

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

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE
NANOCÁPSULAS PARA A LIBERAÇÃO
CONTROLADA DO NEUROPROTETOR
VIMPOCETINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sabrina Negrini Bolson

Santa Maria, RS, Brasil

2015

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE NANOCÁPSULAS PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DO NEUROPROTETOR VIMPOCETINA

Sabrina Negrini Bolson

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

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

Santa Maria, RS, Brasil

2015

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

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

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE NANOCÁPSULAS PARA
A LIBERAÇÃO CONTROLADA DO NEUROPROTETOR
VIMPOCETINA**

elaborada por
Sabrina Negrini Bolson

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Ana Luiza Maurer da Silva, Dr.^a (UNISINOS)

Letícia Cruz, Dr.^a (UFSM)

Santa Maria, 27 de maio de 2015.

Dedico esta realização à minha família, em especial aos meus pais, João e Carmen, meus alicerces, que foram essenciais para vencer essa etapa. Agradeço pelo apoio, carinho, dedicação e por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela maior de todas as oportunidades que é o dom da vida, por me dar força para prosseguir e superar todos os momentos difíceis e por ter me concedido o privilégio de conviver e aprender com pessoas tão especiais.

Aos meus pais, João e Carmen, pelo apoio, carinho, amor, paciência, amizade e confiança; por contribuírem para minhas conquistas pessoais e profissionais, e principalmente pelos valores de vida que me ensinaram com tanta sabedoria e amor.

À minha orientadora, Prof^a. Dr.^a Scheila Rezende Schaffazick, primeiramente pela oportunidade de aprendizado concedida, por me introduzir com muita dedicação no mundo das nanopartículas, pela paciência em esclarecer minhas dúvidas, e acima de tudo, por ter compartilhado comigo sua experiência e conhecimentos científicos e pela sua amizade.

À farmacêutica Aline Velasquez, pela amizade e companheirismo durante meu estágio final de graduação e por ter sido quem proporcionou meu primeiro contato com a Prof. Dra. Scheila.

À Prof^a. Dr.^a Cristiane de Bona da Silva pela disponibilidade do equipamento Zetasizer.

À Prof. Dr.^a Letícia Cruz, pelas tantas colaborações e ensinamentos nos seminários em grupo e sempre que necessário.

À Patrícia, por todo apoio e companheirismo durante as tantas horas de liberação, pelas conversas, pelo mate e pelos tantos momentos risinhos que amenizaram o cansaço. À Martina, Alessandra e Carolina, por sempre estarem presentes e dispostas a ajudar.

Aos ICs, Daniela, Luiz Eduardo, Camila, Tainara, Gabriela e Gabriele, pela imensa ajuda, colaboração e compromisso que demonstraram.

Aos demais colegas do LabTec, pelo convívio, ajuda, dedicação, colaboração e momentos de descontração, meu muito obrigada; em especial a Luana pelas análises no ZetaSizer, ajuda com a modelagem e pelo exemplo de profissional.

Agradeço à Prof. Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa e à sua aluna Adny Henrique Silva pela parceria na realização do teste de citotoxicidade.

Ao meu tio Alex e sua esposa Cris, que tenho como irmãos, mas que mais parecem meus anjos da guarda, por todo amor, companheirismo, proteção, amizade e por me proporcionarem momentos únicos de muita alegria. Além da pequena Malu, por adoçar meus dias com a inocência que só pode ser proporcionada por uma criança.

Ao Rafael (Éco), pela amizade, pelos incontáveis momentos de descontração compartilhados, brincadeiras e conselhos trocados.

A minha terceira avó Orlanda, que aos seus 95 anos é meu grande exemplo de força e que sempre me apoiou, me fazendo acreditar que estou no caminho certo.

A todos aos que não me referi, mas que de uma forma ou de outra sempre estiveram presentes com um abraço, um sorriso e uma palavra amiga.

À FAPERGS pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao PPG em Ciências Farmacêuticas/UFSM, ao CNPq e à CAPES pelas oportunidades e apoios recebidos. Muito Obrigada!

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DO NEUROPROTETOR VIMPOCETINA

AUTORA: SABRINA NEGRINI BOLSON

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a SCHEILA REZENDE SCHAFFAZICK

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de maio de 2015.

A vimpocetina é um derivado sintético do alcaloide vincamina, que apresenta um significativo efeito neuroprotetor, sendo empregada no tratamento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, além de isquemia vascular cerebral crônica e disfunção cerebral senil. Entretanto, esse fármaco apresenta limitada solubilidade em água e sofre extensivo metabolismo de primeira passagem, ocasionando uma baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral. Neste sentido, sistemas nanoestruturados têm sido desenvolvidos objetivando o aumento da biodisponibilidade oral desta substância. Com isso, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanocápsulas de etilcelulose contendo vimpocetina, utilizando o óleo de coco (OC) ou triglicerídeos de cadeia média (TCM) como núcleos oleosos, tendo em vista o potencial destes sistemas coloidais para a veiculação de substâncias lipofílicas, no controle da liberação e na melhora da biodisponibilidade oral. Também foi avaliada a viabilidade da conversão das suspensões originais em liofilizados redispersíveis e a citotoxicidade preliminar (fibroblastos) *in vitro* dos sistemas desenvolvidos. Conforme os resultados, após a preparação, as suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina apresentaram características físico-químicas adequadas, com diâmetros médios inferiores a 200 nm, baixos índices de polidispersão (PdI), potencial zeta negativo e elevada eficiência de encapsulamento. As formulações foram estáveis quanto ao diâmetro médio e o teor de fármaco permaneceu acima de 90%, após 90 dias de armazenamento. Todas as suspensões de nanocápsulas apresentaram liberação controlada do fármaco, quando comparadas à difusão do fármaco livre, sendo que o tipo de óleo/massa molecular do polímero influenciou a velocidade e o mecanismo de liberação da vimpocetina, em tampão fosfato pH 6,8:etanol (70:30 v/v). Além disto, a liberação/dissolução do fármaco a partir de um comprimido comercial disperso foi mais lenta ($t_{1/2}$ de 91 h) em relação às formulações nanoestruturadas ($t_{1/2}$ de 46 a 87 h). Os liofilizados, preparados a partir das suspensões, contendo trealose como crioprotetor, apresentaram teores entre 96 e 98 %, os quais se mantiveram inalterados após 90 dias de armazenamento. Através de microscopia eletrônica, observou-se a presença de estruturas esféricas coloidais nos produtos secos e os índices de ressuspensão, em água, ficaram entre 0,93 e 1,33, dependendo principalmente da massa molecular do polímero. Em ensaio preliminar, foi observado que as nanoestruturas apresentaram vantagem, em potencial, para reduzir a toxicidade do fármaco, na concentração estudada. Em vista disso, os sistemas desenvolvidos são considerados promissores para a liberação controlada de vimpocetina.

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

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT OF NANOCAPSULES FOR CONTROLLED RELEASE OF NEUROPROTECTOR VINPOCETINE

AUTHOR: SABRINA NEGRINI BOLSON

ADVISOR: SCHEILA REZENDE SCHAFFAZICK

Place and Date of Defense: Santa Maria, May 27th, 2015.

The Vinpocetine is a synthetic derivative of the vincamine alkaloid, which has a significant neuroprotective effect and is used in the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's, as well as chronic cerebrovascular ischaemia and senile brain dysfunction. However, this drug has limited solubility in water and undergoes extensive first pass metabolism, resulting in low bioavailability when administered orally. In this sense, nanostructured systems have been developed aimed at improving the oral bioavailability of this substance. Therefore, this study aimed to develop of vinpocetine-loaded ethylcellulose nanocapsules using coconut oil (CO) or medium chain triglycerides (MCT) as oily cores, due to the potential of these colloidal systems for the delivering of lipophilic substances, resulting in controlled release and improvement in oral bioavailability of drugs. It was also evaluated the feasibility of converting the original suspensions in redispersible lyophilized and an in vitro preliminary cytotoxicity assay (fibroblasts) of the developed systems was conducted. According to the results, after preparation, the nanocapsule suspensions containing vinpocetine showed appropriate physico-chemical characteristics, presenting average diameters less than 200 nm, low polydispersity index (PdI), negative zeta potential and high encapsulation efficiency. The formulations were stable as the average diameter and the drug content remained above 90%, after 90 days of storage. All nanocapsule suspensions showed controlled release of vinpocetine when compared to the diffusion of free drug, and the type of oil/polymeric molecular weight influence the rate and the release mechanism of vinpocetine (phosphate buffer pH 6,8: ethanol 70:30 v/v). Furthermore, the release/dissolution of the drug from a commercial tablet was slower than ($t_{1/2}$ of 91 h) from nanostructured formulations ($t_{1/2}$ 46-87 h). The lyophilized prepared from suspensions (containing trehalose as cryoprotectant) showed vinpocetine content between 96 and 98%, which remained unchanged after 90 days of storage. Using electron microscopy, it was observed the presence of spherical colloidal structures in dry products and the resuspension indexes in water were between 0,93 and 1,33, depending mainly on the molecular weight of the polymer. In the preliminary assay, it was observed that the nanostructures presented potential to reduce the toxicity of vinpocetine in the evaluated concentration. In view of this, the developed systems are considered promising for the controlled release of vinpocetine.

