

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

Maria Gilda De Marco

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM
DIFERENTES REVESTIMENTOS PARA A LIBERAÇÃO CEREBRAL
DE VIMPOCETINA**

Santa Maria, RS
2018

Maria Gilda De Marco

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM DIFERENTES
REVESTIMENTOS PARA A LIBERAÇÃO CEREBRAL DE VIMPOCETINA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Scheila Rezende Schaffazick

Santa Maria, RS
2018

De Marco, Maria Gilda De Marco
DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM
DIFERENTES REVESTIMENTOS PARA A LIBERAÇÃO CEREBRAL DE
VIMPOCETINA / Maria Gilda De Marco De Marco.- 2018.
101 f.; 30 cm

Orientadora: Scheila Rezende Schaffazick Schaffazick
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Nanopartículas poliméricas 2. Neuroprotetor 3.
Poli(e-caprolactona) 4. Barreira hematoencefálica 5.
Fluoresceína I. Schaffazick, Scheila Rezende Schaffazick
II. Título.

Maria Gilda De Marco

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM
DIFERENTES REVESTIMENTOS PARA A LIBERAÇÃO CEREBRAL DE
VIMPOCETINA**

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

Aprovado em 02 de fevereiro de 2018:

Scheila Rezende Schaffazick, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Luciane Varini Laporta, Dr^a. (UNIFRA)

Cristiane Franco Codevilla, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por me incentivarem e me darem força para seguir. Ao meu namorado pela paciência e amor. Com vocês sou mais forte, e todas as conquistas valem muito mais a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Joacir e Valéria pelo exemplo, afeto e incentivo nas escolhas que decido seguir. O apoio de vocês foi fundamental, obrigada por estarem sempre comigo.

Ao Jeferson que esteve do meu lado nas horas boas e ruins, dividindo todos os momentos e me dando o apoio necessário para seguir em frente. Obrigada por tornar tudo sempre mais simples e leve.

À professora Dr^a. Scheila R. Schaffazick, que generosamente abriu as portas do laboratório para que eu pudesse realizar esse sonho. Obrigada pela oportunidade concedida, confiança, paciência, orientação e exemplo.

Ao professor Dr. Carlos Fernando de Mello do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM, pela importante colaboração com os estudos *in vivo*.

À Profa. Dr^a. Cristiane de Bona da Silva pela disponibilidade do equipamento Zetasizer e à professora Dr^a. Letícia Cruz pelos ensinamentos transmitidos e colaborações sempre que necessário.

Às amigas Carol e Milena, por me receberem tão bem no laboratório e por passarem todo conhecimento a alguém estava apenas começando. Obrigada pela paciência, apoio, ombro amigo e carinho durante esse período. Agradeço especialmente à Tainara, Camila e Victória pela agradável convivência, auxílio em momentos importantes e amizade. Vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Paulo Guilherme, Dani, Leonardo, Gabi, Juliane, Luana, Laura, Cris, Taiane, Marcela, Allana, Verônica, Luan, Marila, Felipe, Renata, Fernanda, Marcel, Mailine, Nathi e Charlene, pela colaboração, convivência diária, descontração e carinho com que me receberam.

Ao colega Estevam, um agradecimento especial por colaborar nos experimentos *in vivo*, seu auxílio foi fundamental para a execução do trabalho. Agradeço também a convivência e amizade em dias que não foram tão fáceis.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, juntamente com seus docentes e funcionários, à CAPES e à FAPERGS.

Especialmente ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM DIFERENTES REVESTIMENTOS PARA A LIBERAÇÃO CEREBRAL DE VIMPOCETINA

AUTORA: Maria Gilda De Marco

ORIENTADORA: Scheila Rezende Schaffazick

A vimpocetina (VP) é usada em desordens neurodegenerativas e pesquisas têm indicado um promissor efeito anticonvulsivante relacionado a esse fármaco. No entanto, ele apresenta algumas limitações como baixa solubilidade em água e curta meia-vida. Sistemas nanoparticulados poliméricos são descritos na literatura como alternativas para aumentar a solubilidade de substâncias, promover o controle de liberação, bem como melhorar a capacidade de liberação cerebral de moléculas ativas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanocápsulas biodegradáveis de poli(ϵ -caprolactona) (PCL Mn 10.000), com diferentes revestimentos, para a liberação cerebral de vimpocetina, avaliando-se as características físico-químicas, capacidade de controle de liberação e de alteração ou não da permeabilidade/integridade das junções intercelulares da barreira hematoencefálica (BHE). As nanocápsulas (NCs) foram obtidas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (n=3), sendo preparadas formulações definidas de acordo com os seus revestimentos/estabilizantes [polissorbato 80 (NCs-VP-P80), polissorbato 80 e polietilenoglicol 4000 (NCs-VP-P80/P4000) ou polissorbato 80 e polietilenoglicol 6000 (NCs-VP-P80/P6000)]. As NCs apresentaram tamanho submicrométrico (em torno de 200 nm, Zetasizer[®]), estreita distribuição de tamanho (IPd < 0,11), potencial zeta negativo, teor de vimpocetina próximo ao teórico (96 – 98%) e elevada eficiência de encapsulamento (EE > 99%). O tamanho nanométrico foi confirmado por análises através de difração a laser. O tipo de revestimento das NCs influenciou significativamente a viscosidade relativa desses sistemas (p<0,05), determinada por viscosímetro capilar. As suspensões de NCs foram estáveis por 60 dias após a preparação, havendo decaimento no teor e aumento significativo do tamanho de partículas após 90 dias de armazenamento, sem influência da presença ou não de PEG. A liberação *in vitro*, a partir das NCs, foi realizada utilizando sacos de diálise e tampão fosfato pH 7,4/etanol (70:30 v/v) como meio. Essas estruturas foram capazes de controlar a liberação da vimpocetina em comparação ao fármaco livre, sem efeito *burst*, sendo que a cinética de liberação não foi afetada pela presença de PEG ou por seu peso molecular. Entretanto, o PEG afetou o mecanismo de liberação da vimpocetina. As nanocápsulas apresentaram morfologia esférica e tamanho coloidal, quando analisadas por microscopia eletrônica de varredura, após a liofilização dos sistemas empregando trealose (10% p/v). No estudo *in vivo*, avaliou-se a integridade da BHE em camundongos, por via intraperitoneal, usando fluoresceína de sódio como marcador de abertura, uma vez que ela não atravessa a BHE íntegra. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa (p>0,05) entre o tratamento com as NCs contendo ou não o fármaco em relação aos controles (VP livre e salina), considerando a relação cérebro/sangue de concentração de fluoresceína. Assim, esses sistemas não promoveram alteração ou ruptura da BHE, segundo o estudo realizado, sendo um indício de segurança. Neste sentido, as NCs de PCL desenvolvidas são sistemas promissores para a liberação cerebral de vimpocetina, tendo em vista o tratamento futuro de distúrbios neurológicos, como a epilepsia.

Palavras-chave: Nanopartículas poliméricas. Neuroprotetor. Poli(ϵ -caprolactona). Barreira hematoencefálica. Fluoresceína.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POLYMERIC NANOCAPSULES WITH DIFFERENT COATINGS FOR VIMPOCETINE BRAIN DELIVERY.

AUTHOR: Maria Gilda De Marco
ADVISOR: Scheila Rezende Schaffazick

Vinpocetine (VP) is used in neurodegenerative diseases, and researches have indicated a promising anticonvulsant effect of this drug. However, it shows some limitations as low aqueous solubility and short half-life. Polymeric nanoparticulate systems are described in the literature as alternatives to increase the solubility of substances and to promote controlled release of drugs, as well as these systems are able to improve the brain delivery of active molecules. The objective of this study was to develop biodegradable poly(ϵ -caprolactone) (PCL Mn 10,000) nanocapsules (NCs), with different coatings, for cerebral delivery of vinpocetine, evaluating the physico-chemical characteristics, the ability for the control drug release and the alteration or not of the permeability/integrity of the blood-brain barrier (BBB) intercellular junctions. NCs were obtained by the interfacial deposition of preformed polymer ($n = 3$) and the formulations were defined according to their coatings/ stabilizers (polysorbate 80 (NCs-VP-P80), polysorbate 80 and polyethylene glycol 4000 (NCs-VP P80/P4000) or polysorbate 80 and polyethylene glycol 6000 (NCs-VP-P80/P6000)]. NCs presented a submicrometric size (around 200 nm, Zetasizer[®]), narrow size distribution (IPd <0.11), negative zeta potential, vinpocetine content near to the theoretical value (96-98%) and high encapsulation efficiency (EE > 99%). The nanometric size was confirmed by laser diffraction analysis. The type of coating of the NCs significantly influenced the relative viscosity of these systems ($p < 0.05$), determined by capillary viscometer. The NCs suspensions were stable for 60 days after the preparation, with reduction in the drug content and significant increasing in the particle size after 90 days of storage, without influence of the presence or not of PEG. *In vitro* release from the NCs was performed using dialysis bags and phosphate buffer pH 7.4/ethanol (70:30 v/v) as medium. These structures were able to control release of vinpocetine in comparison to the free drug, without burst effect, and the release kinetics were not affected by the presence of PEG or its molecular weight. However, PEG influenced the mechanism of vinpocetine release. The nanocapsules presented spherical morphology and colloidal size, when analyzed by scanning electron microscopy, after lyophilization of the systems using trehalose (10% w/v). In the *in vivo* study, BBB integrity in mice was evaluated intraperitoneally using sodium fluorescein as the opening marker, because it does not cross entire BBB. The results showed that there was no significant difference ($p > 0.05$) between the treatment with the NCs containing or not the drug in relation to the controls (free vinpocetine and saline), considering the brain/blood ratio of fluorescein concentration. Thus, these systems did not promote alteration or dysfunction in BBB, according to this study, being a sign of safety. In this sense, the developed PCL NCs are promising systems for the cerebral delivery of vinpocetine, with a view to the future treatment of neurological disorders, such as epilepsy.

Keywords: Polymeric Nanoparticles. Neuroprotector. Poly(ϵ -caprolactone). Brain Blood Barrier. Fluorescein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química da vimpocetina.....	20
Figura 2 -	Representação esquemática de nanopartículas poliméricas.....	25
Figura 3 -	Representação esquemática do método de deposição interfacial de polímero pré-formado	27
Figura 4 -	Estrutura química do polímero PCL.....	33
Figura 5 -	Estrutura química do polietilenoglicol e do polissorbato 80.....	36
Figura 6 -	Viscosímetro Cannon-Fenske.....	47
Figura 7 -	Cromatogramas sobrepostos, obtidos por CLAE-UV, a partir das formulações contendo vimpocetina (NCs-VP) ou não (NCs).....	56
Figura 8 -	Distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimpocetina (n=3), obtidos através de espalhamento de luz dinâmico.....	58
Figura 9 -	Gráficos do potencial zeta das formulações (n=3).....	60
Figura 10 -	Viscosidade relativa das formulações de nanocápsulas contendo vimpocetina. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.	63
Figura 11 -	Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, em função do tempo (Zetasizer®). Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	65
Figura 12 -	Diâmetro médio de volume (D4,3) das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	66
Figura 13 -	Diâmetro médio de superfície (D3,2) das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	67
Figura 14 -	Gráficos de distribuição de tamanho de partículas de um lote de cada uma das suspensões de nanocápsulas com sobreposição dos tempos 0, 30, 60 e 90 (linha roxa=90 dias).....	68
Figura 15 -	Valores de span das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	69
Figura 16 -	Índices de polidispersão (IPd) das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	69
Figura 17 -	Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	70
Figura 18 -	Valores de pH das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	71
Figura 19 -	Teor total de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	72
Figura 20 -	Perfis de liberação in vitro da vimpocetina a partir das diferentes nanocápsulas (NCs-VP-P80, NCs-VP-P80/P4000 e NCs-VP-P80/P6000), em comparação à difusão do fármaco livre (VP). Resultados expressos em média \pm DP (n=3).....	74

Figura 21 - Ajustes gráficos do modelo monoexponencial considerando os dados de liberação da vimpocetina, a partir das nanocápsulas em relação ao fármaco livre.....	75
Figura 22 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, a partir das suspensões de nanocápsulas, contendo vimpocetina, liofilizadas em diferentes aumentos (2.500 x; 5.000 x e 10.000 x)..	78
Figura 23 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura, a partir de suspensão de nanocápsulas liofilizada, contendo vimpocetina (NCs-VP-P80), observada em aumento de 15.000 X.....	79
Figura 24 - Diâmetro médio (Zetasizer®) das suspensões de nanocápsulas e das respectivas amostras liofilizadas, após a ressuspensão em água (n=3).....	81
Figura 25 - Teor de vimpocetina nos liofilizados ressuspensos, contendo nanocápsulas, armazenados por 90 dias.....	82
Figura 26 - Relação entre a fluorescência detectada no cérebro, após perfusão, e no plasma (C/P), mediante a administração das suspensões de nanocápsulas, com ou sem vimpocetina, comparativamente aos controles (n=5-6).....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição quali-quantitativa das formulações nanoestruturadas preparadas no trabalho.....	44
Tabela 2 -	Análise da precisão.....	56
Tabela 3 -	Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas (n=3) contendo vimpocetina (0,5 mg/mL), logo após a preparação.....	57
Tabela 4 -	Distribuição de tamanho de partículas obtida através de difração a laser.....	58
Tabela 5 -	Parâmetros calculados através do modelo monoexponencial e Lei da Potência para as nanocápsulas contendo vimpocetina e solução de fármaco livre (n=3).....	75
Tabela 6 -	Diâmetros médios das nanocápsulas liofilizadas, após ressuspensão (n=3), e índices de ressuspensão com base nas suspensões de origem.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Apo	Apolipoproteína
BHE	Barreira hematoencefálica
BSC	Barreira sangue-cérebro
CLAE-UV	Cromatografia a líquido de alta eficiência; detecção na região ultravioleta
CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
cP	CentiPoise
DP	Desvio padrão
EE	Eficiência de encapsulamento
EEG	Eletroencefalografia
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
IPd	Índice de polidispersão
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
MRP	Proteína multirresistente
NCs-P80	Nanocápsulas revestidas com polissorbato 80 sem fármaco
NCs-P80/P4000	Nanocápsulas revestidas com polissorbato 80 e polietilenoglicol 4000 sem fármaco
NCs-P80/P6000	Nanocápsulas revestidas com polissorbato 80 e polietilenoglicol 6000 sem fármaco
NCs-VP-P80	Nanocápsulas revestidas com polissorbato 80 contendo vimpocetina
NCs-VP-P80/P4000	Nanocápsulas revestidas com polissorbato 80 e polietilenoglicol 4000 contendo vimpocetina
NCs-VP-P80/P6000	Nanocápsulas revestidas com polissorbato 80 e polietilenoglicol 6000 contendo vimpocetina
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
OAT	Transportador de íons orgânicos
P80	Polissorbato 80
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PEG	Polietilenoglicol
PgP	Glicoproteína P
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PTZ	Pentilenotetrazol
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VP	Vimpocetina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1	VIMPOCETINA.....	20
3.2	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	24
3.2.1	Processo de liofilização de nanopartículas.....	29
3.3	NANOESTRUTURAS CONTENDO VIMPOCETINA.....	30
3.4	POLI(ε-CAPROLACTONA) COMO POLÍMERO NA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS.....	32
3.5	LIBERAÇÃO CEREBRAL EMPREGANDO NANOPARTÍCULAS E O USO DE POLISSORBATO 80 E POLIETILENOGLICOL COMO REVESTIMENTOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	MATERIAIS.....	41
4.1.1	Matérias-primas e outros materiais.....	41
4.1.2	Equipamentos.....	42
4.1.3	Animais.....	42
4.2	MÉTODOS.....	43
4.2.1	Preparação das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina.....	43
4.2.2	Caracterização físico-química.....	44
4.2.2.1	<i>Determinação do diâmetro médio de partículas, distribuição de tamanho e potencial zeta.....</i>	44
4.2.2.2	<i>Determinação do pH.....</i>	44
4.2.2.3	<i>Determinação do teor e da eficiência de encapsulamento da vimpocetina.....</i>	45
4.2.2.3.1	Validação do método analítico por CLAE-UV para determinação do teor de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas.....	46
4.2.2.4	<i>Avaliação da viscosidade das suspensões de nanocápsulas.....</i>	47
4.2.3	Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina.....	48
4.2.4	Estudo da cinética de liberação da vimpocetina a partir das nanocápsulas em suspensão aquosa.....	49
4.2.5	Preparação de liofilizados, a partir das suspensões de nanocápsulas, caracterização das amostras e estudo de estabilidade.....	50
4.2.6	Avaliação da alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) devido à administração das nanoestruturas.....	51
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1	DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS CONTENDO VIMPOCETINA.....	54
5.1.1	Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor da vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas.....	54

5.1.2	Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina.....	57
5.2	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA.....	64
5.3	ESTUDO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO DA VIMPOCETINA A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS.....	72
5.4	AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS NANOCÁPSULAS, A PARTIR DOS LIOFILIZADOS, E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS SECOS.....	77
5.5	ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA.....	82
6	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

A vimpocetina é um derivado do alcaloide vincamina, que vem sendo utilizada por ser um fármaco sintético vasodilatador, que atua no sistema nervoso central, sendo responsável por aumentar a circulação cerebral e também vem sendo útil no tratamento de doenças como Alzheimer, acidente vascular cerebral agudo e disfunção cerebral senil (MOLNÁR; ERDÓ, 1995; XU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010). Pesquisas demonstram uma pronunciada atividade antiepilética, sendo capaz de inibir convulsões, sendo a vimpocetina utilizada em concentrações menores se comparadas com outros fármacos empregados para o mesmo fim (GÓMEZ et al., 2014; NEKRASSOV; SITGES, 2008; PEREIRA et al., 2003; SITGES et al., 2006). A vimpocetina também apresenta atividade neuroprotetora, diminuindo danos neuronais resultantes de hipóxia ou isquemia (PEREIRA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003).

Este fármaco possui baixa solubilidade em água, curta meia-vida e reduzida biodisponibilidade, principalmente devido ao intenso metabolismo pré-sistêmico (BONOCZK et al., 2000; XU et al., 2009). Para tanto, a necessidade de uma forma farmacêutica capaz de aumentar a biodisponibilidade da vimpocetina torna os sistemas nanoparticulados promissores candidatos para essa finalidade, como demonstrado nos trabalhos de Luo e colaboradores (2006) e Zhuang e colaboradores (2010). Por sua vez, micelas poliméricas proporcionaram um aumento significativo na meia-vida da vimpocetina, em relação a um produto comercial, como visto no estudo de El-Dahmy e colaboradores, em 2014, após a injeção intravenosa em coelhos.

As nanopartículas são carreadores de fármacos, que possuem diâmetro inferior a 1 μm , dentre os quais se incluem as nanocápsulas, onde uma substância ativa pode encontrar-se confinada em uma cavidade aquosa ou oleosa rodeada por uma membrana polimérica, apresentando, assim, uma estrutura típica núcleo-parede, estabilizada por tensoativos/agentes estabilizantes na interface partícula/água. O fármaco também pode distribuir-se na parede polimérica (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003a; SOPPIMATH et al., 2001).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados vem sendo aplicado tanto para fins de diagnóstico quanto terapêutico, destacando-se como importantes alternativas para a administração de substâncias ativas (DOMB et al., 2007; THASSU et al., 2007). As nanocápsulas têm sido amplamente estudadas

visando a diferentes aplicações terapêuticas, devido às vantagens que apresentam, como tamanho reduzido de partículas, capacidade de melhorar a estabilidade de diversas substâncias, de reduzir efeitos adversos e aumentar a eficácia terapêutica, além da possibilidade de o núcleo solubilizar moléculas ativas e o sistema promover controle de liberação, a qual pode ser sítio específica, contemplando diversas vias de administração (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SANTOS et al., 2014).

A seleção de matérias-primas para a constituição dos sistemas nanoparticulados é muito importante, pois parâmetros como a tensão interfacial, viscosidade e concentração podem influenciar no tamanho das estruturas formadas, e, ainda, podem afetar a capacidade de encapsulamento dos fármacos (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003a).

As nanoestruturas poliméricas têm sido muito pesquisadas também para promover a liberação cerebral de fármacos, objetivando emprego em tratamentos de doenças neurológicas, aumentando a concentração dos mesmos no cérebro e, conseqüentemente, o efeito terapêutico, quando administradas por via parenteral (KREUTER, 2014; RONEY et al., 2005).

A distribuição limitada, em função do reconhecimento que as nanopartículas sofrem pelas células do sistema retículo endotelial, é um obstáculo que os sistemas coloidais enfrentam quando injetados no organismo. Modificações de superfície nas nanopartículas têm buscado resolver essa restrição, tornando-as “invisíveis” (furtivas) frente às células do sistema retículo endotelial (MOSQUEIRA et al., 2001; RAO et al., 2004). O polissorbato 80 (P80) é um agente tensoativo não-iônico, que tem a capacidade de facilitar o transporte de nanopartículas para o interior do cérebro, sendo que os mecanismos de endocitose, inibição da bomba de efluxo mediada por glicoproteína-P (PGP) ou também fluidização de membrana, por solubilização de lipídios do endotélio celular, têm sido pesquisados para explicar esta propriedade (PRABHAKAR et al., 2013). O polietilenoglicol (PEG) evita o reconhecimento das nanoestruturas pelo sistema fagocitário mononuclear, aumentando o tempo de residência destas na circulação sistêmica (HANS; LOWMAN, 2002), podendo, assim, alcançar diversos alvos terapêuticos.

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo nanocápsulas, para veiculação de vimopocetina, por via oral (Pinheiro, 2016) ou parenteral (Rosa, 2017), empregando

etilcelulose ou policaprolactona (PCL), como polímero, e P80 como tensoativo de alto EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo), demonstrando alta eficiência de encapsulamento, capacidade de controle de liberação e atividade anticonvulsivante *in vivo* (5 mg/Kg em camundongos, via intraperitoneal), com resultados mais promissores em relação ao fármaco livre. Estudos também estão sendo desenvolvidos a fim de se obter formas farmacêuticas sólidas a partir das suspensões de nanocápsulas de etilcelulose contendo vimpocetina, como liofilizados/granulados/comprimidos, a fim de melhorar a sua aplicabilidade (BOLSON, 2015; PINHEIRO, 2016), uma vez que os sistemas coloidais líquidos tendem a apresentar estabilidade limitada em função do tempo de armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003b; WANG et al., 2012).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é desenvolver tecnologicamente suspensões de nanocápsulas poliméricas biocompatíveis e biodegradáveis contendo vimpocetina, visando à administração parenteral, tendo em vista o potencial destes sistemas coloidais na liberação cerebral. O estudo propõe a utilização de PCL como polímero, de um óleo comumente utilizado (triglicerídeos de cadeia média -TCM) como componente do núcleo e, ainda, o emprego de PEG ou P80/PEG como revestimentos. O trabalho propõe, ainda, avaliar se as nanocápsulas desenvolvidas podem ou não aumentar a permeabilidade da BHE através da abertura das junções endoteliais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) contendo vimpocetina, empregando polissorbato 80 ou a combinação polissorbato 80/polietilenoglicol como estabilizantes, bem como verificar alteração ou não na permeabilidade da BHE devido à administração das nanoestruturas em modelo animal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

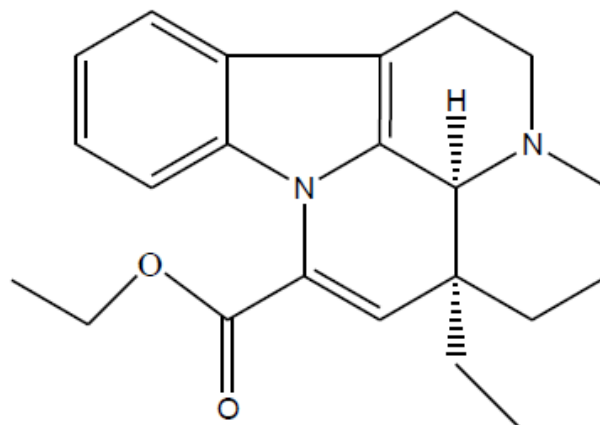
- Preparar suspensões de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo vimpocetina, utilizando PCL e P80 ou P80/PEG como estabilizadores/revestimentos dos sistemas;
 - Caracterizar as formulações coloidais quanto ao diâmetro médio de partículas, distribuição de tamanho [índice de polidispersão (IPd), span], potencial zeta, pH, teor de fármaco, eficiência de encapsulamento (EE%) e viscosidade relativa;
 - Avaliar a morfologia das nanocápsulas, empregando microscopia eletrônica de varredura, após a desidratação das suspensões por liofilização, e caracterização dos produtos secos;
 - Estudar a estabilidade das formulações mantidas em temperatura ambiente (frascos âmbar), durante três meses;
 - Avaliar a cinética de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanocápsulas desenvolvidas, em comparação ao fármaco livre;
 - Avaliar a ocorrência de alteração na permeabilidade da BHE *in vivo*, devido à administração das suspensões de nanocápsulas contendo ou não vimpocetina, empregando fluoresceína como marcador.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 VIMPOCETINA

A vimpocetina é um etil éster sintético [14-etoxicarbonil-3 α ,16 α -etil)-14,15-eburnamina] (Figura 1), produzida alterando-se ligeiramente a molécula do alcaloide vincamina, extraído da folha da *Vinca minor* (KÁRPÁTI; SZPORNÝ, 1976). Em 1978, este fármaco começou a ser comercializado na Hungria, para a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas e cognitivas, com o nome comercial de Cavinton[®], sendo, atualmente, comercializado em diversos países na forma de comprimidos orais de 5 mg, como estimulante da memória (BONOCZK et al., 2000; CAI; LI; YAN, 2013; LIN et al., 2014; MEDINA, 2010; PATYAR et al., 2011). No Brasil, a vimpocetina é comercializada como Vicog[®] (5 mg - Marjan Indústria e Comércio LTDA).

Figura 1 - Estrutura química da vimpocetina



Fonte: Próprio autor

A vimpocetina (CAS 42971-09-5) é um sólido branco solúvel em solventes orgânicos como ácido acético, dimetilsulfóxido, acetona e clorofórmio, pouco solúvel em álcoois e praticamente insolúvel em água (5 $\mu\text{g/mL}$), possui massa molar igual a 350,46 g/mol, seu pKa é de 7,31 e sua categoria terapêutica é vasodilatador cerebral (INDEX, 2006).

