 ± 3,8	5,9 ± 0,3
PCL	Span [®] 80 0,5% (50:50)	666 ± 310	0,733 ± 0,24	-10,5 ± 0,2	6,2 ± 0,2
EUD	Span [®] 80 0,5% (50:50)	172 ± 04	0,093 ± 0,01	9,1 ± 0,8	5,1 ± 0,1

*Volume final da formulação: 10 mL; **PDI: polidispersão

Os tensoativos são importantes componentes nas formulações de nanocápsulas, pois afetam a estabilização dos sistemas, podendo influenciar as propriedades físico-químicas, como tamanho de partículas (MOSQUEIRA et al., 2000). No presente trabalho, mesmo empregando tensoativos com EHL próximos (4,7 para Span[®] 60; 4,3 para Span[®] 80; ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009) em combinação com polissorbato 80, mas com estados físicos diferentes (Span[®] 60 sólido; Span[®] 80 líquido), houve influência significativa na estabilização das partículas formadas. Os valores de pH das formulações com PCL variaram de 6,2 a 7,1, sendo mais ácidas as formulações preparadas com EUD (5,1 a 6,3). Desta forma, as formulações de EUD e OC (3,0% p/v), preparadas com Span[®] 80 (0,5%) e proporções equilibradas das fases aquosa e orgânica (50:50) foram selecionadas como adequadas para a sequência do trabalho (Figuras 5 e 6).

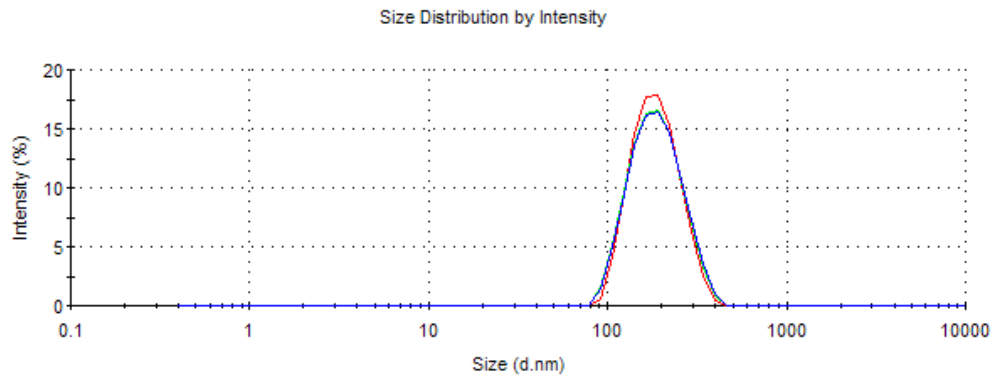


Figura 5 – Gráfico indicando a distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas de Eudragit® RS100 selecionadas, contendo óleo de coco 3% (p/v) e idebenona.

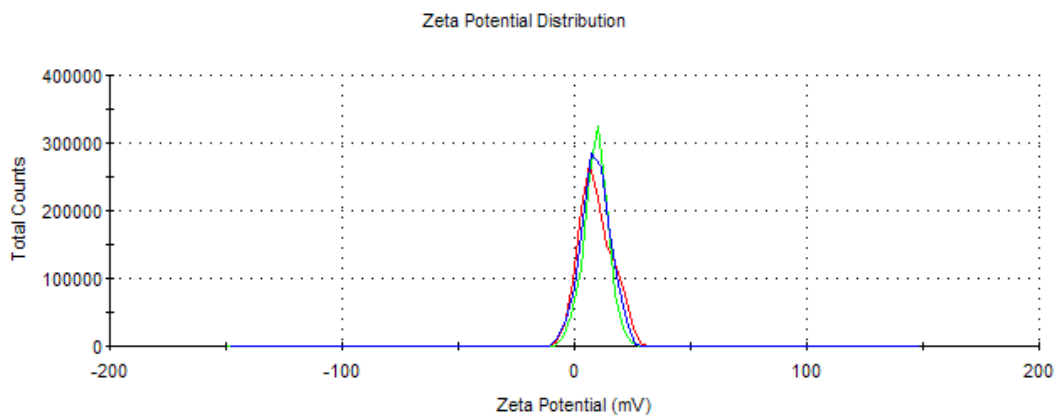


Figura 6 - Gráfico indicando o potencial zeta das nanocápsulas de Eudragit® RS100 selecionadas, preparadas com óleo de coco 3% (p/v) e idebenona.

1.3 Estudo comparativo da influência do tipo de óleo e do polímero sobre as características físico-químicas de nanocápsulas contendo idebenona

Conforme as formulações selecionadas, preparadas com os óleos de origem natural propostos e idebenona, foi realizado um estudo comparativo das características físico-químicas dessas formulações com outras, preparadas nas mesmas condições, utilizando um óleo sintético, classicamente empregado para a preparação de suspensões de nanocápsulas poliméricas (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico ou TCM), apresentando ampla capacidade de solubilização de substâncias ativas. Vários estudos encontrados na literatura empregaram TCM em nanoestruturas para a veiculação de fármacos com diferentes características físico-químicas e diversos objetivos terapêuticos/tecnológicos (MOSQUEIRA

et al., 2000; PALUMBO et al., 2002; ALVES; POHLMANN; GUTERRES, 2005; SCHAFFAZICK et al., 2005; ALVES et al., 2007; SCHAFFAZICK et al. 2008; FONTANA et al., 2010; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; KULKAMP et al., 2011; Li; GE, 2012; OURIQUE et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

Considerando os resultados, todas as formulações apresentaram aspecto macroscópico homogêneo, como um fluido opalescente, levemente amarelado, devido à coloração alaranjada do fármaco, e com diâmetros médios de partículas inferiores a 230 nm, com baixos índices de polidispersão ($<0,2$), denotando homogeneidade de distribuição de tamanho de partículas, estando de acordo com os diâmetros médios de partículas normalmente encontrados para as suspensões de nanocápsulas (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; SCHAFFAZICK et al., 2006; MORA-HUERTAS et al., 2010; OURIQUE et al., 2008; OURIQUE et al., 2011; SANTOS et al., 2013). Deve-se destacar que a homogeneidade da população nanométrica e o tamanho médio de partículas são características chave para se obter sistemas com potencial aplicabilidade, no campo farmacêutico, pois a capacidade de atravessar barreiras biológicas seletivamente depende destes fatores, além das características químicas de superfície (JORNADA et al., 2012).

Tabela 8 – Estudo comparativo das características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas preparadas com diferentes polímeros e óleos, contendo idebenona (n=3).

Formulações*	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)
OP/PCL**	216 ± 09	0,142 ± 0,02	-11,1 ± 1,0	6,42 ± 0,56	0,93 ± 0,03
TCM/PCL**	209 ± 12	0,084 ± 0,02	-12,6 ± 2,1	6,29 ± 0,03	0,93 ± 0,06
OC/EUD***	166 ± 09	0,120 ± 0,01	11,5 ± 0,9	5,27 ± 0,04	0,91 ± 0,05
TCM/EUD***	166 ± 04	0,113 ± 0,01	14,3 ± 1,0	5,37 ± 0,24	0,89 ± 0,01

*Volume final de formulação: 25 mL; Proporção 50:50 FO/FA;

**Formulações com PCL (1,0%) preparadas com Tween[®] 80 (1,0%) e Span[®] 60 (0,5%); óleo (3,0 %);

***Formulações com EUD (1,0 %) preparadas com Tween[®] 80 (1,0 %) e Span[®] 80 (0,5%); óleo (3,0%);

PDI: Índice de polidispersão.

A natureza do óleo não influenciou o diâmetro médio de partículas e a distribuição de tamanho de partículas ($p > 0,05$), tanto para as formulações preparadas com PCL quanto com EUD. Como durante a preparação das formulações ocorre a dissolução dos componentes a 40° C em acetona, o estado físico dos óleos, provavelmente, não influenciou a difusão entre as

fases/viscosidade, nas condições de preparação utilizadas (50:50 FO:FA), não afetando o tamanho de partículas (OP: fusão a cerca de 34,2°C; EDEM, 2002; OC: fusão a cerca de 24°C; FOSTER; WILLIAMSON; LUNN, 2009).

As suspensões TCM/PCL preparadas neste trabalho são um tipo particular de nanocápsulas, denominadas de núcleo lipídico, as quais são constituídas por uma parede polimérica (PCL) que envolve o núcleo lipofílico (dispersão de material lipofílico), constituído por TCM e monoestearato de sorbitano, estabilizadas por Tween[®] 80. Estes sistemas, por possuírem uma substância lipídica sólida (Span[®] 60) no núcleo hidrofóbico, apresentam núcleo mais viscoso do que as nanocápsulas convencionais, sendo estudadas na veiculação de substâncias ativas hidrofóbicas almejando a diversas aplicações (JAGER et al., 2009; BERNARDI et al., 2009; VENTURINI et al., 2011; JORNADA et al., 2012). O mecanismo de formação destas partículas foi descrito, recentemente (JORNADA et al., 2012), como sendo baseado na solução molecular das matérias-primas, que, em contato com um não-solvente (água), se auto-organizam em estruturas supramoleculares, as quais diminuem de tamanho após a evaporação do solvente. As nanocápsulas propostas no presente estudo, também são diferenciadas, sobretudo com o OP, que possui ponto de fusão mais elevado, uma vez que, após o resfriamento, solidifica-se produzindo, provavelmente, nanocápsulas de núcleo sólido, estando também presente o Span[®] 60 na composição.

O potencial zeta das formulações também foi condizente com o tipo de polímero, variando de -11 a +14 mV. De uma maneira geral, o potencial zeta das nanocápsulas depende da natureza química do polímero, do agente estabilizador e do pH do meio, de maneira que nanocápsulas preparadas com poliésteres empregando tensoativos não-iônicos, como Tween[®] 80, apresentam potencial zeta negativo, devido aos grupos carboxílicos terminais, e potencial zeta positivo quando polímeros catiônicos e tensoativos não-iônicos são utilizados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Para as formulações preparadas com PCL, a natureza do óleo não influenciou este parâmetro. Entretanto, para as formulações preparadas com EUD, as nanocápsulas contendo óleo de coco apresentaram valor de potencial zeta significativamente menor ($p < 0,05$) em relação àquelas preparadas com TCM como núcleo.

Em relação à influência do polímero, as formulações preparadas com PCL foram significativamente ($p < 0,05$) maiores do que aquelas preparadas com EUD, fato que pode estar associado a diferenças no estado de agregação do polímero ao redor do óleo, durante a difusão das fases, devido à diferença da composição química (poliéster ou polimetacrilato), assim

como ocorreu com os valores de pH, mais ácidos com EUD. Resultados similares foram observados por Schaffazick e colaboradores (2007), ao comparar estes mesmos polímeros na preparação de nanocápsulas contendo melatonina e TCM, como núcleo oleoso (245 nm e pH 6,0 para PCL; 135 nm e pH 5,0 para Eudragit[®] RS100). Valores de pH para suspensões de nanocápsulas normalmente encontram-se na faixa de 3,0 a 7,5, quando métodos como nanoprecipitação são empregados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010), estando condizente com os resultados obtidos neste trabalho (5,3 – 6,4).

Considerando as formulações preparadas com 10 mL e com 25 mL, as mesmas apresentaram características próximas, demonstrando reprodutibilidade da metodologia de preparação, de maneira que foram obtidos valores para o diâmetro de 258 ± 8 nm e 216 ± 9 nm, PDI de $0,162\pm 0,00$ e $0,142\pm 0,02$ e potencial zeta de $-10,9\pm 0,4$ mV e $-11,1\pm 1,0$ mV para formulações de OP/PCL com volume final de 10 e 25 mL (tabelas 3 e 6), respectivamente. Houve diferença significativa apenas para o valor de diâmetro médio de partículas ($p < 0,05$). Já as formulações de OC/EUD apresentaram diâmetros de 172 ± 4 nm e 166 ± 9 nm; PDI de $0,093\pm 0,01$ e $0,120\pm 0,01$ e potencial zeta de $9,1\pm 0,8$ mV e $11,5\pm 0,9$ mV para 10 e 25 mL de formulação, respectivamente (tabelas 5 e 6). O diâmetro diminuiu quando o volume de formulação foi aumentado, mas não apresentou diferença significativa, enquanto que valores de PDI e potencial zeta aumentaram de forma significativa ($p < 0,05$).

Quanto ao teor total de fármaco, as suspensões preparadas com EUD tenderam a um teor inicial mais baixo em relação às formulações com PCL, principalmente quando TCM foi empregado, estando a média de teor destas formulações abaixo de 90%. Por outro lado, a eficiência de encapsulamento da idebenona às nanocápsulas resultou em valores próximos e maiores do que 99%, independentemente dos óleos e polímeros empregados. Em função da natureza da idebenona, molécula lipofílica, com baixa solubilidade em água, estes resultados seriam esperados. Além disto, elevada eficiência de encapsulamento de idebenona foi observada em outros sistemas nanoparticulados poliméricos ou lipídicos. No trabalho de Palumbo e colaboradores (2002), foi observado uma eficiência de encapsulamento da idebenona de 97% em nanocápsulas de poli(etil-2-cianocrilato) preparada por polimerização interfacial e com TCM. Li e Ge (2012) prepararam carreadores lipídicos nanoestruturados e nanoemulsões que apresentaram eficiência de encapsulamento de 99,4 % e 96,2%, respectivamente. Nesse caso, a alta eficiência de encapsulamento ocorreu, segundo os autores, devido à presença do óleo (TCM), líquido à temperatura ambiente, junto ao lipídio sólido, que formam cristais imperfeitos, aumentando a capacidade de acomodação do fármaco ao

carreador lipídico. Na nanoemulsão preparada com TCM, a eficiência de encapsulamento foi apropriada também devido à afinidade entre a idebenona e o óleo.

Cabe evidenciar que a idebenona foi quantificada empregando-se um método validado por Amorim e colaboradores (2009), sendo indicativo de estabilidade (degradação forçada em condições de irradiação-UV, oxidação, hidrólise em meio básico e ácido). Este método foi reproduzido e validado para a determinação de idebenona nas suspensões de nanocápsulas desenvolvidas no presente estudo, segundo os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão e exatidão (ANVISA, 2003; ICH, 2005). O teste de especificidade, realizado com as suspensões de nanocápsulas sem fármaco, indicou que não houve interferência dos constituintes das formulações no pico do fármaco, o qual apresentou tempo de retenção de 10,4 minutos (figura 7). Além disto, a pureza de pico do fármaco nos cromatogramas foi confirmada por analisar as amostras usando um detector do tipo PDA (índice de pureza de pico $>0,9999$), indicando que o método é específico para a determinação de idebenona. Uma relação linear significativa entre a área de pico e a concentração de idebenona foi obtida para a faixa de concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ a 25 $\mu\text{g/mL}$, com equação ($n=3$) calculada pelo método dos mínimos quadrados ($y=63749x - 40325$; coeficiente de correlação: $r=0,9998$), confirmada pela Análise de Variância (ANOVA; $p<0,05$). Por sua vez, a análise de precisão da determinação de idebenona em nanocápsulas (OP/PCL), no ponto médio da curva (15 $\mu\text{g/mL}$), está descrita na tabela 9. O método foi preciso uma vez que os valores de desvio padrão relativo foram adequados, menores do que 2,0 %. Em relação à exatidão (tabela 10), foram realizadas análises das amostras em três níveis de concentração do fármaco (baixo, médio e alto), sendo encontrada a faixa de recuperação de 99,76% a 102,12%, evidenciando a exatidão do método. Deve-se ressaltar que a suspensão preparada com OP e PCL foi selecionada para avaliação da precisão e da exatidão por ser a formulação de maior interesse, além de apresentar-se como a matriz mais complexa, com necessidade de extração do fármaco a partir das nanoestruturas com polímero insolúvel em metanol e com o óleo no estado sólido.