Keywords: Vinpocetine. Nanocapsules. Coconut oil. Medium chain triglycerides. Controlled release. Stability. Lyophilization.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE-UV	cromatografia a líquido de alta eficiência; detecção na região ultravioleta
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
EE	eficiência de encapsulamento
ETIL 10	etilcelulose (Ethocel [®] Standard 10 Premium)
ETIL 20	etilcelulose (Ethocel [®] Standard 20 Premium)
LQ	limite de quantificação
LD	limite de detecção
NC	nanocápsulas
NS	nanoesferas
OC	óleo de coco
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
PdI	índice de polidispersão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
S_f/S_i	índice de ressuspensão (S_f : diâmetro médio final; S_i : diâmetro médio inicial)
$t_{1/2}$	tempo necessário para liberar 50% da dose contida na forma farmacêutica
TCM	triglicerídeos de cadeia média (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática dos tipos de nanopartículas poliméricas com fármaco: (A) dissolvido no núcleo ou adsorvido na parede polimérica; (B) retido e adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica	23
Figura 2 – Estrutura química da trealose	28
Figura 3 – Estrutura química do polímero etilcelulose	31
Figura 4 – Estrutura química da vimpocetina	33
Figura 5 – Gráficos com os pesos dos filmes de etilcelulose após 90 dias de imersão em TCM e OC	51
Figura 6 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE; A: nanocápsulas de OC com (b) e sem (a) fármaco. B: nanocápsulas de TCM com (b) e sem (a) fármaco	53
Figura 7 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das formulações (n=3), obtidos através de espalhamento de luz dinâmico (TCM/Etil10, OC/Etil10, TCM/Etil20 e OC/Etil20	56
Figura 8 – Gráficos do potencial zeta das formulações (TCM/Etil10, OC/Etil10, TCM/Etil20 e OC/Etil20	57
Figura 9 – Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias	61
Figura 10 – Índice de polidispersão (PdI) das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias	62
Figura 11 – Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias	63
Figura 12 – Valores de pH das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias	64
Figura 13 – Teor de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas, armazenadas por 90 dias	65
Figura 14 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> da vimpocetina a partir das diferentes nanocápsulas (TCM/Etil 10; TCM/Etil 20; OC/Etil 10; OC/Etil20) em comparação à difusão do fármaco livre (solução metanólica)	67
Figura 15 – Gráficos indicando o melhor ajuste ao modelo monoexponencial para os dados da liberação da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas TCM/Etil 10 (A), TCM/Etil 20 (B), OC/Etil 10 (C), OC/Etil 20 (D) e fármaco livre (E)	70

Figura 16 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> da vimpocetina a partir das nanocápsulas TCM/Etil 20; OC/Etil20 em comparação ao comprimido comercial disperso (Vicog [®])	74
Figura 17 – Gráfico indicando o melhor ajuste ao modelo monoexponencial para os dados da liberação da vimpocetina a partir do comprimido comercial disperso em água	75
Figura 18 – Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas e as respectivas amostras liofilizadas, após a ressuspensão em água, além dos índices de ressuspensão correspondentes (S_f/S_i)	78
Figura 19 – Imagens obtidas por MEV a partir das amostras de liofilizados (aumento de 1.300X – barra corresponde a 10 μ m), em comparação ao crioprotetor trealose (solução aquosa, a 10% p/v, liofilizada)	79
Figura 20 – Imagens obtidas por MEV a partir das amostras de liofilizados (aumento de 2.500X – barra corresponde a 10 μ m), em comparação ao crioprotetor trealose (solução aquosa, a 10% p/v, liofilizada)	80
Figura 21 – Imagens obtidas por MEV a partir das amostras de liofilizados (aumento de 4.300X – barra corresponde a 5 μ m), em comparação ao crioprotetor trealose (solução aquosa, a 10% p/v, liofilizada)	81
Figura 22 – Teor de vimpocetina nos liofilizados, preparados a partir das suspensões de nanocápsulas, no período de 90 dias	83
Figura 23 – Citotoxicidade preliminar das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina (preparadas com OC ou TCM e Etil 10 ou 20), das respectivas formulações sem o fármaco (SF) e da vimpocetina livre (solução), frente às células de fibroblastos (NIH 3T3), correspondendo à dose de 100,0 μ g/mL de fármaco	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina	40
Tabela 2 – Análise de precisão	54
Tabela 3 – Análise de exatidão	54
Tabela 4 – Características físico-químicas (n=3) das suspensões de nanocápsulas de etilcelulose, empregando TCM ou OC como núcleo e o fármaco vimpocetina (1,0 mg/mL)	55
Tabela 5 – Parâmetros calculados através dos modelos de primeira ordem e Lei da Potência para as nanocápsulas (TCM/Etil 10, TCM/ Etil 20, OC/Etil 10 e OC/Etil 20) e solução do fármaco livre	69
Tabela 6 – Parâmetros calculados através dos modelos de primeira ordem e Lei das Potências para o comprimido comercial disperso em água	75
Tabela 7 – Características físico-químicas dos liofilizados de nanocápsulas de etilcelulose (10 e 20) empregando TCM ou OC como núcleo, contendo o fármaco vimpocetina	77

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	18
1.1 Objetivo geral	19
1.2 Objetivo específico	19
REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Sistemas nanocarreadores de fármacos	21
2.1.1 Nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas)	22
2.1.2 Preparação e caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas	25
2.1.3 Processo de liofilização	27
2.2 Óleo de coco	29
2.3 Etilcelulose	30
2.4 Vimpocetina e sua associação a nanoestruturas	32
MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Materiais	38
3.1.1 Matérias-primas.....	38
3.1.2 Solventes e outros materiais	38
3.1.3 Equipamentos	39
3.2 Métodos	39
3.2.1 Teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos	39
3.2.2 Preparação dos sistemas nanoestruturados	40
3.2.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas	41
3.2.4 Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de vimpocetina nas nanoestruturas	42
3.2.5 Estudo de estabilidade das formulações contendo vimpocetina	44
3.2.6 Estudo da cinética de liberação <i>in vitro</i> da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas	44
3.2.7 Preparação dos liofilizados a partir das suspensões de nanocápsulas ...	45

3.2.8	Caracterização físico-química dos liofilizados	46
3.2.9	Análise morfológica dos liofilizados	47
3.2.10	Estudo da estabilidade dos liofilizados	47
3.2.11	Avaliação preliminar da citotoxicidade <i>in vitro</i> das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina	47
3.2.12	Análise estatística	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO		49
4.1	Desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados poliméricos	50
4.1.1	Teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos de etilcelulose..	50
4.1.2	Preparação preliminar dos sistemas nanoestruturados	52
4.1.3	Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de vimpocetina nas suspensões nanoestruturadas	52
4.1.4	Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas	55
4.2	Estudo de estabilidade das formulações contendo vimpocetina	61
4.3	Estudo da cinética de liberação da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas	65
4.3.1	Estudo comparativo da cinética de liberação da vimpocetina a partir das suspensões e comprimido comercial	73
4.4	Liofilização das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina	76
4.4.1	Estudo de estabilidade dos liofilizados	82
4.5	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> das suspensões de nanocápsulas utilizando linhagem celular de fibroblastos (NIH 3T3)	84
CONCLUSÃO		87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		90

INTRODUÇÃO

A vimpocetina é um derivado sintético do alcaloide vincamina, que apresenta um significativo efeito neuroprotetor, sendo bastante empregada para o tratamento de doenças neurodegenerativas como Acidente Vascular Cerebral agudo, Alzheimer e Parkinson, além de isquemia vascular cerebral crônica e disfunção cerebral senil, apresentando propriedades protetivas da memória e melhoria das funções cognitivas (ZHUANG et al., 2010; PATYAR et al., 2011; JINCAI et al., 2014; WANG et al., 2014). Ainda, pesquisas têm evidenciado que propriedades antioxidantes deste fármaco exercem mecanismos importantes em seus efeitos neuroprotetores (PATYAR et al., 2011). Um potencial uso desse fármaco para epilepsia vem sendo recentemente estudado, relacionando sua ação a outros fármacos empregados para este fim (NEKRASSOV e SITGES, 2008; SITGES et al., 2011). Além disso, a vimpocetina também apresenta ação em inibir o crescimento de células de câncer de mama tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HUANG et al., 2012).

Entretanto, a vimpocetina é um fármaco fracamente solúvel em água, apresenta baixa e irregular taxa de dissolução no trato gastrointestinal, e sofre um extensivo metabolismo de primeira passagem, o que ocasiona uma baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral, restringindo seu uso clínico (XU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010; LIN et al., 2014). Está disponível, usualmente no mercado, na forma de comprimidos contendo 5 mg de substância ativa, no entanto, a biodisponibilidade oral tem sido reportada como próxima a 7 %, em humanos (RIBEIRO et al., 2003). Neste sentido, sistemas baseados em ciclodextrinas (RIBEIRO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007; LIN et al., 2014) e em sistemas nanoestruturados baseados em lipídios (LUO et al., 2006, XU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010) têm sido desenvolvidos, objetivando o aumento da biodisponibilidade oral desta substância.

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). Quando comparados às formulações convencionais, esses sistemas de liberação proporcionam inúmeras vantagens, como uma melhor resposta no sítio de ação envolvido, por períodos mais prolongados, potencializando o tratamento (VAUTHIER et al., 2003), além de

promoverem redução da toxicidade, aumento da eficácia terapêutica e da adesão do paciente ao tratamento (KUMAR, 2000). Dentre a grande variedade de nanocarreadores, incluem-se os lipossomas, as microemulsões, as nanopartículas lipídicas, as nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas), entre outros (TORCHILIN et al., 2006; DOMB et al., 2007; THASSU et al., 2007; MENG et al., 2014).

As nanopartículas poliméricas são carreadores de fármacos que possuem diâmetro inferior a 1 μm , dentre os quais se incluem as nanocápsulas, que são sistemas nanovesiculares, onde o fármaco se encontra confinado em uma cavidade aquosa ou oleosa rodeada por uma membrana polimérica, apresentando, assim, uma estrutura típica núcleo-parede, estabilizada por tensoativos ou agentes estabilizantes na interface partícula/água (SOPPIMATH et al., 2001; COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As nanocápsulas podem penetrar por meio de pequenos capilares, o que facilita sua captura por células e possibilita a permeabilidade pelas barreiras biológicas, propiciando uma liberação controlada do fármaco em sítios de ação (COUVREUR et al., 2002; ALONSO, 2004; MOHANRAJ e CHEN, 2006; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). Estes sistemas são pesquisados para a veiculação de moléculas pouco solúveis, vetorização de fármacos, aumentando o índice terapêutico, proteção de substâncias lábeis no trato gastrointestinal e aumento da biodisponibilidade, entre outros propósitos (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MISHRA et al., 2010; PETERSEN et al., 2011; MENG et al., 2014).