Segundo MOLNÁR e ERDÓ (1995), embora a vimpocetina seja um agente capaz de estimular a capacidade cognitiva, foram verificados também significativos efeitos neuroprotetores, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, devido a sua utilização. Pesquisas também demonstraram que a propriedade antioxidante, relativa à eliminação de radicais livres, é um mecanismo importante na neuroproteção (PATYAR et al., 2011). A vimpocetina tem sido estudada e revelada como um potente neuroprotetor, pois aumenta o fluxo cerebral na área isquêmica afetada em pacientes com doenças cerebrovasculares reduzindo a lesão neuronal em condições de hipóxia e isquemia, melhora a microcirculação sanguínea, diminui a agregação plaquetária, aumenta a absorção de oxigênio e a utilização de glicose pelo cérebro, previne a morte celular induzida por excitotoxinas, exibindo efeitos clínicos favoráveis em doenças como Alzheimer, isquemia vascular cerebral crônica, acidente vascular cerebral agudo e disfunção cerebral senil (BONOCZK et al., 2000; CHIU et al., 1988; JINCAI et al., 2014; MOLNÁR; ERDÓ, 1995; PEREIRA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003; XU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010).

A atividade neuroprotetora bem como alguns efeitos anticonvulsivantes, também relatados para a vimpocetina, podem estar relacionados a um mecanismo proposto para a neuroproteção, que resulta da prevenção da diminuição do gradiente eletroquímico de Na^+ e da liberação dos aminoácidos excitatórios aspartato e glutamato, que ocorre em situação de estresse oxidativo. Essas atividades também se relacionam com o bloqueio dos canais de Na^+ dependentes de voltagem e inibição indireta de processos moleculares iniciados pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular (GÓMEZ; BUIGS; SITGES, 2014; MOLNÁR; ERDÓ, 1995; PEREIRA et al., 2003).

Um estudo realizado por Ali e colaboradores (2016) avaliou a atividade neuroprotetora, analgésica e anti-inflamatória da vimpocetina, na artrite reumatoide, em comparação com a indometacina. A artrite foi induzida através do adjuvante completo de Freund, em ratos, que foram tratados com indometacina (1 ou 2 mg/Kg de peso corporal) e/ou vimpocetina (20 mg/Kg de peso corporal), durante três semanas. A vimpocetina apresentou potentes efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos, que foram iguais ou superiores aos da indometacina, fármaco usual no tratamento da artrite reumatoide. A vimpocetina também foi capaz de potencializar o efeito anti-inflamatório da indometacina, quando administradas concomitantemente,

tornando essa combinação muito promissora principalmente quando esta doença manifesta-se associada à depressão e à inflamação cerebral.

Os efeitos vasculares relacionados ao fármaco, como diminuição da agregação plaquetária, a melhora na circulação cerebral e maior fluidez dos glóbulos vermelhos, devem-se à inibição da fosfodiesterase-GMPc Ca^+ /calmodulim-dependente, induzindo o aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (BONOCZK et al., 2000; JINCAI et al., 2014; PEREIRA et al., 2003).

Mecanismos de ação antioxidante da vimpocetina estão sendo sugeridos, especialmente relacionados à capacidade de neutralizar o radical OH^\bullet , formado pela reação de Fenton (HERRERA-MUNDO; SITGES, 2013). Este fármaco pode proteger o organismo do ataque das espécies reativas de oxigênio (EROs) e da peroxidação lipídica, protegendo as estruturas e a permeabilidade das membranas biológicas de alterações que podem resultar em morte celular, através de sua capacidade de diminuir a formação de EROS, como aquelas induzidas por ascorbato/ Fe^{2+} (PEREIRA et al., 2003). RUIZ-MIYAZAWA e colaboradores, em 2015, conduziram um estudo no qual a vimpocetina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, induzido por um lipopolissacarídeo, na pele da pata de ratos, e o efeito foi observado empregando diferentes testes, como a capacidade sequestrante de radicais $\text{ABTS}^{\cdot+}$, além de ensaios de redução férrica (FRAP) e de glutathiona reduzida (GSH). O fármaco apresentou efeito na redução dos níveis, que estavam aumentados, do ânion radical superóxido, nitrito e malondialdeído (MDA). A vimpocetina também apresentou efeito antioxidante pronunciado, capaz de proteger a rigidez causada nas células, diminuindo também o vazamento do potássio das células após a utilização de metossulfato de fenazina, empregado para gerar radicais livres em amostras de suspensões de células vermelhas sanguíneas de humanos, gerando células vermelhas rígidas (HORVATH et al., 2002).

Cai e colaboradores, em 2013, realizaram um estudo onde ratos foram alimentados com dieta normal ou dieta com alto teor de colesterol por 16 semanas, e, durante este tempo, os animais receberam, via intraperitoneal, vimpocetina (5 mg/kg) ou veículo. Após esse período, a formação da lesão arterosclerótica, a pressão arterial, o nível de colesterol, o acúmulo de lipoproteína de baixa densidade oxidada (ox-LDL), entre outros parâmetros, foram analisados. Os resultados demonstraram que a vimpocetina pode, através da diminuição de receptores de ox-LDL, como o

receptor LOX-1, e da inibição da captação ox-LDL, reduzir parcialmente a deposição lipídica e a lesão causada pela aterosclerose em ratos. Neste estudo, ficou evidenciado que os animais tratados com vimpocetina apresentaram melhores resultados.

Estudos relataram também ação anticonvulsivante da vimpocetina (GÓMEZ et al., 2014; NEKRASSOV; SITGES, 2008; PATYAR et al., 2011; SITGES et al., 2006; SITGES et al., 2011; SITGES; ALDANA; REED, 2016; ROSA, 2017). Em 2004, Sitges e Nekrassov avaliaram a atividade anticonvulsivante da vimpocetina, em porcos-da-índia, induzida por 4-aminopiridina (4-AMP). Os resultados demonstraram que o fármaco foi capaz de impedir as mudanças na eletroencefalografia (EEG) dos animais, utilizando doses de 2 mg/Kg, confirmando, assim, o efeito anticonvulsivante relatado. Os mesmos autores induziram convulsões utilizando pentilenotetrazol (PTZ), também em porcos-da-índia, e avaliaram através de EEG que a vimpocetina demonstrou um potencial efeito anticonvulsivante, com doses de 2 mg/Kg (i.p) suficientes para impedir completamente as mudanças no EEG dos animais (NEKRASSOV; SITGES, 2004). A vimpocetina apresentou novamente um potente efeito antiepiléptico após ser administrada pela via intraperitoneal, em porcos-da-índia, em uma dose de 3 mg/kg, sendo capaz de apresentar efeito em doses menores comparadas com outros fármacos empregados para este fim, como a carbamazepina (NEKRASSOV; SITGES, 2008). Tem-se avaliado sua possível utilização no tratamento da epilepsia devido a essas vantagens, além de ajudar a melhorar a memória (SITGES et al., 2006).

Sitges e colaboradores, em 2011, demonstraram que a vimpocetina é capaz de inibir a liberação de glutamato induzida pelo agente convulsivante 4-AMP, reduzindo, assim, as convulsões. Também foi descrito que as convulsões foram reduzidas em uma concentração menor do que a de outros fármacos amplamente utilizados para este fim, como a carbamazepina, sugerindo que a vimpocetina poderia ser mais potente, além de reduzir a perda auditiva oriunda do uso de antiepilépticos clássicos (NEKRASSOV; SITGES, 2008; SITGES et al., 2006).

Um estudo comparativo da vimpocetina com outros antiepilépticos clássicos (carbamazepina e ácido valproico) foi conduzido, onde as expressões de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , em hipocampus de ratos, foram avaliadas, sendo que, quando estão em níveis aumentados, podem indicar epilepsia em modelos animais. As expressões de ambos os marcadores, em condições basais, foram reduzidas quando a carbamazepina e a vimpocetina foram empregadas,

diferentemente do ácido valproico que não obteve resultados satisfatórios. Assim, os pesquisadores concluíram que a carbamazepina e a vimpocetina possuem efeitos anti-inflamatórios cerebrais eficazes na prevenção de crises epiléticas (GÓMEZ; BUIJS, SITGES, 2014).

Antiepilépticos usuais (levetiracetam, carbamazepina, fenitoína, valproato, lamotrigina, oxcarbamazepina, topiramato), a vimpocetina e o antidepressivo sertralina foram testados, em hipocampus isolados de ratos, quanto à capacidade de aumentar o Ca^{2+} induzido por 4-AMP. O aumento de Ca^{2+} foi inibido seletivamente pela sertralina e vimpocetina, efeito também visto para os demais anticonvulsivantes. No entanto, essa atividade não foi observada para o levetiracetam, ácido valproico e topiramato (SITGES; CHIU; REED, 2015).

Apesar das vantagens da vimpocetina, a mesma possui baixa solubilidade em água, apresenta reduzida biodisponibilidade oral (~6,7% em jejum), além de curta meia-vida (cerca de duas horas), extenso metabolismo de primeira passagem, transformando-se em seu principal metabólito (ácido apovincamínico), e apresenta, ainda, lenta dissolução no trato intestinal, impactando negativamente em seu uso clínico (BONOCZK et al., 2000; GRANDT et al., 1989; KATA; LUCÁCS, 1986; XU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010). Para superar essas dificuldades, várias tentativas têm sido feitas, como a formação de sais de vimpocetina com citrato e fosfato (CALVO; MANRESA, 1988), sua complexação com ciclodextrinas (RIBEIRO et al., 2005), associação a nanopartículas lipídicas sólidas (NLS; LUO et al., 2006), prolipossomas (XU et al., 2009), carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN; ZHUANG et al., 2010) ou micelas poliméricas (EL-DAHMY et al., 2014).

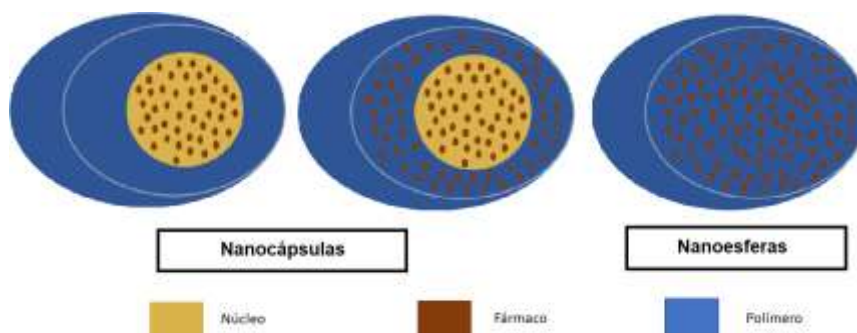
3.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A nanociência estuda as propriedades dos materiais na escala do nanômetro, e a nanotecnologia é o emprego deste conhecimento para a obtenção e controle de nanomateriais com objetivos práticos e/ou comerciais (SOPPIMATH et al., 2001; TOMA; ARAKI, 2005). Dentre os sistemas carreadores de fármacos descritos na literatura, os sistemas nanoparticulados poliméricos têm atraído interesse na aplicação medicinal por serem altamente promissores no desenvolvimento e no aperfeiçoamento de produtos destinados à saúde e são, ainda, uma alternativa para

superar desvantagens que restringem o uso clínico de moléculas ativas (DIMER et al., 2013; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

As nanopartículas poliméricas podem ser definidas como dispersões de partículas sólidas com um tamanho na gama de 10 a 1000 nm. A substância ativa é dissolvida, aprisionada, encapsulada ou retida em uma matriz ou núcleo (BHOKARE et al., 2015; COUVREUR et al., 2002). Conforme a composição e o método utilizado para a preparação, pode-se obter nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas, também descritas como nanovesículas (Figura 2), são sistemas constituídos por um núcleo oleoso ou aquoso envolto por uma camada de polímero, sendo que o fármaco pode estar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas são sistemas matriciais, não havendo núcleo na sua constituição (COUVREUR et al., 1991, FRANK et al., 2015; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Dentre as vantagens, estão o controle de liberação do fármaco, direcionamento até o local de ação, manipulação do tamanho e controle de superfície das partículas, favorecendo a administração parenteral, melhoria da estabilidade química e biológica, possibilidade de incorporação de substâncias tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, além da capacidade de serem administradas por várias vias como oral, pulmonar, parenteral, oftálmica e tópica. Nanopartículas poliméricas, em geral, são mais estáveis em fluidos biológicos quando comparadas com outros sistemas nanométricos (ALVES et al., 2005; BHOKARE et al., 2015; MASSERINI, 2013; RONEY et al., 2005).

Figura 2 - Representação esquemática de nanopartículas poliméricas



Fonte: Próprio autor

As nanocápsulas são constituídas, geralmente, por uma substância ativa de interesse no encapsulamento, um óleo, um polímero, e um ou dois tensoativos (de

alta e baixa hidrofília), que são importantes para a estabilização dos sistemas formados, prevenindo ou retardando a aglomeração das partículas.

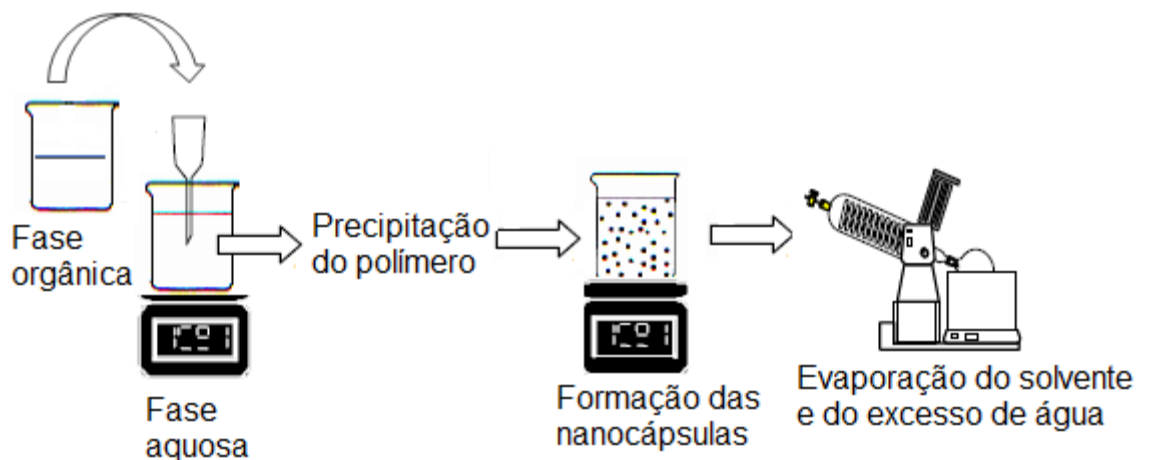
Diferentes polímeros vêm sendo utilizados na preparação de nanocápsulas, como sintéticos [poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(cianoacrilato de alquila) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL)], de origem natural (quitosana, albumina e gelatina) ou semissintética, como a etilcelulose (BOLSON, 2015; COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; NOGUEIRA et al., 2016; WILSON et al., 2014). Para a administração oral, o polímero deve ser obrigatoriamente biocompatível e, para as vias parenterais, deve ser também biodegradável (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; RONEY et al., 2005).

A escolha do núcleo oleoso tem grande importância no desenvolvimento de nanocápsulas, pois pode interferir no tamanho e na capacidade de encapsulamento da substância ativa, dependendo de suas propriedades como viscosidade, concentração e tensão interfacial. Para a escolha do óleo, deve-se levar em consideração a ausência de toxicidade, boa capacidade de dissolução da substância ativa a ser encapsulada, e, ainda, o óleo não pode solubilizar o polímero formador das partículas. O TCM tem uma grande capacidade de solubilizar fármacos e é usualmente utilizado na preparação de sistemas nanoparticulados (BADEA et al., 2015; COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS et al., 2012; SANTOS et al., 2014; SCHAFFAZICK et al., 2003a).

Quanto aos métodos de preparação das nanocápsulas, podem ser baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados. O método baseado em deslocamento de solvente (*self-assembly*), também conhecido como nanoprecipitação (nanopartículas/nanoesferas) ou deposição interfacial de polímero pré-formado (para nanocápsulas), fundamenta-se em uma fase orgânica, contendo um solvente miscível em água, um polímero (natureza sintética, semissintética ou natural), um óleo (nanocápsulas), a substância ativa e um tensoativo de baixo equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL; opcional), além de uma fase aquosa, constituída por água e um tensoativo de alto EHL. A fase orgânica é vertida na fase aquosa, assim, o polímero, insolúvel na fase aquosa e no óleo, precipita na interface e, por fim, o solvente orgânico é evaporado sob pressão reduzida para ajuste final da concentração do fármaco (figura 3). A formação das nanocápsulas ocorre instantaneamente no momento em que a fase orgânica é vertida, através de

um funil, sobre a aquosa. Este método apresenta como vantagens a simplicidade, diâmetros de partículas de aproximadamente 200 nm, a possibilidade de obtenção de monodispersão do sistema e a ausência de monômeros residuais (COUVREUR et al., 2002; FESSI et al., 1989; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Os produtos originais, independentemente do método utilizado, são suspensões coloidais aquosas, que podem ser administradas por via oral ou parenteral, ou, ainda, incorporadas em formas farmacêuticas semissólidas (SCHAFFAZICK et al, 2003a). As suspensões também podem ser transformadas em formas farmacêuticas sólidas como pós, através de processo de desidratação, como a liofilização (RIBEIRO et al., 2016; SCHAFFAZICK et al., 2003) ou secagem por aspersão/*spray-drying* (RIBEIRO et al., 2016) ou até mesmo incorporadas em comprimidos (FRIEDRICH et al., 2010; PINHEIO, 2016).

Figura 3 - Representação esquemática do método de deposição interfacial de polímero pré-formado.



Fonte: Próprio autor

Devido à complexidade dos sistemas coloidais, inúmeras técnicas de caracterização físico-química são necessárias para avaliar estes sistemas, pois verificam a adequação dos mesmos às aplicações delineadas. A avaliação macroscópica das suspensões é realizada através da observação do fluido branco opaco, com um reflexo azulado (efeito Tyndall), e a avaliação morfológica pode ser feita através de microscopia eletrônica, onde as nanocápsulas apresentam geralmente forma esférica (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN,

2007). O tamanho médio de partículas pode ser determinado por espalhamento de luz dinâmico/espectroscopia de correlação de fótons, detectando o raio hidrodinâmico das partículas através do movimento browniano das mesmas na suspensão coloidal aquosa. Para avaliações mais eficientes quanto à possível presença de partículas maiores, é possível fazer uma análise granulométrica dos sistemas por difração a laser (BOOTZ et al., 2004; COUVREUR et al., 2002). O IPd também pode ser determinado por espectroscopia de correlação de fótons e o span por difração a laser, esses parâmetros demonstram a homogeneidade do sistema, ou seja, quanto menor o valor, menor a variação de tamanho encontrada. O potencial zeta, determinado por técnicas de eletroforese, reflete o potencial elétrico de superfície das partículas, sendo que este parâmetro é influenciado pelos diferentes componentes das nanocápsulas, como o polímero e os tensoativos utilizados e pelo pH do meio. Quanto maior o valor do potencial zeta, em módulo, melhor tende a ser a estabilidade do sistema, já que reduz a tendência à agregação. Porém, um valor de potencial zeta baixo pode não indicar uma baixa estabilidade, pois existem outros mecanismos de estabilização, como a estérica (CORANDINI et al., 2014; COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003a).

O pH é um critério importante para avaliação físico-química das suspensões, visto que alterações em seus valores podem estar associados à degradação do polímero ou de outros componentes da formulação, sendo, portanto, uma avaliação útil no monitoramento da estabilidade dos produtos obtidos (GUTERRES et al., 1995).

A eficiência de encapsulamento (EE) descreve o percentual de fármaco presente no interior/superfície das nanoestruturas em relação ao total de fármaco adicionado para a preparação das mesmas. A avaliação desse parâmetro é fundamental e a técnica mais comumente utilizada para a separação do fármaco livre do associado é a ultrafiltração-centrifugação, a qual utiliza uma membrana para a separação entre a fase aquosa dispersante e as estruturas coloidais, sendo que a fração livre do fármaco é determinada no ultrafiltrado. Por fim, a eficiência de encapsulamento é calculada através da diferença entre o teor total de fármaco existente na suspensão e a concentração de fármaco livre no sistema (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al, 2003a).

A avaliação da cinética de liberação da substância ativa presente nos sistemas nanoestruturados é muito importante, sendo que o método mais utilizado para essa análise é o de difusão em sacos de diálise convencional, onde o fármaco liberado das

nanoestruturas difunde através de uma membrana de diálise para o compartimento exterior. Ressalta-se que as nanoestruturas apresentam tamanho reduzido e, assim, uma grande área superficial de contato, neste sentido, as propriedades químicas, físicas e biológicas das formulações acabam sendo alteradas, fato que pode modificar a farmacocinética e farmacodinâmica da substância ativa encapsulada (SOUZA, 2014). Diferentes estudos já demonstraram que nanopartículas podem melhorar a absorção de fármacos através de barreiras biológicas, como intestinal ou mesmo a BHE, inclusive podendo liberá-los em locais específicos (LEYVA-GÓMEZ, et al., 2014), além de proporcionar liberação lenta e gradual, ou seja, controlada da substância ativa associada (RIBEIRO et al., 2016; RIGO et al., 2014; SANTOS et al., 2014).

3.2.1 Processo de liofilização de nanopartículas

A liofilização é uma operação de desidratação envolvendo congelamento seguido da sublimação do gelo, sob vácuo, que consiste na passagem da água do estado sólido diretamente ao de vapor. A liofilização pode auxiliar na estabilização das nanopartículas e, na literatura, são encontradas várias formas de congelamento, o qual é considerado o ponto mais crítico do processo (ALI; LAMPRECHT, 2014; BOLSON, 2015; BAZYLINSKA et al., 2014; DADPARVAR et al., 2014), tais como armazenamento em freezer a -20 °C (SCHAFFAZICK et. al., 2003b), -45 °C (ABDELWAHED et al., 2006) e -70 °C ou em nitrogênio líquido a -196 °C (CHACON et al., 1999).

A agregação de nanoestruturas pode ocorrer após a liofilização, em função do maior contato entre elas durante o congelamento (estado sólido), e, em alguns casos, pode ocorrer a fusão das mesmas. Desestruturações/modificações na morfologia dos coloides podem ocorrer devido às baixas temperaturas empregadas para o congelamento, sendo que a formação de cristais de gelo pode provocar um estresse mecânico nas partículas. A adição de adjuvantes ou crioprotetores na formulação a ser liofilizada é, na maioria das vezes, necessária para evitar que as baixas temperaturas possam alterar as propriedades físico-químicas das partículas (ABDELWAHED et al., 2006; ALI; LAMPRECHT, 2014).

Os açúcares são os crioprotetores mais comuns encontrados na literatura, entre eles destaca-se a trealose, lactose, glicose, sacarose e o manitol (ALI;

LAMPRECHT, 2014; DADPARVAR et al., 2014; HIRSJÄRVI; PELTONEN; HIRVONEN, 2009; KONAN et al., 2002; SAEZ et al., 2000). As concentrações de crioprotetor podem variar de 2% até 30% (p/v), conforme a composição da formulação (BAZYLINSKA et al., 2014; BOLSON, 2015; STRICKLEY, 2004).

Dadparvar e colaboradores (2014) desenvolveram nanopartículas de albumina HI-6 que foram, posteriormente, liofilizadas utilizando como crioprotetores manitol, sacarose ou trealose (1%, 2% e 3% p/v). Após o processo de liofilização, o tamanho das partículas aumentou, independentemente do tipo e da concentração de crioprotetor utilizado. Para o estudo de estabilidade, foi escolhida a formulação que utilizou trealose (3% p/v), a qual foi armazenada (-20 °C, 4 °C, 20 °C e 40 °C) durante 3 meses. Observou-se que o tamanho de partículas não diferiu significativamente nas temperaturas de -20 °C, 4 °C e 20 °C, enquanto que, para a temperatura de 40 °C, ocorreu aglomeração das partículas, aumentando o tamanho significativamente. Em relação ao teor durante o armazenamento, verificou-se que, na temperatura de -20 °C, não houve degradação significativa, enquanto que, para as outras temperaturas, o teor decresceu significativamente ao final do estudo.

Santos e colaboradores (2014) desenvolveram suspensões de nanocápsulas contendo clotrimazol, utilizando o polímero catiônico Eudragit® RS 100 e óleo de coco como núcleo, com objetivo de avaliar o potencial das formulações frente à candidíase vaginal. Para a avaliação da morfologia das nanocápsulas, empregando microscopia eletrônica de varredura, procedeu-se à liofilização prévia das formulações, utilizado o crioprotetor trealose, sendo, então, possível observar a presença de nanoestruturas esféricas nas amostras.

3.3 NANOESTRUTURAS CONTENDO VIMPOCETINA

NLS contendo vimpocetina foram preparadas com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco. Foram avaliadas as características físico-químicas, onde se obteve potencial zeta de -17 mV a -40 mV, tamanho médio de partículas de 70 a 200 nm e eficiência de encapsulamento de 97% a 99%. Após seis meses e um ano de armazenamento a 4 °C, as formulações selecionadas mantiveram-se estáveis com uma redução mínima (~2%) na eficiência de encapsulamento. As nanopartículas proporcionaram uma melhora significativa na biodisponibilidade da

vimpocetina, em comparação ao fármaco livre, após analisado o perfil farmacocinético em ratos Wistar (LUO et al., 2006).

Sistemas baseados em prolipossomas foram desenvolvidos e apresentaram tamanho médio de partículas de 300 nm e eficiência de encapsulamento de 86,3% para vimpocetina, cuja biodisponibilidade oral foi aumentada devido a essa associação, em coelhos (XU et al., 2009).

Zhuang e colaboradores, em 2010, descreveram CLN com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade oral da vimpocetina. Através do método de homogeneização à alta pressão, o fármaco foi incorporado aos carreadores, os quais apresentaram tamanho médio de partículas de 107 a 177 nm, eficiência de encapsulamento de 83% a 95%, de acordo com o lipídio utilizado, e potencial zeta de -13 mV a -25 mV, dependendo do tensoativo. Quanto à morfologia, analisada por microscopia eletrônica de transmissão, as partículas mostraram-se esféricas. A vimpocetina apresentou um perfil de liberação sustentado, ficando retida ao sistema, sem efeito *burst* (pH 6,8). O estudo de farmacocinética *in vivo* mostrou que a biodisponibilidade relativa da formulação foi de 322% em comparação com uma suspensão controle (suspensão de vimpocetina preparada pela dispersão de comprimidos comerciais em uma solução de 0,5% de carboximetilcelulose sódica), em ratos Wistar, após administração oral. Este estudo pôde demonstrar que o veículo lipídico nanoestruturado seria uma opção em potencial para aumentar a biodisponibilidade oral do fármaco.