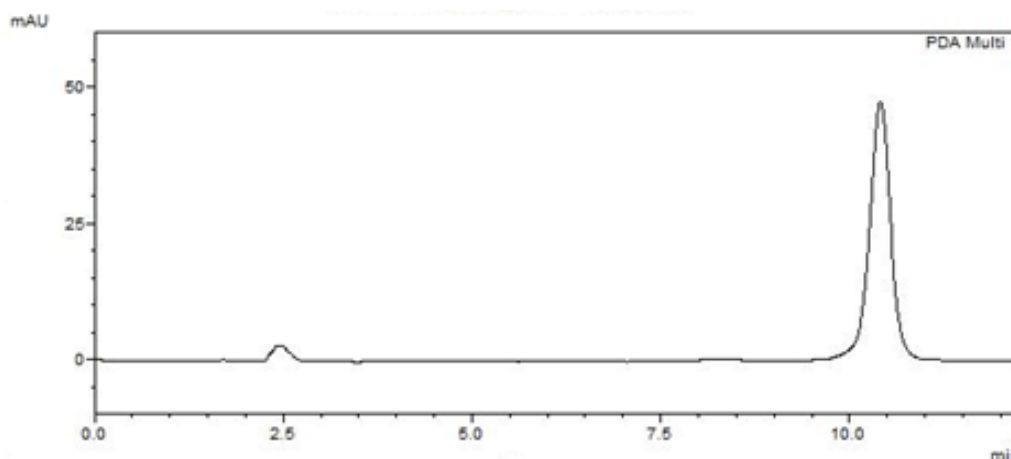


Figura 7 – Cromatograma indicando o ponto médio da curva padrão (concentração de trabalho), para a quantificação de idebenona.

Tabela 9 – Análise de precisão na determinação de idebenona em suspensão de nanocápsulas de PCL com óleo de palma e idebenona

Amostra	Quantidade teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR* (%)
Dia 1 (n=6)	15,00	15,34 \pm 0,11	102,26 \pm 0,70	0,69
Dia 2 (n=6)	15,00	15,16 \pm 0,09	101,07 \pm 0,62	0,61
Inter-dias (n=12)	15,00	15,25 \pm 0,13	101,67 \pm 0,89	0,87

*DPR: desvio padrão relativo.

Tabela 10 – Análise de exatidão na determinação de idebenona em suspensão de nanocápsulas de PCL com óleo de palma e idebenona

Nível de concentração	Amostra conhecida ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Valor obtido ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
Baixo	5,15	2,00	7,13 \pm 0,02	99,76 \pm 0,32
Médio	5,15	10,00	15,47 \pm 0,31	102,12 \pm 2,02
Alto	5,15	18,00	23,26 \pm 0,23	100,48 \pm 0,98

Estes resultados demonstraram que foi possível preparar idebenona associada a nanocápsulas com polímeros e óleos de natureza diferentes das encontradas na literatura, com adequadas características físico-químicas e através de deposição interfacial de polímero pré-formado. Apenas Palumbo e colaboradores (2002) relataram a preparação de nanocápsulas poliméricas com este fármaco, empregando polímero da classe poli(alquícianoacrilato) e TCM como núcleo, conforme anteriormente citado, preparadas através de polimerização *in situ*.

1.4 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo idebenona, armazenadas em temperatura ambiente e protegidas da luz

Após o desenvolvimento das formulações, realizou-se um estudo comparativo da influência do polímero e dos óleos sobre a estabilidade físico-química dos sistemas contendo a idebenona. No estudo, amostras das diferentes suspensões de nanocápsulas (OP/PCL, TCM/PCL, OC/EUD e TCM/EUD) foram mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz, durante 75 dias e, após diferentes tempos, realizou-se análises físico-químicas [diâmetro, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, pH e teor de fármaco].

Conforme os resultados obtidos, na figura 8, para as suspensões que permaneceram protegidas da luz durante o período de estudo, foi observado que os diâmetros médios de partículas das formulações, tanto preparadas com PCL (Figura 8A) quanto com EUD (Figura 8B), foram mantidos em função do tempo, não havendo aumento significativo de tamanho de partículas após 75 dias em relação aos diâmetros médios iniciais ($p > 0,05$).

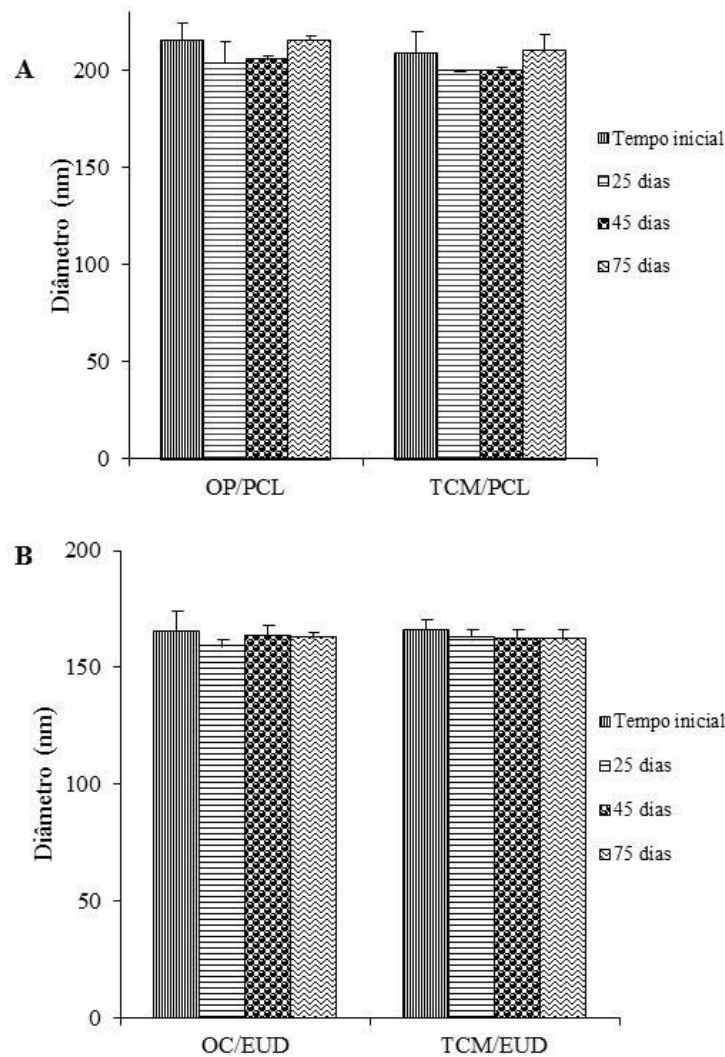


Figura 8 –Diâmetros médios das suspensões de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona), em A, ou com Eudragit RS 100[®], em B, armazenadas à temperatura ambiente e com proteção da luz, durante 75 dias.

Por sua vez, em relação aos resultados de distribuição de tamanho médio de partículas, avaliados através do índice de polidispersão (figura 9), verificou-se maior variação em função do tempo/metodologia de análise. Entretanto, independentemente do tipo de polímero e de óleo, o PDI permaneceu baixo, durante os 75 dias do estudo, inferior a 0,18, denotando homogeneidade adequada considerando os sistemas nanoestruturados farmacêuticos. Índices menores do que 0,20, geralmente são considerados satisfatórios para estes tipos de formulações (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

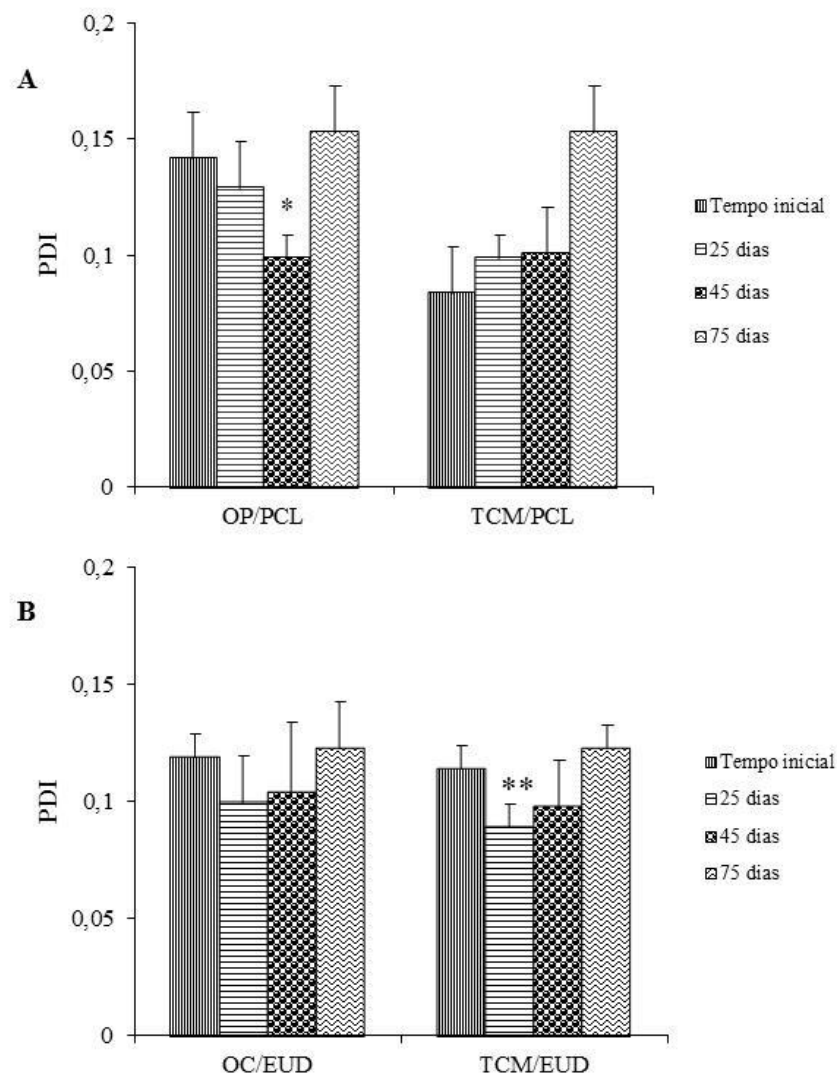


Figura 9 –Índices de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona), em A, ou com Eudragit RS100[®], em B, armazenadas à temperatura ambiente e com proteção da luz, durante 75 dias. *Diferença significativa em relação ao tempo inicial e aos demais tempos do estudo ($p < 0,05$). ** Diferença significativa em relação ao tempo inicial e final ($p < 0,05$).

Também é importante avaliar no estudo de estabilidade o comportamento quanto ao potencial zeta e valores de pH das suspensões de nanopartículas. O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas e é importante que o valor, em módulo, seja mantido relativamente alto, para reduzir a tendência à agregação das partículas. Já variações importantes de pH das formulações podem indicar possíveis degradação dos componentes, como do polímero e do óleo (COUVREUR et al. 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a).

Quanto ao potencial zeta, conforme a figura 10, foi possível observar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) neste parâmetro após 75 dias de armazenamento para as suspensões preparadas com TCM, tanto com EUD quanto com PCL. Por outro lado, houve

um aumento significativo ($p < 0,05$) do potencial zeta, em módulo, para as suspensões OP/PCL e OC/EUD, após 75 dias de armazenamento, fato que pode, em tese, favorecer a estabilidade dos sistemas, aumentando a repulsão entre as partículas.

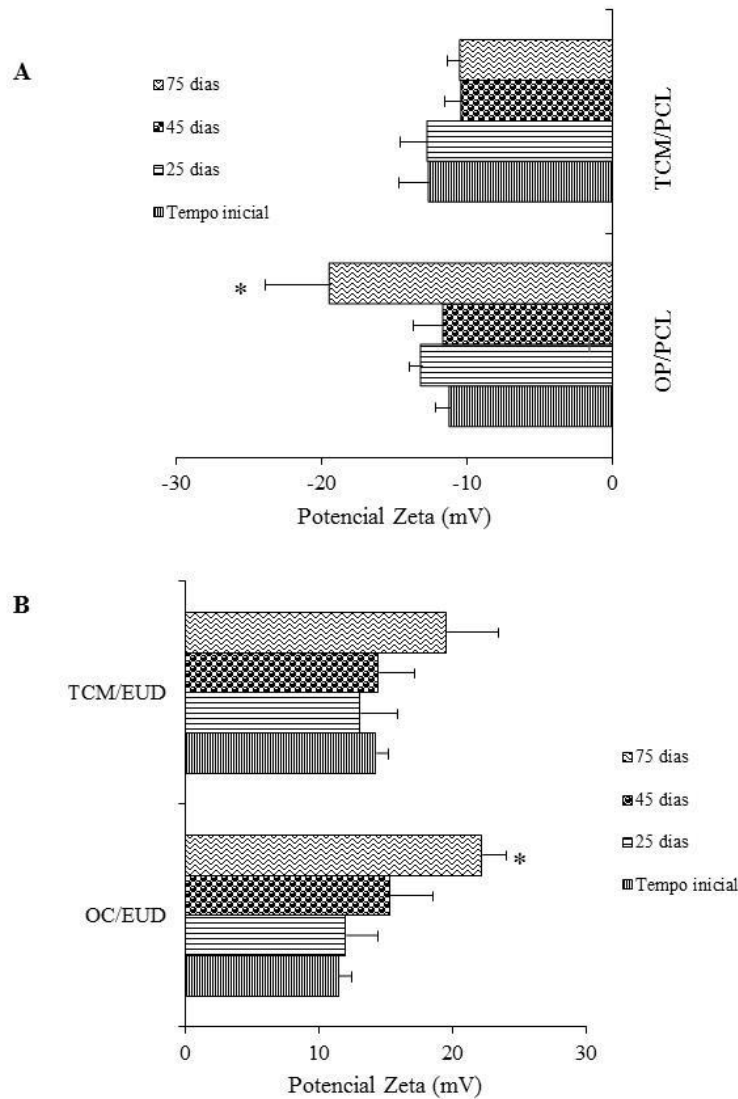


Figura 10 – Potenciais zeta das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (A) ou de Eudragit RS100® (B), mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz, durante 75 dias. *Diferença significativa em relação ao tempo inicial e aos demais tempos do estudo.

Em relação aos valores de pH, as suspensões de nanocápsulas apresentaram diminuição deste parâmetro durante o período de armazenamento. As formulações OP/PCL apresentaram redução significativa do pH somente após 75 dias de armazenamento ($5,3 \pm 0,3$), enquanto as demais formulações diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação aos valores de pH iniciais, já após 25 dias de armazenamento ($5,2 \pm 0,2$ para TCM/PCL; $4,7 \pm 0,1$

para TCM/EUD; $4,3 \pm 0,3$ para OC/EUD, após 75 dias), conforme a figura 11. Observou-se ainda que não houve influência do óleo utilizado, pois em todo o período de estudo os valores de pH verificados entre formulações OP/PCL e TCM/PCL não apresentaram diferenças significativas e da mesma forma ocorreu entre OC/EUD e TCM/EUD. A alteração do pH pode indicar que está ocorrendo degradação polimérica em função do tempo (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996). Em um estudo realizado por Calvo e colaboradores, as nanopartículas de PCL apresentaram diminuição do pH durante o período de estudo (6 meses à temperatura ambiente). No trabalho de Schaffazick e colaboradores (2007), nanocápsulas preparadas com PCL ou Eudragit RS[®] 100 também apresentaram uma diminuição significativa do pH após 30 dias de armazenamento das formulações protegidas da luz e à temperatura ambiente.

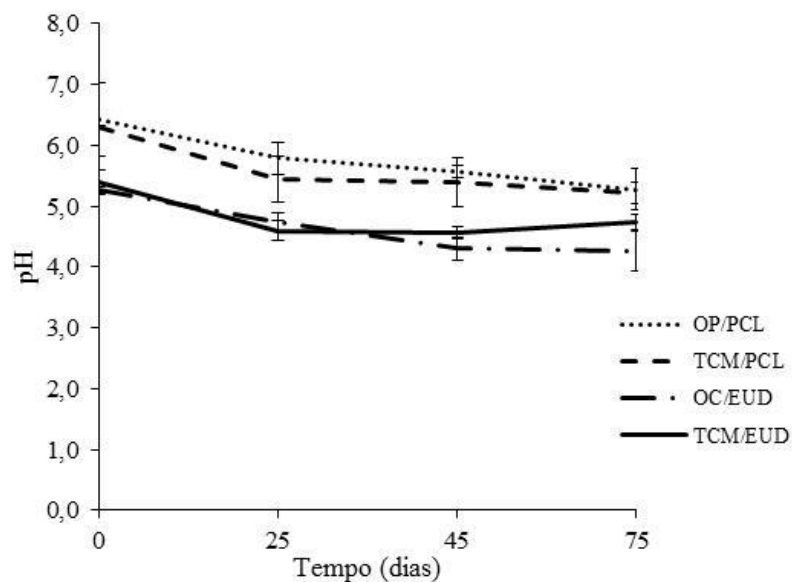


Figura 11 – Valores de pH das suspensões de nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) ou de Eudragit RS100[®], armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz, durante 75 dias.