Além disto, nanoestruturas poliméricas podem promover a liberação de fármacos objetivando emprego em tratamentos de doenças neurológicas, aumentando a concentração dos mesmos e, conseqüentemente, o efeito terapêutico (KREUTER, 2001; RONEY et al., 2005). Pesquisas também têm demonstrado importantes vantagens da associação entre substâncias com atividade antioxidante e nanopartículas, como o aumento da estabilidade físico-química, da capacidade antioxidante e o incremento da biodisponibilidade (KWON et al., 2002; PALUMBO et al., 2002; SHEA et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2005; BALA et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2008; KULKAMP et al., 2011).

Para o desenvolvimento dos sistemas poliméricos é importante a seleção do polímero e do núcleo oleoso, 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; SCHAFFAZICK et al., 2003a;

GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). O polímero utilizado deve ser biocompatível, sendo a escolha importante no controle de liberação do fármaco, e, quanto à origem, podem ser sintéticos, naturais ou semissintéticos, como é o caso da etilcelulose (PAN-IN et al., 2014; LAI et al., 2010). Óleos vegetais com elevados teores de substâncias antioxidantes (vitaminas e polifenóis), como o óleo de coco (OC) (ALVAREZ e RODRIGUEZ, 2000; SANTI, 2003; CUNHA et al., 2004; MARINA et al., 2009c), são interessantes para a constituição do núcleo das nanocápsulas poliméricas, conforme pesquisas demonstradas recentemente (SANTOS, 2012; BRENDLE, 2013; SANTOS et al., 2014).

Neste contexto, o objetivo do trabalho proposto foi o desenvolvimento tecnológico de nanocápsulas à base de OC ou triglicerídeos de cadeia média (TCM), como núcleos oleosos, para associação do neuroprotetor vimpocetina, tendo em vista o potencial destes sistemas coloidais poliméricos na veiculação de substâncias lipofílicas, no incremento da biodisponibilidade oral e no controle da liberação de fármacos associados, almejando a futuras aplicações em neuroproteção. Além da comparação entre um óleo de origem natural com outro sintético, empregou-se como polímero a etilcelulose de duas diferentes massas moleculares, avaliando-se também a citotoxicidade preliminar *in vitro* dos sistemas desenvolvidos, em comparação ao fármaco livre, e a viabilidade da conversão das suspensões em liofilizados redispersíveis. Cabe mencionar que, até o presente momento, não foram encontrados estudos relativos à veiculação de vimpocetina a nanocápsulas poliméricas, comprovando a originalidade deste trabalho.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O presente trabalho almejou preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo o fármaco vimpocetina, empregando dois diferentes tipos de óleos como núcleo (OC ou TCM), de maneira a comparar o comportamento dos sistemas quanto às características físico-químicas, estabilidade, controle de liberação e citotoxicidade preliminar, além da conversão em liofilizados redispersíveis.

1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo vimpocetina, empregando o OC ou TCM como núcleo, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, utilizando etilcelulose, de duas diferentes massas moleculares, como polímero;
- Caracterizar as formulações coloidais quanto ao pH, diâmetro médio de partículas, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta, teor total e eficiência de encapsulamento da vimpocetina;
- Efetuar um estudo de estabilidade das formulações, em temperatura ambiente e protegidas da luz, avaliando-se o pH, diâmetro médio, PdI, potencial zeta e teor de fármaco, durante 90 dias;
- Determinar a cinética de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanocápsulas desenvolvidas e selecionadas, através da técnica de difusão em sacos de diálise, em comparação ao fármaco livre e a um comprimido comercial redisperso;
- Verificar a viabilidade tecnológica da obtenção de liofilizados redispersíveis, a partir das suspensões de nanocápsulas desenvolvidas, empregando um crioprotetor solúvel como adjuvante, e caracterizar os produtos secos obtidos quanto ao teor de fármaco, tamanho médio de partículas e análise morfológica, bem como estudar a estabilidade dos liofilizados, por um período de 90 dias;
- Avaliar, preliminarmente, a citotoxicidade *in vitro* das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, empregando, como modelo, células de fibroblastos, em comparação ao fármaco livre.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistemas nanocarreadores de fármacos

Nano é um prefixo que vem do grego antigo e significa “anão”, sendo um termo técnico utilizado em notação científica. Um nanômetro (nm) equivale a um bilionésimo de metro (TOMA e ARAKI, 2005). A nanociência estuda as propriedades dos materiais na escala do nanômetro, e nanotecnologia é o emprego deste conhecimento para a obtenção e controle de nanomateriais com objetivos práticos e/ou comerciais (SOPPIMATH et al., 2001; TOMA e ARAKI, 2005; POLETTO; POHLMANN; GUTERRES, 2008; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar que tem avançado rapidamente nos últimos anos, encontrando aplicações nas mais diversas áreas, desde setores de energia e eletrônica até da indústria farmacêutica, tendo como finalidade dar origem a estruturas em escala nanométrica, integrando-as para formar componentes e sistemas maiores (QUINA, 2004; POLETTO; POHLMANN; GUTERRES, 2008; FERREIRA; RANGEL, 2009). Também tem o potencial de revolucionar amplamente vários campos tecnológicos e científicos (POLETTO; POHLMANN; GUTERRES, 2008). Foi no ano de 1970 que as primeiras nanopartículas foram desenvolvidas, sendo inicialmente utilizadas como carreadores de vacinas e fármacos para o tratamento do câncer (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Até o momento, têm sido encontradas propostas na literatura de diferentes tipos de nanodispositivos e estratégias nanotecnológicas adequadas para a liberação controlada de substâncias ativas (AMORIM et al., 2010; IRACHE et al., 2011, KULKAMP et al., 2011), para aumentar a biodisponibilidade (BALA et al., 2006; LIN et al., 2014), para estabilização físico-química de princípios ativos (KWON et al., 2002; KULKAMP et al., 2009; OURIQUE et al., 2011; LOBATO et al., 2015), para vetorização de fármaco a alvos específicos (KREUTER, 2001; SCHAFFAZICK et al., 2008), para o aumento do índice terapêutico (PALUMBO et al., 2002), diminuindo os efeitos adversos e aumentando a eficácia terapêutica (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007), entre outras aplicações (MAYER et al., 2015).

Conforme o processo e a composição utilizada na preparação, as principais nanoestruturas empregadas como sistemas de liberação de fármacos são lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, carreadores lipídicos nanoestruturados e ciclodextrinas, apresentando, portanto, tamanho na faixa de 10 a 1000 nm (inferior a 1 μm) (COUVREUR et al., 2002; ALONSO, 2004; MOHANRAJ e CHEN, 2006; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; POLETTO; POHLMANN; GUTERRES, 2008; MARCATO e DURÁN, 2008).

O uso das nanoestruturas poliméricas como dispositivos de liberação de moléculas ativas decorre, principalmente, do tamanho reduzido e da versatilidade dos sistemas, sendo apontados como duas propriedades básicas (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). As aplicações desses carreadores podem resultar em vantagens conforme a via de administração envolvida, como a promoção da vetorização de fármacos, almejando a uma distribuição mais seletiva e, assim, um aumento do índice terapêutico, principalmente após administração parenteral, e a veiculação de substâncias ativas visando a diversos fins mediante a administração oral, ocular, tópica, transdérmica, nasal e pulmonar (SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; TOMODA et al., 2012; SILVA et al., 2013; PARANJPE et al., 2014; DE BRUM et al., 2015; SAVIAN et al., 2015). Estudos também vêm mostrando a eficiência no encapsulamento de proteínas e peptídeos, além de pequenas moléculas, protegendo-os frente à degradação enzimática e hidrolítica, aumentando a sua permeação e biodisponibilidade, no tratamento com agentes infecciosos e do câncer e na liberação cerebral de fármacos (MOHANRAJ e CHEN, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

2.1.1 Nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas)

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores coloidais de fármacos, classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas, sendo diferenciadas segundo a presença ou ausência do núcleo oleoso (Figura 1) (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; PLAPIED et al., 2011). Estas partículas são basicamente formadas por um polímero, um ou dois tensoativos, um óleo (no caso das nanocápsulas) e o fármaco associado, dispersas em uma fase aquosa externa (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).



Figura 1 – Representação esquemática dos tipos de nanopartículas poliméricas com fármaco: (A) dissolvido no núcleo e/ou adsorvido na parede polimérica; (B) retido, adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica

As nanoesferas são sistemas matriciais (Figura 1), onde o fármaco encontra-se disperso no polímero, ou seja, ficando retido ou adsorvido na matriz polimérica, enquanto que as nanocápsulas são consideradas sistemas vesiculares, onde o ativo encontra-se confinado em uma cavidade que está envolta por uma membrana polimérica, sendo assim, podendo o fármaco estar dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido à parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003a; PLAPIED et al., 2011). Em casos mais específicos, as nanocápsulas podem apresentar um núcleo aquoso em substituição ao oleoso (COUVREUR et al., 2002).

Nas nanocápsulas, é interessante que o fármaco tenha a maior afinidade possível com o óleo, uma vez que o núcleo lipofílico é capaz de aumentar a concentração de fármaco nesses sistemas, em relação às nanoesferas (SOPPIMATH et al., 2001; RAFFIN et al., 2003; SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). Neste sentido, a escolha do núcleo oleoso tem grande importância no desenvolvimento das nanocápsulas, visto que, dependendo das suas propriedades (viscosidade, concentração e tensão interfacial), podem interferir no tamanho das estruturas formadas, além de influenciarem na capacidade de encapsulamento da substância ativa. Vale enfatizar que para essa escolha, existem alguns requisitos importantes, como boa capacidade de dissolução do fármaco a ser encapsulado, não serem capazes de solubilizar o polímero formador das vesículas, e ainda apresentar ausência de toxicidade (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS et al., 2012).