Um estudo, conduzido por El-Dahmy e colaboradores (2014), descreveu a incorporação da vimpocetina em micelas poliméricas, utilizando copolímeros de diferentes EHL, objetivando o aumento médio *in vivo* de permanência do fármaco após a administração intravenosa. A formulação otimizada apresentou tamanho médio de partículas de 161,50 nm, IPD de 0,21, potencial zeta negativo (-22,42 mV) e eficiência de encapsulamento de 50,74 %. Os processos de liofilização, utilizando manitol, e de esterilização também se mostraram favoráveis, não afetando as características das formulações originais. Quando realizados testes *in vivo* (em coelhos), a formulação gerou valor de meia-vida/tempo médio de residência da vimpocetina mais elevado em comparação a um produto comercial.

Em um estudo realizado por Bolson (2015), foram preparadas nanocápsulas com vimpocetina (1 mg/mL) pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, utilizando etilcelulose como polímero e óleo de coco ou TCM, para compor

o núcleo oleoso. As nanocápsulas apresentaram elevada eficiência de encapsulamento (próximo a 100%), potencial zeta negativo (entre -18 e -24 mV), IPd menor que 0,2 e diâmetro inferior a 200 nm. Esses sistemas também foram capazes de controlar a liberação da vimpocetina, *in vitro*, sendo a velocidade e o mecanismo de liberação influenciados pelo tipo de óleo/peso molecular do polímero. Outro estudo utilizando nanocápsulas de etilcelulose contendo vimpocetina (3 mg/mL) foi realizado, em que as partículas apresentaram tamanho adequado (138 a 157 nm), baixo IPd, e elevada eficiência de encapsulamento. Esses sistemas foram empregados como líquido de granulação para desenvolver granulados, que apresentaram características físico-químicas e tecnológicas adequadas, os quais foram empregados para a preparação de comprimidos de 2,5 mg de vimpocetina. Esses sistemas foram capazes de controlar a liberação desse fármaco (PINHEIRO, 2016).

Rosa, em 2017, desenvolveu suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina (0,5 mg/mL), utilizando PCL como polímero e TCM ou óleo de abacate como núcleo, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. As partículas apresentaram tamanho nanométrico (200 a 2011 nm), IPd de 0,12 a 0,13, potencial zeta negativo, teor próximo a 95% e elevada eficiência de encapsulamento. As nanocápsulas desenvolvidas demonstraram controlar a liberação do fármaco e as suspensões produzidas com TCM apresentaram efeito antioxidante superior à do fármaco livre, pelo método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi realizado, ainda, um estudo em modelo animal de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ), e os resultados demonstraram que as suspensões produzidas com TCM foram capazes de melhorar o efeito anticonvulsivante do fármaco livre, na dose de 5 mg/kg, quando administradas intraperitonealmente 30 minutos antes da injeção de PTZ.

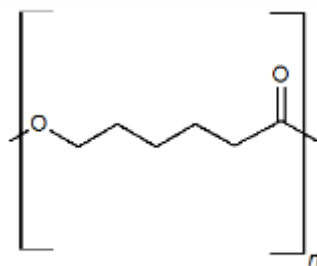
3.4 POLI(ε-CAPROLACTONA) COMO POLÍMERO NA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

O polímero PCL (Figura 4) é um poliéster alifático, semicristalino, biocompatível, biodegradável e não tóxico, que possui lenta degradação e elevada permeabilidade para muitos fármacos, sendo adequado para quando se deseja uma liberação prolongada da substância ativa (BEHERA et al., 2012; SINHA et al., 2004). Ele é degradado por hidrólise de suas ligações éster em condições fisiológicas e,

devido a isto, recebeu uma grande atenção para o seu uso em sistemas de liberação de fármacos (KUMARI et al., 2010). Vários estudos de nanopartículas desenvolvidas com PCL, para liberação cerebral, podem ser encontrados na literatura (BENVEGNÚ et al., 2012; KANAZAWA et al., 2011; LIU et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016; VIEIRA et al., 2016; XIN et al., 2011).

Considerando o ponto de vista farmacêutico, suspensões de nanocápsulas de PCL são formulações versáteis, uma vez que estudos vêm demonstrando sua utilização tanto na forma líquida, quanto incorporadas em formas de dosagem semissólidas, como hidrogéis, além de pós, grânulos e comprimidos, os quais foram viáveis e a sua estrutura tende a permanecer intacta, independentemente da técnica utilizada para secagem. Dentre as principais vantagens que têm sido apontadas, para utilização de nanocápsulas de PCL, estão a redução de efeitos colaterais, distribuição mais seletiva nos tecidos e melhores respostas farmacológicas, em comparação ao fármaco livre. Além disso, as nanocápsulas de PCL podem liberar substâncias ativas através das barreiras biológicas, tais como a BHE, proporcionando direcionamento para o cérebro. Estudos relativos à segurança de nanocápsulas com PCL foram publicados, mostrando resultados promissores (POHLMANN et al., 2013).

Figura 4 - Estrutura química do polímero PCL



Fonte: Próprio autor

3.5 LIBERAÇÃO CEREBRAL EMPREGANDO NANOPARTÍCULAS E O USO DE POLISSORBATO 80 E POLIETILENOGLICOL COMO REVESTIMENTOS

A barreira hematoencefálica (BHE) ou barreira sangue-cérebro (BSC) “separa” o sangue circulante dos líquidos cefalorraquidiano e intersticial cerebral, não permite

a passagem de algumas macromoléculas, que normalmente circulam por outros órgãos e tecidos corporais, e protege o cérebro de toxinas, bactérias e vírus. Essa barreira, em geral, é altamente permeável à água, ao dióxido de carbono, ao oxigênio e à maioria das substâncias lipossolúveis, sendo ligeiramente permeável aos eletrólitos e quase totalmente impermeável às proteínas e às macromoléculas orgânicas não lipossolúveis, o que dificulta a obtenção de concentrações eficazes de muitos fármacos no sistema nervoso central (SNC) (GUYTON; HALL, 1996; REIMOLD et al., 2008). A vimpocetina, fármaco em estudo neste trabalho, já demonstrou atravessar a BHE após administração intravenosa, atingindo o SNC (BORNOCZK et al., 2000).

A BHE é formada por células endoteliais dos capilares cerebrais, astrócitos, perócitos, micróglia e neurônios, com distância de aproximadamente 20 nm entre elas (MERTSCH; MAAS, 2002). Essas células são unidas por junções que possuem sistemas de transporte de fármacos, nutrientes endógenos e produtos do metabolismo. Esses transportes podem ser sistemas mediados por carreadores, por lipídios e também por transcitose (CORNFORD, 1999). Outros fatores podem influenciar na passagem de fármacos pela BHE, como a presença de uma membrana basal contendo perócitos, que ajudam na função de defesa e, na superfície mais externa da base membranosa, astrócitos que secretam um fator de crescimento solúvel que estabelece e mantém o fenótipo das células endoteliais cerebrais e a resistência elétrica extremamente alta do endotélio (FRICKER; MILLER, 2004). Outro processo importante, envolvido na passagem através da BHE, é a presença de transportadores que podem gerar o processo de efluxo de substâncias/fármacos, como a glicoproteína P (PGP) e a proteína multirresistente (MRP) (MERTSCH; MAAS, 2002).

Para promover a liberação de fármacos no cérebro, aumentando a concentração e o efeito terapêutico, foram desenvolvidos diversos tipos de nanoestruturas, como nanopartículas poliméricas (KREUTER, 2014), nanoemulsões (TAN et al., 2016), NLS (LEYVA-GÓMEZ et al., 2014; NAIR et al., 2012), entre outros.

NLS contendo quitosana e carbamazepina, utilizando P80 como tensoativo, foram desenvolvidas por Nair e colaboradores (2012), com o objetivo de melhorar o efeito terapêutico do fármaco em crises convulsivas. As formulações apresentaram diâmetro inferior a 200 nm, e o fármaco associado às nanopartículas demonstrou aumento na latência para iniciar as crises convulsivas, quando comparado à

carbamazepina livre e ao controle (administrados via oral), sugerindo, assim, que esses sistemas seriam adequados para o tratamento de convulsões.

Diferentes sistemas coloidais foram desenvolvidos contendo clonazepam (NLS e micelas poliméricas), para auxiliar no tratamento da epilepsia. Foi avaliado o potencial anticonvulsivante *in vivo* (via oral e/ou i.p; ratos), além da permeabilidade *in vitro* da BHE, em linhagens de células humanas endoteliais cerebrais (hCMEC/D3). As formulações apresentaram diâmetros submicrométricos [16,5 nm (micelas) e 332 nm (NLS)] e potencial zeta negativo. O potencial anticonvulsivante foi avaliado através de eletroencefalografia (EEG) e estudos comportamentais, sendo que as convulsões foram induzidas por PTZ e o tratamento realizado após 30 min. O efeito anticonvulsivante do fármaco aumentou quando associado às NLS, porém, não ocorreu o mesmo com a associação às micelas poliméricas. Quanto à permeabilidade do fármaco à BHE, ela diminuiu quando as micelas foram empregadas e aumentou na presença de NLS (LEYVA-GÓMEZ et al., 2014).

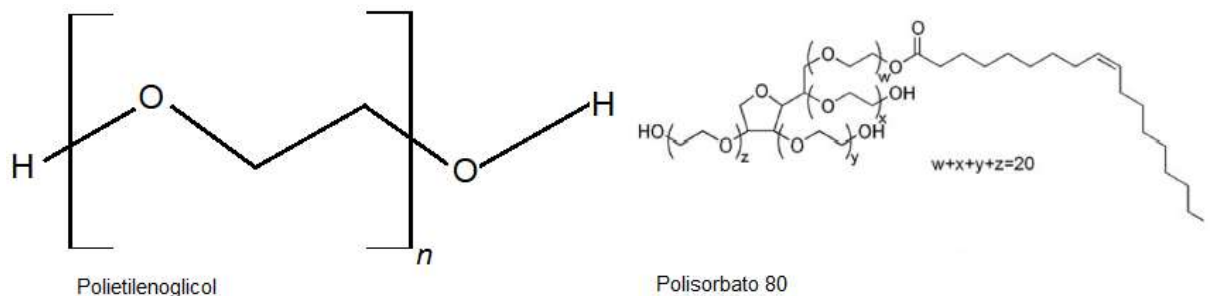
Nanopartículas de PLGA contendo oxcarbamazepina, um fármaco capaz de atravessar a barreira placentária, sem apresentar malformação congênita nos fetos, foram desenvolvidas, para avaliar a permeabilidade das formulações utilizando modelos *in vitro* de membranas [células hCMEC/D3 para BHE e trofoblastos da placenta humana (células BeWo) para barreira placentária]. As partículas apresentaram tamanhos entre 140 e 170 nm, com potencial zeta negativo e elevada eficiência de encapsulamento. O marcador cumarina-6 foi utilizado no estudo, demonstrando que a permeabilidade do fármaco livre e a do ativo nanoencapsulado apresentaram-se semelhantes, entretanto, a liberação foi controlada no caso das nanopartículas (LOPALCO et al., 2015).

Gayosso, Moreno e colaboradores (2015) desenvolveram lipossomas contendo nimodipino para liberação cerebral, com a intenção de avaliar a atividade anticonvulsivante induzida por pilocarpina em ratos (via i.p/após 30 mim). Os lipossomas contendo o fármaco apresentaram efeito antiepiléptico superior ao do nimodipino livre, além de reduzir a toxicidade deste nos animais.

As propriedades de superfície das nanopartículas desempenham um papel importante na liberação cerebral de substâncias ativas (KREUTER, 2014). O P80 é descrito como um tensoativo não-iônico (fig 5), usado como material de revestimento/estabilizante de sistemas carreadores, que se mostrou eficiente no direcionamento ao SNC (GARCIA-GARCIA et al., 2005; GULYAEV et al., 1999;

WEISS et al., 2008). Ele está presente na interface partículas/água das nanoestruturas, podendo auxiliar na vetorização até o sítio de ação, como demonstrado por alguns estudos, onde nanopartículas revestidas com este tensoativo melhoraram a liberação cerebral de fármacos e, conseqüentemente, o efeito desejado (KREUTER, 2014; WILSON et al., 2014; YUSUF et al., 2012). O P80 poderia atuar como uma âncora para apolipoproteínas (Apo), principalmente as dos tipos A (A-I), B e E, e essas interagiriam com receptores endoteliais localizados nos capilares do cérebro. A Apo A-I interage com receptor classe B tipo I (SR-BI), já a Apo B e E interagem com os receptores de LDL (RLP1), sendo que a interação com estes receptores poderia promover endocitose e transcitose de nanopartículas através das células endoteliais, ocasionando a passagem dessas através da BHE e, assim, a difusão do fármaco associado para o cérebro (KREUTER, 2014). Outros mecanismos descritos seriam a difusão passiva e a fluidização da membrana através da solubilização dos lipídios presentes na barreira (JAIN et al., 2014).

Figura 5 - Estrutura química do polietilenoglicol e do polissorbato 80



Fonte: Próprio autor (Polietilenoglicol) e Obradovic e Posa, 2017 (polissorbato 80)

Neste sentido, vários mecanismos têm sido sugeridos e estudados para explicar o aumento da liberação cerebral de moléculas ativas, a partir de nanopartículas, incluindo, segundo Kreuter (2014): I) a retenção das nanoestruturas nos capilares cerebrais, gerando aumento do gradiente de concentração e, assim, promovendo o transporte do fármaco; II) geração de um possível efeito tóxico na vasculatura cerebral; III) inibição do efluxo, por exemplo, mediado pela glicoproteína P, em função do tensoativo do sistema (como P80); IV) os tensoativos presentes no sistema poderiam aumentar a permeabilidade da BHE a fármacos, em função da

solubilização das células endoteliais; V) as nanoestruturas poderiam promover a abertura das junções entre as células endoteliais, e a passagem das mesmas através do endotélio poderia ocorrer; VI) outro mecanismo, bem aceito, atualmente, seria baseado na endocitose das nanopartículas mediada por receptores de macromoléculas das células endoteliais dos capilares cerebrais, em seguida, ocorreria a transição desses colóides; É possível também ocorrer a combinação de mecanismos.

Um estudo realizado por Rodrigues e colaboradores, em 2016, teve como objetivo a produção de nanocápsulas de núcleo lipídico, contendo indometacina, estabilizadas com P80, a fim de verificar a permeabilidade da BHE, após administração intravenosa ou oral da formulação. Os pesquisadores sintetizaram um conjugado do polímero/B-Rodamina e utilizaram fluoresceína como marcador. Um modelo de glioblastoma foi utilizado para determinar o impacto do uso das nanocápsulas como um mediador de transporte. Os resultados demonstraram que as nanocápsulas foram excelentes sistemas de vetorização, sem desestruturação da BHE e com resultado favorável frente ao glioblastoma. O mecanismo sugerido seria que a indometacina poderia regular genes e/ou proteínas que participam da apoptose, ciclo celular, supressão tumoral e invasividade, para isso, ela precisaria atingir as células tumorais, sendo que as nanopartículas poderiam regular esse transporte, promovendo a eficácia do medicamento.

Ressalta-se que as nanocápsulas de núcleo lipídico são sistemas coloidais vesiculares constituídos por uma dispersão de monoestearato de sorbitano em triglicerídeos de cadeia média como núcleo, uma parede polimérica formada de PCL e, ainda, P80, formando micelas estabilizadoras do sistema (RODRIGUES et al, 2016). A administração intraperitoneal desses sistemas foi usada com sucesso para tratar glioblastoma (BERNARDI et al, 2009), doença de Alzheimer (FROZZA et al, 2013) e esquizofrenia (DIMER et al, 2014; DIMER et al, 2015).

Yusuf e colaboradores (2012) avaliaram a atividade anticonvulsivante de nanopartículas poliméricas contendo o antioxidante β -caroteno, revestidas ou não com P80, utilizando PLGA como polímero. As formulações apresentaram tamanho médio de partículas menor que 200 nm, potencial zeta negativo, IPd inferior a 0,5 e eficiência de encapsulamento de 83%. Os testes *in vivo*, realizados em camundongos, permitiram observar o efeito anticonvulsivante das nanopartículas, administradas via

i.p, sendo este potencializado com o revestimento, demonstrando uma vetorização cerebral bem sucedida do β -caroteno.

Wilson e colaboradores, em 2014, desenvolveram nanopartículas de albumina, contendo gabapentina, com diâmetro médio de 141 nm e potencial zeta negativo. As nanopartículas foram avaliadas *in vivo*, com administração intraperitoneal, resultando em aumento na concentração de fármaco no cérebro em relação ao fármaco livre, resultados ainda melhores foram observados com as nanopartículas revestidas com P80.

Por sua vez, o PEG é formado através da polimerização de cadeias de etileno com água, que apresenta uma fórmula estrutural $H(OCH_2CH_2)_nOH$, onde o n pode variar de 4 a 180 e, assim, apresentar pesos moleculares que variam de 190 a 7.000 (HANS; LOWMAN, 2002). Sua estrutura química está representada na Figura 5.

O PEG é utilizado em um processo chamado peguilação, que foi desenvolvido e estudado a partir de 1970, por Abuchowsky e colaboradores. Este processo consiste na ligação covalente de substâncias ativas ou de nanoestruturas às cadeias poliméricas de PEG, que tanto podem ser lineares como ramificadas, resultando na diminuição da hidrofobicidade da superfície do complexo formado (OWENS; PEPPAS, 2006). O PEG dificulta o reconhecimento das nanoestruturas pelo sistema fagocitário mononuclear, aumentando o tempo de residência destas na circulação sistêmica (HANS; LOWMAN, 2002). O mecanismo pelo qual o PEG obtém esses resultados é através da proteção estérica que confere aos sistemas coloidais. As cadeias de PEG na superfície das nanopartículas são flexíveis, organizando-se em conformação de nuvem, que evita a interação de outros componentes com a superfície das partículas. Isso evita a opsonização, diminuindo a adsorção de proteínas à superfície das nanopartículas e o conseqüente processo de fagocitose das mesmas (OWENS; PEPPAS, 2006).

Em um estudo publicado, foi avaliada a relação entre as características físico-químicas das nanocápsulas de poli(ácido láctico) revestidas com PEG e ativação do sistema complemento avaliado em função da clivagem do componente do sistema complemento C3, além da captação dos sistemas coloidais por macrófagos (células da linhagem J774A1). Os resultados revelaram que a presença de PEG diminui a ativação do sistema complemento e o conseqüente *clearance* plasmático por parte das células do sistema retículo endotelial. Esses resultados mostraram-se

proporcionais ao tamanho da cadeia de PEG e a sua concentração na formulação (TOSI et al., 2008).

Em um trabalho objetivando direcionar as nanopartículas para o SNC, foram comparadas NP de poli(metoxi-poli(etilenoglicol) cianoacrilato-co-n-hexadecil cianoacrilato) com NP de poli(hexadecil cianoacrilato), onde as contendo PEG foram capazes de vetorizar para o cérebro, enquanto que as sem o PEG não se direcionaram para o mesmo. Estudos foram feitos para determinar qual o mecanismo de transporte pelas células endoteliais no cérebro do rato e foi constatado que este transporte foi mediado pelos receptores LDL, resultando na penetração paracelular, das nanopartículas com superfície modificada pelo PEG (PATEL et al., 2009).

Nanocápsulas de PCL revestidas com P80, quitosana ou PEG contendo clozapina, fármaco muito utilizado na esquizofrenia, foram desenvolvidas e testadas frente a crises psicóticas induzidas por D,L-anfetamina em ratos. O efeito antipsicótico aumentou com a administração de todas as nanocápsulas revestidas avaliadas em comparação com a substância ativa livre, em especial, as partículas revestidas com PEG e quitosana apresentaram uma duração de ação aumentada em comparação com aquelas revestidas com P80 (VIEIRA et al., 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas e outros materiais

- Acetona – Química Moderna (Barueri, SP, Brasil);
- Ácido tricloroacético - Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Água destilada;
- Água ultrapura – Mega Purity Water Purification;
- Cetamina – Syntec (Santana de Parnaíba, SP);
- Dispositivo de ultrafiltração-centrifugação (Amicon[®] Ultra, 0,5 mL; Ultracel 10 K –membrana de celulose regenerada; 10,000 MWCO; Millipore);
- Etanol – (Neon, São Paulo, SP, Brasil);
- Fluoresceína sódica (Sigma Aldrich; São Paulo, SP, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico – Êxodo Científica (Hortolândia, SP, Brasil);
- Funil de Büchner;
- Hidróxido de Sódio (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil);
- Membranas hidrofílicas (nylon; 0,45 µm; Sartorius – EUA; diâmetro de 13 mm ou 47 mm);
- Membrana de celulose para sacos de diálise, 10 mm (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich, MO, USA);
- Metanol grau HPLC – Merck (Alemanha);
- Metanol UV/HPLC - Dinâmica (Diadema, SP, Brasil);
- Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) – Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Papel filtro qualitativo, gramatura: 80 g/m²; espessura: 205 µm – J Prolab (São José dos Pinhais, Brasil);
- Polietilenoglicol 4000 – Bela Química (Goiânia, GO, Brasil);
- Polietilenoglicol 6000 – Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Poli(ε-caprolactona Mn 10.000) - Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) – Delaware (Porto Alegre, RS, Brasil);
- Trealose - Attivos Magisttrais (São Paulo, SP, Brasil);

- Tris - Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Triglicerídeos de cadeia média (TCM) – Alpha Química (Porto Alegre, RS, Brasil);
- Vimocetina (valor declarado 101,16%) – Pharma Nostra (Anápolis, GO, Brasil).
- Xilasina - Syntec (Santana de Parnaíba, SP, Brasil).

4.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético – Tecnal TE-0851;
- Balança analítica – Shimadzu AUY220;
- Centrífuga MTD III-Plus – Servilab;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência – Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japão), equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A (arranjo de diodos – PDA) e sistema controlador com injeção automática;
- Evaporador rotatório – Buchi Rotavapor R-3;
- MasterSizer® 3000 E – Malvern Instruments;
- Microcentrífuga – Sigma 1-14;
- Potenciômetro – pH 21 pH/mV meter – Hanna Instruments;
- Ultrassom – ALT Sonic Clean 3PA;
- ZetaSizer® Nano series Nano-Zs – Malvern Instrument.

4.1.3 Animais

Para os experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos Wistar machos, pesando entre 25-35 g, provindos do biotério central da UFSM.

Os animais, provenientes do Biotério Central da UFSM, foram mantidos em condições ambientais controladas (12:12 h de ciclo claro/escuro, a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e com 55% de umidade relativa), com livre acesso à água e à comida (Supra®). Todos os protocolos foram realizados objetivando a minimização do sofrimento, assim como o uso mínimo de animais, os quais foram conduzidos de acordo com normas nacionais (CONCEA) e internacionais. O protocolo está aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa com animais da Universidade Federal de Santa Maria (nº 9040100815), e

foi realizado em colaboração com o professor Dr. Carlos Fernando de Mello do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado descrito por Fessi e colaboradores (1989). A fase orgânica, constituída de PCL ($M_n \sim 10.000$), óleo (TCM), tensoativo de baixo EHL (monoestearato de sorbitano – Span[®] 60), vimpocetina e solvente orgânico miscível em água (etanol/acetona), foi submetida à agitação magnética, a 40°C, até completa dissolução dos componentes. Posteriormente, a fase orgânica foi vertida, lentamente, com auxílio de um funil, sobre uma fase aquosa, contendo estabilizante [P80)/PEG 4000 ou P80/PEG6000 ou apenas P80] e água destilada. Essa mistura foi mantida, sob agitação moderada, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi levada ao evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e ajuste do volume da formulação e da concentração do fármaco (0,5 mg/mL). As concentrações dos componentes foram determinadas segundo testes preliminares e estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1 - Composição quali-quantitativa das formulações nanoestruturadas preparadas no trabalho.

Constituintes	Formulações**		
	NCs-VP-P80	NCs-VP-P80/P4000	NCs-VP-P80/P6000
PCL (g)	0,25	0,25	0,25
Span 60 (g)	0,1925	0,1925	0,1925
TCM (g)	0,75	0,75	0,75
Vimocetina (g)	0,0125	0,0125	0,0125
Etanol (mL)	5,00	5,00	5,00
Acetona (mL)*	127,50	127,50	127,50
Água (mL)*	132,50	132,50	132,50
P80 (g)	0,1925	0,1925	0,1925
PEG 4000 (g)	-	0,1925	-
PEG 6000 (g)	-	-	0,1925

*Após a concentração em evaporador rotativo, o volume final da formulação foi de 25 mL, correspondendo à concentração de 0,5 mg/mL de vimocetina.

**NCs-VP-P80 = suspensões de nanocápsulas contendo vimocetina revestida com P80; NCs-VP-P80/P4000 = nanocápsulas contendo vimocetina revestidas com P80 e P4000; NCs-VP-P80/P6000 = nanocápsulas contendo vimocetina revestidas com P80 e P6000

Ressalta-se, ainda, que outras formulações foram testadas nos estudos de pré-formulação até que fosse definida a composição definitiva. Para isso, outros tipos de polímero e óleos, além de mudanças na proporção de ambos, foram testados, além, inclusive, de outras concentrações de fármaco.

Suspensões de nanocápsulas sem fármaco também foram preparadas para fins comparativos, da mesma forma como acima descrito, sem a presença da vimocetina na fase orgânica (NCs-P80; NCs-P80/P4000; NCs-P80/P6000).

4.2.2 Caracterização físico-química

Os lotes em triplicata de formulação foram analisados logo após a preparação, através dos seguintes parâmetros: diâmetro médio de partículas, distribuição de tamanho, dispersidade [índice de polidispersão (IPd), span], potencial zeta, pH, teor de fármaco, eficiência de encapsulamento (EE) e viscosidade relativa.

4.2.2.1 Determinação do diâmetro médio de partículas, distribuição de tamanho e potencial zeta

As suspensões nanoestruturadas obtidas foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio e IPd por espectroscopia de correlação de fótons (espalhamento de luz dinâmico), e potencial zeta por mobilidade eletroforética das partículas através do equipamento Zetasizer[®] Nano Series (Zen 3600; Malvern Instruments), após diluição das amostras (500 vezes) com água ultrapura (diâmetro e IPd) ou solução aquosa de NaCl 10 mM (potencial zeta) à 25 °C.

Foram analisados também o tamanho e o perfil de distribuição de partículas empregando o equipamento Mastersizer[®] 3000E (Malvern Instruments), através de difração a laser. Para isso, as amostras foram dispersas em água até atingirem o índice de obscuração padrão do equipamento e lidas utilizando o índice de refração do polímero PCL (1,59) (LOBATO et al., 2013).

4.2.2.2 Determinação do pH

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

4.2.2.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulamento da vimpocetina

Para determinar o teor de fármaco (concentração total), a amostra foi diluída até a concentração de 6,0 µg/mL em metanol, submetida a banho de ultrassom por 30 minutos e centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e injetado no cromatógrafo (ROSA, 2017).