Na determinação do teor de idebenona (figura 12), em função do tempo de armazenamento, verificou-se que as formulações preparadas com PCL não apresentaram alteração significativa no teor após 25 dias de armazenamento, fato que ocorreu após 45 dias ($p < 0,05$), para ambos os óleos. Por sua vez, as formulações preparadas com EUD tenderam a maior velocidade de degradação, de maneira que após 25 dias houve redução significativa do teor para as suspensões OC/EUD, e, após 45 dias para a formulação TCM/EUD. Os teores de fármaco, encontrados no final do estudo para as suspensões de nanocápsulas de PCL, não

diferiram significativamente ($p > 0,05$) em relação ao tipo de óleo empregado, representando 77,93 % e 81,18 % do teor inicial, correspondendo a $0,72 \pm 0,01$ mg/mL e $0,75 \pm 0,05$ mg/mL em relação à concentração teórica (1,0 mg/mL), respectivamente, para óleo de palma e TCM como núcleos. No mesmo sentido, o tipo de óleo não influenciou o teor de idebenona após 75 dias de armazenamento ($p > 0,05$), para as formulações preparadas com Eudragit® RS100, representando 74,13 e 78,55% do teor inicial das formulações OC/EUD e TCM/EUD, respectivamente, correspondendo a $0,67 \pm 0,01$ mg/mL e $0,70 \pm 0,02$ mg/mL considerando a concentração teórica de fármaco.

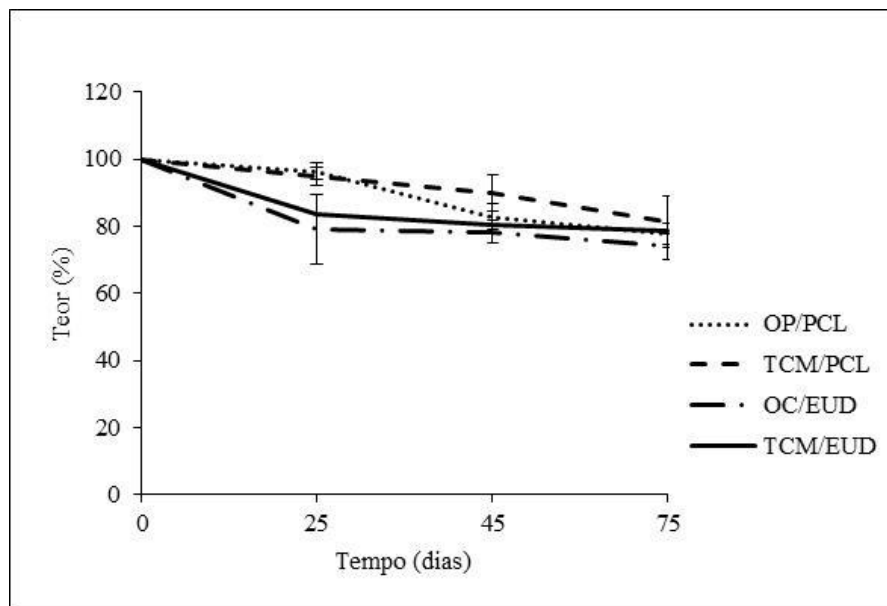


Figura 12 – Teor de idebenona nas suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) ou de Eudragit RS 100® em relação ao teor inicial, durante 75 dias de armazenamento, à temperatura ambiente e com proteção da luz.

Em relação ao aspecto macroscópico, não houve alteração de coloração, as formulações continuaram levemente amareladas, homogêneas e sem a presença de precipitados durante todo o estudo.

1.5 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo idebenona, armazenadas em temperatura ambiente e expostas à luz

Paralelamente ao estudo anteriormente descrito, amostras das mesmas suspensões foram armazenadas com exposição à luz, em frascos de vidro transparente, sobre a bancada e

à temperatura ambiente, visando avaliar se a luz poderia catalisar a degradação da idebenona associada às nanocápsulas e a influência do tipo de polímero e óleo nestas condições.

No estudo, verificou-se que o diâmetro médio de partículas (figura 13) não foi alterado durante os 75 dias de armazenamento, independentemente da composição das formulações ($p>0,05$). Também não foram observadas diferenças significativas entre os diâmetros das suspensões armazenadas com (figura 13) ou sem (figura 8) exposição à luz.

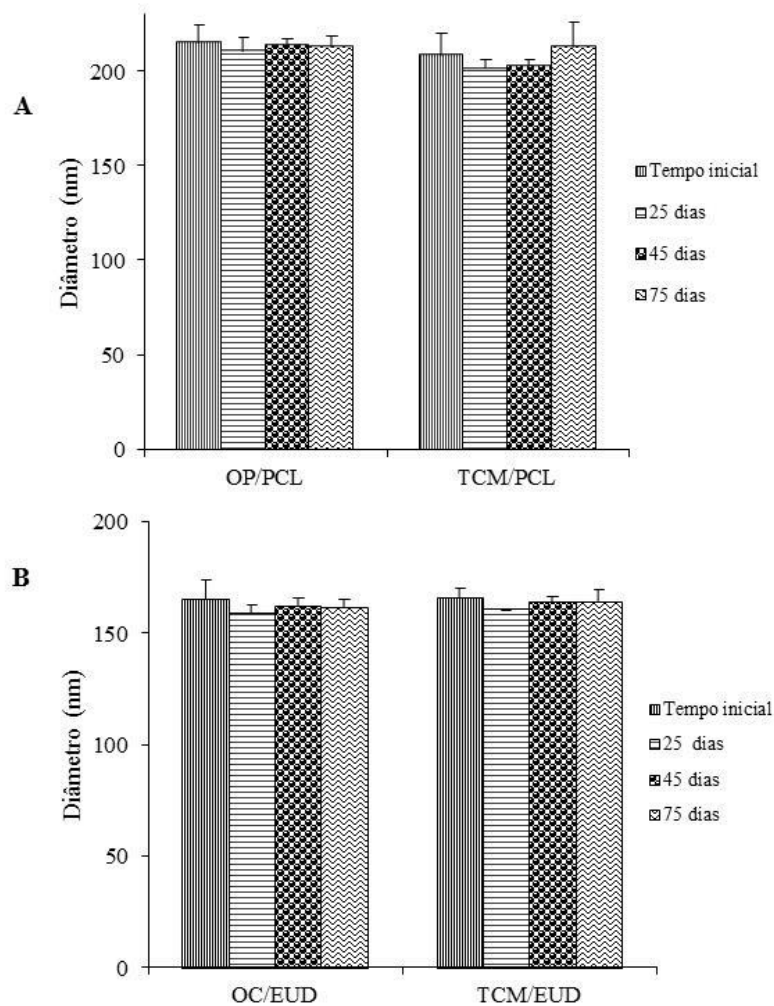


Figura 13 – Diâmetros médios das suspensões de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) (A) ou com Eudragit RS 100[®] (B), armazenadas à temperatura ambiente e expostas à luz, durante 75 dias.

Quanto aos índices de polidispersão (figura 14), não foram verificadas diferenças significativas entre os valores do tempo inicial e após 75 dias ($p>0,05$), permanecendo inferiores a 0,2, denotando homogeneidade de distribuição de tamanho em função do tempo.

Também não houve diferença significativa entre os valores de PDI das formulações protegidas da luz e das suspensões expostas à luz (figura 9).

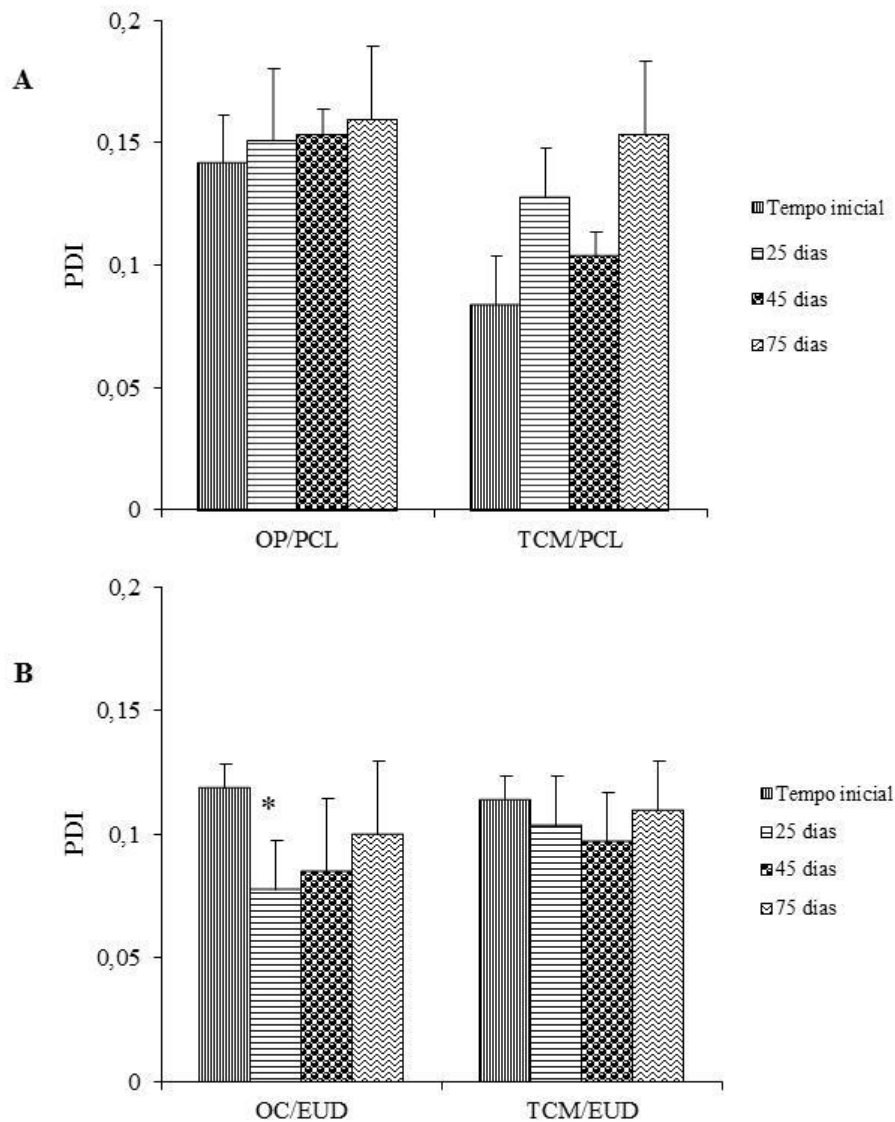


Figura 14 – Índices de polidispersão das suspensões de poli(ϵ -caprolactona) (A) e de Eudragit RS 100[®] (B), contendo idebenona, em função do tempo de armazenamento, à temperatura ambiente e com exposição à luz. *Diferença significativa em relação à suspensão no tempo inicial.

Em relação às características de superfície (figura 15), verificou-se que o potencial zeta das suspensões não sofreu alteração significativa ($p > 0,05$) comparando-se os valores iniciais e após os 75 dias de armazenamento, exceto para a formulação OC/EUD em que houve um aumento médio significativo.

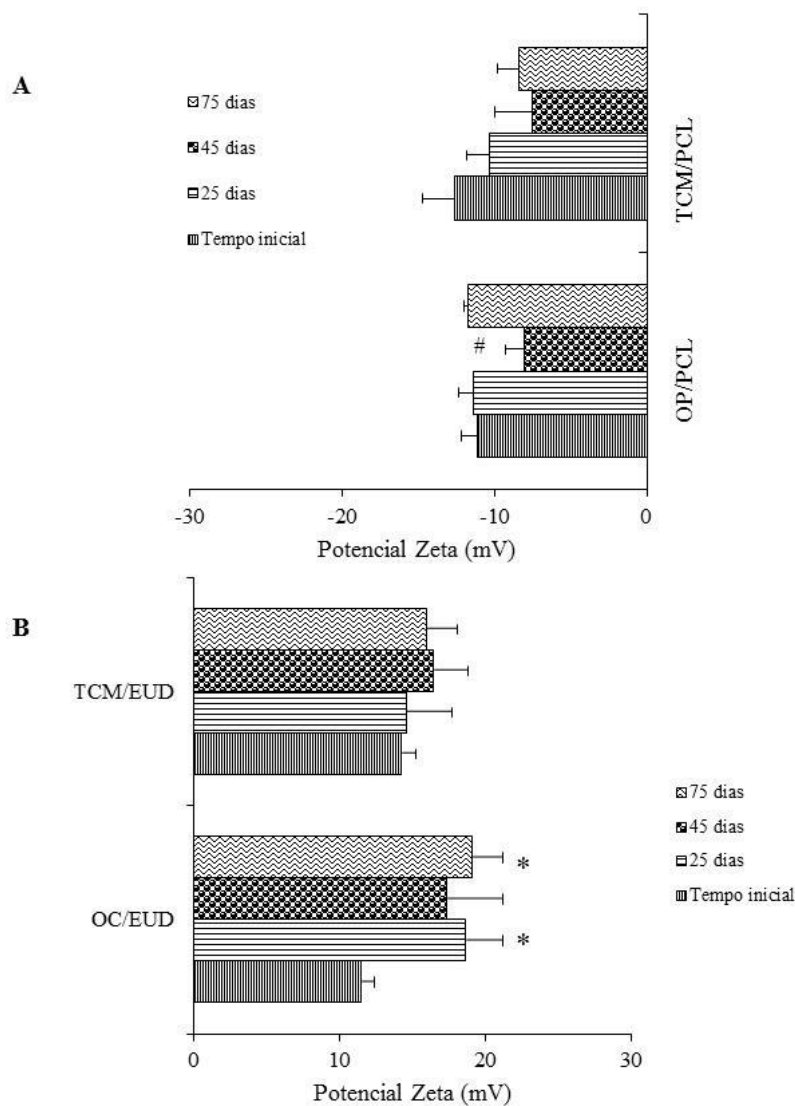


Figura 15 –Potenciais zeta das suspensões de poli(ϵ -caprolactona) (A) e de Eudragit RS 100[®] (B), contendo idebenona, em função do tempo de armazenamento, à temperatura ambiente e com exposição à luz. *Diferença significativa em relação ao tempo inicial do estudo ($p < 0,05$); # Diferença significativa em relação aos demais tempos do estudo ($p < 0,05$).

Na análise de pH (figura 16), realizada durante o estudo das formulações expostas à luz, foi observado uma diminuição significativa dos valores ($p < 0,05$) já após 25 dias de armazenamento para as suspensões OP/PCL, TCM/PCL, OC/EUD e TCM/EUD, havendo praticamente uma estabilização do pH entre 25 e 75 dias ($4,9 \pm 0,1$ para OP/PCL; $4,8 \pm 0,1$ para TCM/PCL; $4,8 \pm 0,1$ para TCM/EUD; $4,6 \pm 0,2$ para OC/EUD, após 75 dias). Da mesma forma que o óleo não apresentou influência sobre o valor de pH para as formulações protegidas da luz, para as formulações expostas à luz o óleo também não influenciou de forma significativa ($p > 0,05$) o pH durante todo o estudo.

Foi observado uma redução do pH em 25 dias e após esse período ocorreu uma estabilização do mesmo. Esse comportamento também foi evidenciado para as mesmas formulações protegidas da luz, em 25 dias. Em um estudo de estabilidade realizado por Schaffazick e colaboradores (2007) também houve uma diminuição significativa do pH de formulações com PCL e Eudragit RS[®] 100 em um período de 30 dias, quando expostas à luz e em temperatura ambiente.

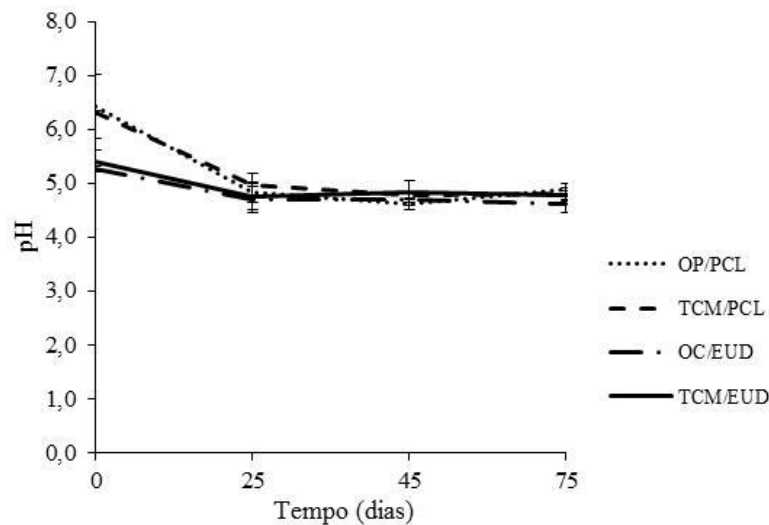


Figura 16 – Valores de pH das suspensões de poli(ε-caprolactona) (A) e de Eudragit RS 100[®] (B), contendo idebenona, em função do tempo de armazenamento, à temperatura ambiente e com exposição à luz.