Diferentes substâncias podem compor o núcleo destes sistemas, como misturas de triacilgliceróis (ex: Miglyol[®] 810, 812, 829), óleos vegetais ou compostos puros (ex: oleato de

etila) (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012b). Vale ressaltar que os triglicerídeos de cadeia média (TCM ou triacilgliceróis) são as matérias-primas mais utilizadas para a composição do núcleo oleoso das nanocápsulas, pelo fato deles solubilizarem diferentes fármacos (COUVREUR et al., 2002).

O polímero em torno do núcleo é essencial ao sistema, pois protege a integridade do mesmo frente a condições agressivas do meio ambiente, como luz e umidade e, também, do próprio microambiente fisiológico, auxiliando no processo produtivo e modulando a liberação do fármaco, além de poder interagir favoravelmente com as barreiras biológicas (COUVREUR et al., 2002; RAFFIN et al., 2003; SCHAFFAZICK et al., 2003a; ALONSO, 2004; MOHANRAJ e CHEN, 2006; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Quanto a sua escolha, o polímero pode ser biodegradável ou não, dependendo da via de administração a que se pretende, e, obrigatoriamente, biocompatível, sendo suas características físico-químicas importantes no controle de liberação do fármaco. Os polímeros podem ser de origem natural ou podem ser semissintéticos, como a etilcelulose, ou, ainda, sintéticos como a poli(ϵ -caprolactona) [PCL], o poli(ácido lático) e poli(metacrilato de alquila-co-ácido acrílico ou metacrílico) – [Eudragit[®] S, Eudragit[®] RS, Eudragit[®] EPO] (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; RONEY et al., 2005; MOHANRJ e CHEN, 2006; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Segundo Fessi e colaboradores (1989), o uso de polímeros em baixa concentração é necessário para que seja possível obter partículas pequenas, além de evitar a formação de agregados. Conforme MORA-HUERTAS e colaboradores (2010), a concentração de polímeros usada varia de 0,2 a 0,5% em relação ao solvente.

Os tensoativos são substâncias anfifílicas, tendo grande importância na estabilização das suspensões, de forma a manter o tamanho reduzido das partículas, de maneira a prevenir ou retardar a agregação entre as mesmas, durante o processo de armazenamento. Sobretudo, o tipo e a concentração do polímero e de tensoativos pode afetar as propriedades dos sistemas nanoparticulados, como diâmetro, distribuição tamanho de partículas e teor de fármaco (SCHAFFAZICK et al., 2003a; BOUCHEMAL et al., 2004; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; FRIEDRICH et al., 2008).

2.1.2 Preparação e caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas

Na literatura, existem vários métodos relatados para a preparação de nanopartículas poliméricas (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; GUTERRES et al., 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Muitos destes métodos estão geralmente baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos, no qual o polímero é formado no momento da preparação das nanopartículas, ou na precipitação de polímeros pré-formados, no qual o polímero já está formado no momento da preparação das nanoestruturas (MOHANRAJ e CHEN, 2006; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; PLAITED et al., 2011; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012a,b; LAI et al., 2014).

No método de polimerização *in situ* de monômeros dispersos, são utilizados monômeros como cianoacrilatos de alquila. A desvantagem deste método, em relação ao método que emprega polímeros pré-formados, é que podem ocorrer reações químicas entre o monômero e o fármaco durante o processo (COUVREUR et al., 2002; MOHANRAJ e CHEN, 2006; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

Um dos métodos mais usuais é o de nanoprecipitação ou deslocamento de solvente, baseado em polímeros pré-formados (FESSI et al., 1988), podendo gerar tanto nanoesferas quanto nanocápsulas, ao inserir um óleo à fase orgânica da preparação (FESSI et al., 1989). No caso da formação de nanocápsulas, o método é denominado deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). Para isto, uma fase orgânica, contendo o polímero, o óleo, um tensoativo lipofílico opcional (baixo EHL) e o fármaco, dissolvidos em um solvente orgânico (por exemplo, acetona ou etanol), é vertida em uma fase aquosa que contém um tensoativo hidrofílico (alto EHL). Após esse preparo, as estruturas são formadas instantaneamente por emulsificação espontânea, devido à mútua miscibilidade entre a água e o solvente orgânico. Pelo fato do polímero ser insolúvel tanto no óleo, quanto na fase aquosa, ele se deposita na interface dos dois componentes imiscíveis. Por fim, o solvente orgânico é evaporado sob pressão reduzida. Em geral, esse método gera taxas de encapsulamento elevadas para moléculas lipofílicas, entretanto, é pouco eficiente para encapsular substâncias hidrofílicas. Normalmente, as nanocápsulas formadas por este método apresentam diâmetros que variam de 200 a 500 nm (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012a,b).

Após a preparação das nanopartículas, segue-se a caracterização físico-química, com a qual se obtêm um importante conjunto de informações para avaliar a adequabilidade do desenvolvimento dos sistemas, além da possibilidade de gerar informações que tentem descrever a organização estrutural dos componentes, a qual é dependente da composição quali-quantitativa das formulações e do método de preparação escolhido (SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; WU; ZHANG; WATANABE, 2011; FONTANA et al., 2014).

Em vista disso, a caracterização das nanopartículas envolve a avaliação macroscópica, morfológica (microscopia eletrônica), a determinação do potencial zeta (eletroforese), do pH, a determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partículas (espectroscopia de correlação de fótons), determinação da concentração de fármaco associado às nanoestruturas (ultrafiltração-centrifugação ou ultracentrifugação), além da cinética de liberação do fármaco a partir dos nanocarreadores (ex: sacos de diálise). Estes parâmetros avaliados são importantes, pois podem influenciar a distribuição *in vivo* das nanoestruturas (destino biológico/sítio de ação), toxicidade, perfil de liberação do fármaco, estabilidade do sistema e capacidade de atravessar as barreiras biológicas (SCHAFFAZICK et al., 2003a; MOHANRAJ e CHEN, 2006; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; PLAPIED et al., 2011; MORA-HUERTAS et al., 2012; FONTANA et al., 2014; ROUSSAKI et al., 2014). Quanto à eficiência de encapsulamento, a mesma depende da afinidade do fármaco pelos sistemas desenvolvidos. Geralmente, fármacos hidrofílicos apresentam uma eficiência de encapsulamento menor, enquanto a eficiência para fármacos lipofílicos é superior a 70% (MOHANRAJ e CHEN, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Quanto à questão do controle da liberação, como já mencionado anteriormente, cabe ressaltar que essa liberação do fármaco a partir das nanoestruturas depende de mecanismos de desorção, difusão e processo de erosão da partícula, ou ainda, a associação desses fatores. Para entender melhor como o fármaco está associado aos sistemas e como esse processo ocorre, é necessário o estudo da modelagem matemática (SOARES, 2003; MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2010; CRUZ et al., 2006; SCHAFFAZICK et al., 2006). Em um estudo realizado por Santos e colaboradores (2013), observou-se um perfil de liberação correspondente à cinética de primeira ordem, ocorrendo uma única etapa de liberação sem a ocorrência de efeito *burst*. Ao ser aplicado o modelo de Lei da Potência foi concluído que o mecanismo de liberação para o fármaco em estudo (clotrimazol) ocorreu

através do transporte anômalo, sendo assim, nesse estudo, a liberação do ativo dependeu do relaxamento do polímero acompanhado da difusão do fármaco.

Um tipo particular de nanovesículas, as nanocápsulas de núcleo lipídico (JAGER et al., 2009), vêm sendo desenvolvidas, em que os núcleos lipídicos são compostos por uma mistura de um óleo e um lipídio sólido (como o monoestearato de sorbitano) envoltos por uma membrana polimérica. No trabalho de Rigo e colaboradores (2014), o comportamento de diferentes óleos vegetais para preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico foi estudado. As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Quanto às características físico-químicas, todas as formulações apresentaram tamanho de partículas nanométrico (220 – 230 nm), potencial zeta negativo e PDI inferior a 0,2, mantendo-se inalteradas por um período de 3 meses de armazenamento. Para avaliar a influência do tipo de óleo vegetal no controle da liberação a partir das nanoestruturas, foi selecionado o propionato de clobetasol como fármaco modelo. Com isso, as formulações mostraram um perfil de liberação controlado bifásico, independente do tipo de óleo, havendo uma liberação rápida inicial (fármaco na superfície das partículas), seguida de uma fase sustentada (fármaco encapsulado). No entanto, foi observada diferença na concentração de fármaco liberado a partir das formulações, dependendo do tipo de óleo, onde para a formulação contendo óleo de girassol essa concentração foi de 0,36 mg/mL, para o óleo de soja foi de 0,40 mg/mL e para o farelo de arroz foi de 0,45 mg/mL. Portanto, segundo os autores, a escolha de um óleo no estado líquido pode ajudar a modular o controle da liberação do fármaco a partir do núcleo lipídico das nanocápsulas.

2.1.3 Processo de liofilização

Um processo com grande importância que pode ajudar na estabilização das nanopartículas é a liofilização, que consiste na desidratação por congelamento seguida da sublimação do gelo sob vácuo, que faz a passagem da água no estado sólido diretamente ao de vapor. O congelamento é considerado o ponto mais importante do processo. Na literatura, são encontradas várias formas de congelamento (ALI; LAMPRECHT, 2014; BAZYLINSKA et al., 2014; DADPARVAR et al., 2014). Para as nanocápsulas, diferentes condições de congelamento foram empregadas, tais como armazenamento em freezer a -20 °C

(SCHAFFAZICK et. al., 2003b), -45 °C (ABDELWAHED et al., 2006a) e -70 °C ou em nitrogênio líquido a -196 °C (CHACON et al., 1999).