Quanto à eficiência de encapsulamento, as suspensões foram submetidas à técnica de ultrafiltração-centrifugação (Amicon[®] Ultra 10,000 MW), a 7.000 rpm (3.615 xg) por 10 minutos, onde o fármaco livre foi separado das nanoestruturas e analisado por CLAE-UV. A eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada a partir da diferença entre as concentrações total e livre de vimpocetina, determinadas nas suspensões de nanoestruturas e no ultrafiltrado, respectivamente, de acordo com a equação 1.

$$EE = \frac{\textit{Teor total} - \textit{Teor livre}}{\textit{Teor total}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

4.2.2.3.1 Co-validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas

A validação foi realizada segundo parâmetros (especificidade, linearidade e precisão) preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017), sendo a exatidão inferida (ICH, 2005).

A quantificação da vimpocetina, nas suspensões de nanocápsulas, foi determinada com base no método desenvolvido por Elbary e colaboradores (2002), com algumas modificações segundo o nosso grupo de pesquisa (BOLSON, 2015; PINHEIRO, 2016; ROSA, 2017), utilizando cromatografia a líquido em fase reversa (CLAE-UV), empregando detecção a 274 nm, fase móvel metanol:água (85:15 v/v), contendo 0,1% de trietilamina e ácido acético glacial para ajuste do pH 7,0, coluna C₁₈ (Phenomenex-NST-C₁₈; 250 mm x 4,6 mm; 5 µm; acoplada à pré-coluna C₁₈ Gemini, 4 x 3 mm, Phenomenex) e vazão de 1,0 mL/min (cromatógrafo Shimadzu LC-20A, Kyoto, Japão, equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A – arranjo de diodos – PDA e sistema controlador CBM-20A. O volume de injeção foi de 20 µL e a curva analítica foi feita em metanol (concentrações de 2 a 10 µg/mL).

A especificidade do método foi analisada através da pureza do pico da vimpocetina, confirmada pelo detector de arranjo de diodos (PDA). Foram feitas injeções de amostras das suspensões de nanocápsulas sem fármaco (NCs-P80; NCs-P80/P4000; NCs-P80/P6000), comparando-as com os cromatogramas das suspensões com vimpocetina (NCs-VP-P80; NCs-VP-P80/P4000; NCs-VP-P80/P6000), a fim de avaliar se os excipientes empregados nas formulações poderiam influenciar na detecção do fármaco.

Para a linearidade, foram preparadas três curvas analíticas em metanol, em três dias diferentes, a partir de soluções de referência contendo 0,5 mg/mL de vimpocetina em metanol, constituídas pelas concentrações de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0

$\mu\text{g/mL}$. Os dados foram avaliados através da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados ($n=3$).

Quanto à precisão do método, a repetibilidade (intra-dia; $n=6$) e a precisão intermediária (entre-dias: $n=12$) foram efetuadas. O fármaco foi extraído das nanocápsulas através da preparação de seis amostras de uma mesma formulação. Assim, 120 μL da suspensão foram diluídos em metanol (balões volumétricos de 10 mL), ultrassonicados por 30 minutos e, após completar o volume, foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm, em seguida, o sobrenadante foi filtrado em membrana de nylon 0,45 μm para análise em CLAE-UV. Os resultados foram expressos através do desvio padrão relativo (DPR%).

4.2.2.4 Avaliação da viscosidade das suspensões de nanocápsulas

Para a avaliação da viscosidade das formulações, primeiramente, foi determinada a densidade relativa à água, a 20 °C, das suspensões contendo vimpocetina, utilizando picnômetro (capacidade de 5 mL). O picnômetro vazio foi pesado em balança analítica e, em seguida, pesado novamente, contendo a amostra ou água. A massa da amostra foi obtida através da diferença entre o picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa (mg/mL ; a 20°C) foi obtida através da razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água.

Um viscosímetro de vidro do tipo Cannon-Fenske (n° 25 reto; Vidrolabor) para líquidos opacos (capilar em formato de U), também conhecido como viscosímetro de Ostwald modificado, foi empregado para a avaliação da viscosidade. Os testes de densidade e de viscosidade foram realizados como preconizado pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (ANVISA, 2010), para viscosímetros do tipo capilar de Ostwald modificado. A análise da viscosidade relativa foi realizada em triplicata, com prévia ambientação do aparato, a 20 °C, utilizando 12 mL de amostra, a qual foi adicionada cuidadosamente na extremidade A (Figura 6). A mesma ficou em contato com o viscosímetro por aproximadamente 10 minutos para equilibrar a temperatura do sistema, em seguida, registrou-se o tempo que a amostra demorou para passar entre os meniscos do bulbo B e C.

Figura 6 - Viscosímetro Cannon-Fenske



A viscosidade relativa foi obtida através da equação 2:

$$n_1 = \frac{n_2}{t_2 \cdot d_2} \cdot t_1 \cdot d_1 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde: n_1 : viscosidade relativa da amostra; n_2 : viscosidade do líquido de referência (água; 1,004 cP a 20°C); t_2 : tempo de escoamento da água; d_2 : densidade da água (0,9982 g/mL a 20°C); t_1 : tempo de escoamento da amostra e d_1 : densidade relativa da amostra.

4.2.3 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo vimopocetina

Para avaliar a estabilidade das formulações, as suspensões de nanocápsulas, contendo vimopocetina, foram armazenadas por 90 dias à temperatura ambiente e protegidas da luz (frascos de vidro âmbar).

Em determinados tempos (0, 30, 60, e 90 dias), amostras das formulações foram coletadas e submetidas às análises de pH, diâmetro médio de partículas, IPd,

potencial zeta, diâmetro médio de volume ($D_{4,3}$), diâmetro médio de superfície ($D_{3,2}$), span e teor de vimpocetina presente nas nanocápsulas.

4.2.4 Estudo da cinética de liberação da vimpocetina a partir das nanocápsulas em suspensão aquosa

Os perfis de liberação da vimpocetina, a partir das suspensões de nanoestruturas, foram obtidos através da técnica de difusão em sacos de diálise e os experimentos foram conduzidos em triplicata de lote, seguindo-se condição *sink*, utilizando como meio de liberação tampão fosfato pH 7,4 com 30% de etanol à 37 ± 2 °C (ROSA, 2017). A coleta de amostras do meio de liberação, em intervalos de tempo pré-determinados, foi realizada para a determinação da porcentagem de fármaco liberado, sendo que, para fins comparativos, uma solução de vimpocetina em metanol foi também avaliada (0,5 mg/mL).

Neste experimento, os sacos de diálise (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich) foram cortados (8 cm), preenchidos com 1 mL da suspensão de nanocápsulas, equivalente à 0,5 mg de vimpocetina, e fechados com grampos específicos para esse fim. Após, os sacos foram colocados em béqueres de 250 mL (contendo 200 mL de meio de liberação) e mantidos sob agitação magnética moderada, em uma cuba à temperatura de 37 °C. Em intervalos pré-determinados, foram coletadas alíquotas de 1,0 mL do meio de liberação e analisadas em CLAE-UV sob as condições descritas no item 4.2.2.3, alterando-se o volume de injeção para 50 µL. O volume de meio de liberação retirado foi repostado, também a 37 °C. Uma curva analítica foi preparada, empregando o mesmo meio de liberação do experimento, na faixa de 0,0625 a 3 µg/mL, a partir de uma solução mãe de vimpocetina em metanol.

Os perfis de liberação *in vitro* da vimpocetina foram analisados através de modelagem matemática (Scientist 2.0 software - MicroMath®, USA), empregando modelos dependentes [ordem zero ou primeira ordem (monoexponencial-equação 3 ou biexponencial)] e Lei da Potência/Korsmeyer-Peppas – equação 4. O modelo mais adequado foi escolhido baseando-se no maior coeficiente de correlação (r), maior critério de seleção de modelo (MSC), melhor ajuste gráfico e avaliação dos critérios estatísticos de estimativa de parâmetros.

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \text{ (monoexponencial)} \quad \text{Equação (3)}$$

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

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde, C é a concentração no tempo t , 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 em estudo (equação 5), 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.

4.2.5 Preparação de liofilizados, a partir das suspensões de nanocápsulas, caracterização das amostras e estudo de estabilidade

As suspensões de nanocápsulas (NCs-VP-P80 e NCs-VP-P80/P6000; (volume final = 25 mL, $n = 3$) foram novamente preparadas, conforme método descrito anteriormente, e adicionadas em frascos de boca larga juntamente com 10,0% (p/v) do crioprotetor trealose. A mistura foi deixada sob agitação magnética até a dissolução total do carboidrato, e, após, foi levada ao freezer para congelamento (-35 °C por 24 horas). Em seguida, as amostras foram inseridas no liofilizador (LIOTOP L 101, Liobras) para desidratação a uma temperatura de aproximadamente -55 °C, durante 24 horas, para a obtenção dos produtos secos.

A análise morfológica das nanocápsulas, a partir dos liofilizados, foi realizada empregando um microscópio eletrônico de varredura (MEV, VEGA3 TESCAN), localizado no Departamento de Engenharia Química da UFSM. Empregou-se uma voltagem de 20 e 5 kV, para a obtenção das imagens (2.500X, 5.000X e 10.000X), após a metalização com ouro.

Também, os liofilizados foram ressuspensos em água ultrapura (3,0 mL), após pesagem (NCs-VP-P80 = 0,4677 g e NCs-VP-P80/P6000 = 0,4908 g), visando à obtenção da mesma concentração dos componentes da suspensão original. As amostras de cada lote foram mantidas sob agitação magnética, durante 30 minutos, para homogeneização. Na sequência, as amostras foram filtradas em membrana hidrofílica (0,45 μm) e levadas para as análises de tamanho de partículas (Zetasizer®; diluição de 1:500 v/v em relação ao pó recostituído). O índice de ressuspensão (S_f/S_i) foi calculado pela relação entre o diâmetro médio das partículas dos pós após a

redispersão em água (tamanho final) e o diâmetro médio das suspensões (tamanho inicial). Análise granulométrica também foi conduzida empregando Mastersizer® 3000E, a partir dos liofilizados ressuspensos, da mesma forma como para as suspensões.

Os pós liofilizados foram armazenados em frascos de vidro, com tampa de rosca, ao abrigo da luz (n = 3), e, nos tempos 0, 45, 60 e 90 dias, foram submetidos à análise do teor de fármaco conforme metodologia descrita anteriormente (item 4.2.2.3). Para isso, pesou-se exatamente uma quantidade correspondente ao valor teórico de 60 µg do fármaco (concentração de 6,0 µg/mL) em um balão de 10 mL. Após, adicionou-se metanol e deixou-se em ultrassom por 30 minutos. O volume do balão foi completado com metanol, a amostra filtrada e levada para análise no cromatógrafo (CLAE-UV), seguindo a mesma metodologia descrita para as suspensões (item 4.2.2.3).

4.2.6 Avaliação da alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) devido à administração das nanoestruturas

Para a realização deste estudo, os animais foram divididos em 7 grupos (n=5-6 animais por grupo) para receberem o tratamento via i.p:

- 1) Solução salina (controle negativo),
- 2) Veículo (10% p/v de P80 em água destilada);
- 3) Vimpocetina solubilizada no veículo (10% p/v de P80 em água destilada);
- 4) Nanocápsulas revestidas com P80 sem vimpocetina (NCs-P80);
- 5) Nanocápsulas revestidas com P80 com vimpocetina (NCs-VP-P80);
- 6) Nanocápsulas revestidas com P80 e P6000 sem vimpocetina (NCs-P80/P6000)
- 7) Nanocápsulas revestidas com P80 e P6000 com vimpocetina (NCs-VP-P80/P6000).

Foi administrada intraperitonealmente (i.p.), em camundongos machos Swiss (cerca 30 g de peso corporal; MORREY et al., 2008), uma solução de fluoresceína sódica em salina (0,1 mL, 100 mg/mL), e, após 30 minutos, ocorreu a administração (i.p.) dos controles ou das suspensões de nanocápsulas poliméricas selecionadas, contendo ou não vimpocetina, equivalente à dose de 5 mg/Kg de fármaco.

Após 30 minutos, os animais foram anestesiados para a coleta de sangue ventricular, o qual foi centrifugado a 12.000 rpm/10 minutos, o plasma diluído 1:10 em tampão PBS e, posteriormente, novamente diluído em ácido tricloroacético (TCA) a 20% e deixado a 4°C por 24h. O cérebro foi perfundido com cerca de 150 mL de tampão PBS pH 7,2 heparinizado (3.000UI/L), pesado e homogeneizado com tampão PBS pH 7,2. As amostras de cérebro foram centrifugadas (12.000 rpm/10 min) e o sobrenadante diluído 1:10 com TCA a 20%, assim como as amostras de plasma. Todas as amostras foram incubadas a 4°C por 24 h e centrifugadas a 12.000 rpm/15 min para a remoção das proteínas precipitadas. O sobrenadante foi, em seguida, removido e diluído 1:10 em volume equivalente de Tris (1M, pH 10).

A fluorescência foi quantificada empregando 480 nm e 538 nm, respectivamente, como comprimentos de onda de excitação e de emissão em aparelho FlexStation. O grau de permeabilidade da BHE foi medido como a percentagem (m/V) de fluoresceína sódica por grama de tecido cerebral pela quantidade desta em um (1) mL de plasma.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como significativo, utilizando software GraphPad Prism®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS CONTENDO VIMPOCETINA

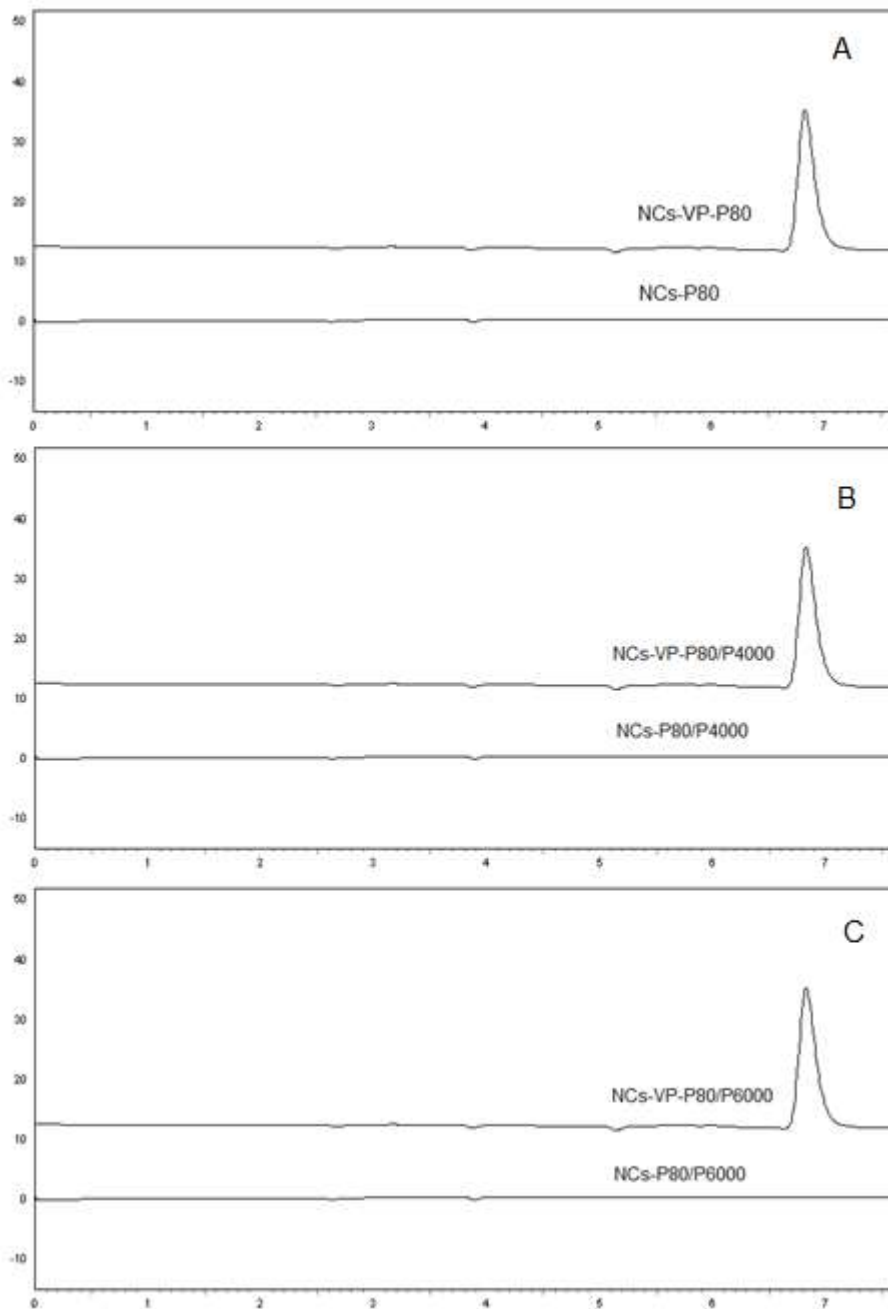
As formulações foram desenvolvidas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, descrito por Fessi e colaboradores, 1989. As nanocápsulas foram preparadas seguindo as proporções usuais (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010) de componentes, com modificações apenas na quantidade de solvente orgânico, pois foi observado, em testes preliminares, que conforme se aumentava essa quantidade o tamanho das partículas diminuía, assim como a distribuição destas tornava-se mais estreita. As formulações contendo 0,5 mg/mL de vimpocetina foram constituídas por PCL ($M_n \sim 10.000$) (1,0%, p/v), pois é um polímero biocompatível e biodegradável, por TCM como núcleo (3,0%, p/v), além de Span 60[®] (0,77%, p/v) como tensoativo de baixo EHL, e P80 (0,77%, p/v) ou proporção 1:1 de P80/PEG [PEG com peso molecular médio aproximado de 4.000 ou 6.000 (0,77%, p/v) + 0,77 % p/v de P80], como estabilizantes hidrofílicos revestindo à superfície das nanoestruturas. Para isso, partiu-se de 5 mL de etanol para solubilizar o Span 60[®] e 127,5 mL de acetona para a solubilização do restante dos componentes da fase orgânica, e de 132,5 mL de água destilada (fase aquosa) para a formação de 25 mL de suspensão final, após evaporação do solvente orgânico e parte da água. Macroscopicamente, esses sistemas demonstraram ser homogêneos e sem precipitados visíveis.

5.1.1 Co-validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor da vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas

Para a quantificação da vimpocetina, foi utilizado o método desenvolvido por Elbary e colaboradores (2002), com algumas adaptações (proporção da fase móvel/vazão) realizadas por nosso grupo (BOLSON, 2015; ROSA, 2017), o qual foi, então, reproduzido e covalidado para a quantificação do fármaco presente nas suspensões de nanocápsulas de PCL desenvolvidas neste estudo, segundo os parâmetros de linearidade, especificidade e precisão (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

A especificidade expressa a capacidade que o método tem de medir, sem interferência dos demais componentes da formulação ou de impurezas, exatamente a substância de interesse (ICH, 2005). De acordo com os cromatogramas sobrepostos (Figura 7), observou-se que não houve interferência dos constituintes da formulação no pico do fármaco. A especificidade foi ainda confirmada através do detector do tipo PDA (índice de pureza do pico = 1,000).

Figura 7 - Cromatogramas sobrepostos, obtidos por CLAE-UV, a partir das formulações contendo vimopcetina (NCs-VP) ou não (NCs)



A linearidade deve ser realizada empregando no mínimo cinco concentrações diferentes e expressa a relação diretamente proporcional entre o sinal emitido pelo equipamento e a concentração do fármaco na amostra analisada (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Uma relação linear foi verificada através da regressão linear das curvas analíticas (n=3), descrita pela equação $y = 41.538x - 9008,8$, com coeficiente de correlação de 0,9981, ou seja, o método proposto foi linear (ANOVA $p < 0,05$) na faixa de concentração analisada (2,0 a 10,0 $\mu\text{g/mL}$).

Para a análise de precisão, foi escolhida a formulação NCs-VP-P80/P6000 por representar o sistema mais complexo. A precisão de um método consiste na avaliação dos resultados de uma série de análises da mesma amostra, e deve ser avaliada por meio da repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (entre-dias) (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Na tabela 2, os resultados de precisão obtidos intra e entre-dias para as suspensões contendo vimopocetina estão descritos, nos quais, em todas as análises, o desvio padrão relativo (DPR) foi inferior a 3,5%, demonstrando que o método é preciso para o fim proposto.

Tabela 2 - Análise da precisão

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)*	6,00	5,86 \pm 0,09	97,62 \pm 1,56	1,60
Dia 2 (n=6)**	6,00	5,84 \pm 0,18	97,32 \pm 2,95	3,03
Entre-dias (n=12)	6,00	5,85 \pm 0,13	97,47 \pm 2,25	2,31

*Analista 1; **Analista 2.

Assim, o método analítico utilizado para a quantificação da vimopocetina, presente nas suspensões coloidais preparadas com PCL/P80/PEG, demonstrou-se adequado, considerando os parâmetros avaliados.

5.1.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

Quanto à análise macroscópica dos sistemas desenvolvidos, observou-se homogeneidade de aspecto, com coloração branco leitosa e reflexo azulado (efeito *tyndall*), ou seja, demonstraram características típicas de suspensões de nanocápsulas poliméricas (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Para a caracterização dos sistemas nanoestruturados, foram preparadas triplicatas de lote de todas as formulações, seguindo-se a determinação do pH, diâmetro médio de partículas, IPd, potencial zeta, diâmetro médio de volume ($D_{4,3}$), diâmetro médio de superfície ($D_{3,2}$), span, teor de vimpocetina presente nas nanocápsulas e porcentagem de fármaco encapsulado. Os resultados estão apresentados nas tabelas 3 e 4, e, na figura 8, é possível observar os gráficos de distribuição de tamanho obtidos por espectroscopia de correlação de fótons (espalhamento de luz dinâmico). Na figura 9, está apresentado o potencial zeta obtido por mobilidade eletroforética.

Tabela 3 - Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas (n=3) contendo vimpocetina (0,5 mg/mL), logo após a preparação

Parâmetro	NCs-VP-P80	NCs-VP-P80/P4000	NCs-VP-P80/P6000
pH	6,74 ± 0,13	6,89 ± 0,14	6,50 ± 0,06*
Diâmetro médio (nm)	194,3 ± 7,5	205,5 ± 7,9	206,9 ± 2,4
Ip _d	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,01
Potencial zeta (mV)	-9,12 ± 1,11	-8,05 ± 0,45	-8,23 ± 0,08
$D_{4,3}$ (µm)	0,77 ± 0,09	0,41 ± 0,01	0,70 ± 0,26
$D_{3,2}$ (µm)	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Teor (%)	98,38 ± 1,77	95,84 ± 2,56	96,88 ± 3,55

*Diferença significativa entre as formulações NCs-VP-P80 e NCs-VP-P80/P6000

Figura 8 - Distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimopcetina (n=3), obtidos através de espalhamento de luz dinâmico

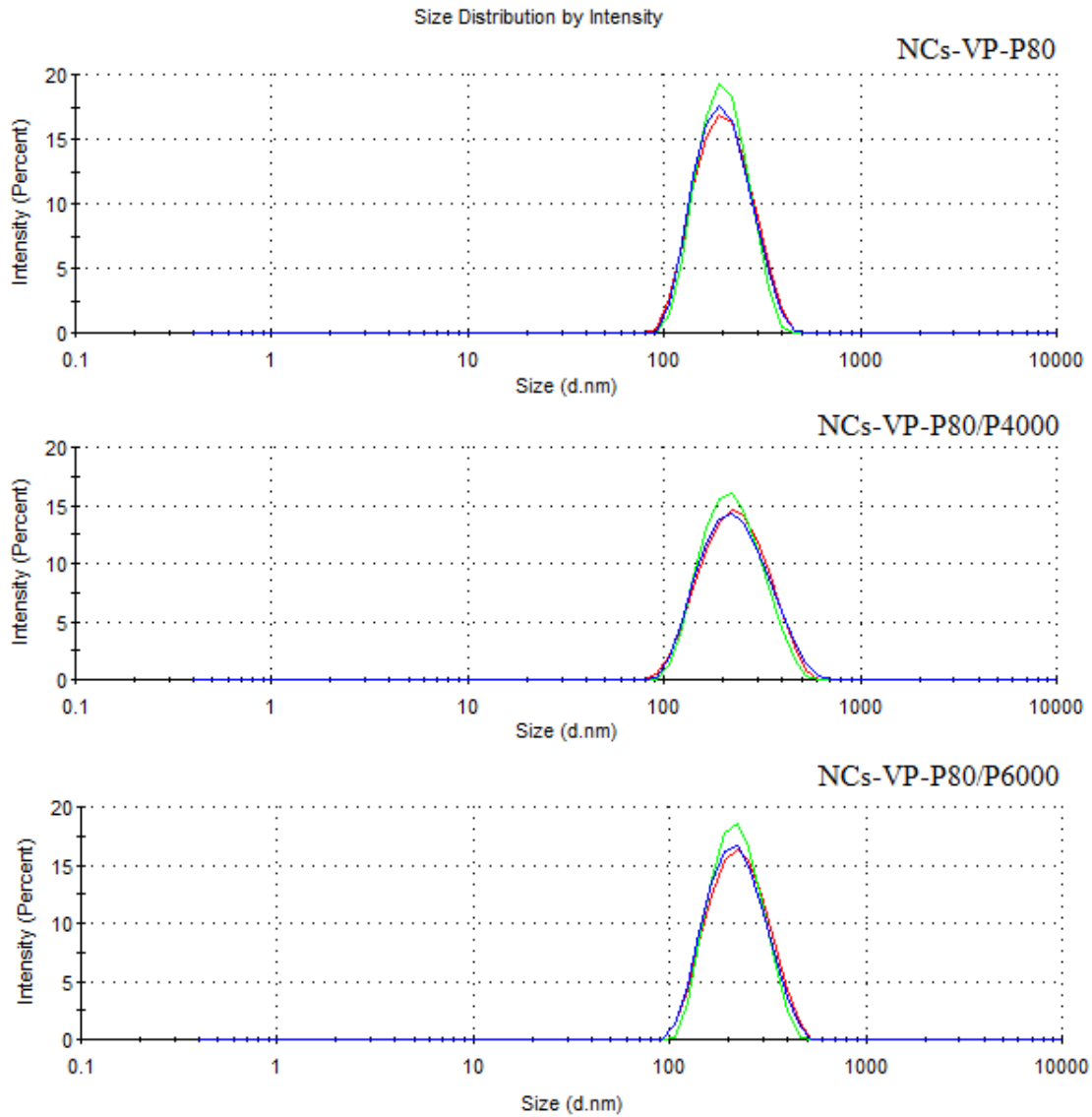


Tabela 4 – Distribuição de tamanho de partículas obtida através de difração a laser

Formulação	d (0,1) nm	d (0,5) nm	d (0,9) nm	Span*
NCs-VP-P80	0,271 ± 0,011	0,401 ± 0,017	0,628 ± 0,112	0,866 ± 0,241
NCs-VP-P80/P4000	0,278 ± 0,005	0,403 ± 0,007	0,569 ± 0,008	0,722 ± 0,007
NCs-VP-P80/P6000	0,279 ± 0,000	0,406 ± 0,004	0,595 ± 0,040	0,779 ± 0,090

*Span = $D_{0,9}-D_{0,1}/D_{0,5}$, onde $D_{0,9}$, $D_{0,1}$ e $D_{0,5}$ correspondem a 90%, 10% e 50% da distribuição cumulativa dos diâmetros, equivalentes a volume de esferas.