O teor de fármaco nas formulações expostas à luz, durante o período de 75 dias (figura 17), diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em todas as formulações, tanto com PCL quanto com EUD, após 25 dias de armazenamento. O teor de idebenona encontrado no final do estudo para as suspensões de nanocápsulas de PCL não diferiram significativamente ($p > 0,05$) em relação ao tipo de óleo empregado, representando 41,07 % e 44,88 % do teor inicial, correspondendo a $0,38 \pm 0,01$ mg/mL e $0,42 \pm 0,01$ mg/mL em relação à concentração teórica (1,0 mg/mL), respectivamente, para OP e TCM como núcleos. O tipo de óleo também não influenciou o teor de idebenona após 75 dias de armazenamento ($p > 0,05$), para as formulações preparadas com EUD, representando 46,30 % e 43,01 % do teor inicial das formulações OC/EUD e TCM/EUD, respectivamente, correspondendo a $0,42 \pm 0,02$ mg/mL e $0,38 \pm 0,03$ mg/mL considerando a concentração teórica de fármaco. Entre os 4 tipos de formulação, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quanto ao teor de idebenona após 75 dias de armazenamento.

Da mesma forma como ocorreu para as formulações de EUD protegidas da luz, aquelas expostas à mesma tenderam a uma maior velocidade de degradação em relação às formulações com PCL, principalmente nos primeiros 25 dias de armazenamento, apresentando uma queda menos acentuada entre 25 e 45 dias. Este comportamento pode estar, em hipótese, relacionado a uma fração de fármaco livre/nanocristais, ou seja, não associada às nanocápsulas de EUD, ou à adsorção do fármaco à superfície das partículas (parede polimérica), fato que levaria a uma degradação mais rápida no início. Um perfil de decaimento do teor de idebenona com característica mais gradual foi observado para as formulações de PCL. Além disto, a presença da luz (0,38-0,42 mg/mL) catalisou significativamente a degradação da idebenona ($p < 0,05$), em todas as formulações nanoestruturadas, ao compará-las no estudo com proteção da luz (0,67-0,75 mg/mL), durante os 75 dias de armazenamento, mesmo com o nanoencapsulamento do fármaco.

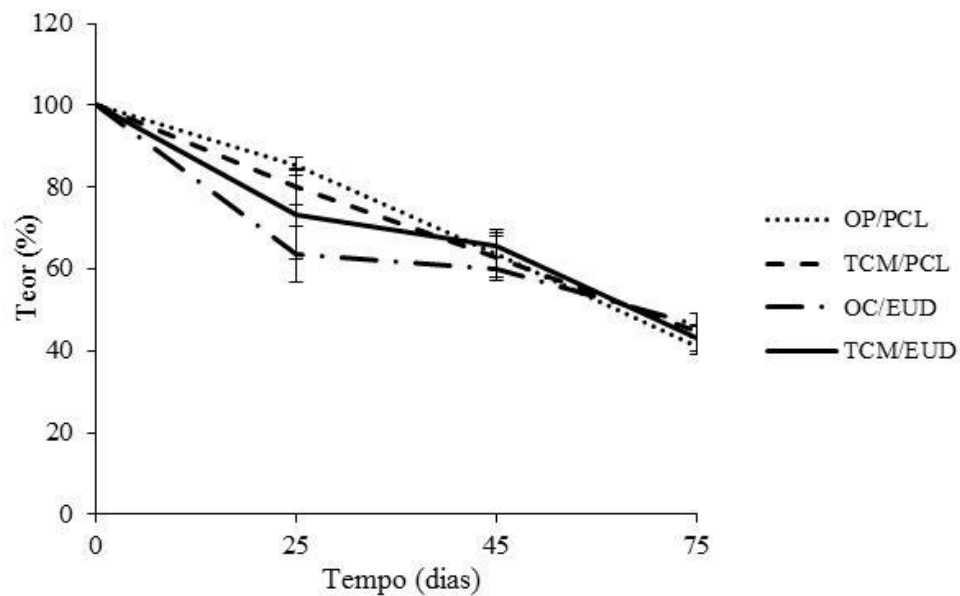


Figura 17 – Teor de idebenona nas suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) ou de Eudragit RS 100[®] em relação ao teor inicial, durante 75 dias de armazenamento, à temperatura ambiente e com exposição à luz.

Quanto ao aspecto macroscópico, observou-se que as suspensões continuaram apresentando característica de fluido homogêneo opalescente de coloração levemente amarelada. As formulações expostas à luz apresentaram, ainda, uma coloração amarelada de

intensidade menor do que as formulações protegidas da luz e não apresentaram formação de precipitados em todo o período de análise.

1.6 Estudo de fotoestabilidade da idebenona associada às nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) em suspensão

Após o estudo de estabilidade, à temperatura ambiente, das diferentes formulações, com proteção ou exposição à luz natural, as formulações preparadas com PCL foram selecionadas como as mais promissoras para veiculação de idebenona e, portanto, foram utilizadas para os estudos adicionais de avaliação da potencialidade destes sistemas em relação ao fármaco não encapsulado. Nesta etapa do trabalho, foi realizado um estudo comparativo da capacidade destes sistemas desenvolvidos, empregando 3% de OP (OP/PCL) ou TCM (TCM/PCL), em fotoprotger a idebenona em relação ao fármaco em uma dispersão aquosa micelar, empregando radiação UVA ou UVC artificiais. Deve-se enfatizar que a dispersão micelar contendo idebenona foi selecionada como formulação comparativa, pois se buscou empregar o mesmo veículo das nanocápsulas. A dispersão foi preparada da mesma forma que as suspensões de nanocápsulas, entretanto, utilizando apenas os tensoativos (polissorbato 80 e Span 80[®]). As micelas preparadas com polissorbato 80 e com Span 60[®] não foram capazes de formar um sistema homogêneo, devido à precipitação de idebenona na fase aquosa, rapidamente após a preparação, inviabilizando o estudo.

Conforme a figura 18, foi possível observar que o fármaco remanescente, nas suspensões de OP/PCL ou de TCM/PCL, correspondeu à média de 55,05% e 40,64%, após 13 horas de exposição à radiação UVC, respectivamente, e a 31,25% para a dispersão micelar aquosa. Segundo a análise estatística ($p < 0,05$), as nanocápsulas de PCL contendo OP foram capazes de reduzir significativamente a fotodegradação da idebenona em comparação à dispersão micelar e às nanocápsulas preparadas com TCM. As formulações TCM/PCL não foram capazes de proteger significativamente o fármaco, exposto à radiação UVC, em relação à dispersão micelar.

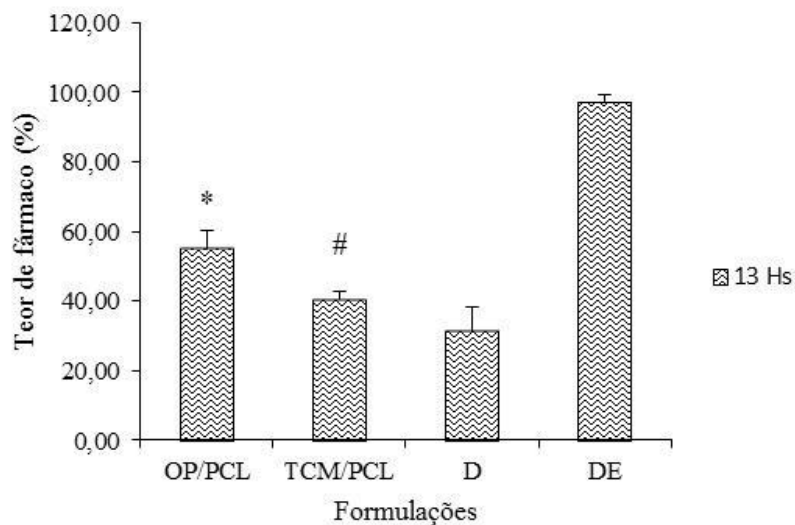


Figura 18 – Teor de idebenona nas suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), preparadas com óleo de palma (OP) ou triglicérides de cadeia média (TCM), em comparação à dispersão micelar (D) contendo o fármaco, após 13 h de exposição à radiação UVC. DE: dispersão micelar, contendo o fármaco, disposta em cubetas protegidas com papel alumínio (controle escuro).

*Estatisticamente significativo em relação à dispersão micelar aquosa ($p < 0,05$).

≠Estatisticamente significativo em relação à formulação OP/PCL ($p < 0,05$).

Quando as formulações foram expostas por 13 h à radiação UVA (Figura 19), as suspensões OP/PCL e TCM/PCL apresentaram teores de fármaco de 76,11% e 74,41%, respectivamente, sendo que a dispersão micelar permaneceu com 63,14 % de idebenona. Após 23 h de exposição a esta mesma radiação, os teores de fármaco remanescente foram 53,70%, 56,70% e 42,77%, respectivamente, para as suspensões OP/PCL, TCM/PCL e dispersão micelar. Desta forma, tanto as nanocápsulas preparadas com OP quanto com TCM foram capazes de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a fotodegradação da idebenona, durante 13 e 23 h, em relação à dispersão micelar. Neste caso, não houve influência do tipo de óleo na fotoproteção do fármaco. É importante mencionar que a dispersão de fármaco protegida com papel alumínio não apresentou diminuição de teor, indicando que somente a radiação foi responsável pela queda de teor nas formulações (Figuras 18 e 19).

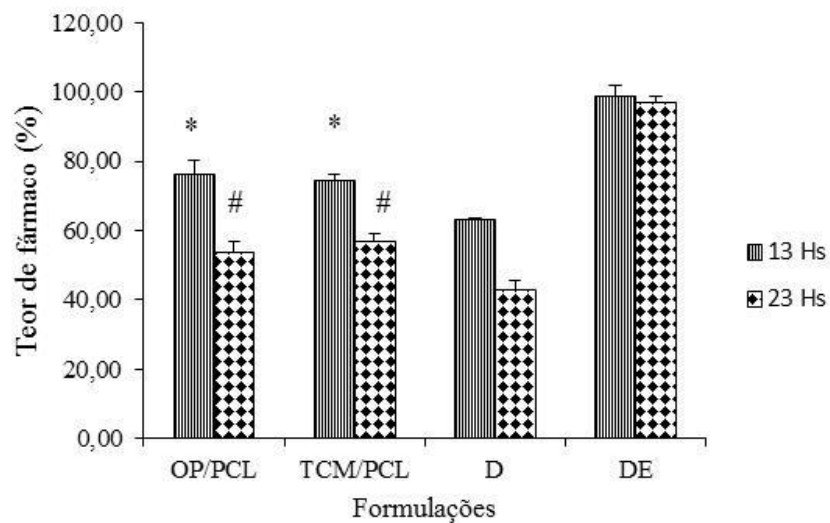


Figura 19 – Teor de idebenona nas suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), preparadas com óleo de palma (OP) ou triglicérides de cadeia média (TCM) (OP/PCL ou TCM/PCL), em comparação à dispersão micelar (D) contendo o fármaco, após 23 h de exposição à radiação UVA.

DE: dispersão micelar, contendo o fármaco, disposta em cubetas protegidas com papel alumínio (controle escuro).

*Estatisticamente significativo em relação à dispersão micelar aquosa após 13 horas ($p < 0,05$).

#Estatisticamente significativo em relação à dispersão micelar aquosa após 23 horas ($p < 0,05$).

Estes resultados estão de acordo com estudos encontrados na literatura, os quais têm demonstrado que as nanocápsulas poliméricas podem aumentar a proteção de fármacos fotolábeis (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2010; SANTOS et al., 2013). Ourique e colaboradores (2008) avaliaram a fotodegradação comparando a tretinoína livre e a presente em nanoestruturas expostas à radiação UVC, por uma hora. Verificou-se que a tretinoína livre apresentou um tempo de meia-vida de 40 minutos e, quando presente em nanocápsulas de PCL ou nanoemulsões (TCM), apresentou tempo de meia-vida de 85 a 100 minutos e de 69 a 82 minutos, respectivamente. Através desse estudo, observou-se a importância da presença do polímero para reduzir a fotodegradação da tretinoína, sendo que a natureza do óleo não influenciou na proteção (TCM ou óleo de semente de girassol). A proteção que o polímero proporcionou pode ser atribuída à cristalinidade deste componente, sendo capaz de refletir e espalhar a radiação UV (OURIQUE et al., 2008). Em outro trabalho, Fontana e colaboradores (2010) observaram que as nanocápsulas (PLA, PLGA 50:50 ou PLGA 85:15 e TCM) protegeram o proprionato de clobetasol em relação à solução do mesmo contra a radiação UVA por 24 horas. Os tempos de meia-vida do fármaco associados às nanocápsulas foram maiores (19 a 21 horas), em relação à solução (11 horas). A proteção obtida pelas

nanocápsulas também foi atribuída à presença do polímero, que seria capaz de refletir a radiação UVA.

No presente estudo, quando a radiação de mais alta energia (UVC) foi empregada, apenas as nanocápsulas preparadas com óleo de palma foram efetivas em reduzir a fotodegradação da idebenona em comparação às micelas, fato que talvez possa estar relacionado a uma possível proteção dos antioxidantes presentes neste óleo. Segundo a ficha técnica do fornecedor do OP empregado no estudo, ele é extraído da polpa do fruto da palmeira oleaginosa *Elaeis guineensis*, através de métodos físicos (prensagem mecânica), sem emprego de solventes ou outras substâncias químicas. Quanto ao refino do óleo, é realizado de forma natural, fisicamente, sendo que apenas produtos naturais são usados em seu processamento. Além disto, consta que, devido à presença de antioxidantes naturais, como tocotrienóis, e seu baixo teor de ácido linolênico, o OP é altamente estável a oxidação.

Outra hipótese seria a provável diferença de estado físico entre os óleos (TCM e OP), o que poderia conferir maior proteção. No estudo de Li e Ge (2012), o teor de idebenona remanescente nos carreadores lipídicos nanoestruturados (7% lipídio sólido e 3% TCM-lipídio líquido; 90% de teor) foi maior significativamente em relação à nanoemulsão (lipídio líquido-TCM; 65% de teor), quando as formulações foram armazenadas sob calor e exposição à luminosidade (40°/75% UR; 3.000 lx), sendo que o fármaco, nos primeiros, estaria provavelmente no lipídio líquido que é envolto pelo lipídio sólido.

Por outro lado, quando a radiação UVA foi incidida, a natureza do óleo não influenciou na proteção. A radiação UVC (teor de 31 a 55 %) promoveu maior degradação do fármaco ($p < 0,05$) em relação à radiação UVA (63 a 76 %), para todos os sistemas (nanocápsulas ou micelas), após 13 h de exposição (Figuras 18 e 19). As figuras 20 e 21 apresentam os cromatogramas das formulações após 13 h de exposição à radiação UVC, demonstrando a redução das áreas referentes ao pico da idebenona em comparação às formulações antes da exposição. Cabe ressaltar que as formulações expostas à radiação UVA, por 13 e 23 horas, apresentaram coloração amarelada menos intensa do que as formulações não expostas à radiação e continuaram com aspecto homogêneo. As formulações expostas à radiação UVC por 13 horas também continuaram homogêneas, mas apresentaram coloração levemente acastanhada.

A sensibilidade de idebenona à fotólise também foi reportada no trabalho de Amorim e colaboradores (2009), sendo que uma solução do fármaco (água/etanol 1:1 v/v) apresentou 28% de degradação após 8 h de exposição à radiação UV (330 nm).