Na maior parte das vezes, a adição de adjuvantes ou crioprotetores na amostra a ser liofilizada é necessária para evitar que as baixas temperaturas possam alterar e/ou danificar as propriedades físico-químicas das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003a,b; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; DADPARVAR et al., 2014). O objetivo dos crioprotetores é conferir proteção para as nanopartículas durante o congelamento/liofilização, para reduzir o estresse do processo sobre as partículas. Alguns dos crioprotetores mais comuns encontrados na literatura são os açúcares, tais como trealose [Figura 2] (SAEZ et al., 2000; KONAN et al., 2002; ALI; LAMPRECHT, 2014; DADPARVAR et al., 2014), lactose (SAEZ et al., 2000; KONAN et al., 2002), glicose (KONAN et al., 2002), sacarose (SAEZ et al., 2000; HIRSJÄRVI; PELTONEN; HIRVONEN, 2009) e o manitol (SAEZ et al., 2000; KONAN et al., 2002). Quanto à quantidade de crioprotetor a ser adicionada para que essa proteção/estabilização seja efetiva, varia conforme a composição da formulação. São encontrados na literatura valores que vão de 2% até 30% (p/v) (STRICKLEY, 2004; BAZYLINSKA et al., 2014; KUMAR; GOKHALE; BURGESS, 2014; BRENDLE, 2013).

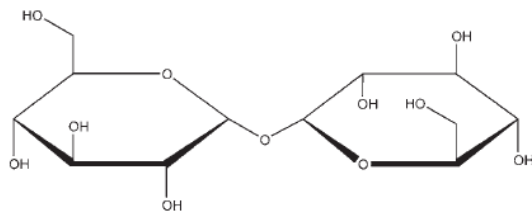


Figura 2 - Estrutura química da trealose (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

No estudo de Swarnakar e colaboradores (2011), os autores obtiveram liofilizados a partir de nanopartículas poliméricas de poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) – PLGA – contendo coenzima Q10, e utilizaram como crioprotetores (5% p/v) a trealose, dextrose, manitol e sacarose. Ao comparar o diâmetro médio de partículas das suspensões originais com os produtos na forma sólida (liofilizados), foram obtidos os seguintes índices de ressuspensão: 1,04, 1,22, 1,16 e 1,35 para trealose, dextrose, manitol e sacarose, respectivamente, sendo que foi observado um aumento não significativo de tamanho para as nanopartículas liofilizadas com o crioprotetor trealose. No estudo de estabilidade acelerada, as formulações, contendo trealose, foram mantidas em câmara de estabilidade com temperatura de 25 °C e 60% de

umidade por um período de 6 meses, apresentando resultados positivos, já que não foi observada diferença significativa entre o tempo inicial e final para o tamanho de partículas, PdI e teor do ativo.

Outro estudo envolvendo o processo de desidratação por sublimação (liofilização) foi realizado por Dadparvar e colaboradores (2014), no qual foram preparadas nanopartículas de albumina HI-6 e posteriormente obtidos os produtos liofilizados, utilizando como crioprotetores manitol, sacarose ou trealose (1%, 2% e 3% p/v). Todos os produtos liofilizados apresentaram aumento significativo no tamanho das partículas, independentemente do tipo e da concentração de crioprotetor, em relação às suspensões originais, porém, esse aumento foi menor nos liofilizados com sacarose e trealose. Os autores explicaram essa desvantagem, em relação ao manitol, por apresentar uma possível formação de cristais de manitol durante o processo de liofilização. Quanto ao teor, a diferença entre as suspensões originais e os liofilizados só foi observada nas formulações com 2% de manitol e com 3% de trealose. A formulação de escolha para o teste de estabilidade foi a formulação utilizando trealose (3% p/v), a qual foi armazenada em diferentes temperaturas (-20 °C, 4 °C, 20 °C e 40 °C) durante 3 meses. Após 3 meses, foi observado 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 os 3 meses de armazenamento, observou-se que, na temperatura de -20 °C, não ocorreu degradação significativa, enquanto que, para as outras temperaturas, o teor teve um decaimento significativo ao final de experimento.

2.2 Óleo de coco

Dentre as plantas oleaginosas de grande interesse econômico, pode-se destacar o coqueiro - *Cocos nucifera* Linné (Família Palmae). Do seu fruto (o coco) ou da sua semente, é extraído um óleo de alto valor nutricional e farmacêutico (YONG et al., 2009). O óleo de coco (OC) é constituído de uma massa branca a levemente amarelada, sabor discreto, odor bem característico, com ponto de fusão entre 23 e 26 °C, e, quando refinado, apresenta-se como uma massa branca untuosa (EDEM, 2002; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; FOSTER; WILLIAMSON; LUNN, 2009). Os principais ácidos graxos presentes neste óleo são os ácidos láurico, cáprico e caprílico, mirístico, esteárico, palmítico, oleico e linoleico, no qual

cerca de 50 % dos ácidos graxos presentes no óleo apresentam cadeias médias de 6 a 12 carbonos, sendo que o ácido láurico (C₁₂) é o componente que apresenta a maior proporção (40–50 %), seguido do ácido mirístico (15–20 %) (LAURELES et al., 2002; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; PARFENE et al., 2013; HAMSI et al., 2014). Tradicionalmente, o OC é utilizado na indústria farmacêutica como emoliente, em bases de pomadas, xampus, sabonetes e sabonetes líquidos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Embora ainda existam poucos relatos na literatura, alguns trabalhos indicam que este óleo apresenta atividade antioxidante e efeitos antifúngicos (OGBOLU et al., 2007; MARINA et al., 2009a,b,c; AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2010; SANTOS et al., 2014; VYSAKH et al., 2014).

Trabalhos têm indicado que o OC pode prevenir a oxidação de lipídios, melhorar a atividade antioxidante *in vivo*, aumentando a capacidade de enzimas antioxidantes, inclusive gerando aumento nos níveis de vitaminas antioxidantes, em função da sua administração (NEVIN e RAJAMOHAN, 2006; MARINA et al., 2009b,c).

O OC foi proposto como núcleo oleoso (3,0 % p/v) na preparação de nanocápsulas poliméricas (SANTOS, 2012; SANTOS et al., 2014), para o encapsulamento e liberação controlada do fármaco clotrimazol, utilizando como polímero o Eudragit[®] RS100, objetivando a aplicação vaginal. Estes sistemas apresentaram atividade antifúngica contra espécies patogênicas de *Candida spp.* BRENDELE (2013) preparou liofilizados redispersíveis adequados, a partir de suspensões de nanocápsulas preparadas com OC e Eudragit[®] RS100, com teor de idebenona próximo ao teórico, em que se evidenciou a presença de estruturas coloidais na matriz formada pelo crioprotetor trealose (10 % p/v). Estes produtos secos, contendo idebenona associada às nanocápsulas, foram capazes de aumentar a estabilidade química do fármaco, em comparação às suspensões de origem.

2.3 Etilcelulose

A etilcelulose (Figura 3), um derivado semissintético da celulose, possui uma longa cadeia de β-anidroglicose unida por ligações acetal, que vem tendo ampla aplicação nas áreas de alimentos, cosméticos e farmacêutica (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; LAI et al., 2010). A etilcelulose é um polímero não-biodegradável, biocompatível, podendo ser utilizada, na maioria das vezes, em formulações orais ou tópicas (LOKHANDE et al., 2013b; MURTAZA, 2012). Quanto as suas características físicas, encontra-se na forma de um pó branco, inodoro e

insípido, solúvel em uma vasta gama de solventes, tais como álcoois, solventes clorados e óleos naturais, e praticamente insolúvel em glicerina, propilenoglicol e água (DOW EXCIPIENTS, 2005; ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009; MURTAZA, 2012).

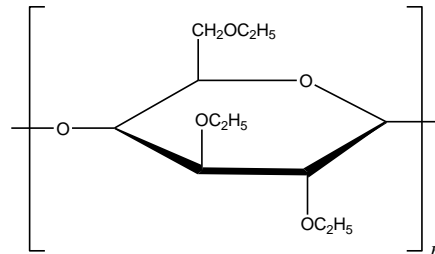


Figura 3 – Estrutura química do polímero etilcelulose (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Esse polímero trata-se de um material inerte, com importantes propriedades como a ausência de toxicidade, sendo um dos poucos polímeros insolúveis em água com aprovação do FDA para uso interno. Além disto, apresenta estabilidade durante o armazenamento, boa compressibilidade, sendo apropriado no desenvolvimento de microcápsulas, protegendo o fármaco de interação, hidrólise ou oxidação, além de ser amplamente utilizado no controle da velocidade de liberação de fármacos a partir de produtos de liberação sustentada, como por exemplo, comprimidos revestidos (peliculados). Aliado a estas propriedades, apresenta um custo relativamente baixo (DABBAGH et al., 1996; GRATTARD et al., 2002; WU et al., 2003; LAI et al., 2010; MURTAZA, 2012). Recentemente, a etilcelulose vem sendo utilizada para o desenvolvimento de nanoestruturas poliméricas (SUWANNATEEP et al., 2012; LOKHANDE et al., 2013a,b; PAN-IN et al., 2014; CHASSOT et al., 2014).

Um estudo envolvendo nanopartículas poliméricas foi proposto por SUWANNATEEP e colaboradores (2012), sendo que neste foram desenvolvidas nanoesferas de etilcelulose associando a curcumina, um fitoquímico com atividade antioxidante, mas que apresenta alta instabilidade frente à luz e ao calor. Analisando as características físico-químicas, observou-se um tamanho médio de partículas de 276 nm, PDI de 0,19, potencial zeta de -30 mV e eficiência de encapsulamento de 95%, considerando todas adequadas para os sistemas formados. Os autores concluíram que o nanoencapsulamento da curcumina protegeu o fármaco contra a degradação e, conseqüentemente, prolongou a sua atividade antioxidante.