As suspensões apresentaram diâmetro médio de partículas na faixa coloidal (194 a 207 nm) quando analisadas por espectroscopia de correlação de fótons, assim como quando foram analisadas por difração a laser, uma vez que o $D_{4,3}$ e o $D_{3,2}$ encontram-se também em dimensões nanométricas (tabela 3), condizente com outras formulações de nanocápsulas preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (CHARÃO et al., 2015; CORADINI et al., 2014; FONTANA et al., 2014). A técnica de difração a laser é uma ferramenta útil para a verificação de sistemas unimodais, importante pois pode detectar partículas maiores em sistemas coloidais, por apresentar uma ampla faixa de medição (KECK; MÜLLER, 2008), confirmando, assim o caráter nanométrico de formulações. Conforme a tabela 4, nota-se que 90% das partículas apresentaram diâmetros inferiores a 628 nm. Verifica-se, ainda, que a presença do PEG não alterou significativamente o tamanho das partículas ($p > 0,05$; tabelas 3 e 4), como observado também no estudo de Vieira e colaboradores, em 2016, que prepararam nanocápsulas de PCL contendo clozapina, revestidas ou não com PEG (90% das partículas abaixo de 232 nm). O peso molecular do PEG também não influenciou o tamanho médio das nanocápsulas contendo vimpocetina (tabelas 3 e 4).

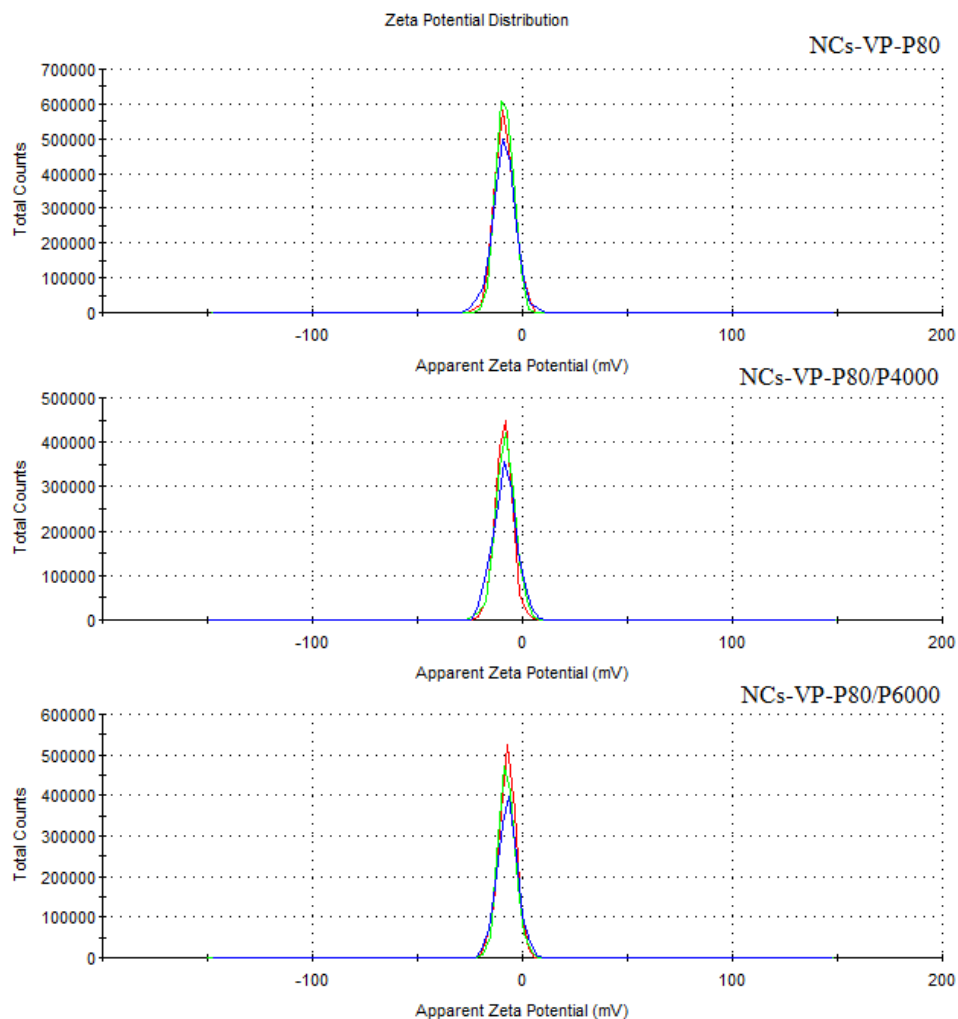
Os valores de span e de IPd, idealmente, devem estar abaixo de 2,0 e de 0,2, respectivamente, para indicar adequada homogeneidade, ou seja, estreita faixa de distribuição de tamanho de partículas do sistema formado (GUTERRES; BENVENUTTI; POHLMANN, 2012; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; OURIQUE et al., 2014). As nanocápsulas desenvolvidas apresentaram span entre 0,7 e 0,9 (tabela 4) e o IPd próximo a 0,1 (tabela 3), indicando, assim, que as suspensões são homogêneas quanto à distribuição de tamanho de partículas. Ressalta-se que é de grande importância que os sistemas coloidais apresentem IPd abaixo de 0,2 e diâmetros de partículas até por volta de 200 nm para administração parenteral e intravenosa (ZHANG; MUROWCHICK; YOUAN, 2011).

Charão e colaboradores, 2015, desenvolveram nanocápsulas de PCL contendo melatonina com estreita distribuição de tamanho, confirmada através de baixos valores de IPd (0,09) e de span (1,75), obtidos por espectroscopia de correlação de fótons e por difração a laser, respectivamente. Ianiski e colaboradores, 2015, também prepararam suspensões de nanocápsulas utilizando PCL, P80 e PEG 4000, além de Span 60 e TCM, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, contendo meloxicam, com adequadas características de tamanho 261 ± 13 nm e IPd

$0,15 \pm 0,07$. Outro trabalho também mostra o desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo o antioxidante bixina, através da técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado. As nanoestruturas desenvolvidas apresentaram $D_{4,3}$ de 195 ± 27 nm e $D_{3,2}$ de 138 ± 13 nm, além de 190 ± 9 nm correspondente ao diâmetro médio de partículas obtido por espectroscopia de correlação de fótons (LOBATO et al., 2015).

A homogeneidade dos sistemas e o diâmetro médio de partículas são características que podem influenciar na estabilidade dos sistemas durante o armazenamento, na toxicidade, na capacidade de liberação do fármaco e na sua distribuição *in vivo*, sendo, assim, parâmetros fundamentais a serem avaliados quando se desenvolve sistemas nanométricos (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

Figura 9 – Gráficos do potencial zeta das formulações (n=3)



Os potenciais zeta observados para as formulações mostraram-se negativos e próximos, sem diferença significativa conforme a composição ($p > 0,05$), indicando que a presença de PEG e seu peso molecular não influenciaram neste parâmetro em relação à presença apenas de P80 na superfície das partículas. Os valores negativos refletem a presença de grupos carboxílicos nas extremidades do polímero, uma vez que PCL é um poliéster (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). A carga de superfície, refletida pelo potencial zeta, influencia a interação dos coloides com o meio aquoso (CHO et al., 2013; SCHAFFAZICK et al., 2003a). Quanto maior o potencial zeta, em módulo, maior seria o indicativo de estabilidade, ou seja, menores as chances de ocorrer agregação de partículas, devido à repulsão eletrostática (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). No entanto, neste trabalho, os valores de potencial zeta apresentaram-se em torno de -8 a -9 mV. Outros estudos utilizando a mesma técnica, mas com diferentes compostos bioativos, também mostraram resultados negativos e baixos, em módulo, como Coradini e colaboradores (2014), que produziram nanocápsulas de PCL (núcleo lipídico) com resveratrol e curcumina ($-7,8 \pm 0,7$ mV), assim como nanocápsulas de PCL contendo licopeno ($-11,5$ mV) (Santos et al., 2015). Neste sentido, outros mecanismos de estabilização podem estar envolvidos, como a estabilização estérica, em função do emprego de um tensoativo não-iônico (ex: P80) na interface partículas/água (RIGO et al., 2015).

No presente estudo, as formulações apresentaram valores de pH levemente ácidos, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre as formulações NCs-VP-P80/P6000 e NCs-VP-P80/P4000. Esses dados podem ser explicados pela presença dos grupos carboxílicos terminais presentes no polímero estudado (RIGO et al., 2015). A medida do pH pode fornecer informações sobre a estabilidade das formulações desenvolvidas, pois modificações significativas na faixa de pH podem indicar alterações nos componentes da formulação ou, até mesmo, a difusão do fármaco das nanopartículas para o meio aquoso (GUTERRES et al., 1995).

O teor total encontrado para as nanocápsulas foi adequado, acima de 95%, considerando a concentração teórica de 0,5 mg/mL, e sem diferença significativa entre elas ($p > 0,05$).

A eficiência de encapsulamento (EE) correspondeu a 99,94% para NCs-VP-P80, a 99,95% para NCs-VP-P80/P4000 e a 99,93% para NCs-VP-P80/P6000, inferindo-se, assim, que o fármaco está associado às nanocápsulas. A EE do fármaco nos sistemas nanoestruturados foi de aproximadamente 100% devido,

provavelmente, à natureza lipofílica da vimpocetina, que por apresentar baixa solubilidade no meio aquoso, apresentou menos afinidade pela fase externa, associando-se preferencialmente às nanocápsulas. Valores altos de EE para vimpocetina (cerca de 99%) foram também encontrados em estudos anteriores do nosso grupo tanto para nanocápsulas preparadas com etilcelulose (BOLSON, 2015; PINHEIRO, 2016) quanto com PCL (0,5% de polímero e 1,5% de TCM ou óleo de abacate; ROSA, 2017). Outros sistemas também apresentaram altas taxas de EE para este neuroprotetor, como NLS (98%) desenvolvidas por Luo e colaboradores (2006), micelas poliméricas (95%) (EL-DAHMY et al., 2014) e CLN (94,9%; ZHUANG et al., 2010).

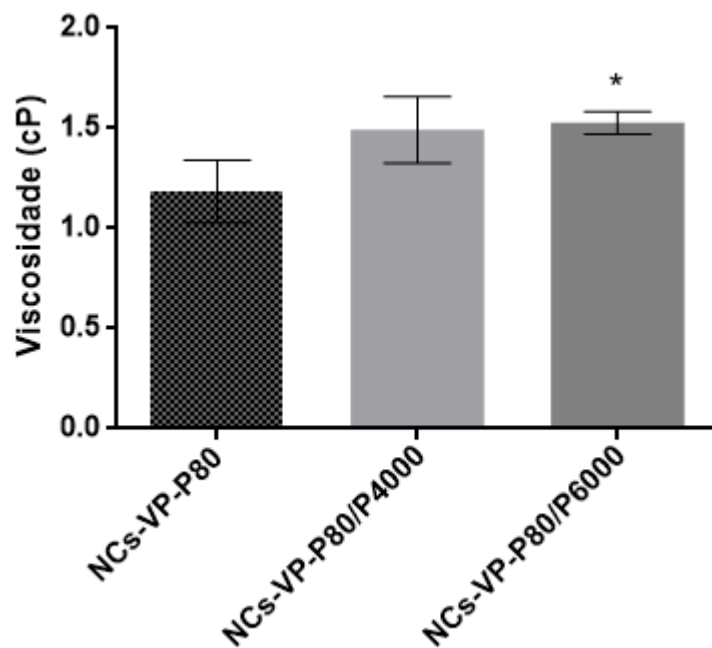
As suspensões com PCL/TCM/Span 60 têm sido consideradas um tipo particular de nanocápsulas, constituídas, na fase interna, de uma dispersão de monoestearato de sorbitano e TCM no núcleo, envoltas pelo polímero e estabilizadas por P80. Estes coloides, por possuírem uma substância lipídica sólida no núcleo (Span 60[®]), apresentam cavidade com maior viscosidade em relação às demais nanocápsulas, sendo, assim, denominadas de núcleo lipídico pelos autores (CHARÃO et al., 2015; JORNADA et al., 2012; VENTURINI et al., 2011). As suspensões desenvolvidas no presente trabalho podem ser consideradas de núcleo lipídico, porém, algumas são envoltas também por PEG além de polissorbato 80.

Foi também analisada a viscosidade relativa das formulações, com a utilização de um viscosímetro capilar, e, para isso, foi necessário também realizar a determinação da densidade das suspensões, utilizando picnômetro. A viscosidade representa a resistência de líquidos ao escoamento, sendo que essa provém do atrito interno (forças de coesão entre moléculas relativamente juntas), sendo, assim, a resistência ao deslocamento de parte de suas moléculas sobre outras vizinhas. A viscosidade da água (1,004 cP a 20°C) é utilizada como referência para a determinação de líquidos de baixa viscosidade, empregando-se os valores de sua viscosidade conforme a temperatura do ensaio. O *poise* (P; usualmente cP, *centipoise*) é a unidade dinâmica (Sistema CGS) de viscosidade, e, no sistema internacional, a unidade que corresponde ao cP é o mili.Pascal.segundo (mPa.s) (ANVISA, 2010; LACHMAN, 2001, p.123). Ressalta-se que, no desenvolvimento de formulações nanotecnológicas, é importante a avaliação da viscosidade, principalmente, quando se trata de produtos destinados à administração parenteral (RIGO et al., 2015). A partir dela, é possível realizar comparações entre os sistemas

desenvolvidos, além de ser também um parâmetro adicional de controle de qualidade (YANG et al., 2015).

Os resultados de viscosidade deste trabalho demonstram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos NCs-VP-P80 e NCs-VP-P80/P6000, de maneira que as formulações revestidas apenas com P80 apresentaram valor de $1,185 \pm 0,156$ cP, aquelas revestidas com P80/P4000 de $1,492 \pm 0,166$ cP e as revestidas com P80/P6000 de $1,528 \pm 0,057$ cP. Assim, pode-se observar, na figura 10, que com o uso do revestimento peguillado e, também, com o aumento do peso molecular do mesmo, o valor de viscosidade tendeu a aumentar para as formulações estudadas. Estes resultados são coerentes, pois a adição de mais um componente polimérico (PEG) ao sistema poderia aumentar a resistência ao movimento dos coloides desenvolvidos, com influência do tamanho das cadeias.

Figura 10 - Viscosidade relativa das formulações de nanocápsulas contendo vimopcetina. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.



(*) Diferença significativa entre as formulações NCs-VP-P80 e NCs-VP-P80/P6000.

Dentre os aparatos disponíveis para avaliação da viscosidade, selecionou-se o viscosímetro capilar Cannon-Fenske nº 25 (para líquidos opacos), adequado para avaliação de fluidos com viscosidade entre 0,5 e 2,0 cP e com comportamento

newtoniano presumido, além de ser bastante simples, de baixo custo e empregar pouco volume de amostra (12 mL) (YANG et al., 2015; ROSA, 2017). O estudo de Eltayebe e colaboradores (2016) relacionou a viscosidade de soluções (ácido esteárico/etilvanilina; 0,82 a 1,18 mPa.s) com o tamanho de NLS (52 a 65 nm), para aplicação no campo alimentício, empregando viscosímetro Cannon-Fenske nº25. Recentemente, nosso grupo tem aplicado esse viscosímetro para a comparação da viscosidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas com diferentes composições. No trabalho de Rosa (2017), foi realizada a análise da viscosidade por este mesmo método, sendo que suspensões de nanocápsulas de PCL com TCM demonstraram menor viscosidade ($1,40 \pm 0,01$ cP) em comparação àquelas preparadas com o óleo de abacate ($1,60 \pm 0,02$ cP).

Outros métodos têm sido empregados para a avaliação da viscosidade de nanoformulações, com base no uso de viscosímetro rotacional (RIGO et al., 2014) ou vibracional (TERROSO et al., 2016). Um viscosímetro rotacional foi utilizado por Rigo e colaboradores (2014) para determinar a viscosidade de nanocápsulas de PCL, mostrando que as suspensões preparadas com o óleo de soja apresentaram o valor mais baixo ($1,36 \pm 0,01$ mPa.s) e aquelas com óleo de farelo de arroz o mais alto ($1,58 \pm 0,02$ mPa.s).

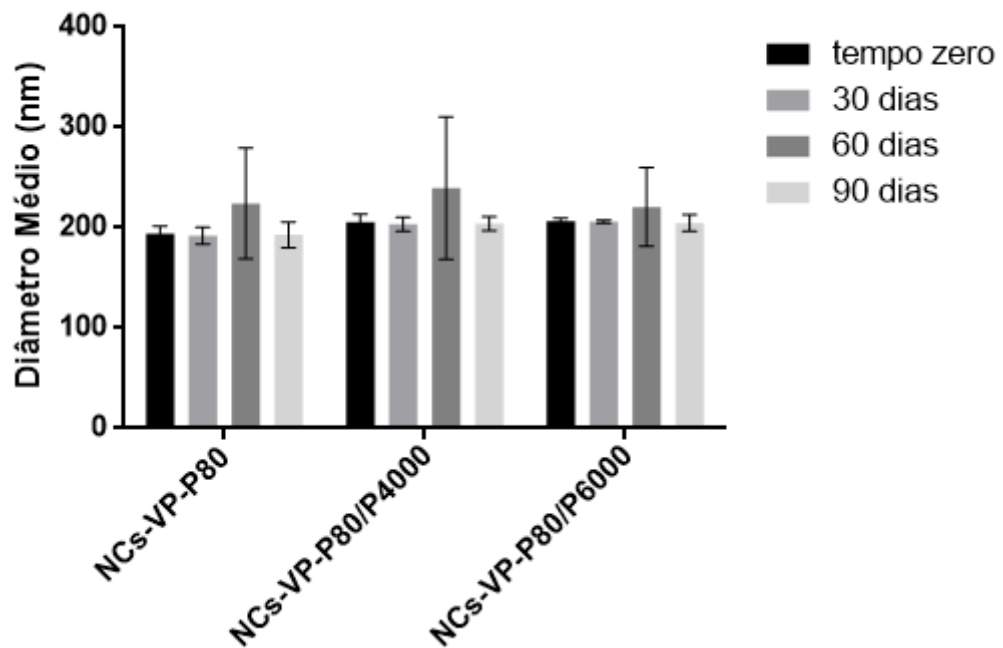
5.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA

As nanocápsulas contendo vimpocetina foram armazenadas por 90 dias à temperatura ambiente e em frascos de vidro âmbar para protegê-las da luz. Nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias, alíquotas da suspensão (triplicata de lote) foram retiradas para a análise do pH, diâmetro médio de partículas, IPd, potencial zeta, diâmetro médio de volume ($D_{4,3}$), diâmetro médio de superfície ($D_{3,2}$), span e teor de vimpocetina presente nas nanocápsulas. O estudo de estabilidade é considerado um dos fatores mais importantes a serem avaliados no processo de desenvolvimento das formulações e auxilia na garantia da segurança e eficácia de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2005).

A avaliação do aspecto macroscópico demonstrou que as suspensões mantiveram-se homogêneas, com coloração branca/opalescente e sem a presença de precipitados, durante os 90 dias de armazenamento.

A análise do diâmetro médio de partículas e sua distribuição são parâmetros importantes na avaliação da estabilidade física dos coloides, pois nestes sistemas pode ocorrer agregação das partículas alterando esses parâmetros (WU et al., 2011; GUTERRES et al., 1995). Na figura 11, observa-se que não houve diferença significativa nos valores de diâmetro médio com o passar dos 90 dias, quando as formulações foram analisadas por espalhamento da luz dinâmico.

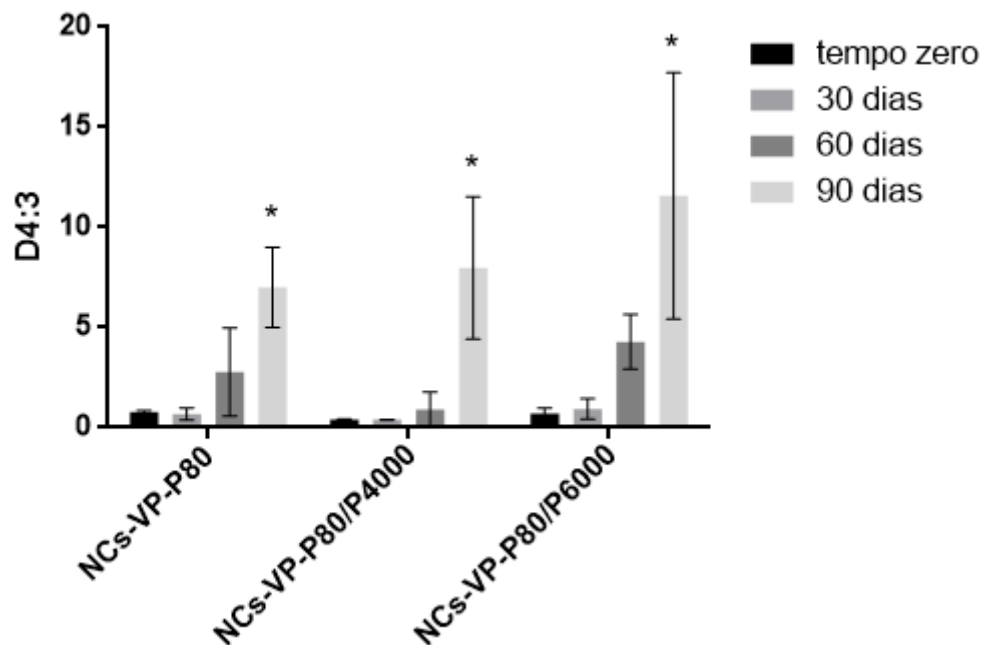
Figura 11 – Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, em função do tempo (Zetasizer®). Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata



As suspensões também foram avaliadas por difração a laser e, como mencionado no item 5.1.3, essa técnica é mais sensível para detectar partículas acima da faixa nanométrica. Assim, os resultados demonstram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) no diâmetro médio de volume ($D_{4,3}$) para todas as formulações somente em 90 dias da preparação, indicando agregação do sistema (figura 12) e que a presença de PEG não conferiu adicional estabilização estérica aos coloides. O diâmetro médio de superfície ($D_{3,2}$; Figura 13) aumentou significativamente ($p < 0,05$)

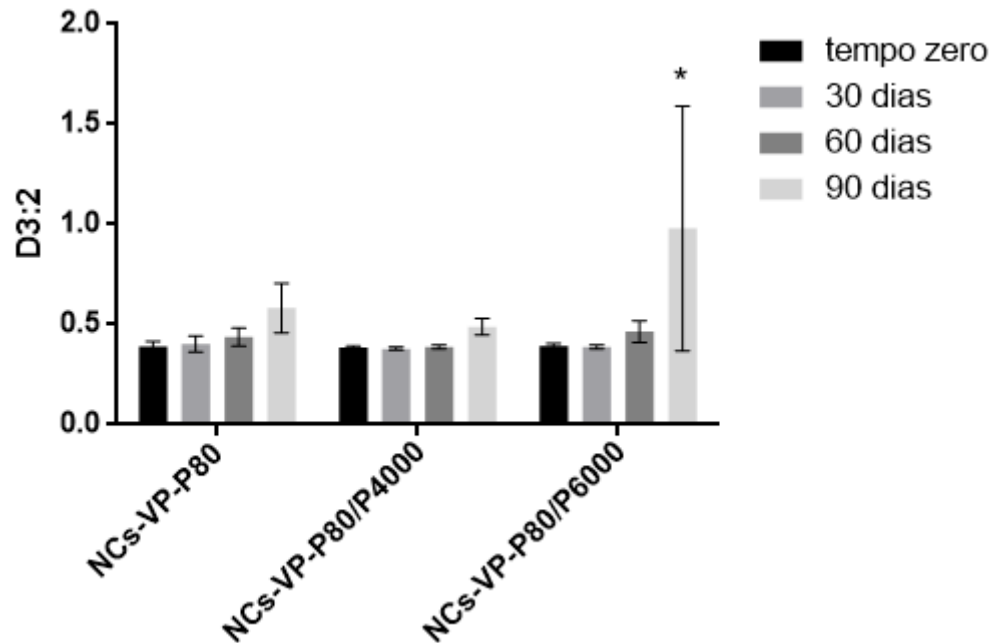
apenas para a formulação NCs-VP-P80/P6000 em 90 dias de armazenamento. Ressalta-se que o diâmetro $D_{0,9}$ também aumentou significativamente em 90 dias, para todas as formulações [0,628 nm para 10,82 μm (NCs-VP-P80); 0,569 nm para 10,73 μm (NCs-VP-P80/P4000); 0,595 nm para 7,43 μm (NCs-VP-P80/P6000)]. Os diâmetros $D_{0,1}$ e $D_{0,5}$ permaneceram sem apresentar alteração significativa ($p > 0,05$) se comparado ao tempo zero, em todos os sistemas.

Figura 12 - Diâmetro médio de volume ($D_{4,3}$) das suspensões de nanocápsulas contendo vimopcetina armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.



(*) Diferença significativa em relação ao tempo inicial [ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$)].