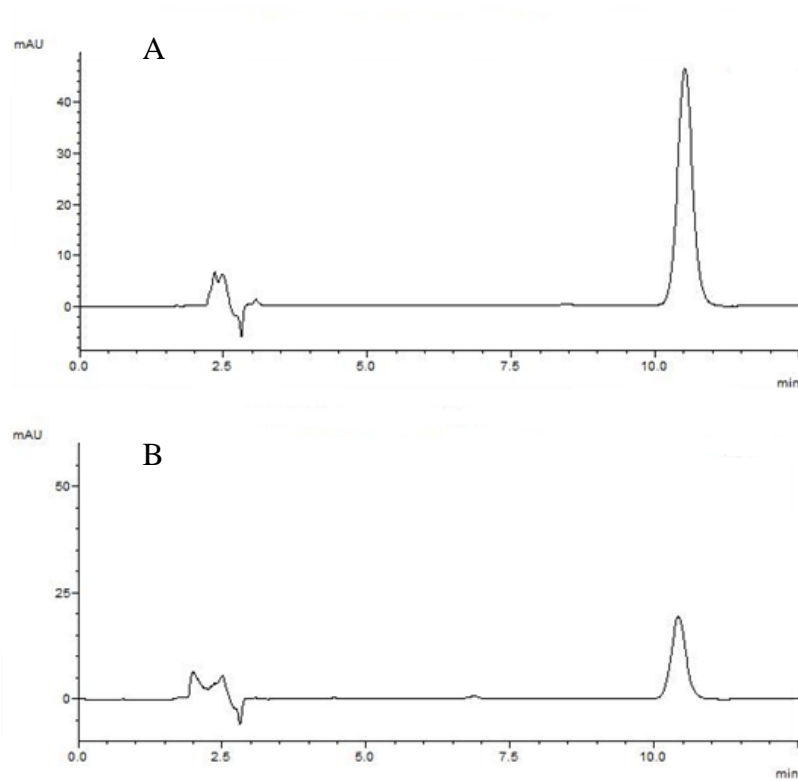


Figura 20 - Cromatogramas obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas OP/PCL, sendo (A) o tempo inicial e (B) após 13 horas de exposição à radiação UVC.

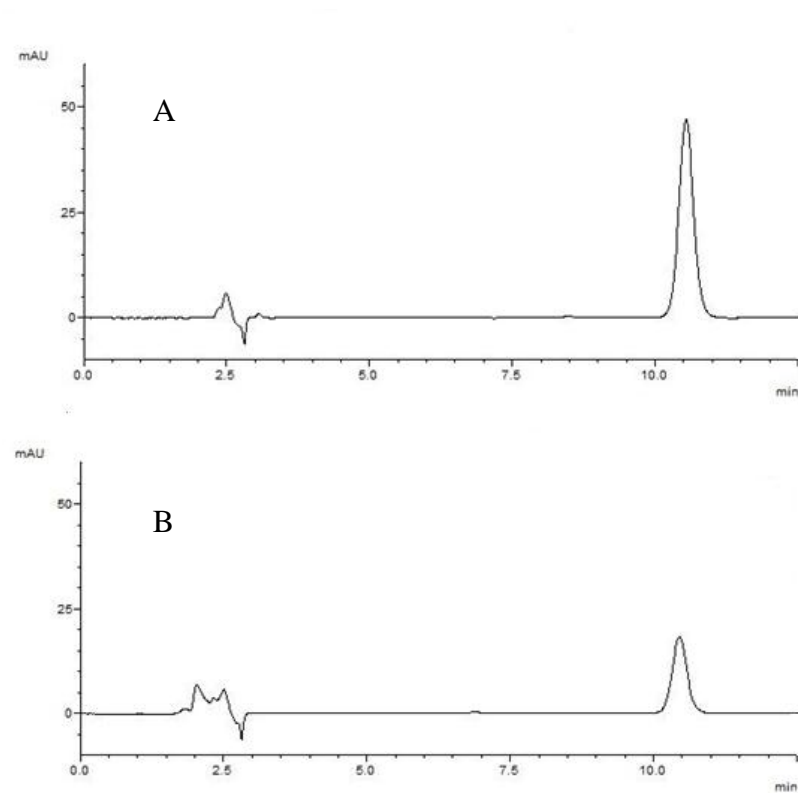


Figura 21 - Cromatogramas obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas TCM/PCL, sendo (A) o tempo inicial e (B) após 13 horas de exposição à radiação UVC.

1.7 Estudo do perfil de liberação *in vitro* de idebenona a partir das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona)

O estudo de liberação foi realizado através de difusão em sacos de diálise a 37 °C, onde foram obtidos os perfis de liberação da idebenona a partir das nanocápsulas de PCL, preparadas com OP ou TCM, em comparação a uma solução orgânica do fármaco livre (controle). Foi observado (Figura 22) que as nanocápsulas de PCL, preparadas com OP ou TCM, apresentaram uma liberação controlada do fármaco, em comparação à difusão do fármaco livre (solução metanólica). A formulação preparada com OP apresentou liberação média de 81,18%, em 60 horas, enquanto que a formulação contendo TCM liberou 82,46% do fármaco no mesmo período. Já a idebenona em solução completou sua difusão em 12h, indicando a influência do sistema nanoestruturado em retardar a liberação do fármaco associado.

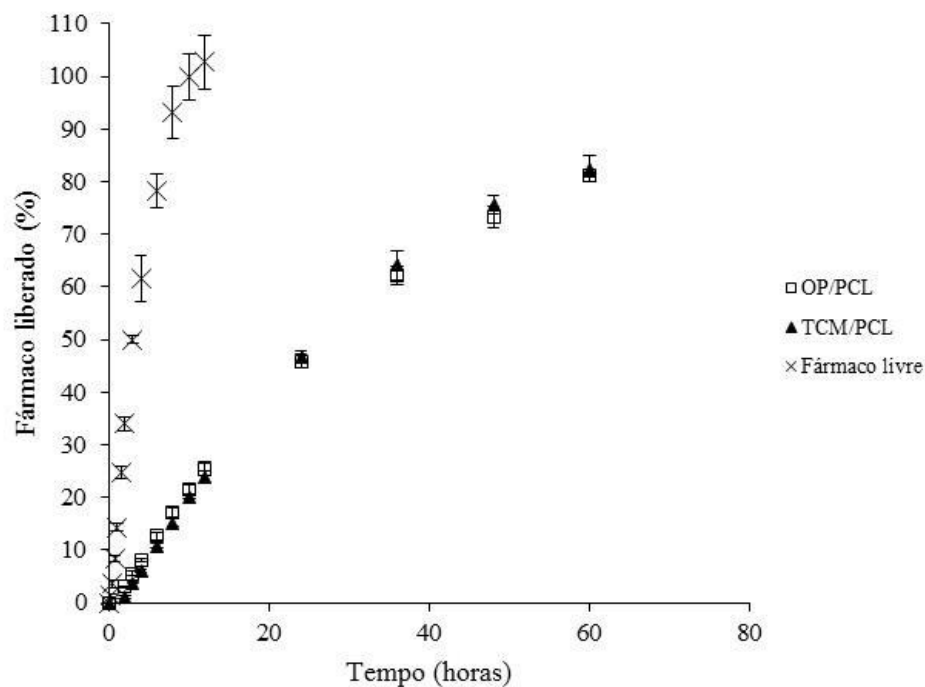


Figura 22 – Perfil de liberação *in vitro* da idebenona a partir das suspensões de nanocápsulas de PCL (OP ou TCM) em comparação à difusão do fármaco livre (solução metanólica).

Conforme modelagem matemática dos dados, o modelo que melhor descreveu os dados de liberação foi o monoexponencial (tabela 11, equação 2, pag. 45), apresentando o

maior coeficiente de correlação (r), alto critério de seleção de modelo (MSC) e melhor ajuste gráfico (figura 23), independentemente da formulação. Segundo estes modelos, os valores das constantes de velocidade (k) foram $0,0261 \text{ h}^{-1}$, $0,0263 \text{ h}^{-1}$ e $0,2413 \text{ h}^{-1}$ para as suspensões de nanocápsulas OP/PCL, suspensões de nanocápsulas TCM/PCL e solução orgânica, respectivamente. Os tempos de meia-vida, calculados a partir dos valores das constantes (k) do modelo monoexponencial (equação 3, pag. 45), foram 26,55 horas, 26,35 horas e 2,87 horas para as nanocápsulas OP/PCL, nanocápsulas TCM/PCL e solução orgânica, respectivamente. Os valores de K obtidos para as formulações desenvolvidas e, conseqüentemente, os tempos de meia-vida de liberação, diferiram significativamente em relação aos mesmos parâmetros calculados para o fármaco livre ($p < 0,05$), em solução. As nanocápsulas apresentaram valores de k aproximadamente 9 vezes menores do que o fármaco em solução, evidenciando que a associação da idebenona às nanoestruturas desenvolvidas reduziu significativamente a sua velocidade de liberação, em comparação à difusão do fármaco livre. Como descrito acima, o modelo que melhor descreveu os perfis de liberação foi o monoexponencial ($r > 0,99$), de maneira que dependeu apenas da concentração do fármaco (cinética de primeira ordem), sendo descrito por uma equação constituída por um único termo exponencial, indicando que a liberação da idebenona ocorreu em uma única etapa, sem haver liberação rápida inicial (efeito *burst*). Este resultado, sugere que, provavelmente, toda a dose de idebenona presente no sistema está confinada no núcleo das nanocápsulas, independentemente do óleo empregado, corroborando com os resultados de alta eficiência de encapsulamento obtidas. Além disto, estes dados são reforçados pelo decaimento de teor mais gradual observado para as formulações preparadas com PCL (OP ou TCM), em relação às formulações que empregaram EUD na composição, sugerindo que a idebenona nas últimas poderia estar, em parte, livre nos sistemas (pág. 73).

Tabela 11 – Parâmetros calculados através dos modelos de primeira ordem e Lei da Potência para a idebenona a partir das suspensões de nanocápsulas e da solução orgânica (n=3)

	Nanocápsulas (OP/PCL)	Nanocápsulas (TCM/PCL)	Solução
Monoexponencial			
r	0,9993 ± 0,0001	0,9985 ± 0,0004	0,9956 ± 0,0020
MSC	5,3126 ± 0,3892	4,1777 ± 0,1662	3,4693 ± 0,4166
K (h ⁻¹)	0,0261 ± 0,0004	0,0263 ± 0,0012	0,2413 ± 0,0184
Lei da Potência			
r	0,9957 ± 0,0008	0,9929 ± 0,0004	
MSC	4,3348 ± 0,1724	3,8259 ± 0,0495	
a	0,0489 ± 0,0035	0,0372 ± 0,0003	
n	0,7711 ± 0,0199	0,8211 ± 0,0036	

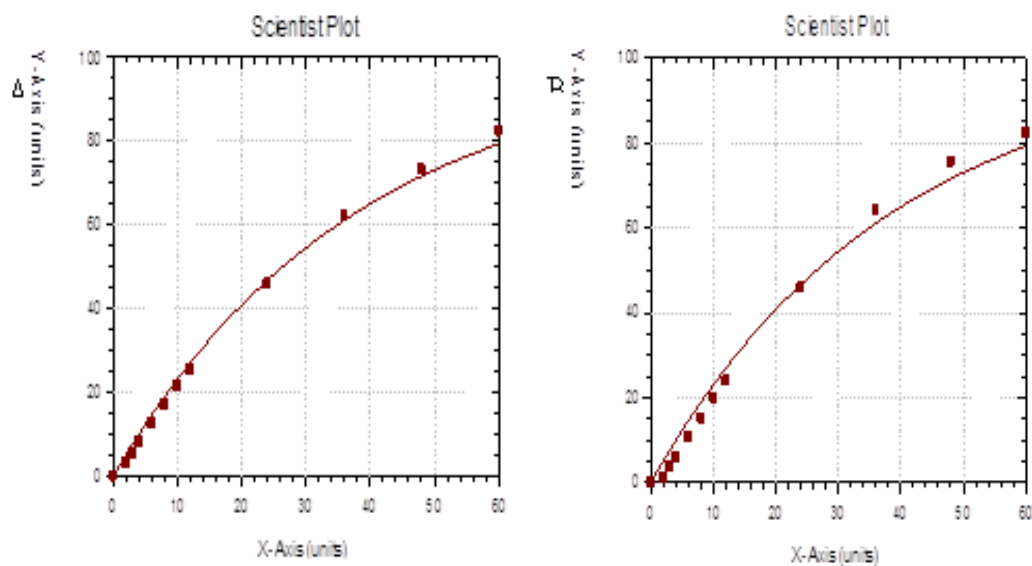


Figura 23 – Gráficos indicando o melhor ajuste ao modelo monoexponencial para os dados da liberação de idebenona a partir das nanocápsulas OP/PCL (esquerda) e TCM/PCL (direita).

Deve-se ressaltar que os perfis de liberação foram praticamente sobrepostos, não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de k e tempos de meia-vida calculados para as suspensões de nanocápsulas, indicando não ter havido influência do tipo de óleo sobre

a liberação do fármaco encapsulado. Dessa forma, como o ensaio de liberação ocorreu à temperatura de 37°C e o ponto de fusão do OP é de aproximadamente 34,2°C (EDEM, 2002), o óleo encontrava-se no estado líquido durante o experimento, assim como o TCM, não havendo diferenças de estado físico entre os óleos no momento da liberação do fármaco. Segundo a ficha técnica do fornecedor do óleo de palma, que foi empregado neste estudo, a faixa de fusão é de 34 a 38 °C.

Na sequência, foi avaliado o mecanismo de liberação da idebenona a partir dos sistemas poliméricos desenvolvidos (Tabela 9), empregando a Lei da Potência (modelo de Korsmeyer-Peppas). Para sistemas com geometria esférica, os limites considerados para o expoente de liberação (n) são: (a) para n igual a 0,43, a liberação do fármaco é do tipo difusão fickiana; (b) para n entre 0,43 e 0,85, há transporte anômalo; (c) com n maior ou igual a 0,85, a liberação do fármaco é do tipo transporte de caso II (RITGER; PEPPAS, 1987). Quando a liberação ocorre por difusão fickiana, o fármaco difunde para o meio por gradiente de potência. Já no transporte anômalo, a liberação do princípio ativo ocorre através do relaxamento das cadeias poliméricas e por difusão (PEPPAS; SAHLIN, 1989). Neste contexto, aplicando-se a equação 4 (pag. 45) aos dados experimentais, obteve-se um alto coeficiente de correlação (>0,99) e MSC, podendo-se empregá-la para sugerir o mecanismo de liberação da idebenona a partir das nanocápsulas. Conforme os valores de “n” obtidos para a modelagem dos dados das formulações OP/PCL e TCM/PCL, o valor de n foi igual a 0,77 e 0,82, respectivamente, indicando, portanto, uma liberação do tipo transporte anômalo. Desta forma, tanto para as nanocápsulas de PCL contendo OP quanto para aquelas preparadas com TCM, a liberação da idebenona associada depende do relaxamento das cadeias poliméricas, seguida pela difusão do fármaco. Estes resultados estão de acordo com as características deste polímero. Segundo a literatura, PCL é um homopolímero biocompatível, biodegradável, hidrofóbico (poliéster alifático), sendo insolúvel em água (solubilidade pH-independente), características que favorecem a sua aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos (LEMOINE et al., 1996; ABDELWAHED et al., 2006; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Estes resultados estão corroborando com a literatura, uma vez que estudos têm demonstrado a capacidade de nanocápsulas poliméricas, contendo núcleo oleoso, em promover liberação controlada de diferentes fármacos (FONTANA et al., 2009; SANTOS et al., 2013). Deve-se evidenciar que o meio de liberação (etanol:água) não interferiu na quantificação do fármaco (método específico) e o método mostrou-se linear na faixa de concentração

empregada (0,125 a 16,00 µg/mL; ANOVA, $p < 0,05$), sendo a equação $y = 122738x + 25524$ ($r = 0,9999$), obtida a partir da construção de três curvas analíticas.

1.8 Liofilização das suspensões de nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) e Eudragit RS[®]100 contendo idebenona

Na última etapa do trabalho, após a avaliação da viabilidade tecnológica da preparação das nanocápsulas de PCL, contendo OP ou TCM, e das vantagens em relação ao fármaco livre, um estudo sobre a conversão destas formulações em formas farmacêuticas sólidas foi realizado, objetivando a obtenção de produtos secos redispersíveis, capazes de aumentar a estabilidade físico-química do fármaco, molécula bastante instável. Neste sentido, empregou-se a liofilização como método de desidratação à baixa temperatura, e a trealose, um carboidrato, como crioprotetor das nanoestruturas. Para fins comparativos, também foram liofilizadas as suspensões de nanocápsulas preparadas com EUD e com TCM ou OC, as quais sofreram maior redução de teor durante os estudos de estabilidade apresentados anteriormente.

A trealose é um açúcar redutor, solúvel em água, usada para lioproteção de proteínas terapêuticas, principalmente para administração parenteral, de lipossomas, estabilização de células sanguíneas e de anticorpos monoclonais, tendo também aplicações em formulações tópicas, cosméticos, como hidratante/umectante, como diluente de comprimidos e intensificador de sabor. Sua estrutura pode ser observada na figura 24 (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Além disto, tem sido empregada em pesquisas como crioprotetor de suspensões de nanopartículas para obtenção de produtos liofilizados, em concentrações de 5 a 10% (HIRSJÄRVI; PELTONEN; HIRVONEN, 2009). Deve-se ressaltar que sacarídeos, como a trealose, possuem a capacidade de promover um espaçamento entre as partículas podendo impedir a agregação destas (VAN WINDEN; TALSMA; CROMMELIN, 1998).