Dois outros estudos, realizados por LOKHANDE e colaboradores (2013a,b), foram baseados em diferenças de viscosidade e de concentração da etilcelulose. No primeiro (LOKHANDE et al., 2013a), foram preparadas nanopartículas poliméricas utilizando etilcelulose em diferentes concentrações, associando o hipoglicemiante repaglinida. Os autores observaram que os valores de tamanho de partículas (90 a 240 nm), potencial zeta (-21 a -33 mV) e eficiência de encapsulamento (76 a 97%) aumentaram na medida que se aumentou a proporção do polímero. Já no segundo estudo (LOKHANDE et al., 2013b), foram utilizados três diferentes pesos moleculares de etilcelulose, também em três diferentes concentrações de cada, para a associação do cloridrato de metformina. O resultado obtido não foi muito diferente do estudo anterior, sendo que os autores observaram que os diferentes graus de viscosidade desse polímero afetaram o diâmetro médio das partículas, o teor de fármaco associado e o seu perfil de liberação a partir das nanopartículas. Eles atribuíram esses resultados à viscosidade da fase interna, sendo a principal razão da mudança de todas essas características.

Nanocápsulas poliméricas, utilizando a etilcelulose como polímero, foram desenvolvidas no estudo de Chassot e colaboradores (2014), no qual foi empregado o óleo de amêndoas para formação do núcleo oleoso, a fim de encapsular o dipropionato de beclometasona para liberação pulmonar. Quanto às características físico-químicas do sistema proposto, observou-se que foram adequadas, apresentando tamanho médio de partículas entre 158 e 185 nm, índice de polidispersão de 0,08 a 0,15, potencial zeta entre -11,7 e -15,9 mV, eficiência de encapsulamento superior a 98 % e liberação controlada do fármaco.

2.4 Vimocetina e sua associação a nanoestruturas

A vimocetina (Figura 4) é um fármaco éster etílico sintético, vasodilatador cerebral, da classe dos nootrópicos, derivado do alcaloide vincamina, extraído da folha da *Vinca minor* (CHIU et al., 1988; ZHUANG et al., 2010; JUNCAI et al., 2014; LIN et al., 2014). É amplamente utilizado, atuando em diversas células ou alvos do sistema nervoso central, aumentando o metabolismo e a circulação cerebral, exibindo efeitos clínicos favoráveis em doenças como Alzheimer, isquemia vascular cerebral crônica, acidente vascular cerebral agudo e disfunção cerebral senil (CHIU et al., 1988; MOLNÁR e ERDÓ, 1995; BONOCZK et al., 2000; XU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010). Esta substância aumenta o fluxo cerebral

na área isquêmica afetada em pacientes com doenças cerebrovasculares, diminui a agregação plaquetária, apresenta potentes propriedades neuroprotetoras, em vários modelos experimentais, inclusive diminuindo os danos neuronais resultantes de condições de hipóxia ou isquemia (RIBEIRO et al., 2003; PEREIRA et al., 2003).

Desta forma, segundo MOLNÁR e ERDÓ (1995), embora a vimpocetina tenha sido classificada como um agente nootrópico, também foram documentados importantes efeitos neuroprotetores, tanto *in vitro* como *in vivo*. Além disso, pesquisas tem demonstrado que a atividade antioxidante significativa deste fármaco, devido à eliminação de radicais livres, é um mecanismo importante nessa neuroproteção (PATYAR et al., 2011).

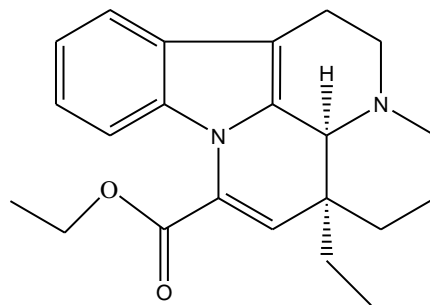


Figura 4 – Estrutura química da vimpocetina [CAS 42971-09-5; [14-etoxicarbonil-3 α , 16 α -etil)-14,15-eburnamina]; categoria terapêutica: vaso dilatador cerebral; massa molar 350,45 g/mol ; solubilidade em água: cerca de 5 μ g/mL; pka de 7,31; RIBEIRO et al., 2005; THE MERCK INDEX, 2006].

Estudos têm identificado os alvos moleculares responsáveis pelos efeitos da vimpocetina, sendo encontradas evidências de que sua atividade protetora estaria relacionada à inibição de canais de Na⁺ voltagem-dependentes e com a inibição indireta de processos moleculares iniciados pelo aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺, entre outros (PEREIRA et al., 2003).

O papel protetor da vimpocetina em relação ao estresse oxidativo, induzido por ascorbato/Fe²⁺, em terminais nervosos isolados (sinaptossomas) tem sido avaliado. Com a análise dos resultados foi observado que a vimpocetina é eficiente em prevenir a lesão induzida por ascorbato/Fe²⁺ em sinaptossomas, inibindo a formação de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica, protegendo as membranas celulares do ataque dos radicais livres, concordando com os dados clínicos que mostram a importância da vimpocetina no tratamento de várias doenças cerebrovasculares, onde a produção de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica ocorrem em elevada extensão (PALMEIRA et al., 1993; CARDOSO et al., 1998; SANTOS et al., 2000; PEREIRA et al., 2003). A vimpocetina, assim

como α -tocoferol, também foi capaz de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio induzidas por ácido 3-nitropropiónico e a peroxidação lipídica em terminações nervosas isoladas, indicando importante ação neuroprotetora deste composto (HERRERA-MUNDO; SITGES, 2013).

Em pesquisas mais recentes, a vimpocetina tem se destacado também como fármaco com potencial uso em epilepsia, com ação bastante pronunciada em relação a fármacos classicamente empregados para este propósito (NEKRASSOV e SITGES, 2008; SITGES et al., 2011), além de inibir o crescimento de células de câncer de mama tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HUANG et al., 2012).

Esse fármaco foi introduzido no mercado mundial em 1978, estando geralmente disponível na forma de comprimidos contendo 5 mg de substância ativa, como, por exemplo, o produto CAVINTON[®] (RIBEIRO et al., 2003; THE MERCK INDEX, 2006) e VICOG[®] (Marjan Indústria e Comércio LTDA), com indicação para tratamento de sintomas oriundos de problemas cognitivos relacionados às patologias cerebrovasculares.

No entanto, a vimpocetina é caracterizada por possuir uma baixa biodisponibilidade (7%) após administração oral, resultante por ser pouco solúvel em meio aquoso, e por possuir um significativo efeito de primeira passagem (XU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010; SOZANSKI et al., 2011). Segundo PATYAR e colaboradores (2011), a biodisponibilidade da vimpocetina, quando administrada com alimentos aumenta cerca de 60-100%, em comparação quando o fármaco é administrado em jejum. Em vista disso, tem-se desenvolvido sistemas diferenciados na tentativa de melhorar a biodisponibilidade deste fármaco (LUO et al., 2006; LIN et al., 2014). Sistemas baseados em ciclodextrinas (RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2003; RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2005; RIBEIRO et al., 2007; LIN et al., 2014), nanopartículas lipídicas sólidas (LUO et al., 2006), prolipossomas (XU et al., 2009) e carreadores lipídicos nanoestruturados (ZHUANG et al., 2010) são algumas dessas tentativas.

A vimpocetina é facilmente eliminada do organismo, tendo uma meia-vida de eliminação, após administração oral, em torno de uma a duas horas (ZHUANG et al., 2010; PATYAR et al., 2011), sendo que, devido ao curto tempo de meia-vida biológica e a necessidade de administração geralmente crônica, é interessante o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada/controlada, aumentando seu valor clínico em relação a formas farmacêuticas convencionais (RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2005). Devido à resposta farmacológica do fármaco estar diretamente ligada a sua concentração no sítio de ação requerido, uma alternativa para o seu direcionamento, com consequente aumento da sua

biodisponibilidade, é a associação a sistemas carreadores de fármacos (COUVREUR et al., 2002).

No estudo de LUO e colaboradores (2006), foram preparadas nanopartículas lipídicas sólidas contendo vimpocetina, com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco. Foram avaliadas as características físico-químicas, onde se obteve um tamanho médio de partículas de 70 a 200 nm, potencial zeta de -17 mV a -40 mV, e eficiência de encapsulamento de 97% a 99%. A estabilidade de duas formulações selecionadas foi analisada após seis meses e um ano de armazenamento a 4 °C, onde não se observou um aumento significativo no tamanho, tendo uma mínima redução ($\approx 2\%$) na eficiência de encapsulamento. Também, foi realizado um estudo de farmacocinética por via oral, conduzido em ratos machos Wistar, e os resultados mostraram que as nanopartículas lipídicas sólidas apresentaram uma melhora significativa na biodisponibilidade da vimpocetina comparada com o fármaco livre.

Um estudo para melhorar a biodisponibilidade oral da vimpocetina, foi realizado por ZHUANG e colaboradores (2010). Neste trabalho, a vimpocetina foi incorporada a carreadores lipídicos nanoestruturados, através do método de homogeneização de alta pressão. As formulações apresentaram um tamanho médio de partículas de 107 a 177 nm, dependendo do lipídio utilizado, potencial zeta de -13 mV a -25 mV, dependendo do tensoativo, e eficiência de encapsulamento de 83% a 95% conforme o lipídio empregado na formulação. No estudo de liberação *in vitro*, observou-se que a vimpocetina foi retida no sistema, tendo um perfil de liberação sustentada do fármaco, 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 dissolução de comprimidos comerciais em uma solução de 0,5% de CMC-Na), em ratos Wistar após administração oral. Concluiu-se que o veículo lipídico nanoestruturado ofereceu uma abordagem em potencial para aumentar a biodisponibilidade oral do fármaco.

Lin e colaboradores (2014) também estudaram a associação da vimpocetina com ciclodextrinas incorporadas a carreadores lipídicos nanoestruturados, com o objetivo de melhorar a absorção oral desse fármaco. Ao analisar os resultados obtidos, os autores obtiveram tamanho médio de partículas de 89 a 152 nm, potencial zeta de -12,5 a +13,1 mV, PDI de 0,14 a 0,44 e eficiência de encapsulamento de 59,4 a 85,7%. Com isso, observaram

que essa associação foi positiva, sendo capaz de melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco, em coelhos.