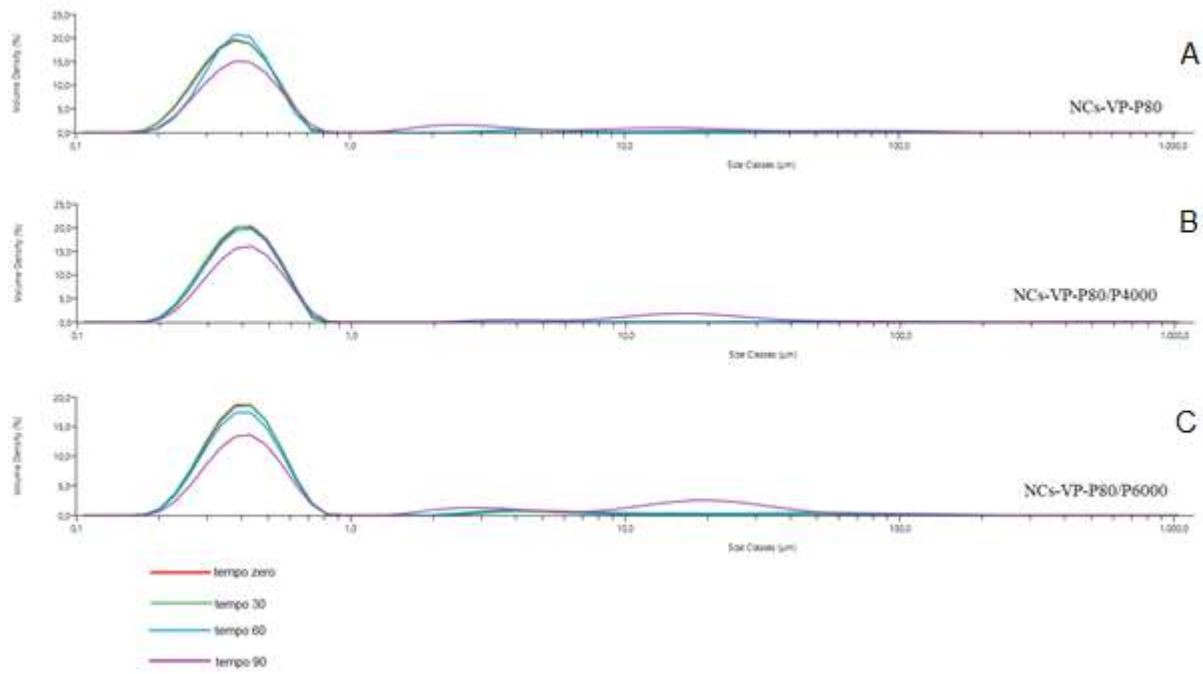
Figura 13 – Diâmetro médio de superfície ($D_{3,2}$) das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.



(*) Diferença significativa em relação ao tempo inicial [ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$)].

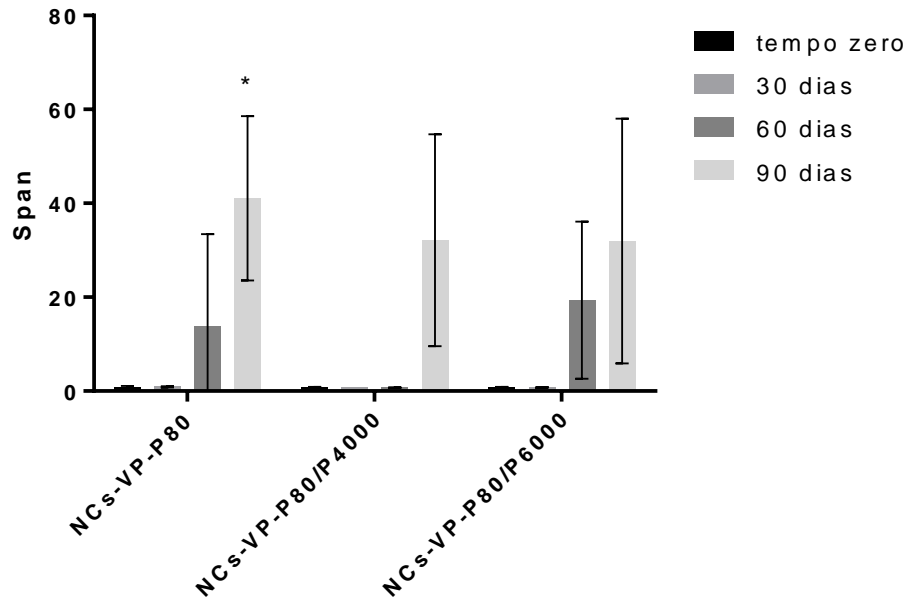
Na figura 14, pode-se notar a diferença nos gráficos, com a diminuição da população nanométrica e aumento de população na faixa micrométrica em 90 dias.

Figura 14 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas de um lote de cada uma das suspensões de nanocápsulas com sobreposição dos tempos 0, 30, 60 e 90 (linha roxa=90 dias).



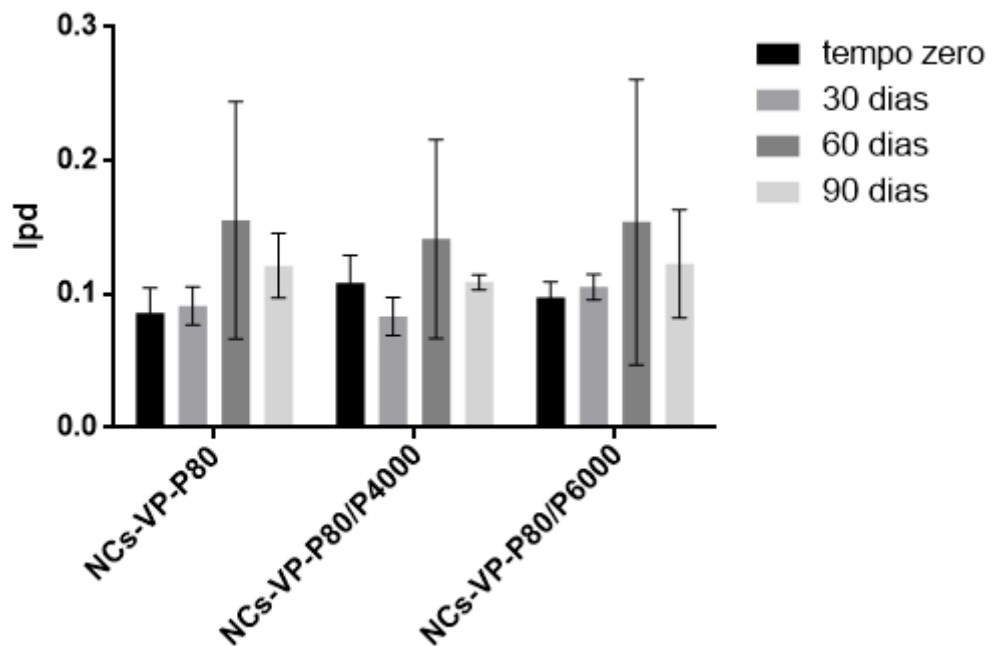
Quanto à avaliação da distribuição de tamanho através dos valores de span (figura 15), esses foram adequados até 30 dias para todos os grupos, visto que se encontram abaixo de 2,0 ($0,89 \pm 0,12$ para NCs-VP-P80, $0,72 \pm 0,01$ para NCs-VP-P80/P4000 e $0,77 \pm 0,06$ para NCs-VP-P80/P6000). Entretanto, houve aumento significativo aos 90 dias apenas para o grupo NCs-VP-P80 ($p < 0,05$), em relação ao tempo inicial, apesar de haver tendência ao aumento para todas as formulações, revelando inclusive altos valores de desvio padrão já após 60 dias para a maioria, corroborando com a presença de populações micrométricas acima relatada. Por sua vez, os valores de IPd demonstraram-se adequados visto que estão abaixo de 0,2 em todas as formulações desenvolvidas após os 90 dias de armazenamento (figura 16).

Figura 15 – Valores de span das suspensões de nanocápsulas contendo vimopcetina armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.



(*) Diferença significativa em relação ao tempo inicial.

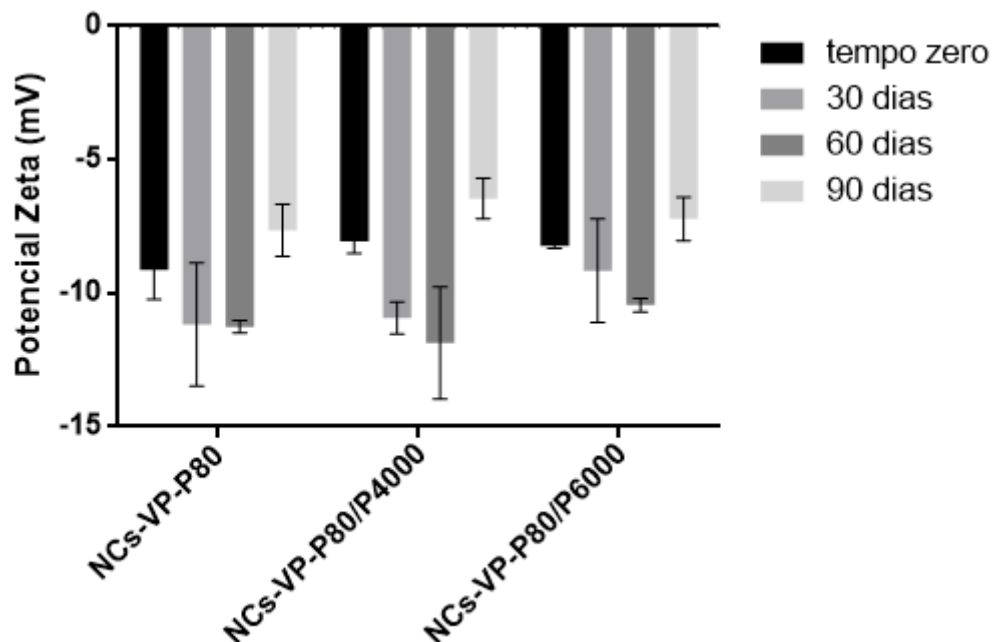
Figura 16 – Índices de polidispersão (IPd) das suspensões de nanocápsulas contendo vimopcetina armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata



A divergência de resultados quanto ao comportamento das formulações em função do tempo, em relação aos valores de diâmetros médios e de distribuição de tamanho (IPd e span), ocorre devido às diferentes metodologias de análise e seus princípios, sendo que a difração a laser (Mastersizer®) é capaz de verificar uma faixa de leitura granulométrica maior, como mencionado anteriormente, em comparação com o espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer®). Esses resultados reforçam a importância da análise por difração a laser, para adequado acompanhamento do perfil granulométrico dos sistemas coloidais durante os estudos de estabilidade.

O potencial zeta apresenta relação direta com a estabilidade das formulações, pois a diminuição do potencial, em módulo, pode favorecer a agregação das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003a). A figura 17 demonstra os valores encontrados durante os 90 dias de armazenamento. Não houve diferença significativa nos valores de potencial zeta ($p > 0,05$) entre o tempo inicial e após 90 dias de armazenamento para todas as formulações.

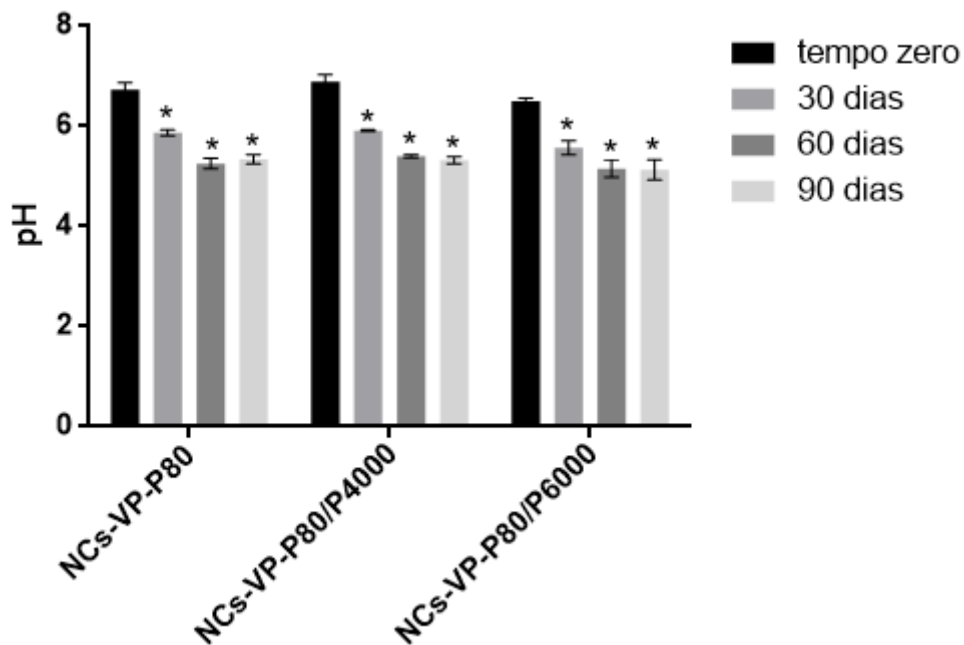
Figura 17 – Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata



A variação de pH em função do tempo está demonstrada na figura 18, onde percebe-se que ocorreu uma diminuição significativa deste parâmetro, em todos os

tempos ($p < 0,05$), durante o armazenamento, independentemente da composição da formulação. O declínio de pH observado nas suspensões pode estar relacionado com a hidrólise do polímero, o PCL, gerando ácido ϵ -hidroxicapróico livre (CALVO et al., 1996) ou devido ao relaxamento das cadeias poliméricas de PCL, que então levaria a uma maior exposição de grupos carboxílicos terminais (RIGO et al., 2015).

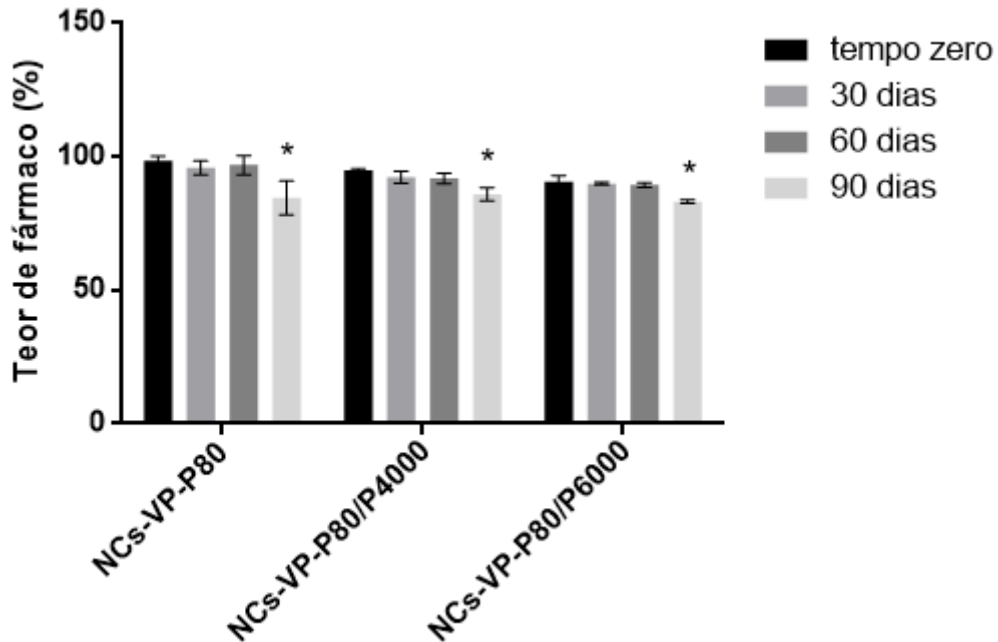
Figura 18 – Valores de pH das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.



(*) Diferença significativa em relação ao tempo inicial.

O teor de fármaco mostrou-se estável até 60 dias (figura 19), com valor próximo ao teórico (0,5 mg/mL), sem diferença significativa em relação ao tempo zero nas formulações analisadas ($p > 0,05$), havendo, entretanto, queda significativa após 90 dias de armazenamento para todas as suspensões ($p < 0,05$).

Figura 19 - Teor total de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas armazenadas por 90 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.



(*) Diferença significativa em relação ao tempo inicial. ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$).

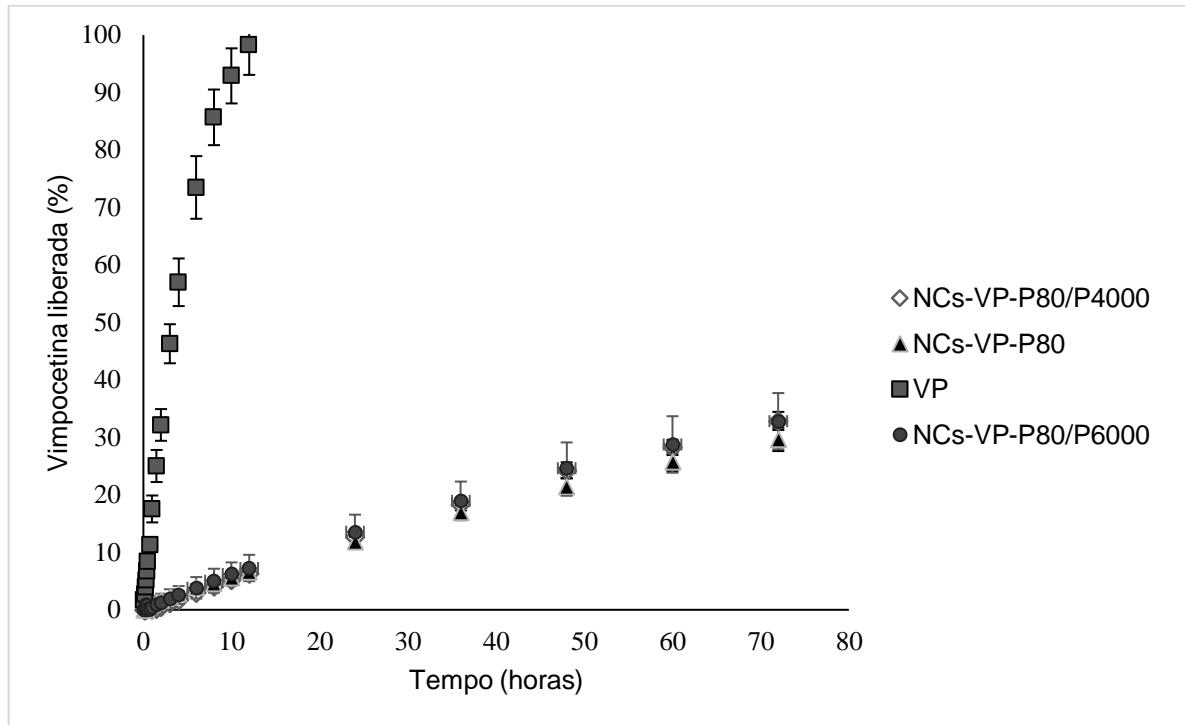
5.3 ESTUDO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA VIMPOCETINA A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

A cinética de liberação *in vitro* da vimpocetina, a partir das suspensões de nanocápsulas, foi realizada através do método de difusão em sacos de diálise, a uma temperatura de 37°C, em meio tampão fosfato pH 7,4 e etanol (70:30), sob agitação constante, por 72 horas, para as suspensões de nanocápsulas, e 12 horas para a solução metanólica de fármaco livre (0,5 mg/mL), sendo respeitada, em todo o experimento, a condição *sink*, garantindo o processo de difusão da vimpocetina no meio de liberação estudado. O método utilizado apresentou-se específico, ou seja, o meio de liberação não interferiu na quantificação da vimpocetina. Além disso, o método mostrou-se linear na faixa de concentração de 0,0625 a 3,0 $\mu\text{g/mL}$ (ANOVA, $p < 0,05$), com coeficiente de correlação de 0,9999 e equação da reta $y = 102.336x + 248$, obtida a partir de 3 curvas analíticas.

Conforme pode ser observado na figura 20, as suspensões de nanocápsulas controlaram a liberação do fármaco, quando comparadas à solução metanólica de fármaco livre, sendo que o último completou a sua difusão em cerca de 12 horas. Por outro lado, as nanocápsulas, em 72 horas, liberaram $29,65 \pm 2,02\%$ (NCs-VP-P80), $32,87 \pm 1,57\%$ (NCs-VP-P80/P4000) e $32,82 \pm 4,89\%$ (NCs-VP-P80/P6000) de fármaco, evidenciando a liberação significativamente mais lenta da vimpocetina ($p < 0,05$). Este resultado corrobora com nanocápsulas preparadas com PCL, pois é um polímero com cristalinidade, por consequência, apresenta maior tortuosidade se comparado a outros polímeros amorfos, o que leva a uma diminuição na velocidade de liberação do fármaco estudado (POHLMANN et al., 2013). No caso das nanocápsulas, sendo de núcleo lipídico, devido ao uso do tensoativo monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) disperso em TCM, o núcleo também poderia contribuir por ser mais viscoso, diferentemente das nanocápsulas de núcleo oleoso convencionais, em que apresentariam, usualmente, somente a barreira do polímero para realizar a difusão do ativo. Além disso, ressalta-se que houve a formação de cristais no saco de diálise, nas formulações de nanocápsulas, ao final do tempo de experimento, não sendo viável a continuação do mesmo.

Um estudo realizado por Rigo e colaboradores (2014), utilizando monoestearato de sorbitano e diferentes óleos como núcleo de nanocápsulas poliméricas de PCL, verificou que há uma correlação entre o índice de consistência do núcleo lipídico (óleo/monoesterato de sorbitano) e a velocidade de liberação do fármaco, de maneira que quanto maior este índice, maior também foi o controle de liberação. No trabalho de Rosa (2017), suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimpocetina (TCM ou óleo de abacate; P80 e Span 60) liberaram cerca de 45-50% de fármaco após 72 h de experimento, empregando o mesmo protocolo, quando as concentrações de polímero e óleo foram a metade das usadas no presente trabalho. Já o resultado para o fármaco livre foi semelhante (difusão completa em 14 h).

Figura 20 - Perfis de liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das diferentes nanocápsulas (NCs-VP-P80, NCs-VP-P80/P4000 e NCs-VP-P80/P6000), em comparação à difusão do fármaco livre (VP). Resultados expressos em média \pm DP (n=3)



A modelagem matemática dos dados foi realizada e o modelo que melhor descreveu o comportamento de liberação foi o monoexponencial (equação 4), pois apresentou um coeficiente de correlação (r) adequado, alto critério de seleção do modelo (MSC) e coerente ajuste gráfico (figura 21; tabela 4), para todas as formulações. O modelo monoexponencial descreve a liberação do fármaco a partir das nanocápsulas em apenas um estágio, sem efeito *burst*, e, no caso desse experimento, isso se deve, provavelmente, à hidrofobicidade da vimpocetina, que ficaria retida no núcleo dos coloides, corroborando com a alta eficiência de encapsulamento obtida nos sistemas desenvolvidos (<99%).

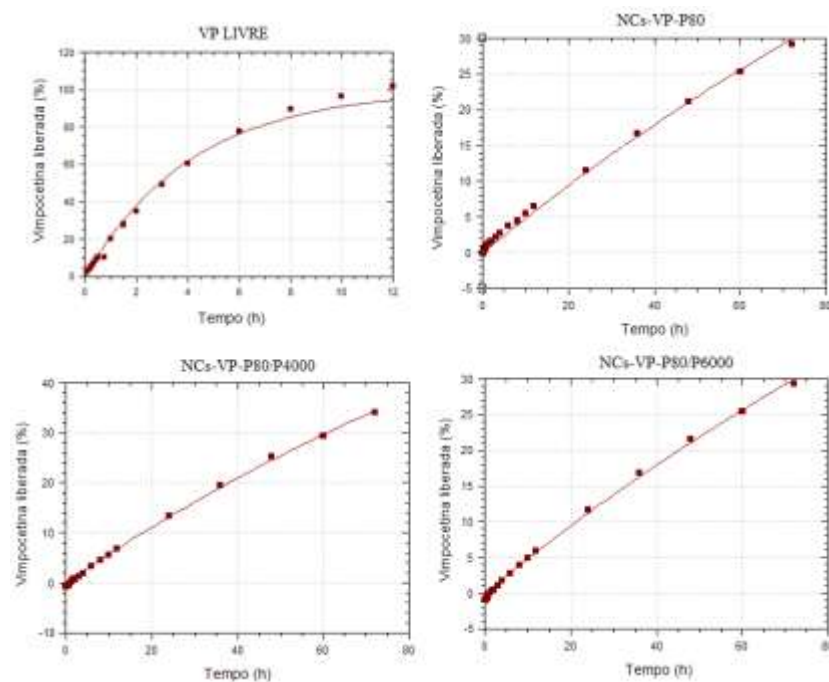
A meia-vida de liberação foi calculada a partir dos valores de k , que demonstrou não apresentar diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações testadas, estando entre 123 a 138 horas, enquanto que a meia-vida de difusão do fármaco livre foi de 3,2 horas (tabela 4). A constante de velocidade de liberação (k) não diferiu significativa ($p > 0,05$) entre as formulações testadas, indicando que a presença do PEG não

influenciou o perfil de cedência da vimpocetina a partir das nanocápsulas de núcleo lipídico.

Tabela 4 - Parâmetros calculados através do modelo monoexponencial e Lei da Potência para as nanocápsulas contendo vimpocetina e solução de fármaco livre (n=3)

	NCs-VP-P80	NCs-VP-P80/P4000	NCs-VP-P80/P6000	VP LIVRE
Monoexponencial				
r	0,9972 ± 0,0010	0,9970 ± 0,0004	0,9945 ± 0,0024	0,9967 ± 0,0014
MSC	5,3950 ± 0,3721	5,4071 ± 0,1521	4,7992 ± 0,4848	4,9123 ± 0,5202
k (h ⁻¹)	0,0050 ± 0,0004	0,0056 ± 0,0003	0,0058 ± 0,0012	0,2167 ± 0,0268
t _{1/2} (h)	138,16 ± 10,91	124,38 ± 7,70	123,55 ± 23,95	3,23 ± 0,42
Lei da Potência				
r	0,9998 ± 0,0000	0,9986 ± 0,0001	0,9981 ± 0,0001	-
a	0,0294 ± 0,0022	0,0186 ± 0,0011	0,0263 ± 0,0120	-
n	0,8260 ± 0,0186	0,9383 ± 0,0141	0,8712 ± 0,0995	-

Figura 21 – Ajustes gráficos do modelo monoexponencial considerando os dados de liberação da vimpocetina, a partir das nanocápsulas em relação ao fármaco livre



O mecanismo de liberação do fármaco a partir das suspensões de nanocápsulas poliméricas foi avaliado empregando a Lei da Potência (Korsmeyer-

Peppas). Este modelo é simples, utilizado para a análise de formas farmacêuticas poliméricas e relaciona exponencialmente a liberação do ativo com o tempo, muito utilizado quando o mecanismo não é conhecido ou quando ocorre mais de um fenômeno de liberação (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Esses processos, para sistemas de liberação esféricos, podem ser classificados de acordo com o expoente (n) que caracteriza o mecanismo como difusão Fickiana (caso I) ou Não-Fickiana (transporte anômalo ou caso II). O caso I ocorre quando o n é inferior a 0,43, o transporte anômalo acontece quando o valor de n encontrado é maior ou igual a 0,43 e inferior a 0,85, e, por último, o caso II ocorre para valores de n maiores ou iguais a 0,85 (RITGER; PEPPAS, 1987).