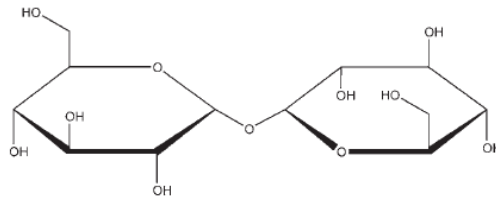


Figura 24 - Estrutura química da trealose (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Os liofilizados devem apresentar propriedades importantes como preservação das características físico-químicas do produto, reconstituição aceitável do mesmo, com manutenção do tamanho de partícula, teor de umidade adequado e estabilidade durante o armazenamento (ABDELWAHED et al., 2006). Através da caracterização da amostra é possível obter uma análise de conservação da mesma. A visualização microscópica do produto possibilita observar a estrutura das nanopartículas na matriz formada e permite analisar se houve a manutenção da integridade das nanopartículas ou se ocorreu alguma modificação no aspecto morfológico das mesmas (ABDELWAHED et al., 2006). Inicialmente, foi realizada a caracterização morfológica dos produtos secos desenvolvidos por microscopia eletrônica de varredura (SEM). Dessa forma, na figura 25, observa-se a microfotografia obtida para a amostra de trealose liofilizada, demonstrando uma superfície lisa, sem a presença de partículas esféricas na estrutura formada pelo crioprotetor. Por outro lado, para as amostras liofilizadas, oriundas das suspensões de nanocápsulas, pode-se observar claramente (grupos OP/PCL, TCM/PCL, OC/EUD e TCM/EUD) superfícies rugosas, devido à presença de inúmeras estruturas próximas à forma esférica. Normalmente, as nanocápsulas apresentam um formato esférico e quando liofilizadas com crioprotetor, é possível observar a formação de uma estrutura (matriz amorfa do crioprotetor) em torno das nanocápsulas. Em um estudo de Abdelwahed, Degobert e Fessi (2006), nanopartículas de PCL foram liofilizadas com a utilização de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Através de microscopia, foi observada a presença de nanocápsulas esféricas dispersas na matriz amorfa formada pelo crioprotetor (ABDELWAHED et al., 2006).

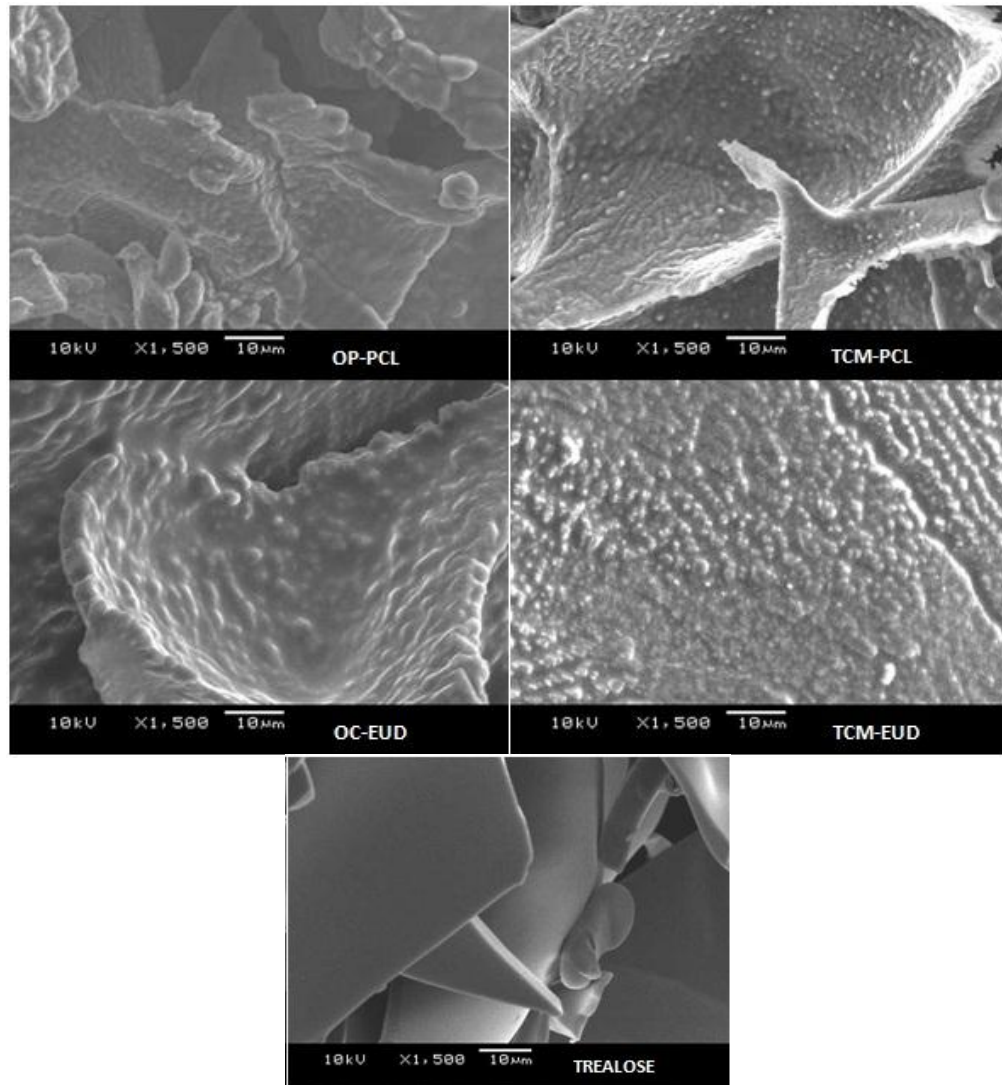


Figura 25 —Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura a partir das amostras de liofilizados contendo idebenona (aumento de 1.500X – barra corresponde a 10 µm), em comparação ao crioprotetor trealose (solução aquosa, a 10% p/v, liofilizada).

Nas figuras 26 e 27, é possível observar a existência de partículas inclusive na faixa coloidal, devido ao maior aumento. A presença destas partículas coloidais esféricas indica a provável manutenção da integridade das nanocápsulas após o congelamento/liofilização das suspensões de origem, as quais algumas podem estar aglomeradas devido à presença de uma matriz de trealose em volta das mesmas. Os liofilizados obtidos a partir de suspensões de nanocápsulas de EUD, especialmente para a formulação OC/EUD, são constituídos de partículas arredondadas menores do que as preparadas com PCL, fato que está condizente com os diâmetros médios das formulações originais (tabela 8).

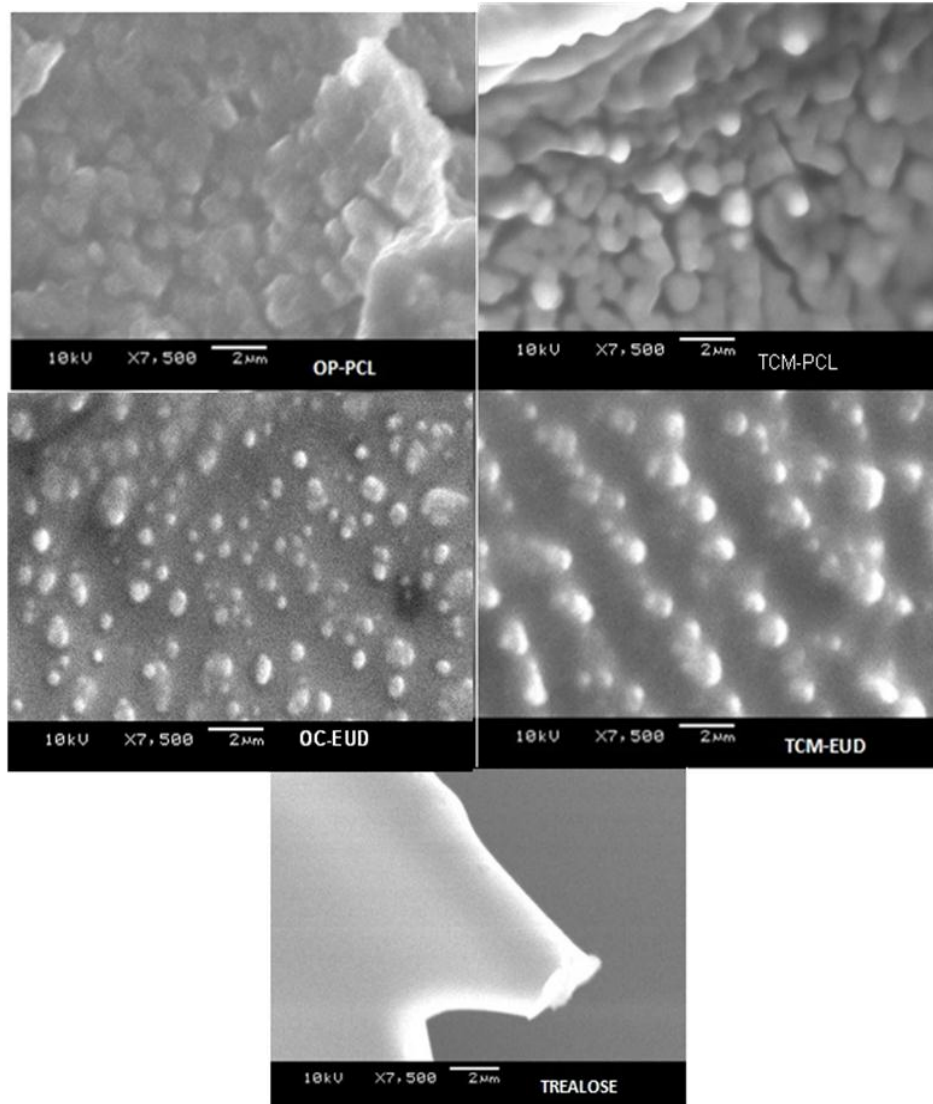


Figura 26 –Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura a partir das amostras de liofilizados contendo idebenona (aumento de 7.500X – barra corresponde a 2 μm), em comparação ao crioprotetor trealose (solução aquosa, a 10% p/v, liofilizada).

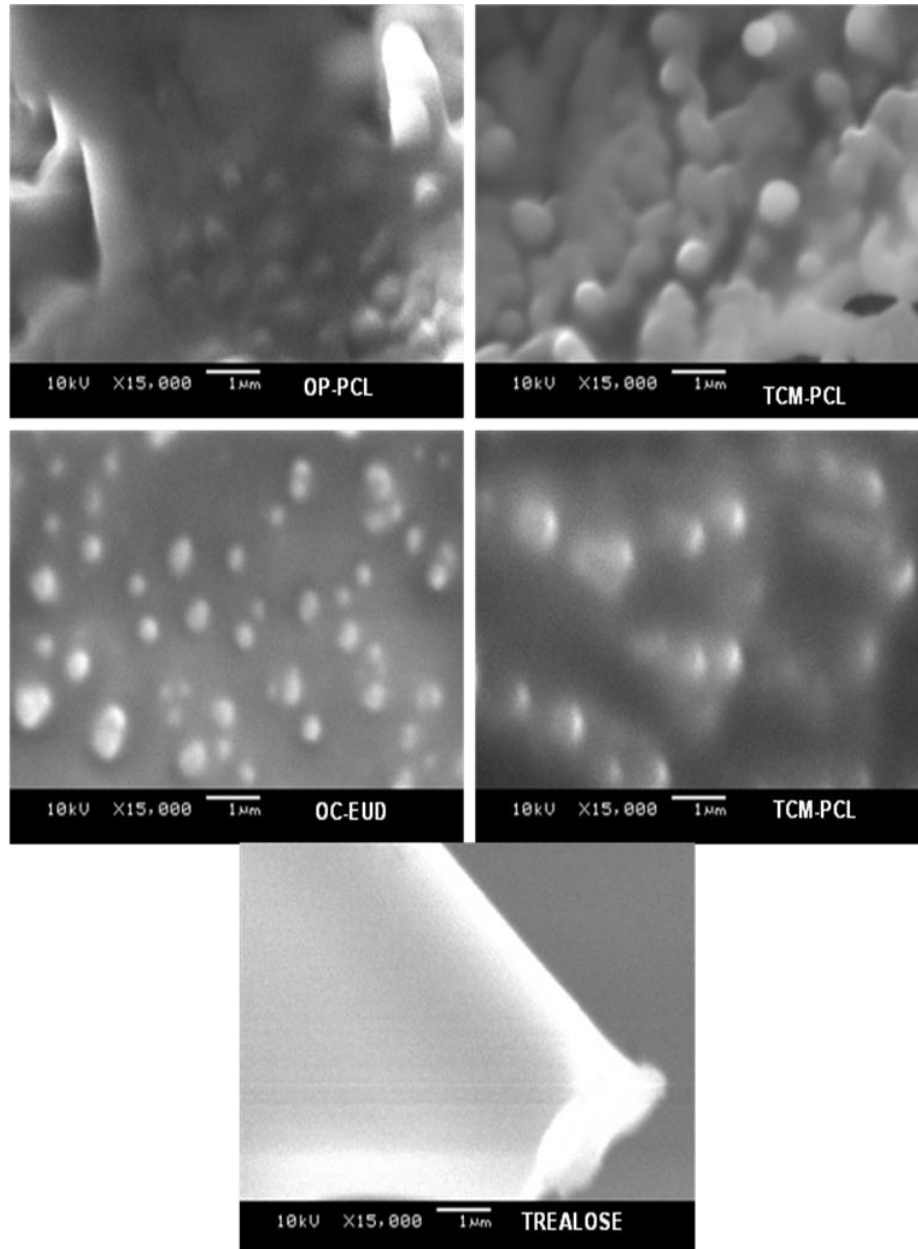


Figura 27 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura a partir das amostras de liofilizados contendo idebenona (aumento de 15.000X – barra corresponde a 1 μ m), em comparação ao crioprotetor trealose (solução aquosa, a 10% p/v, liofilizada).

Quanto ao aspecto macroscópico, os liofilizados apresentaram-se como sólidos aglomerados (*cake*; ABDELVAHED et al, 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003a,b), o que é característico de produtos liofilizados, com coloração levemente amarelada e sem odor.

A análise do diâmetro médio de partículas das amostras após a liofilização é importante para observar se essa característica se manteve durante o processo. Em geral, o tipo de crioprotetor selecionado e a concentração otimizada do mesmo podem proporcionar

uma maior conservação das características da amostra e assegurar maior estabilização das nanopartículas (ABDELWAHED et al., 2006). Uma relação do diâmetro médio de partículas após a liofilização e antes da liofilização pode ser realizada através do cálculo do índice de ressuspensão (equação 5, pág. 46). Quando o índice calculado apresentar um resultado próximo a 1,0 é indicativo de que o diâmetro das partículas permaneceu estável durante a liofilização. Se o valor aumentar e se distanciar muito da unidade pode ter ocorrido a formação de agregados de partículas (CHACÓN et al., 1999).

O diâmetro médio foi analisado por espectroscopia de correlação de fótons e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 12. Para as nanopartículas liofilizadas, verificou-se que nas formulações de PCL os diâmetros foram menores do que os diâmetros das formulações de origem (suspensões), enquanto que nas amostras liofilizadas de EUD os diâmetros foram maiores em comparação aos mesmos obtidos antes da liofilização. Os índices de ressuspensão variaram de 0,8 a 1,2 (figura 28). Foi realizada também a análise de diâmetro para a amostra contendo apenas trealose liofilizada com o objetivo de comparar esses resultados com os obtidos para amostras contendo os sistemas nanoestruturados, a fim de verificar se este adjuvante poderia influenciar no tamanho de partículas. A trealose liofilizada e ressuspensa em água apresentou valor de diâmetro médio maior (380 nm) do que os observados para as amostras com nanopartículas (167 a 207 nm), indicando que o crioprotetor utilizado não influenciou de forma importante a ressuspensão dos sistemas nanocápsulas/crioprotetor, de modo que índices de ressuspensão (0,8 a 1,2) foram dentro da faixa encontrada na literatura (CHACÓN et al., 1999; ABDELWAHED et al., 2006; KHAYATA, et al., 2012; SWARNAKAR et al., 2011; HIRSJÄRVI; PELTONEN; HIRVONEN, 2009).