El-Dahmy e colaboradores (2014) estudaram a incorporação da vimpocetina em micelas poliméricas, objetivando o aumento médio *in vivo* de permanência do fármaco após a administração intravenosa. Os autores obtiveram valores de encapsulação de fármaco, tamanho de partículas, PDI e potencial zeta considerados adequados. Os processos de liofilização e esterilização também se mostraram favoráveis, não afetando as características das formulações originais. Ainda, foi observado, nos resultados *in vivo* (em coelhos), que o nanocarreador mostrou um valor de meia-vida significativamente mais elevado e tempo médio de resistência quando comparado com o produto comercial. Assim, os autores concluíram que as micelas podem ser consideradas nanocarreadores promissores para fármacos lipofílicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Matérias-primas

- Etilcelulose (Cotia, Brasil):
 - EthocelTM Standard 10 Premium Ethylcellulose– Colorcon[®] (Etil10)
 - EthocelTM Standard 20 Premium Ethylcellulose – Colorcon[®] (Etil20);
- Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) – Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil);
- Óleo de coco virgem orgânico (TheraHerb VCO, Filipinas) – Fignelli Comércio Importação e Exportação (Niterói, Brasil);
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) – Delaware (Porto Alegre, Brasil);
- Poli(ϵ -caprolactona) [M_n 80.000; (PCL)] - Sigma-Aldrich
- Triglicerídeos de cadeia média (TCM) – Alpha Química (Porto Alegre, Brasil);
- Vimpocetina – Attivos Magisttrais (São Paulo, Brasil).
- Trealose - Attivos Magisttrais (São Paulo, Brasil).

3.1.2 Solventes e outros materiais

- Acetona - Proquímios (Rio de Janeiro, Brasil);
- Água ultrapura – Mega Purity Water Purification;
- Etanol – Proquímios (Rio de Janeiro, Brasil);
- Metanol grau HPLC – Tedia (Rio de Janeiro, Brasil);
- Dispositivo de ultrafiltração-centrifugação (Amicon[®] Ultra, 0,5 mL; Ultracel 10 K-membrana de celulose regenerada;10,000 MWCO; Millipore);
- Membranas hidrofílicas (nylon; 0,45 μ m; Sartorius-EUA; diâmetro de 13 mm ou 47 mm);
- Membrana de celulose para tubos de diálise, 10 mm (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich, MO, USA).

Todos os outros solventes e reagentes empregados apresentaram grau analítico e foram utilizados como recebidos.

3.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético – Tecnal TE-0851
- Agitador Vórtex – Phoenix Luferco AP56
- Balança analítica – Shimadzu AUY220
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência – Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japan), equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A (arranjo de diodos – PDA) e sistema controlador com injeção automática
- Evaporador Rotatório – Fisatom 558
- Microcentrífuga – Sigma 1-14
- Liofilizador (LIOTOP L 101, Liobras)
- Potenciômetro – pH 21 pH/mV meter - Hanna Instruments
- Ultrassom – ALT Sonic Clean 3PA
- ZetaSizer[®] Nano series Nano-Zs – Malvern Instruments

3.2 Métodos

3.2.1 Teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos

Primeiramente, foram preparados filmes poliméricos de etilcelulose (Etil10 e Etil20). Para isto, o pó de cada um dos polímeros foi pesado (2,0 g) e dissolvido em 20 mL de acetona, formando um líquido viscoso. Na sequência, esse líquido foi deixado na capela até evaporação total do solvente. Após a formação dos filmes, estes foram cortados em porções de 600 a 800 mg. Os filmes foram pesados em balança analítica e o valor anotado, sendo, em seguida, imersos completamente no TCM ($n = 3$) e deixados em temperatura ambiente. Esses filmes também foram imersos no óleo de coco ($n = 3$), sendo que estes foram mantidos em estufa com temperatura de 37°C, durante todo experimento, para permanecer no estado líquido. Após 1, 2, 3, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de imersão, os filmes foram retirados do

contato com o óleo, com auxílio de uma pinça, secos suavemente com papel absorvente e, novamente, pesados em balança analítica.

3.2.2 Preparação dos sistemas nanoestruturados

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). Desta forma, a fase orgânica, contendo vimpocetina, o polímero (Etil10 ou Etil20), o tensoativo de baixo EHL (monoestearato de sorbitano – Span[®] 60), o óleo (OC ou TCM), em um solvente orgânico miscível em água (acetona), foi mantida sob agitação a 40 °C, até a dissolução total dos componentes (aproximadamente 50 minutos). Em seguida, a fase orgânica foi vertida, lentamente, com auxílio de um funil sobre a fase aquosa, contendo o tensoativo de alto EHL [polissorbato 80 (Tween[®] 80)], sendo a mistura mantida sob agitação moderada, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após, a mistura foi evaporada, sob pressão reduzida, empregando rotavapor, para eliminação do solvente orgânico e ajuste do volume final (10 mL), obtendo-se, assim, suspensões de nanocápsulas na concentração teórica de 1,0 mg/mL de vimpocetina. Para fins comparativos, formulações sem fármaco também foram preparadas, da mesma maneira. Todas as formulações foram preparadas em triplicata e a composição quali-quantitativa pode ser observada na tabela 1. As suspensões foram designadas TCM/Etil10, TCM/Etil20, OC/Etil10 ou OC/Etil20, conforme o óleo e a etilcelulose empregados.

Tabela 1 - Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

Formulação	Polímero (%)	Óleo (%)	Tensoativo de baixo EHL (%)	Tensoativo de alto EHL (%)	Vimpocetina (%)	Água/ Acetona (mL)	Volume final* (mL)
TCM/Etil10	1,0	3,0	0,77	0,77	0,1	53 mL / 27 mL	10 mL
OC/Etil10	1,0	3,0	0,77	0,77	0,1	53 mL / 27 mL	10 mL
TCM/Etil20	1,0	3,0	0,77	0,77	0,1	53 mL / 27 mL	10 mL
OC/Etil20	1,0	3,0	0,77	0,77	0,1	53 mL / 27 mL	10 mL

*Após a evaporação da acetona e parte da água.

Vale salientar que para se obter as formulações estudadas neste trabalho (Tabela 1), anteriormente, foram feitos testes preliminares mediante a preparação de outras formulações apresentando os mesmos constituintes, exceto pela substituição do polímero etilcelulose pela poli(ϵ -caprolactona) [M_n 80.000; (PCL); Sigma-Aldrich]. Testes adicionais também foram feitos aumentando a concentração dos tensoativos (Span[®] 60 e Tween[®] 80) de 0,77% (Tabela 1) para 1,0 % e do solvente (acetona) de 27 mL (Tabela 1) para 53 mL.

3.2.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

Cada lote ($n = 3$) de formulação foi avaliado, logo após a preparação, através da determinação das seguintes características físico-químicas: pH, diâmetro médio, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta, teor de fármaco e eficiência de encapsulamento (EE%).

3.2.3.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado diretamente nas suspensões de nanocápsulas, utilizando potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,00 e 7,00.

3.2.3.2 Determinação do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta

Os diâmetros médios e PdI das partículas em suspensão foram avaliados por espectroscopia de correlação de fótons a 25°C, através do equipamento Zetasizer[®] Nano Series (Malvern Instruments), após diluição das amostras (500 vezes) com água MilliQ[®].

Com relação ao potencial zeta, este foi determinado por eletroforese, no mesmo equipamento, após diluição das amostras em NaCl 10 mM (500 vezes).

3.2.3.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulamento (EE) da vimpocetina

A metodologia foi baseada no trabalho de ELBARY e colaboradores (2002), adaptada para quantificação da vimpocetina nas suspensões desenvolvidas e validada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). A técnica consistiu em pipetar 150 μ l da

suspensão em um balão de 10 mL (concentração teórica de 15,0 µg/mL), adicionou-se metanol e deixou-se em ultrassom por 30 minutos. Após completado o volume do balão com metanol, a amostra foi filtrada e injetada no cromatógrafo para a determinação do teor total de vimpocetina nas formulações [Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japan), equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A (arranjo de diodos – PDA) e sistema controlador CBM-20A e com injeção automática (volume de injeção de 20 µL)].

Para a determinação da EE (concentração de vimpocetina associada aos sistemas nanoestruturados), as suspensões foram submetidas à técnica de ultrafiltração-centrifugação (Amicon® Ultra 10,000 MW; Millipore), onde o fármaco livre, presente na fase aquosa, foi separado das nanoestruturas e analisado por CLAE-UV. A técnica consistiu em adicionar 300 µL das suspensões aos dispositivos, que permaneceram na microcentrífuga por 10 minutos a 7.000 rpm, para obtenção do ultrafiltrado. A EE foi calculada a partir da diferença entre as concentrações total e livre de vimpocetina, determinadas na suspensão e no ultrafiltrado, respectivamente, de acordo com a equação 1:

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

3.2.4 Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de vimpocetina nas nanoestruturas

A validação seguiu os parâmetros preconizados pela International Conference on Harmonisation (ICH, 2005) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003): especificidade, linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão. As condições cromatográficas validadas foram as seguintes: fase móvel metanol/água (80:20 v/v), contendo 0,1% de trietilamina e ácido acético glacial 10% (para ajuste do pH 7,0); vazão de 1,5 mL/min; volume de injeção de 20 µL; comprimento de onda de detecção de 274 nm; coluna cromatográfica C₁₈ 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, 110 Å – Nanoseparation, e pré-coluna C₁₈, 4 x 3,0 mm – Phenomenex.

Para avaliar a especificidade do método, foi feita a análise da pureza do pico da vimpocetina e realizada uma comparação entre os cromatogramas das suspensões de

nanocápsulas sem a presença do fármaco e contendo a vimpocetina, a fim de verificar se os excipientes das formulações interferem no pico do fármaco.