Como descrito na tabela 4, os valores de n obtidos, neste estudo, demonstram que a liberação da vimpocetina apresentou um comportamento anômalo na formulação de nanocápsulas revestidas apenas com P80, demonstrando, então, que o sistema depende da erosão ou relaxamento do polímero seguido pela difusão do princípio ativo, enquanto que as nanocápsulas revestidas com P80 e PEG apresentaram comportamento caso II, onde a liberação do fármaco está relacionada aos fenômenos de intumescimento (relaxamento) do gel, envolvendo a transição de um estado semirrígido a outro mais flexível (BOLSON, 2015; RITGER; PEPPAS, 1987). Esse fato pode estar, provavelmente, associado ao possível aumento da interação com o solvente (água) em função da presença das cadeias altamente hidrofílicas do PEG. No entanto, esse comportamento não resultou na modificação da cinética de liberação, *in vitro*, em comparação com as formulações sem PEG, o que poderia, talvez, relacionar-se ao aumento da viscosidade também promovido pelo mesmo.

Em 2015, Bolson realizou um estudo com nanocápsulas de etilcelulose contendo vimpocetina (1,0 mg/mL) e óleo de coco como núcleo, verificando que o mecanismo de liberação do fármaco a partir dos sistemas nanoestruturados foi do tipo anômalo, no entanto, as mesmas nanocápsulas produzidas com TCM apresentaram transporte caso II. Essa diferença foi, em hipótese, correlacionada com a pequena tendência ao inchamento do polímero (filmes macroscópicos) pelo TCM, fato que não ocorreu com o óleo de coco. Pinheiro (2016) utilizou etilcelulose, óleo de coco ou TCM para produzir nanocápsulas, porém, mais concentradas (3 mg/mL de vimpocetina), e o mecanismo de liberação foi o transporte anômalo. Rosa (2017) desenvolveu nanocápsulas de vimpocetina utilizando óleo de abacate ou TCM como núcleo e PCL

como polímero e encontrou, novamente, o sistema anômalo como mecanismo de liberação.

Os resultados obtidos no estudo da cinética de liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das nanocápsulas de PCL, revestidas somente com P80 ou com P80/PEG, corroboram com a literatura, em que estudos vêm demonstrando a capacidade desses sistemas, de elevada área superficial, de controlar a liberação de diversos princípios ativos (CORADINI et al., 2014; LINDNER et al., 2015; SANTOS et al., 2014; ROSA, 2017; SAVIAN et al. 2015).

5.4 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS NANOCÁPSULAS, A PARTIR DOS LIOFILIZADOS, E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS SECOS

As suspensões de nanocápsulas foram liofilizadas, inicialmente, para a realização da análise da morfologia, a partir das formulações selecionadas, empregando MEV, técnica que requer a desidratação do sistema. A figura 22 mostra imagens de amostras das formulações NCs-VP-P80 e NCs-VP-P80/PEG6000 liofilizadas, sendo que, em aumentos menores (2.500 x; A e B), pode-se evidenciar a estrutura porosa dos liofilizados, o que é uma característica desse tipo de produto, como resultado da sublimação dos cristais de gelo, fato que favorece a reconstituição após a adição de solvente (água). Já em aumentos maiores, é possível observar a existência de partículas com morfologia próxima a de esferas (Figura 22 C,D,E e F), com tamanho coloidal, condizente com a faixa de diâmetro encontrada para as suspensões originais, mesmo após a operação de liofilização. As nanocápsulas podem ser melhor visualizadas na figura 23, em um aumento de 15.000 x.

Figura 22 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, a partir das suspensões de nanocápsulas, contendo vimopocetina, liofilizadas em diferentes aumentos (2.500 x; 5.000 x e 10.000 x)

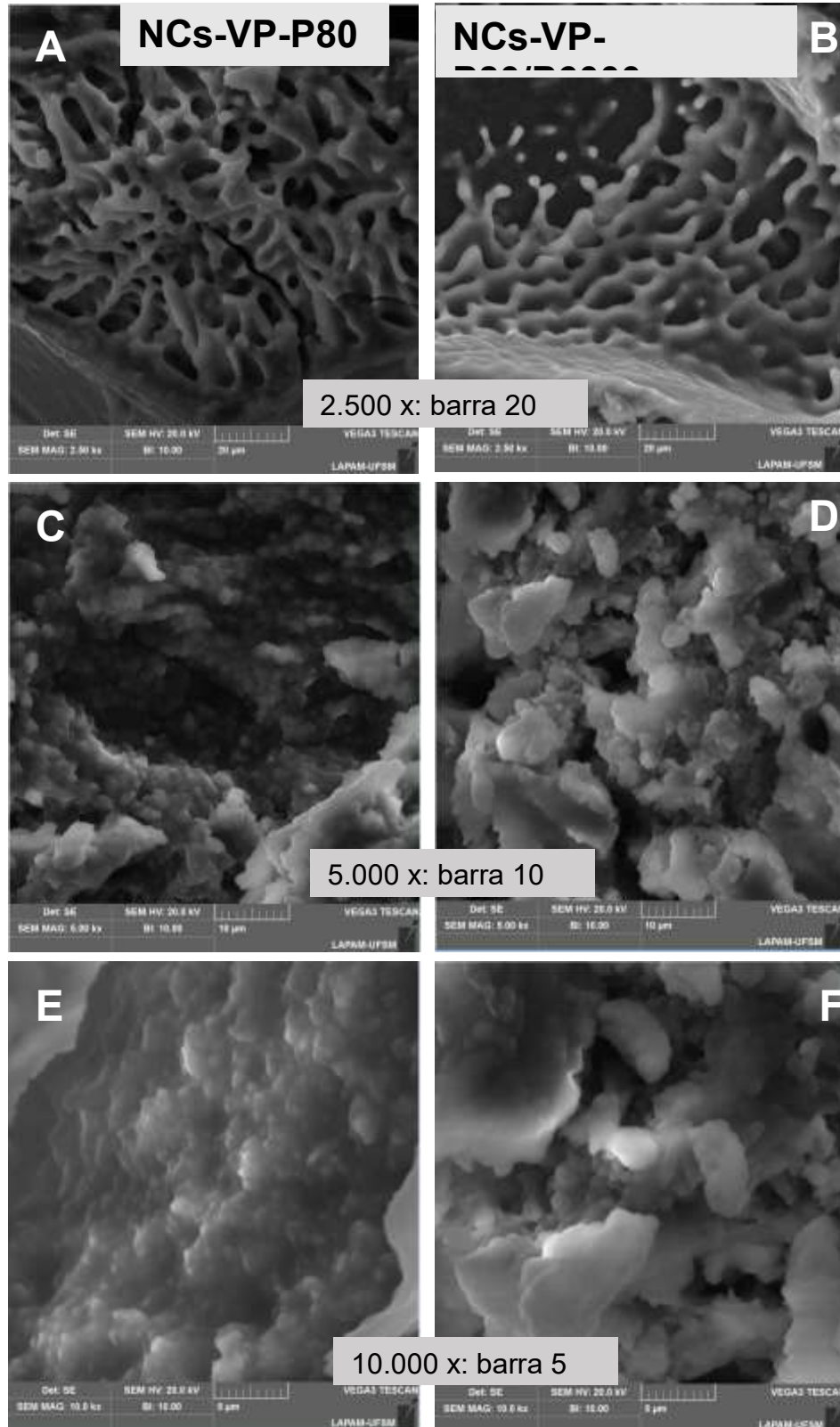
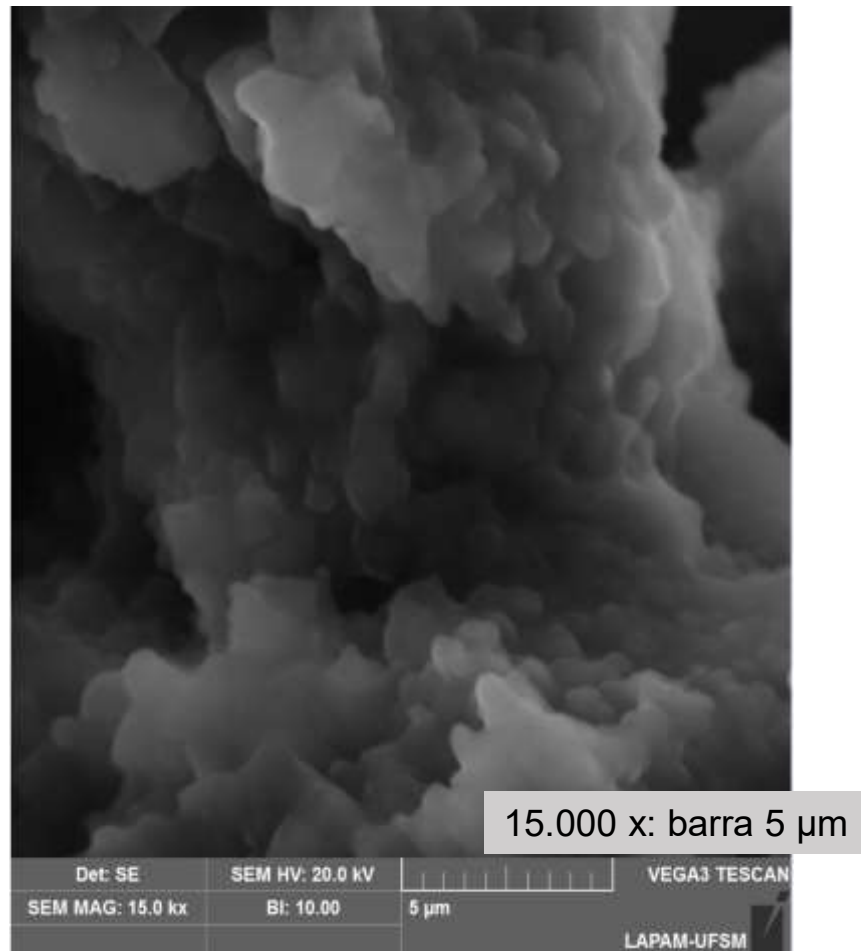


Figura 23 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura, a partir de suspensão de nanocápsulas liofilizada, contendo vimopocetina (NCs-VP-P80), observada em aumento de 15.000 X.



Em uma segunda etapa, verificou-se, então, a viabilidade tecnológica da obtenção de produtos secos redispersíveis, a partir dos liofilizados preparados com trealose a 10% e com as suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimopocetina desenvolvidas, sob as condições de congelamento/sublimação empregadas neste estudo. Isto seria vantajoso em função de que a transformação de sistemas coloidais líquidos em sólidos tende a conduzir ao aumento da aplicabilidade industrial devido ao potencial incremento da estabilidade (utilização extemporânea). Para esse tipo de secagem, é necessária a utilização de crioprotetores que apresentem boa capacidade de promover um espaçamento entre as partículas, dificultando a desestabilização das mesmas, e também a possível agregação, sobretudo devido ao congelamento (VAN WINDEN; TALSMA; CROMMELIN, 1998; DADPARVAR et al., 2014). Nesse estudo,

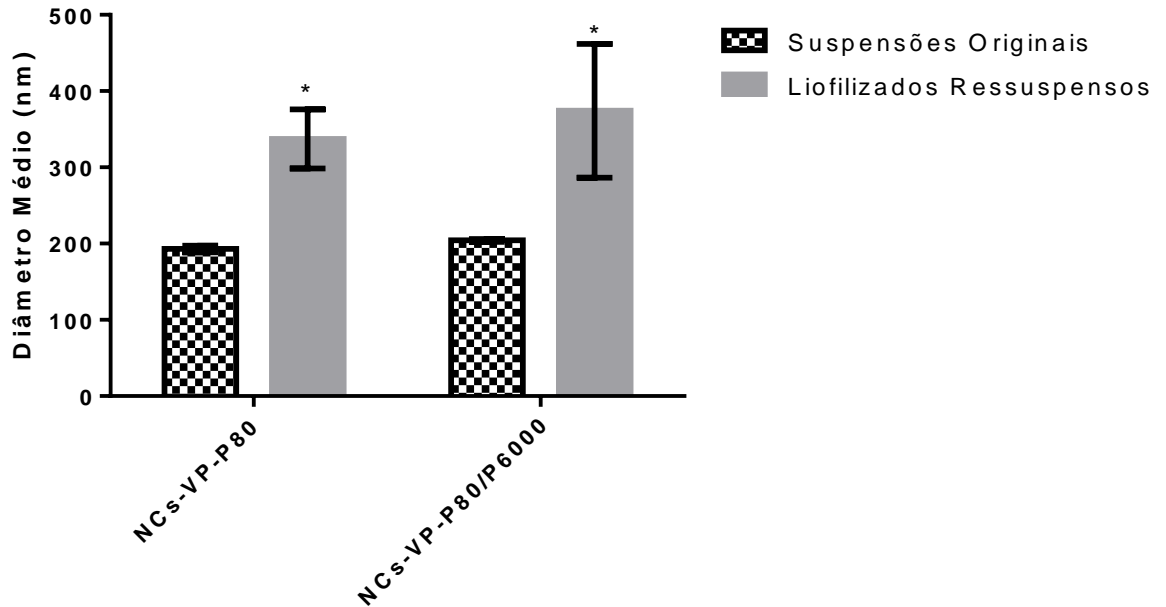
utilizou-se a trealose a 10% (p/v), que se caracteriza por ser um açúcar redutor, solúvel em água, utilizada em processos de liofilização por apresentar boas características crioprotetoras, usualmente na faixa de concentração de 5 a 10% (HIRSJÄRVI; PELTONEN; HIRVONEN, 2009; ALI; LAMPRECHT, 2014; BRENDLE, 2013; DADPARVAR et al., 2014). Em relação ao aspecto macroscópico dos pós liofilizados, estes apresentaram-se como sólidos aglomerados, sem odor, e de coloração branca, o que é bastante característico para esses sistemas (SCHAFFAZICK et al., 2003a; BAZYLINSKA et al., 2014; KUMAR; GOKHALE; BURGESS, 2014).

A liofilização pode alterar o tamanho das partículas após serem ressuspensas em água, principalmente na ausência de crioprotetores, ou pela inadequabilidade de concentração e/ou tipo destes. O índice de ressuspensão descreve a relação entre o diâmetro médio das partículas antes e após a liofilização, importante para verificar se houve alteração do sistema com esse processo. É ideal que o valor do índice seja próximo de 1,0, caso contrário, pode-se dizer que tenha ocorrido formação de agregados de partículas (CHACÓN et al., 1999). No presente trabalho, através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer[®]), foi determinado o diâmetro médio dos pós liofilizados, ressuspensos em água purificada/filtrados, e comparado com o diâmetro das suspensões de origem (tabela 5 e figura 23), indicando que os primeiros apresentaram tamanhos médios de partículas significativamente maiores após o processo de desidratação, mesmo empregando trealose a 10%. Os índices de ressuspensão não permaneceram muito próximos da unidade, sendo que a presença do PEG não alterou a ressuspensibilidade do sistema. Em relação às análises por difração a laser, verificou-se diâmetros médios micrométricos, confirmando a agregação do sistema após a liofilização.

Tabela 5 – Diâmetros médios das nanocápsulas liofilizadas, após ressuspensão (n=3), e índices de ressuspensão com base nas suspensões de origem.

Formulações	Diâmetro médio Zetasizer[®] (nm)	D_{4:3} Mastersizer[®] (µm)	IPd Zetasizer[®]	Span Mastersizer[®]	Índice de ressuspensão
NCs-VP-P80	337,30 ± 38,83	1,93 ± 0,42	0,39 ± 0,02	2,68 ± 0,11	1,74 ± 0,24
NCs-VP-P80/P6000	374,17 ± 87,85	2,03 ± 0,48	0,40 ± 0,07	2,265 ± 0,69	1,83 ± 0,44

Figura 24 - Diâmetro médio (Zetasizer®) das suspensões de nanocápsulas e das respectivas amostras liofilizadas, após a ressuspensão em água (n=3).

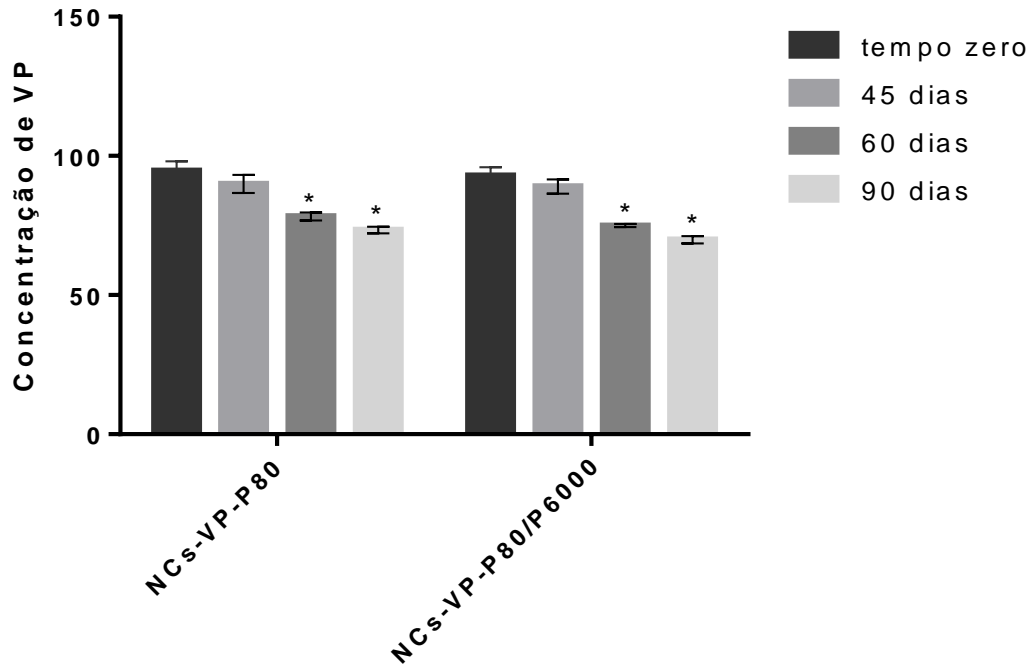


(*) Diferença significativa em relação à suspensão.

Quanto à quantificação da vimpocetina nos produtos secos (figura 24), o teor foi adequado, próximo ao valor teórico, tanto após o processo de liofilização quanto após 45 dias de armazenamento, sem diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às suspensões de origem. No entanto, após 60 dias, ocorreu uma redução significativa ($p < 0,05$) do teor de fármaco, o qual se manteve estável após os 90 dias do estudo, tanto para as formulações contendo somente P80 quanto para aquelas com PEG. Este fato, em hipótese, pode estar relacionado à dificuldade de extração da vimpocetina, a partir das amostras que se encontram aglomeradas.

Já no trabalho anterior do grupo (Bolson, 2015), os liofilizados preparados a partir de suspensões de nanocápsulas de etilcelulose contendo vimpocetina, obtidos também com trealose a 10%, apresentaram teor de fármaco estável após 90 dias de armazenamento e com adequado índice de ressuspensão em água, o qual foi dependente do peso molecular do polímero. Neste sentido, os liofilizados preparados, no presente estudo, com nanocápsulas de PCL com vimpocetina, não estão otimizados, tendo em vista sistemas extemporâneos, necessitando de mais estudos para a manutenção das características iniciais.

Figura 25 - Teor de vimpocetina nos liofilizados ressuspensos, contendo nanocápsulas, armazenados por 90 dias.



(*) Diferença significativa em comparação ao tempo inicial

5.5 ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A alteração na permeabilidade da BHE, devido à administração das nanoestruturas, foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Morrey et al., 2008 e Lenz et al., 2014. Para o estudo, foram escolhidas as suspensões de nanocápsulas revestidas com P80 e aquelas revestidas com P80 e P6000. As nanocápsulas preparadas com PEG 4000 não foram avaliadas por apresentarem características semelhantes às contendo PEG de maior peso molecular (6000), sendo também o último mais encontrado em citações literárias (VIEIRA et al, 2016; ROTMAN et al., 2015) considerando os sistemas nanoparticulados, reduzindo-se, neste sentido, o número de animais do experimento.

A BHE tem a função de proteger o sistema nervoso central, além de regular o transporte de substâncias endógenas, sendo um problema na liberação de fármacos, pois exerce controle na absorção, efluxo e metabolismo destas moléculas (GARCIA-

GARCIA, et al.; 2005; REIMOLD et al., 2008). A vimpocetina comprovadamente atravessa a BHE e apresenta efeito anticonvulsivante, em diferentes doses (a partir de 2 mg/Kg), quando administrado na forma livre, via i.p. em diferentes modelos animais (GÓMEZ; BUIJS; SITGES, 2014; NEKRASSOV; SITGES, 2008; SITGES et al., 2006) e através de sistemas carreadores de fármacos, como nanocápsulas (na dose de 5 mg/Kg) (ROSA, 2017).

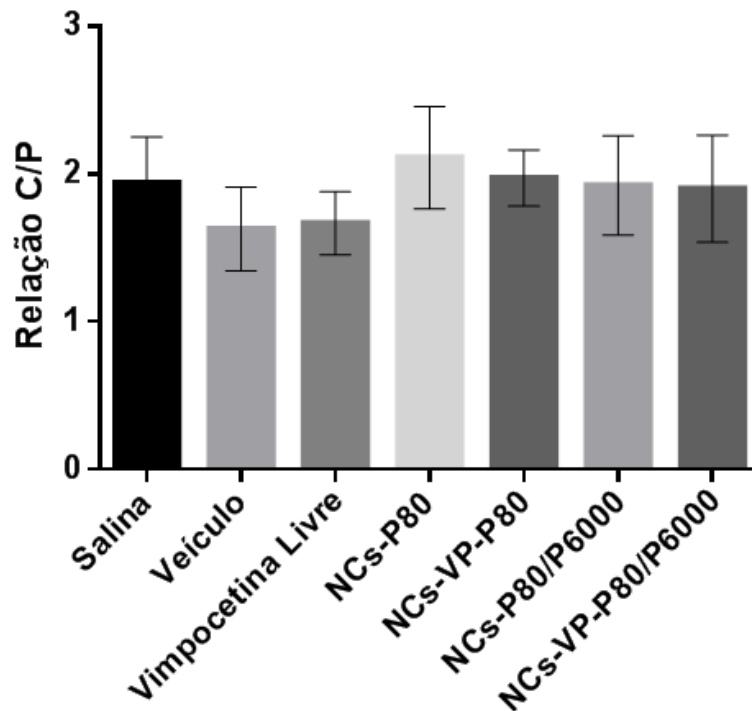
Alguns marcadores inertes são utilizados na pesquisa da integridade da BHE, são eles o azul de evans e a fluoresceína de sódio. Ambos são marcadores de baixo peso molecular com similares perfis lipofílicos (YEN et al., 2013). A fluoresceína de sódio é um fluoróforo, marcador de ruptura paracelular de BHE, que tem sido amplamente utilizada, em uma variedade de sistemas-modelo para avaliação da permeabilidade da BHE (ERDLENBRUCH et al., 2003; GUPTA et al., 1999; HATASHITA; HOFF 1990; HAWKINS; EGLETON, 2006; HOOPER et al., 2001; LENZ et al., 2014). No entanto, a fluoresceína é também um substrato para pelo menos dois grupos de transportadores expressos na BHE: proteínas de resistência a multidrogas (MRP) e transportadores de íons orgânicos (OAT) (SUN; MILLER; ELMQUIST, 2001). Portanto, a distribuição de fluoresceína no cérebro pode ser afetada tanto pela integridade das junções paracelulares quanto pela expressão/atividade desses transportadores. Embora a fluoresceína seja um substrato para transportadores de efluentes na BHE (HUAI-YUN et al., 1998; SUN; MILLER; ELMQUIST, 2001), a interrupção osmótica da BHE aumenta a permeabilidade à fluoresceína (HAWKINS; EGLETON, 2006), o que indica que a distribuição cerebral de fluoresceína pode ser aumentada através da abertura da rota paracelular.

O teste de passagem da fluoresceína sódica é bastante empregado para análise de permeabilidade à BHE em função de diferentes agentes, como mostra o estudo de Morrey e colaboradores (2008). Neste caso, a fluoresceína foi administrada via intraperitoneal, em ratos, para avaliar o potencial de alguns vírus em desestruturar a BHE, tornando-a mais permeável. Os soros e cérebros foram processados para análise.

No presente trabalho, empregou-se a fluoresceína como marcador para avaliar se a presença das nanoestruturas poderia alterar a permeabilidade cerebral, uma vez que, no estudo anterior do nosso grupo (ROSA, 2017), o nanoencapsulamento da vimpocetina favoreceu o seu efeito anticonvulsivante *in vivo* em relação ao fármaco livre, após administração intraperitoneal. Sendo assim, o grau

de permeabilidade da BHE foi medido a partir da porcentagem (m/v) de fluoresceína de sódio por grama de tecido cerebral por quantidade desta em 1 mL de plasma, após a administração, em camundongos, das suspensões de nanocápsulas contendo ou não vimpocetina ou dos controles do experimento.

Figura 26 - Relação entre a fluorescência detectada no cérebro, após perfusão, e no plasma (C/P), mediante a administração das suspensões de nanocápsulas, com ou sem vimpocetina, comparativamente aos controles (n=5-6).



Conforme os resultados (figura 26), não foi detectada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos testados em comparação com o grupo salina (controle negativo), considerando a relação entre a fluorescência detectada no cérebro após perfusão e a fluorescência detectada no plasma, indicando que a presença das nanocápsulas, contendo ou não vimpocetina, não foi capaz de alterar a permeabilidade da BHE, não causando, aparentemente, toxicidade para a mesma, segundo o protocolo realizado. O tipo de revestimento também não influenciou nessa relação. Estas evidências reforçam a hipótese de que as nanoestruturas podem aumentar a liberação cerebral de fármacos em função de endocitose mediada por receptores, e não devido à perturbação/abertura da BHE, sobretudo pela presença do tensoativo polissorbato 80 adsorvido à superfície (KREUTER, 2014). Os outros

grupos, a vimpocetina livre e seu veículo, também não alteraram a permeabilidade da barreira.

Lockman e colaboradores, em 2004, avaliaram, em cérebro de ratos perfundidos, a alteração da permeabilidade e integridade da BHE levando em consideração a carga de superfície de nanopartículas, administradas por infusão contínua. Dessa forma, foram preparadas três diferentes formulações, alterando o tensoativo (octadecil eicosaetileno glicol eter para nanopartículas neutras; octadecil eicosaetileno glicol eter e dodecil sulfato de sódio para as nanopartículas aniônicas; octadecil eicosaetilenoglicol eter e N-octadecil colina para as nanopartículas catiônicas), para que se obtivesse carga positiva ($97,2 \pm 68,9$ nm e $+45,2 \pm 3,5$ mV), carga negativa ($127,1 \pm 70,6$ nm e $-59,6 \pm 2,9$ mV) ou partículas próximas à neutralidade ($74,7 \pm 53,4$ nm e $-14,1 \pm 2,1$ mV). Os resultados demonstraram que as nanopartículas preparadas com tensoativos de carga próxima à neutralidade ou baixa concentração de tensoativo aniônico podem ser utilizadas de forma segura, enquanto que os tensoativos catiônicos apresentaram efeitos tóxicos na microvascularização do endotélio cerebral. O estudo informou, ainda, que baixas concentrações de tensoativos aniônicos aumentam a permeabilidade das partículas sem causar toxicidade.