Tabela 12 – Diâmetro médio de partículas após a ressuspensão dos liofilizados, contendo as nanocápsulas, comparativamente à solução do crioprotetor liofilizada nas mesmas condições

Liofilizados	Diâmetro médio (nm)
OP/PCL	181 ± 04
TCM/PCL	167 ± 06
OC/EUD	175 ± 21
TCM/EUD	207 ± 40
Trealose	380 ± 140

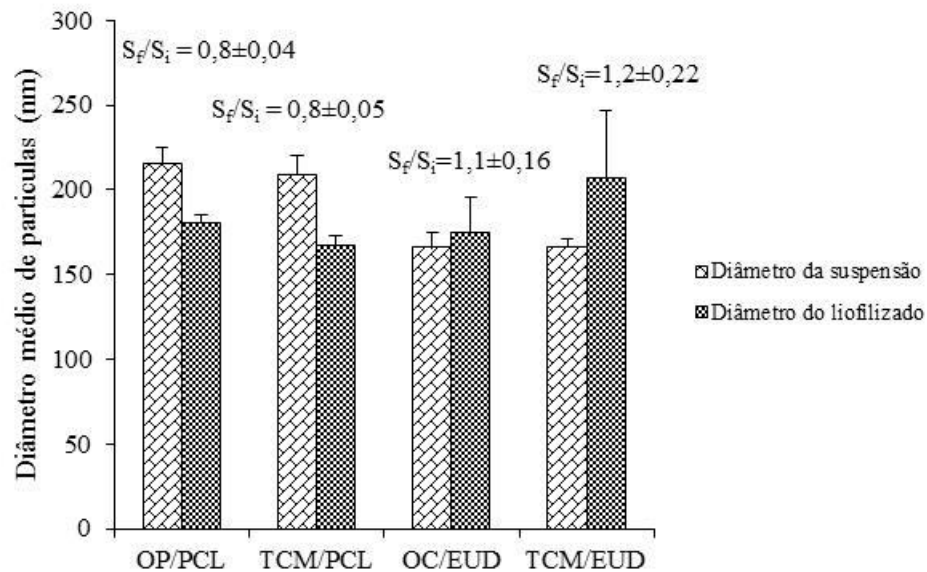


Figura 28 – Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas contendo idebenona e das respectivas amostras liofilizadas, após a ressuspensão em água, além dos índices de ressuspensão correspondentes (S_f/S_i).

Hirsjärvi e colaboradores (2009) preparam nanopartículas de PLA (200 nm) com diferentes crioprotetores [trealose 5% (com S_f/S_i de 1,0 a 1,2), sacarose 5% (com S_f/S_i de 1,0), lactose 5% (com S_f/S_i de 1,3), glicose 5% (com 1,0 a 1,1) e poloxamer 5% (com S_f/S_i de 1,0), lactose 4% e glicose 2% (com S_f/S_i de 1,0 a 1,2)], os quais apresentaram características de ressuspensão aceitáveis. Em um estudo realizado por Swarnakar e colaboradores (2011), onde nanopartículas de PLGA com coenzima Q10 foram liofilizadas com a utilização de crioprotetores (trealose, dextrose, manitol e sacarose), verificou-se que os índices de ressuspensão obtidos foram 1,04; 1,22; 1,16 e 1,35; respectivamente. Dessa forma, as nanopartículas liofilizadas com trealose apresentaram uma maior proteção em comparação aos outros crioprotetores. Nakagawa e colaboradores (2011) obtiveram produtos secos a partir de nanocápsulas de PCL, empregando solução de gelatina como estabilizante e várias temperaturas de congelamento. Índices de ressuspensão maiores do que 1,2 foram atribuídos ao processo de congelamento, em função do estresse físico devido ao crescimento dos cristais de gelo, influenciando nas características de dispersão dos produtos liofilizados.

As análises do percentual de umidade e do teor de fármaco nas amostras também foram realizadas (tabela 13). Os valores de umidade variaram de 2,6 a 3,8%, sendo considerados adequados uma vez que não se empregou secagem secundária na preparação dos liofilizados e o teor de umidade da trealose di-hidratada é em torno de 9,5%, segundo a literatura (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Os teores de idebenona nos liofilizados, após a preparação, apresentaram-se adequados (96 a 100 %), considerando o valor teórico, mesmo para as formulações preparadas com EUD, que foi baixo para as suspensões de origem, indicando estabilização dos sistemas. Deve-se informar que as suspensões foram congeladas em menos de 24 h após a preparação, para minimizar a possibilidade de degradação, cuidado necessário principalmente devido a maior velocidade de degradação evidenciada para as formulações com EUD.

Tabela 13 – Caracterização dos liofilizados contendo idebenona associada a nanocápsulas

Amostras liofilizadas	Teor de umidade (%)	Teor de fármaco (%)
OP/PCL	3,8	98,55 ± 2,11
TCM/PCL	3,2	100,10 ± 4,15
OC/EUD	2,6	96,18 ± 2,29
TCM/EUD	3,0	96,94 ± 5,15

Cabe enfatizar que o método analítico utilizado foi o mesmo empregado para as suspensões de nanocápsulas, sendo também validado para quantificação de idebenona nos liofilizados. O teste de especificidade, realizado com amostras de nanocápsulas preparadas sem fármaco, indicou que não houve interferência dos constituintes das formulações no pico do fármaco (tempo de retenção de 10,5 minutos), além de apresentar pureza de pico de acordo com o detector PDA. A análise de precisão para a determinação de idebenona, nas amostras liofilizadas da formulação de OP, na concentração de 15 µg/mL, está descrita na tabela 14. O experimento foi realizado em dois dias (repetibilidade e precisão intermediária), com a utilização de seis amostras cada dia, sendo encontrados valores de desvio padrão relativo adequados (menores do que 2,0 %). Para os liofilizados, a exatidão foi inferida após a avaliação da especificidade, linearidade e precisão, conforme a literatura específica permite (ICH, 2005).

Tabela 14 – Análise de precisão do liofilizado contendo idebenona associada a nanocápsulas

Amostra	Quantidade teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	15,00	14,07 \pm 0,05	94,33 \pm 0,64	0,67
Dia 2 (n=6)	15,00	14,35 \pm 0,19	95,67 \pm 1,27	1,33
Inter-dias (n=12)	15,00	14,21 \pm 0,20	95,00 \pm 0,95	1,00

1.9 Estudo de estabilidade das nanocápsulas liofilizadas contendo idebenona, em comparação às suspensões de origem

Foi realizado um estudo de estabilidade durante o período de 75 dias, de maneira que foram feitas análises de teor de fármaco após 25, 45 e 75 dias de armazenamento, à temperatura ambiente e com proteção da luz e da umidade (dessecador), para comparação com o estudo de estabilidade das suspensões de origem, armazenadas sob as mesmas condições (temperatura ambiente/proteção da luz), objetivando avaliar a capacidade dos produtos secos em reduzir a degradação da idebenona.

Conforme a figura 29, não houve alteração significativa no teor de idebenona ($p>0,05$) para todas as formulações durante os primeiros 25 dias, evidenciando que a liofilização retardou a queda de teor para as formulações preparadas com EUD, com ambos os óleos empregados. Após 45 dias de armazenamento, foi evidenciada redução de teor para todas as formulações. Entretanto, a queda de teor foi mais lenta do que para as respectivas formulações em suspensão (figura 29), havendo praticamente a manutenção do teor de idebenona entre 45 e 75 dias para os liofilizados. Ao final do estudo, as suspensões apresentaram teores entre 74% e 81%, enquanto que os liofilizados apresentaram teores entre 89% e 94% em relação ao inicial. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os teores dos liofilizados após 75 dias de armazenamento, indicando não haver influência do tipo de polímero ou de óleo na

estabilidade química da idebenona associada às nanocápsulas desenvolvidas e desidratadas. Macroscopicamente, não houve diferença no aspecto dos liofilizados durante o período do estudo.

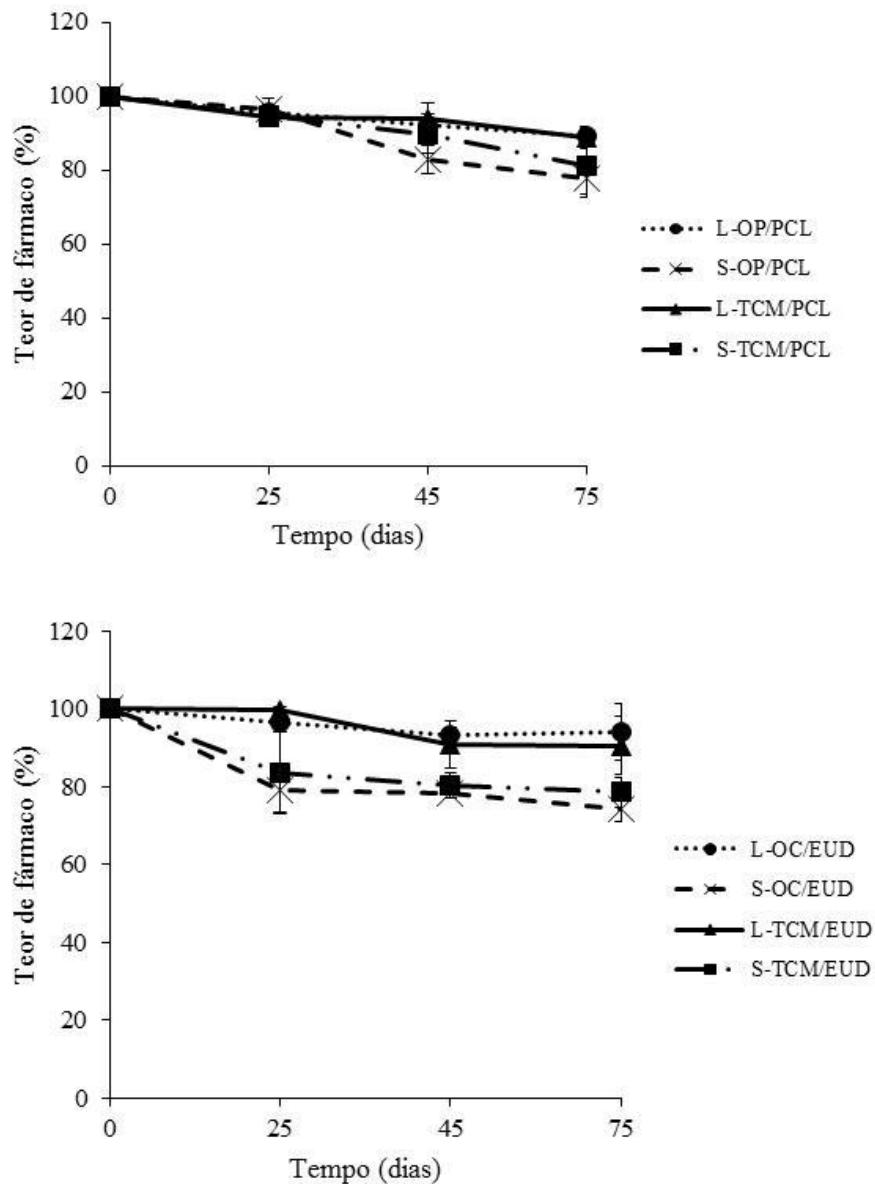


Figura 29 – Teor de idebenona nos liofilizados (L), obtidos a partir de diferentes suspensões de nanocápsulas (S), em função do tempo, armazenados protegidos da luz e da umidade, em relação ao tempo inicial.

É importante mencionar que não foram encontrados estudos, na literatura consultada, relativos ao desenvolvimento de liofilizados contendo idebenona associada a nanopartículas, apenas de nanoestruturas poliméricas obtidas por secagem por aspersão (AMORIM et al.,

2010). Neste trabalho, o teor de idebenona livre remanescente foi de 42 %, enquanto que nas formulações variou de 67 a 94 %, após 45 dias de armazenamento a 40 °C e 75% de UR.

Esta última parte do trabalho demonstrou que o uso da liofilização tem potencialmente a capacidade de aumentar a estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo idebenona, independentemente do tipo de polímero e óleo empregados, fato que pode viabilizar uma possível aplicabilidade industrial destes produtos, além de resultarem em tamanhos médios de partículas próximos aos tamanhos das suspensões originais, após a ressuspensão em água.

Como perspectivas para a continuação deste trabalho, torna-se importante a realização de experimentos de atividade antioxidante, como contra a peroxidação lipídica em tecido cerebral, visando avaliar a influência de se empregar triglicerídeos de cadeia média e os óleos naturais propostos neste trabalho, principalmente o de palma, como núcleo oleoso das nanocápsulas contendo idebenona, de maneira a explorar a potencialidade dos sistemas desenvolvidos na veiculação de fármacos neuroprotetores.

CONCLUSÃO

- Foi demonstrada a viabilidade da preparação de suspensões de nanocápsulas poliméricas preparadas, pela primeira vez, com óleo de palma como núcleo, composto graxo sólido/semissólido à temperatura ambiente, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, com adequadas características quanto ao diâmetro médio, distribuição de tamanho de partículas e potencial zeta. Parâmetros como a concentração do óleo, concentração de tensoativo de baixo EHL e, principalmente, a proporção das fases aquosa/orgânica influenciaram a otimização dos sistemas, além do tipo de polímero empregado;
- As suspensões de nanocápsulas selecionadas foram as preparadas com poli(ϵ -caprolactona), óleo de palma a 3,0 %, menor concentração de Span[®] 60 e com proporção 50:50 FO:FA. Por outro lado, não foi viável a obtenção de nanoestruturas com o emprego de polímero catiônico (Eudragit[®] RS100) tendo como núcleo o óleo de palma;
- Já para as formulações preparadas com óleo de coco (3,0 %), as condições selecionadas foram: Eudragit[®] RS100 como polímero, proporção das fases 50:50 FO/FA e Span[®] 80 como tensoativo de baixo EHL. Com poli(ϵ -caprolactona), não foi viável a obtenção de sistemas adequados, demonstrando a importante relação entre as características do óleo e polímero na obtenção tecnológica destes carreadores;
- Considerando as formulações preparadas com poli(ϵ -caprolactona) (OP e TCM) ou com Eudragit[®] RS100 (OC e TCM), verificou-se a viabilidade do emprego das mesmas na veiculação do neuroprotetor idebenona com tamanho de partículas inferior a 230 nm, baixo PDI e elevada eficiência de encapsulamento (>99%). As nanocápsulas preparadas com Eudragit[®] RS100 foram menores em relação àquelas preparadas com poli(ϵ -caprolactona). Apenas a formulação EUD/TCM apresentou teor inicial de fármaco abaixo de 90%;
- No estudo de estabilidade, observou-se que as formulações catiônicas (Eudragit[®] RS100) tenderam a maior redução de teor em função do tempo, independentemente do óleo usado (OC-natural ou TCM) ou da presença ou ausência de exposição à luz, em relação às de poli(ϵ -caprolactona), mas houve estabilidade física, quanto ao diâmetro médio de partículas e manutenção de baixo PDI, durante os 75 dias de armazenamento, assim como para as últimas (OP ou TCM). As suspensões de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -

caprolactona) (OP ou TCM) mantiveram-se estáveis físico-quimicamente por 25 dias, quando armazenadas protegidas da luz e em temperatura ambiente;

- A presença da luz catalisou a degradação da idebenona para todas as formulações, independentemente da composição (polímero/óleo), mas não alterou o diâmetro médio, PDI e potencial zeta, após 75 dias;
- No estudo de fotoestabilidade das suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (OP ou TCM), foi possível observar que os sistemas nanoestruturados protegeram o fármaco de forma significativa em comparação à dispersão micelar contendo a idebenona, após exposição à radiação UVA (13 e 23 horas). Entretanto, quando uma radiação de maior energia incidiu nos sistemas (UVC/13 h), apenas as nanocápsulas com óleo de palma (OP) reduziram significativamente a fotodegradação da idebenona em relação à formulação controle (dispersão micelar), o que em hipótese pode ser devido à presença de antioxidantes neste produto natural e/ou à proteção em função do provável estado sólido;
- Através do estudo de liberação *in vitro*, evidenciou-se que as nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) apresentaram uma liberação 9 vezes mais lenta do fármaco em comparação à difusão da idebenona livre, sendo que o perfil de liberação não foi influenciado pelo tipo de óleo (OP ou TCM). Segundo modelagem dos dados, a liberação ocorreu em uma única etapa, dependendo apenas da concentração do fármaco (cinética de primeira ordem), sem a ocorrência de uma liberação rápida inicial do mesmo, inferindo-se que a idebenona está confinada no núcleo (OP ou TCM) e não adsorvida à parede polimérica ou na forma de nanocristais/fármaco livre;
- Foi possível a obtenção de liofilizados redispersíveis adequados, a partir das suspensões de nanocápsulas desenvolvidas (OP/PCL; TCM/PCL; OC/EUD; TCM/EUD), com teor de idebenona próximo ao teórico (96-100%) para todas as formulações, evidenciando-se a presença de estruturas coloidais na matriz formada pelo crioprotetor trealose. Estes produtos desidratados contendo idebenona associada às nanocápsulas foram capazes de aumentar a estabilidade química do fármaco, em comparação às suspensões de origem, inclusive na manutenção de teor para as formulações de Eudragit® RS100.
- As nanocápsulas desenvolvidas são promissoras para a liberação controlada de idebenona, almejando a futuras aplicações no campo da neuroproteção.

•

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery**, v. 58, p. 1688-1713, 2006.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G. FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 87-94, 2006.

ALVAREZ, A.M.R.; RODRÍGUEZ, M.L.G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. **Grasas y aceites**, v. 51, p. 74-96, 2000.

ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, p. 900–904, 2005.

ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

AMORIM, C. M; NETZ, D. J.A.; COUTO, A. G.; DE FREITAS, R. A.; TANIA M. B. BRESOLIN, T.M.B. Stability-indicating LC-PDA method for determination of idebenone in nanoparticles based on chitosan and *N*-carboxymethylchitosan. **Chromatographia**, v. 70, nº. 9/10, p. 1411-1415, 2009.

AMORIM, C. de M.; COUTO, A. G.; NETZ, D. J. A.; FREITAS, R. A.; BRESOLIM, T. M. B. Antioxidant idebenone-loaded nanoparticles based on chitosan and *N*-carboxymethylchitosan. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 745-752, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BALA, I; BHARDWAJ, V.; HARIHARAN, S.; KHARADE, S.V.; ROY, N.; KUMAR, M.N.V.R. Sustained release nanoparticulate formulation containing antioxidant-ellagic acid as potential prophylaxis system for oral administration. **Journal of Drug Targeting**, v. 14, p. 27-34, 2006.

BECKER, C.; BRAY-FRENCH, K.; DREWE, J. Pharmacokinetic evaluation of idebenone. **Expert Opinion Drug Metabolism Toxicology**, v. 6, p. 1437-1444, 2010.

BERNARDI, A.; ZILBERSTEIN, A. C. C.; JAGER, E.; MORRONE, F. B.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 1104-1111, 2009.

BORA, P. S.; ROCHA, R. V. M.; NARAIN, N.; MOREIRA-MONTEIRO, A. C.; MOREIRA, R. A. Characterization of principal nutritional components of Brazilian oil palm (*Eliaes guineensis*) fruits. **Bioresource Technology**, v. 87, p.1, 2003.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 530-536, 1996.

CARDOSO, S. M.; PEREIRA, C; OLIVEIRA, C. R. The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, p. 703-710, 1998.

CHACÓN, M.; MOLPECERES, J., BERGES, L.; GUZMÁN, M; ABERTURAS, M. R. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. **Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 99-107, 1999.

CHAUHAN, V; CHAUHAN, A. Oxidative stress in Alzheimer s disease. **Phatophysiology**, v. 13, p. 196, 2006.

CHUNG, N.-O.; LEE, M. K.; LEE, J. Mechanism of freeze-drying drug nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, p. 42-50, 2012.

CROUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**, v. 19, p. 99-134, 2002.

EDEM, D. O. Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 319-341, 2002.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010, 546p., 1v/il.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by Interfacial Polymer Deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 1-4, 1989.

FONTANA, M.C.; CORADINI.; GUTERRES, S. S.; POHKMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 1-10, 2009.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. BECK, R. C. R. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics of drug release, and photostability. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 3091-3099, 2010.

FOSTER, R.; WILLIAMSON, C. S.; LUNN, J. Culinary oils and their health effects. **Journal Compilation**, v. 34, p. 4-47, 2009.

FRIEDRICH, R.B.; BASTOS, M.O; FONTANA, M.C.; OURIQUE, A.F.; BECK, R.C.R. Tablets containing drug-loaded polymeric nanocapsules: An innovative platform. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 1-4, 2010a.

FRIEDRICH, R.B.; FONTANA, M.C; BASTOS, M.O; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Drying Polymeric Drug-loaded nanocapsules: The wet granulation process as a promising approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, 1-6, 2010b.

GAIKWAD, A.; TAMIZHRASI, S.; SORTI, A.; GAVALI, P.; MEHARE, G. Formulation and in vitro characterization of polymethacrylic acid nanoparticle containing frusemide. **Pharm Tech**, v. 2, p. 300-304, 2010.

GANAFI, A.A.; SOCCI, R.R.; EATAMAN, D.; SILVESTROV, N. ABUKAHALAF, I.K.; BAYORH, M.A. Effect of palm oil on oxidative stress-induced hypertension in Sprague-dawley rats. **American Journal of Hypertension**, v. 15, p. 725-731, 2002.

GEROMEL, V.; DARIN, N.; CHRÉTIEN, D.; BÉNIT, P.; DeLONLAY, P.; RÖTIG, A.; MUNNICH, A.; RUSTIN, P. Coenzyme Q10 and idebenone in the therapy of respiratory chain diseases: rationale and comparative benefits. *Molecular Genetics and Metabolism*, v.77, p. 21-30, 2002.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: MORALES, M. M. **Terapias avançadas células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde**. São Paulo: Atheneu, 2007. Cap. 17, p. 247-264.

HIRSJÄRVI, S.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly(lactic acid) nanoparticles. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, p. 488-494, 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), 2005.

IMADA, I.; FUJITA, T.; SUGIYAMA, Y.; OKAMOTO, K.; KOBAYASHI, Y. Effects of idebenone and related compounds on respiratory activities of brain mitochondria, and on lipid peroxidation of their membranes. **Archives Gerontology Geriatrics**, v. 8, p. 323-324, 1989.

JAGER, E; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F. S.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDINI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130, 2009.

JORNADA, D. S.; FIEL, L. A.; BUENO, K.; GERENT, J. F.; PETZHOLD, C. L.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**, v. 8, p. 6646-6655, 2012.

KAMAT, J. P.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Tocotrienols from palm oil potent inhibitors of lipid peroxidation and protein oxidation in rat brain mitochondria. **Neuroscience letters**, v. 195, p. 179, 1995.

KANG , H. S.; KWON, S.-S.; NAM, Y.-S.; HAN, S.-H.; CHANG, I.-S. Determination of zeta potentials of polymeric nanoparticles by the conductivity variation method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 255, p. 352, 2002.

KAUSAR, H.; BHASIN, G.; ZARGAR, M.A.; ATHAR, M. Palm oil alleviates 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced tumor promotion response in murine skin. **Cancer Letters**, v. 192, p. 151-160, 2003.

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M.F.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Stability study and lyophilization of vitamin E – loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, p. 254-259, 2012.

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

KULKAMP, I. C.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, p. 2078-2084, 2009.

KULKAMP, I. C.; RABELO, B. D.; BERLITZ, S. J.; ISOPPO, M.; BIANCHIN, M. D.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; Nanoencapsulation improves the *in vitro* antioxidant activity of lipoic acid. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, p. 1-10, 2011.

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

KWON, S. S.; NAM, Y. S.; LEE, J. S.; KU, B. S.; HAN, S. H.; LEE, J. Y.; CHANG, I. S. Preparation and characterization of coenzyme Q₁₀-loaded PMMA nanoparticles by a new emulsification process based on microfluidization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical, Engineering Aspects**, v. 210, p. 95-104, 2002.

LAMPRECHT, A.; BOULIGAND, Y.; BENOIT, J-P. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. *Journal of controlled release*, v. 84, p. 59-68, 2002.

LAURELES, L. R.; RODRIGUEZ, F. M.; REAÑO, C. E.; SANTOS, G. A.; LAURENA, A. C.; MENDOZA, E. M. T. Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of the oil of coconut (*Cocos nucifera L.*) hybrids and their parentals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1581-1586, 2002.

LEGRAND, P.; LESIEUR, S.; BOCHOT, A.; GREF, R.; RAATJES, W.; BARRATT, G.; VAUTHIER, C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 33-43, 2007.

LEMOINE, D.; FRANCOIS, C.; KEDZIEREWICZ, F.; PREAT, V.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Stability study of nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, p. 2191-2197, 1996.

LETCHEFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 259-269, 2007.

LI, B; GE, Z-Q. Nanostructured lipid carriers improve skin permeation and chemical stability of idebenone. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 13, p. 276-283, 2012.

MARINA, A. M.; CHE MAN, Y. B.; NAZIMAH, S. A. H.; AMIN, I. Chemical properties of virgin coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p. 301-307, 2009a.

MARINA, A.M.; CHE MAN, Y.B.; AMIN, I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 481-487, 2009b.

Marina, A.M.; Che Man, Y.B.; Nazimah, S.A.H.; Amin, I. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60(S2), p. 114-123, 2009c.

MEIER, T.; BUYSE, G. Idebenone: an emerging therapy for Friedreich ataxia. **Journal of Neurology**, v. 256 (suppl 1), 25-30, 2009.

MONTENEGRO, L.; CAMPISI, A.; SARPIETRO, M. G.; CARBONE, C.; ACQUAVIVA, R.; RACITI, G.; PUGLISI, G. In vitro evaluation of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the brain. **Drug development and Industrial Pharmacy**, p. 743-744, 2011.

MONTENEGRO, L.; SINICO, C.; CASTANGIA, I.; PUGLISI, G. Idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin: in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 169-174, 2012.

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

MORDENTE, A.; MARTORANA, G. E.; MINOTTI, G.; GIARDINA, B. Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl-1,4-benzoquinone) (idebenone). **Chemical Research Toxicology**, v. 11, p. 54-63, 1998.

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

MUKHERJEE, S.; MITRA, A. Health effects of palm oil. **Journal of Human Ecology**, v. 26, n.3, p. 197-203, 2009.

MÜLLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, P.R.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S.S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n.3, 343-347, 2000.

NAGY, K.; ZS-NAGY, I. The effects of idebenone on the superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in liver and brain homogenates, as well as in brain synaptosomal and mitochondrial fractions. **Archives of Gerontology Geriatrics**, v. 11, p. 289, 1990.

NAKAGAWA, K.; SURASSMO, S.; MIN, S. G.; CHOI, M. J. Dispersibility of freeze-dried poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by gelatina and the effect of freezing. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 177-188, 2011.

NEVIN, K.G.; RAJAMOHAN, T. Virgin coconut oil supplemented diet increases the antioxidant status in rats. **Food Chemistry**, v. 99, p. 260-266, 2006.

NIKAM, V. K.; KOTADE, K., B.; GAWARE, V. M.; DOLAS, R. T.; DHAMAK, K. B.; SOMWANSHI, S. B.; KHADSE, A. N.; KASHID, V. A. Eudragit a versatile polymer: a review. **Pharmacology online**, v. 1, p. 152-164, 2011.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical, characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1-4, 2008.

OURIQUE, A. F.; MELERO, A.; SILVA, C. de B.; SCHAEFER, U. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; LEHR, C.-M.; KOSTKA, K.-H.; BECK, R. C. R. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 95-101, 2011.

PACETTI, D.; BOSELLI, E.; LUCCI, P.; FREGA, N. G. Simultaneous analysis of glycolipids and phospholids molecular species in avocado (*Persea Americana* Mill) fruit. **Journal of Chromatography A**, p. 241-242, 2006.

PALUMBO, M; RUSSO, A.; CARDILE, V.; RENIS, M.; PAOLINO, D.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Improved antioxidant effect of idebenone loaded poliethyl-2-cyanocrylate nanocapsules tested on human fibroblasts. **Pharmaceutical Research**, v. 19, p. 71-73, 2002.

PARFENE, G.; HORINCAR, V.; TYAGI, A. K.; MALIK, A.; BAHRIM, G. Production of medium chain saturated fatty acids with enhanced antimicrobial activity from crude coconut fat by solid state cultivation of *Yarrowia lipolytica*. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1345-1349, 2013.

PARKINSON, M.H.; SCHULZ, J.B.; GIUNTI, P. Co-enzyme Q10 and idebenone use in Friedreich's Ataxia. **Journal of Neurochemistry**, v. 126 (suppl 1), p. 125-141, 2013.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International of Journal Pharmaceutics**, v.57, p. 169-172, 1989.

PERCHELLET, J.-P.; ABNEY, N. L.; THOMAS, R. M. Effects of combined treatments with selenium, glutathione and vitamin E on glutathione peroxidase activity, ornithine decarboxylase induction, and complete and multistage carcinogenesis in mouse skin. **Cancer Research**, v. 47, p. 477-485, 1987.

PIGNATELLO, R.; ACQUAVIVA, R.; CAMPISI, A.; RACITI, G.; MUSUMECI, T.; PUGLISI, G. Effects of liposomal encapsulation on the antioxidant activity of lipophilic prodrugs of idebenone. **Journal of Liposome Research**, v. 21, p 46-56, 2011.

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

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

REGO, A. C.; SANTOS, M. S.; OLIVEIRA, C. R. Influence of the antioxidants vitamin E and idebenone on retinal cell injury mediated by chemical ischemia, hypoglycemia, or oxidative stress. **Free radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1405-1406, 1999.

RIBEIRO, C.J. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37-42, 1987.

RONEY, C.; KULKARNI, P.; ARORA, V.; ANTICH, P.; BONTE, F.; WU, A.; MALLIKARJUANA, N.N.; MANOHAR, H-Fa.; LIANG, H.-F.; KULKARNI, A.R.; SUNG, H-W.; SAIRAM, M.; AMINABHAVI, T. M. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. **Journal of controlled release**, v. 108, p. 193-214, 2005.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 6th ed., London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.

SANTI, E. Dicionário de princípios ativos em cosmetologia. São Paulo: Organização Andrei, 2003.

SANTOS, S.S. **DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES NANOTECNOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SANTOS, S. S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L. M.; MATTIAZI, J.; ADAMS, A., I., H.; DENARDI, L. B.; ALVES, S. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit[®] RS100 nanocapsules: preparation, characterization and *in vitro* evaluation of antifungal activity against *Candida species*. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1389-1394, 2013.

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

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S.S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003b.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; de CORDOVA, C. A. S.; CRECZYNSKY-PASA T. B.; GUTERRES, S. S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 209-213, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S. S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 562-569, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability evaluation. **Die Pharmazie**, v. 62, p. 354-360, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; SIQUEIRA, I. R.; BADEJO, A. S.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; NETTO, C. A.; GUTERRES, S. S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 64-71, 2008.

SHEA, T.B.; ORTIZ, D.; NICOLOSI, R.J.; KUMAR, R.; WATTERSON, A.C. Nanosphere-mediated delivery of vitamin E increase its efficacy against oxidative stress resulting from exposure to amyloid beta. **Journal of Alzheimers' Disease**. v. 7, p. 297-301, 2005.

SEMSEI, I.; NAGY, K.; Zs-NAGY, I. In vitro studies on the OH^\cdot e O_2^\cdot free radical scavenger properties of idebenone in chemical systems. **Archives of Gerontology Geriatrics**, v. 11, p. 188, 1990.

SUNO, M.; NAGAOKA, A. Inhibition of brain mitochondrial swelling by idebenone. **Archives of Gerontology Geriatrics**, v. 8, p. 299-305, 1989.

SWARNAKAR, N. K.; JAIN, A. K.; SINGH, R. P.; GODUGU, C.; DAS, M.; JAIN, S. Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q-10 loaded polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 6860-6874, 2011.

TANG, X.; PIKAL, M. J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 191-200, 2004.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemical, drugs, and biological. 14th ed. Whitehouse Station (NJ): Merck Research Laboratories, 2006, p. 848.

VAN WINDEN, E. C. A.; TALSMA, H.; CROMMELIN, D. J. A. Thermal analysis of freeze dried liposome-carbohydrate mixtures with modulated differential scanning calorimetry. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 231-237, 1998.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 1025-1058, 2009.

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. 200-2008, 2011.

WU, T-H.; YEN, F-L.; LIN, L-T.; TSAI, T-R.; LIN, C-C.; CHAM, T-M. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p.160-168, 2008.

ZHAI, H.; CORDOBA-DIAZ, M.; WA, C.; HUI, X.; MAIBACH, H. I. Determination of the antioxidative capacity of an antioxidant complex and idebenone: an *in vitro* rapid and sensitive method. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 7, p. 96-100, 2008.

ZS.-NAGY, I. Chemistry, toxicology, pharmacology and pharmacokinetics of idebenone: a review. **Archives Gerontology and Geriatrics**, v. 11, p. 177-186, 1990.