Um estudo para avaliar a permeabilidade de nanoestruturas à BHE foi conduzido testando nanopartículas de poli(*n*-cianoacrilato de butila), contendo fluoresceína sódica e P80, via i.v em ratos. Elas apresentaram tamanho em torno de 120 nm, IPd de 0,20 e potencial zeta negativo (-10 mV). A fluorescência pôde ser detectada no tecido cerebral, confirmando a passagem das nanopartículas pela BHE, uma vez que a fluoresceína sódica, em sua forma livre, não é capaz de ultrapassar essa barreira (REIMOLD et al., 2008).

Kim e colaboradores, 2007, investigaram a distribuição intracelular e a via mediada por receptores de nanopartículas de poli(metoxipolietilenoglicol cianoacrilato-co-hexadecilo cianoacrilato) (PEG-PHDCA; 140 nm e -20 mV), em cultura de células endoteliais de cérebro de ratos. As nanopartículas PEG-PHDCA foram transportadas através da BHE devido às porções de PEG adicionadas à cadeia de poli(alquil cianoacrilato). Conforme demonstrado pelo fracionamento celular e microscopia confocal, as nanopartículas PEG-PHDCA foram internalizadas por endocitose, indicando claramente o envolvimento da via mediada pelo receptor LDL nesta absorção.

Rodrigues e colaboradores, 2016, realizaram um estudo com nanocápsulas de núcleo lipídico, contendo indometacina ou indometacina etil ester, produzidas com PCL, TCM e P80 como estabilizador, e avaliaram a capacidade das partículas em atravessar a barreira hematoencefálica e a possibilidade de causar alguma disfunção, usando o azul de Evans como marcador. A quantidade de azul de Evans no tecido cerebral, após a administração das nanocápsulas, foi semelhante à quantidade observada em animais tratados com solução salina, evidenciando que não houve a desestabilização da BHE frente à administração das nanocápsulas.

Rosa, em 2017, conforme anteriormente referido, desenvolveu nanocápsulas de PCL, preparadas com TCM, revestidas com P80, para a liberação cerebral de vimpocetina, visando avaliar o efeito anticonvulsivante *in vivo*. As nanocápsulas foram capazes de melhorar o efeito anticonvulsivante do fármaco em relação à vimpocetina livre ou ao veículo/nanoestruturas sem fármaco, em alguns parâmetros avaliados, sobretudo após o tratamento com a dose de 5 mg/kg de fármaco, administrada 30 minutos (via i.p.) antes da indução das convulsões por PTZ. Foi observado um aumento significativo na latência das crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas nos animais que receberam as nanocápsulas contendo vimpocetina em comparação àquelas sem fármaco ou à solução do mesmo (livre), além de redução da gravidade dos episódios convulsivos (escala de Racine) em comparação às nanoestruturas sem fármaco.

Assim, torna-se importante correlacionar esses resultados, baseados em efeito farmacológico, com aqueles obtidos no presente estudo, que reforçam dados de segurança associados ao uso de nanocápsulas de PCL/TCM, revestidas com P80 ou P80/PEG, visando à liberação cerebral de vimpocetina, sendo, portanto, sistemas promissores para a liberação controlada desse fármaco altamente lipofílico.

6 CONCLUSÃO

A preparação de nanocápsulas de PCL para veiculação de vimpocetina, em uma concentração de 0,5 mg/mL, empregando P80 ou P80/PEG como estabilizantes/revestimentos, através do método de deposição interfacial, foi viável. As suspensões apresentaram características físico-químicas adequadas, após a preparação, com teor acima de 95%, elevada eficiência de encapsulamento, tamanho adequado para administração parenteral (cerca de 200 nm), com uma distribuição unimodal. O tipo de revestimento/estabilizante (somente P80 ou P80/PEG e o peso molecular do PEG) não influenciou as características físico-químicas das nanocápsulas de PCL contendo vimpocetina, com exceção da viscosidade relativa, em que a presença/peso molecular do PEG na superfície das partículas tendeu a aumentar esse parâmetro.

As nanocápsulas demonstraram a propriedade de controlar a liberação do fármaco em comparação à vimpocetina livre, sem efeito *burst*, seguindo cinética de primeira ordem, sendo que a composição influenciou o mecanismo de liberação, mas não a velocidade. Desta forma, a liberação da vimpocetina, a partir das nanocápsulas, foi baseada no transporte anômalo para aquelas revestidas apenas de P80 e em transporte caso II para as revestidas de P80/PEG.

A estabilidade das formulações demonstrou-se adequada para o seguimento dos experimentos. As suspensões de nanocápsulas foram estáveis por 60 dias após a preparação, ocorrendo decaimento no teor e aumento significativo do tamanho de partículas após 90 dias de armazenamento, sem influência da presença ou não de PEG. Diferença de comportamento foi observada dependendo da técnica empregada para a análise granulométrica.

Através da microscopia eletrônica dos liofilizados, as nanocápsulas contendo vimpocetina mostraram-se esféricas e com diâmetro coloidal. Esses produtos secos, obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas, adicionando-se trealose a 10% como crioprotetor, apresentaram teor de vimpocetina adequado após a preparação, assim permanecendo até 45 dias de armazenamento. No entanto, os liofilizados não apresentaram boa ressuspensão em água e houve queda significativa no teor de fármaco após 60 dias da preparação, havendo necessidade de mais estudos para a otimização dos mesmos.

A avaliação *in vivo*, frente à administração (i.p) das formulações de nanocápsulas de PCL (Mn 10.000), contendo ou não vimpocetina, demonstrou que não houve perturbação da BHE, de acordo com os testes realizados, utilizando fluoresceína como marcador. Esses resultados reforçam a hipótese de que as nanoestruturas poderiam aumentar a liberação cerebral de substâncias ativas em função de endocitose mediada por receptores, e não, por exemplo, devido à alteração/toxicidade na BHE gerada pelos sistemas. Estudos adicionais, como perspectivas desse trabalho, seriam relevantes, no sentido de avaliar a atividade anticonvulsivante da vimpocetina, em diferentes modelos, quando associada a nanocápsulas com P80 ou P80/PEG6000, visando verificar se poderiam influenciar o efeito farmacológico.

Por fim, em seu conjunto, este trabalho resultou em suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimpocetina, revestidas com P80 ou com P80 e PEG, consideradas promissoras para o tratamento alternativo futuro de distúrbios neurológicos, delineadas para liberação controlada deste fármaco.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery**, v. 58, p. 1688-1713, 2006.
- ALI, A.A.; EL-ZAITONY, A.S.; AL-HALEEM, E.N.A. Evaluation of Therapeutic Efficacy of Vinpocetine in Adjuvant Induced Arthritis Model in Rats. **Journal of Pain Management & Medicine**, v. 2, n. 3, 2016.
- ALI, M. E.; LAMPRECHT. A. Spray freeze drying for dry powder inhalation of nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 87, p. 510-517, 2014.
- 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.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira 5ª edição**, Brasília, DF Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- BADEA, G. et al. Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 18–24, 2015.
- BAZYLINSKA, U. et al. Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 442, p. 42-49, 2014.
- BEHERA, A.K.; BARIK, B.B.; JOSHI, S. Poli-ε-caprolactone based microspheres and nanospheres: a review. **FS Journal of Pharmacy Research**, v. 1, p. 38-45, 2012.
- BERNARDI, A. et al. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces *in vivo* glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v. 281, p. 53-63, 2009.
- BHOKARE, S. G. et al. Biodegradable polymer based nanoparticles: A novel approach. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 35, p. 43-52, 2015.
- BOLSON, S. N. **DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE NANOCÁPSULAS PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DO NEUROPROTETOR VIMPOCETINA**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- BONOCZK, P. et al. Role of sodium channel inhibition in neuroprotection: effect of vinpocetine. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 245-254, 2000.

BOOTZ, A. et al. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal Pharmaceutical and Biopharmaceutical**, v. 57, n. 2, p. 369-375, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017: Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017.

CAI, Y.; LI, J. D.; YAN, C. Vinpocetine attenuates lipid accumulation and atherosclerosis formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 434, n. 3, p. 439–443, 2013.

CALVO, F.; MANRESA, M.T. Citric acid salt of (+) vinpocetine. **US Patent, Covex S.A.**; Spain. 1988.

CHACÓN, M. et al. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. **Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 99-107, 1999.

CHARÃO, M.F. et al. Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonar cell line. **Mutation Reserch/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 784/785, p. 1-9, 2015.

CHIU, P.J. et al. Comparative effects of vinpocetine and 8-Br-cyclic GMP on the contraction and ⁴⁵Ca-fluxes in the rabbit aorta. **American Journal of Hypertension**, v. 1, p. 262–268, 1988.

CHO, E. J. et al. Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v, 10, p. 2093-2110, 2013.

CORADINI, K. et al. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their *in vitro* antioxidant effect. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, p. 178-185, 2014.

CORNFORD, E. M.; DIEP, C.; PARDRIDGE, W. M. Blood-brain barrier transport of valproico acid. **Journal of Neurochemistry**, v. 44, p. 1541-1550, 1985.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: A review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, p. 99-134, 2002.

COUVREUR, P.; FATTAL, E.; ANDREMONT, A. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 9, p. 1079-1086, 1991.

DADPARVAR, M. et al. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, p. 510-517, 2014.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DIMER, F. A. et al. Nanoencapsulation of olanzapine increases its efficacy in antipsychotic treatment and reduces adverse effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, p. 1137-1145, 2014.

DIMER, F. A. et al. Nanoencapsulation improves relative bioavailability and antipsychotic effect of olanzapine in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, p. 1482-1493, 2015.

DOMB, A.J. et al. Nanoparticles for Pharmaceutical Applications. **American Scientific Publishers**, v. 1, 2007.

dos SANTOS, P. P. et al. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 107, p. 1-11, 2015.

ELBARY, A. A. et al. Reversed phase liquid chromatographic determination of vinpocetine in humans plasma and its pharmacokinetic application. **Analytical Letters**, v. 35, p. 1041-1054, 2002.

EL-DAHMY, R.M. et al. Optimization of long circulating mixed polymeric micelles containing vinpocetine using simple lattice mixture design, *in vitro* and *in vivo* characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, p. 39-46, 2014.

ELTAYEB, M. et al. Electrosprayed nanoparticle delivery system for controlled release. **Materials Science and Engineering**, v. 66, p. 138-146, 2016.

ERDLLENBRUCH, B. et al. Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, p. 1201–1210, 2003.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FONTANA, M. C. et al. Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on *in vitro* antiproliferative activity of human breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 2979–91, 2014.

FRANK, L. A. et al. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **WIREs: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, p. 623-639, 2015.

FRICKER, G.; MILLER, D. S. Modulation of drug transporters at the blood-brain barrier. **Pharmacology**, v. 70, p. 169-176, 2004.

FRIEDRICH, R. B. et al. Tablets containing drug-loaded polymeric nanocapsules: an innovative platform. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 5885–5888, 2010.

FROZZA, R. L. et al. Neuroprotective effects of resveratrol against A β administration in rats are improved by lipid-core nanocapsules. **Molecular Neurobiology**, v. 47, p. 1066-1080, 2013.

GARCIA-GARCIA, E. et al. Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, p. 274-292, 2005.

GAYOSO, C. L. et al. Acute toxicity and anticonvulsant activity of liposomes containing nimodipine on pilocarpine-induced seizures in mice. **Neuroscience Letters**, v. 585, p. 38-42, 2015.

GÓMEZ, C. D.; BUIJS, R. M.; SITGES, M. The anti-seizure drugs vinpocetine and carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1 β and TNF- α expression in rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 130, p. 770-779, 2014.

GRANDT, R. et al. Vinpocetine pharmacokinetics in elderly subjects. **Arzneim.-Forsch/Drug Research**, v. 39, p.1599–1602, 1989.

GULYAEV, A. E. et al. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 16, p. 1564-1569, 1999.

GUPTA, A.; AGARWAL, R.; SHUKLA, G. S. Functional impairment of blood-brain barrier following pesticide exposure during early development in rats. **Human Experimental Toxicology**, v. 18, p. 174–179, 1999.

GUTERRES, S. S.; BENVENUTI, E. V.; POHLMANN, A. R. Nanopartículas poliméricas para administração de fármacos. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. DE (Eds.). **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: [s.n.]. p. 161–166.

GUTERRES, S.S. et al. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.113, p.57-63, 1995.

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**. Cap. 17, p. 247-264. São Paulo: Atheneu, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9ª edição. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1996.

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

HAWKINS, B. T.; EGLETON, R. D. Fluorescence imaging of blood-brain barrier disruption. **Journal Neuroscience Methods**, v. 151, p. 262–267, 2006.

HERRERA-MUNDO, N.; SITGES, M. Vinpocetine and α -tocopherol prevent the increase in DA and oxidative stress induced by 3-NPA in striatum isolated nerve endings. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, p. 233-240, 2013.

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.

HOOPER, D. C. et al. The Central Nervous System Inflammatory Response to Neurotropic Virus Infection Is Peroxynitrite Dependent. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 3470–3477, 2001.

HORVATH, B. et al. *In Vitro* Antioxidant Properties of Pentoxifylline, Piracetam, and Vinpocetine. **Clinical Neuropharmacology**, v. 25, n. 1, p. 37-42, 2002.

HTASHITA, S.; HOFF, J. T. Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 21, p. 582–288, 1990.

HUAI-YUN, H. et al. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, p. 816–220, 1998.

IANISKI, F. R. et al. Validation of high performance liquid chromatography method for determination of meloxicam loaded PEGylated nanocapsules. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 823-832, 2015.

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

INDEX, T. M. **THE MERCK INDEX an encyclopedia of chemical, drugs, and biological**. Disponível em: <<https://www.rsc.org/Merck/Index/monograph/m11458/vinpocetine?q=unauthorize>>. Acesso em: 08 set. 2017.

JAIN, A. et al. Surface engineered polymeric nanocarriers mediate the delivery of transferrin-methotrexate conjugates for an improved understanding of brain cancer. **Acta Biomaterialia**, v. 24, p. 140-151, 2015.

JINCAI, W. et al. Effects of vinpocetine and ozagrel on behavioral recovery of rats after global brain ischemia. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 661–663, 2014.

JORNADA, D. S. et al. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Royal Society of Chemistry**, v. 8, p. 6645-6655, 2012.

KANAZAWA, T. et al. Cell-penetrating peptide-modified block copolymer micelles promote direct brain delivery via intranasal administration. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 2130-2139, 2011.

KARPATI, E.; SZPORNY, L. General and cerebral haemodynamic activity of ethyl apovincamate. **Arzneimittel-Forschung**, v. 26, p. 1908-1912, 1976.

KATA, M.; LUKÁCS, M. Enhancement of solubility of vinpocetine base with cyclodextrin. **Pharmazie**, v. 41, p. 151–152, 1986.

KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry-90% of the published measurements are false. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, p. 150–63, 2008.

KIM, H. R. et al. Low-density lipoprotein receptor -mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 64, p. 356-364, 2007.

KONAN, Y.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 55, p. 233-239, 2002.

KREUTER, J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 71, p. 2-14, 2014.

KUMAR, S.; GOKHALE, R.; BURGESS, D. J. Sugars as bulking agents to prevent nano-crystal aggregation during spray or freeze-drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, p. 303-311, 2014.

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

LACHMAN, L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 1ª. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LENZ, Q. F. et al. Cysteinyl leucotriene receptor (cys1t) antagonists decrease pentylentetrazol-induced seizures and blood-brain barrier dysfunction. **Neuroscience**, v. 277, p. 859-871, 2014.

LEYVA-GÓMEZ, G. Nanoparticle formulation improves the anticonvulsant effect of clonazepam on the pentylentetrazole-induced seizures: Behavior and electroencephalogram. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 2509-2519, 2014.

LIN, C. et al. A novel oral delivery system consisting in “drug-in cyclodextrin-in nanostructured lipid carriers” for poorly water-soluble drug: Vinpocetine.

International Journal of Pharmaceutics, v. 465, p. 90–96, 2014.

LINDNER, G. R. et al. Improved neuroprotective effects of resveratrol-loaded polysorbate 80-coated poly(lactide) nanoparticles in MPTP-induced Parkinson.

Nanomedicine, v. 10, p. 1127-1138, 2015.

LIU, Z. et al. Lactoferrin-modified PEG-co-PCL nanoparticles for enhanced brain delivery of NAP peptide following intranasal administration. **Biomaterials**, v. 34, p. 3870-3881, 2013.

LOBATO, K.B.S. et al. Characterization and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3906-3912, 2013.

LOCKMAN, P. R. et al. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. **Journal of Drug Targeting**, v. 12, p. 635-641, 2004.

LOPALCO, A. Oxcarbamazepine-loaded polymeric nanoparticles: development and permeability studies across *in vitro* models of the blood-brain barrier and human placental trophoblast. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1985-1996, 2015.

LUO, Y. et al. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine’s oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 53-59, 2006.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na prevenção da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MASSERINI, M. Nanoparticles for brain drug delivery. **ISRN Biochemistry**, v. 2013, p. 1-19, 2013.

MEDINA, A. E. Vinpocetine as a potent antiinflammatory agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 9921–9922, 2010.

MERTSCH, K.; MAAS, J. Blood-brain barrier penetration and drug development from an industrial point of view. **Current Medicinal Chemistry – Central Nervous System Agents**, v. 2, p. 187-201, 2002.

MOLNAR, P.; ERDO, S. L. Vinpocetine is as potent as phenytoin to block voltage-gated Na⁺ channels in rat cortical neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 273, p. 303–306, 1995.

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

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

MORREY, J. D. et al. Increase blood-brain barrier permeability is not a primary determinant for lethality of West Nile virus infection rodents. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 467-473, 2008.

MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

NAIR, R. Formulation and evaluation of chitosan solid lipid nanoparticles of carbamazepine. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, p. 1-8, 2012.

NEKRASSOV, V.; SITGES, M. Vinpocetine inhibits the epileptic cortical activity and auditory alterations induced by pentylentetrazole in the guinea pig *in vivo*. **Epilepsy Research**, v. 60, p. 63-71, 2004.

NEKRASSOV, V.; SITGES, M. Comparison of acute, chronic and post-treatment effects of carbamazepine and vinpocetine on hearing loss and seizures induced by 4-aminopyridine. **Clinical Neurophysiology**, v. 119, p. 2608-2614, 2008.

NOGUEIRA, D. R. Inclusion of a pH-responsive amino acid-based amphiphile in methotrexate-loaded chitosan nanoparticles as a delivery strategy in cancer therapy. **Amino Acids**, v. 48, p. 157-168, 2016.

OURIQUE, A. F. et al. Redispersible liposomal-N-acetylcysteine powder for pulmonary administration: Development, *in vitro* characterization and antioxidant activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, p. 174–182, 2014.

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

PATEL, M.M. et al. Getting into the Brain: Approaches to Enhance Brain Drug Delivery. **CNS Drugs**, v.23, p.35-58, 2009.

PATYAR, S. et al. Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases. **Pharmacological Reports**, v. 63, p. 618-628, 2011.

PEREIRA, C. et al. Estratégias de neuroprotecção: efeito da vimpocetina em modelos *in vitro* de estresse oxidativo. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p. 401-406, 2003.

PINHEIRO, G. P. **DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE VIMPOCETINA ASSOCIADA A NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

POHLMANN, A. R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 10, p. 623-638, 2013.

PRAKHABAR, K. et al. Tween 80 containing lipid nanoemulsion for delivery of indinavir to brain. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3 (5), p. 345-353, 2013.

RAO, G. C. S.; KUMAR, M. S.; MATHIVANAM, N.; RAO, M. B. E. Nanosuspensions as the most promising approach in nanoparticles drug delivery systems. **Pharmazie**, v. 59, p. 5-9, 2004.

REIMOLD, I. et al. Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 627-632, 2008.

RIBEIRO, L. S. S.; FERREIRA, D. C.; VEIGA, F. J. B. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 253-266, 2003.

RIBEIRO, L.; FERREIRA, D. C.; VEIGA, F. J. B. *In vitro* controlled release of vinpocetine – cyclodextrin – tartaric acid multicomponent complexes from HPMC swellable tablets. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 325–339, 2005.

RIGO, L. A. et al. Influence of the type of vegetable oil on the drug release profile from lipid-core nanocapsules and *in vivo* genotoxicity study. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 7450, p. 789–798, 2014.

RIGO, L. A. et al. Nanoencapsulation of rice brain oil increase its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 11-17, 2015.

RITGER, P. L; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 23-36, 1987.

RODRIGUES, S. F. et al. Lipid-core nanocapsules act as a drug shuttle through the blood brain barrier and reduce glioblastoma after intravenous or oral administration. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, p. 986-1000, 2016.

RONEY, C. et al. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease, **Journal of Controlled Release**, v. 108, p. 193-214, 2005.

ROSA, C. P. **NANOCÁPSULAS DE POLI(ϵ -CAPROLACTONA) CONTENDO VIMPOCETINA: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

ROTMAN, M. et al. Enhanced glutathione PEGylated liposomal brain delivery of an anti-amyloid single domain antibody fragment in a mouse model for Alzheimer's disease. **Journal of Controlled Release**, v. 2013, p. 40-50, 2015.

RUIZ-MIYAZAWA, K. W. et al. Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress, cytokines and NF- κ B. **Chemico-Biological Interactions**, v. 237, p. 9–17, 2015.

SAEZ, M. et al. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 379-387, 2000.

SANTOS, S. S. et al. Formulation and *in vitro* evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270–276, 2014.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, p. 726-737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S.R. et al. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 56, 501-505, 2003b.

SAVIAN, A. L. et al. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the *in vitro* irritation potential of this drug. **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems (Print)**, v. 46, p. 69-76, 2015.

SINHA, V.R. et al. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

SITGES, M.; ALDANA, B. R.; REED, R. C. Effect of the anti-depressant sertraline, the novel anti-seizure drug vinpocetine and several conventional antiepileptic drugs on the epileptiform EEG activity induced by 4-aminopyridine. **Neurochemical Research**, v 41, p. 1365-1374, 2016.

SITGES, M.; CHIU, L.M.; NEKRASSOV, V. Single and combined effects of carbamazepine and vinpocetine on depolarization-induced changes in Na⁺, Ca²⁺ and glutamate release in hippocampal isolated nerve endings. **Neurochemistry International**, v. 49, p. 55-61, 2006.

SITGES, M.; CHIU, L.M.; REED, R. C. Effects of levitiracetam, carbamazepine, phenytoin, valproate, lamotrigine, oxcarbazepine, topiramate, vinpocetine and sertraline on presynaptic hippocampal Na⁺ and Ca⁺ channels permeability. **Neurochemical Research**, v. 41, p. 758-769, 2015.

SITGES, M.; NEKRASSOV, V. Vinpocetine prevents 4-aminopyridine-induced changes in the EEG the auditory brainstem responses and hearing. **Clinical Neurophysiology**, v. 115, p. 2711-2717, 2004.

SITGES, M. et al. Vinpocetine inhibits glutamate release induced by the convulsive agente 4-aminopyridine more potently than several antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 96, p. 257-266, 2011.

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

SOUZA, S. D. A Review of *In Vitro* Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances in Pharmaceutics**, n. 304757, p. 1–12, 2014.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 201-230, 2004.

SUN, H.; MILLER, D. W.; ELMQUIST W. F. Effect of probenecid on fluorescein transport in the central nervous system using in vitro and in vivo models. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 1542–1549, 2001.

TAN, S. F. et al. Ultrasonic emulsification of parenteral valproic acid-loaded nanoemulsion with response surface methodology and evaluation of its stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 299-308, 2016.

TERROSO, T. F. et al. *In vivo* prophylactic gastroprotection using α - bisabolol encapsulated in lipid-core nanocapsules and in cocoa-theospheres. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 36, p. 99-109, 2016.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. (Eds.). Nanoparticulate drug delivery systems. **Informa Healthcare USA**, cap.1, 2007.

TOMA, H. E.; ARAKI, K. O gigantesco e promissor mundo do muito pequeno. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 37, n. 217, p. 25, 2005.

TOSI, G. et al. Polymeric nanoparticles for the drug delivery to the central nervous system. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, p.155-174, 2008.

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.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200-208, 2011.

VIEIRA, S. M. et al. A surface modification os clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: A study os formulation development and biological assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 748-756, 2016.

WANG, Y. et al. A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 424, p. 98–106, 2012.

WEISS, C. K.; KOHNLE, M. V.; LANDFESTER, K.; HAUKE, K.; FISCHER, D.; SCHMITZ-WIENKE, J.; MAILANDER, V. The first step into the brain: uptake of NIO-PBCA nanoparticles by endothelial cells *in vivo*, and direct evidence for their blood-brain barrier permeation. **ChemMedChem**, v. 3, p. 1395-1403, 2008.

WILSON, B. et al. Albumin nanoparticles for the delivery of gabapentin: Preparation, characterization and pharmacodynamics studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, p. 73-79, 2014.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456–469, 2011.

XIN, H. et al. Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma. **Biomaterials**, v. 32, p. 4293-4305, 2011.

XU, H. et al. Optimized preparation of vinpocetine proliposomes by a novel method and *in vivo* evaluation of its pharmacokinetics in New Zealand rabbits. **Journal of Controlled Release**, v. 140, p. 61-68, 2009.

YANG, Y. J. et al. Effect of sodium dodecylsulfate monomers and micelles on the stability of aqueous dispersions of titanium dioxide pigment nanoparticles against agglomeration and sedimentation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 450, p. 434-445, 2015.

YEN, L. F. et al. Distinct patterns of cerebral extravasation by Evans Blue and Sodium Fluorescein in rats. *Plos One*, 8(7): e68595, 2013.

YUSUF, M. et al. Plausible antioxidant biomechanics and anticonvulsant pharmacological activity of brain-targeted β -carotene nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4311-4322, 2012.

ZHANG, T.; MUROWCHICK, J.; YOUAN, B.C. Optimization of formulation variables affecting spray-dried oily core nanocapsules by response surface methodology. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.100, n.3, p. 1031-1044, 2011.

ZHUANG, C. Y. et al. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 394, p. 179-185, 2010.