Quanto à linearidade, primeiramente, foram preparadas três soluções padrão contendo 1,0 mg/mL de vimpocetina cada, em metanol, a partir das quais foram preparadas três curvas analíticas constituídas pelas concentrações de 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0 µg/mL, em três dias diferentes, onde os dados foram avaliados através da regressão linear pelo método dos mínimos-quadrados ($n = 3$). O limite de detecção [LD (µg/mL)] e o limite de quantificação [LQ (µg/mL)] foram determinados a partir da média das três curvas analíticas obtidas, utilizando as Equações 2 e 3, onde o DP é o desvio padrão do intercepto e IC é a inclinação da curva analítica.

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{IC} \quad \text{Equação (2)}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad \text{Equação (3)}$$

A fim de confirmar a precisão do método, foi avaliada a repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (inter-dias). Assim, foram preparadas seis diluições em metanol a partir de uma mesma suspensão de nanocápsulas contendo vimpocetina, na concentração teórica de 15,0 µg/mL, sob as mesmas condições, no mesmo dia (intra-dia) e em dois dias consecutivos (inter-dias), por dois analistas diferentes. Os resultados foram expressos através do desvio padrão relativo (DPR%).

Já a exatidão do método foi confirmada através da análise da recuperação de fármaco. Para isso, foram avaliados três níveis de concentração [baixo (7,0 µg/mL), médio (15,0 µg/mL) e alto (23,0 µg/mL)]. A análise consistiu em adicionar, em balões de 10 mL, 50 µL da formulação contendo vimpocetina para todos os níveis de concentrações e os volumes de 20,0, 100,0 e 180,0 µL da solução padrão de vimpocetina (1000 µg/mL), para cada nível de concentração respectivamente; logo após, os balões foram aferidos com metanol ($n=3$).

3.2.5 Estudo da estabilidade das formulações contendo vimpocetina

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

Nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias, foram coletadas amostras das formulações, sendo estas submetidas às análises de pH, diâmetro médio, PDI, potencial zeta e teor de vimpocetina, conforme anteriormente descritas. O estudo foi realizado em triplicata de lote (n = 3).

3.2.6 Estudo da cinética de liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas

A avaliação da liberação *in vitro* foi realizada com as suspensões de nanocápsulas (TCM/Etil10; OC/Etil10; TCM/Etil20; OC/Etil20), através da técnica de difusão em sacos de diálise (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich), em condição *sink*, utilizando como meio de liberação tampão fosfato pH 6,8:etanol (70:30, v/v). Para fins comparativos, foi empregada uma solução metanólica do fármaco (1,0 mg/mL) e comprimidos comerciais (Vicog[®] - vimpocetina 5 mg) dispersos em água ultrapura, nas mesmas concentrações das suspensões (1,0 mg/mL).

Cabe especificar que, quanto aos comprimidos comerciais, inicialmente, foram feitos 5 diferentes testes preliminares de extração da vimpocetina a partir dos mesmos, sendo que o escolhido para fazer o doseamento do comprimido (CLAE-UV), em triplicata, foi colocar 3 comprimidos diretamente em balões volumétricos (3) de 5 mL e deixar sonicando por 10 minutos. Após, foram retiradas 3 alíquotas da suspensão obtida de cada balão, gerando um total de 9 amostras para a quantificação da vimpocetina, segundo a metodologia anteriormente descrita (item 3.2.4). O teor médio obtido, destas amostras (9), foi usado no cálculo do percentual liberado a partir do comprimido comercial disperso, no ensaio da liberação *in vitro*.

Então, preencheu-se os sacos de diálise com 1,0 mL das amostras (aproximadamente 1000 µg de fármaco) e então foram colocados em béqueres contendo 200 mL de meio de liberação, mantidos sob agitação magnética à temperatura de 37 °C. Em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas de 1,0 mL de meio foram coletadas, repondo-se o mesmo volume de meio fresco, aquecido à mesma temperatura. As coletas para o experimento foram realizadas por um período de 72 horas para as suspensões de nanocápsulas e os comprimidos comerciais e de 16 horas para a solução metanólica. A análise das amostras coletadas foi

realizada diretamente por CLAE-UV [cromatógrafo SHIMADZU, Kyoto, Japão, LC-10A, equipado com uma bomba modelo LC-10AD, com detector UV SPD-10A, sistema controlador SCL-10A e injetor automático Rheodyne (volume de injeção de 50 µL)], utilizando a coluna e a fase móvel descritas na determinação do teor (item 3.2.4). Foi também preparada uma solução mãe de vimpocetina em metanol (1,0 mg/mL) e, a partir desta, feita a curva analítica (0,125 a 16,0 µg/mL) empregando o mesmo meio utilizado para a liberação, para aferir o volume final dos balões da curva. O experimento foi realizado em triplicata de lote de formulação (n=3).

A partir dos dados gerados no ensaio de liberação *in vitro*, os perfis foram analisados através de modelagem matemática (Scientist 2.0 software - MicroMath[®], USA), empregando a abordagem modelo-dependente [ordem zero, primeira ordem (monoexponencial ou biexponencial) e Lei da Potência/Korsmeyer-Peppas – equação 6]. O modelo mais adequado (monoexponencial: equações 4 e 5), para descrever os dados gerados, foi selecionado baseado no maior coeficiente de correlação (r), maior critério de seleção do modelo (MSC) e melhor ajuste gráfico.

$$\text{Primeira ordem} \rightarrow C = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (\text{Equação 4})$$

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

$$\text{Modelo de Korsmeyer-Peppas} \rightarrow f_t = a \cdot t^n \quad (\text{Equação 6})$$

Onde, C se refere à 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 presente, f_t é a fração de fármaco liberada no tempo t (horas), a é a constante que incorpora características estruturais e geométricas do sistema de liberação e n é o expoente que indica o mecanismo de liberação do fármaco.

3.2.7 Preparação dos liofilizados a partir das suspensões de nanocápsulas

Após a preparação das suspensões de nanocápsulas (volume final de 25 mL) (TCM/Etil10; OC/Etil10; TCM/Etil20; OC/Etil20), estas passaram pelo processo de liofilização. Este processo consistiu em adicionar a suspensão em frascos de vidro de boca

larga (n=3), juntamente com 10,0 % (p/v) do crioprotetor trealose, deixar sob agitação magnética até a dissolução total do carboidrato e, então, levar ao freezer em temperatura de cerca de -35 °C para o congelamento das amostras (24 horas). Na sequência, essas amostras foram submetidas à desidratação em liofilizador (LIOTOP L 101, Liobras) a uma temperatura de aproximadamente -55 °C durante 24 horas, para obtenção dos produtos secos. Para fins comparativos, uma solução do adjuvante (trealose a 10,0 %) também foi liofilizada. Os liofilizados foram preparados em triplicata (n = 3) e armazenados nos mesmos frascos de vidro, deixados no dessecador e ao abrigo da luz (revestidos com papel alumínio).

3.2.8 Caracterização físico-química dos liofilizados

Cada lote (n = 3) de pó liofilizado foi avaliado, logo após a preparação, através da determinação do diâmetro médio de partículas, após ressuspensão em água, e teor de fármaco. Análise morfológica também foi realizada através de microscopia eletrônica.

3.2.8.1 Determinação do diâmetro médio das partículas

O diâmetro médio das partículas foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer[®]), a 25 ± 2 °C. Para isso, os liofilizados foram pesados (0,310 g) e redispersos em água ultrapura (1,0 mL) a fim de se obter a mesma concentração dos componentes da suspensão original. As amostras de cada lote (n=3) foram submetidas à agitação magnética durante 15 minutos e, após, uma alíquota foi retirada e diluída em água ultra pura (1:500 v/v). Na sequência, as amostras foram filtradas em membrana hidrofílica (0,45 µm) e levadas para análise.

Para calcular o índice de ressuspensão das partículas, que representa a recuperação do tamanho médio de partículas em relação às suspensões originais, foi feita a relação entre o tamanho médio das partículas dos pós após a redispersão em água (tamanho final) e o tamanho médio das suspensões (tamanho inicial), conforme explica a equação 7.

$$\text{Índice de ressuspensão} = \frac{S_f}{S_i} \quad \text{Equação (7)}$$

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

3.2.8.2 Determinação do teor dos liofilizados

Para a determinação do teor de vimpocetina nos pós, a técnica consistiu em pesar exatamente uma quantidade correspondente ao valor teórico de 150 µg do fármaco (concentração de 15,0 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, filtrado e levado para análise no cromatógrafo (CLAE-UV), segundo a mesma metodologia descrita para as suspensões (item 3.2.4).

3.2.9 Análise morfológica dos liofilizados

Para a análise morfológica das formulações liofilizadas, as amostras contendo as nanocápsulas e a amostra da solução aquosa de trealose liofilizada foram colocadas sobre um suporte metálico e metalizadas utilizando ouro, por 30 segundos (metalizador Desk II, Denton Vacuum), e, então, observadas empregando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV, Jeol JSM-6360), localizado no Departamento de Engenharia Mecânica da UFSM. Empregou-se uma voltagem de 10 kV, para obtenção de imagens nos seguintes aumentos: 1.500X, 2.500X e 4.300X.

3.2.10 Estudo da estabilidade dos liofilizados

Com o intuito de avaliar a estabilidade dos liofilizados, os pós foram armazenados por 90 dias em dessecador e protegidos da luz (frascos de vidro transparente recoberto por papel alumínio).

Nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias, os pós foram submetidos à análise de teor de fármaco conforme metodologia descrita anteriormente (item 3.2.8.2; 3.2.4). O estudo foi realizado em triplicata (n = 3).

3.2.11 Avaliação preliminar da citotoxicidade *in vitro* das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

Primeiramente, as células [linhagem celular de fibroblastos NIH-3T3] ($2 \times 10^4/0,2$ mL) foram incubadas por um período de 24 horas, em triplicata, com as amostras em placas

de 96 poços. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e uma nova alíquota de meio contendo Alamar Blue (10 %) foi acrescentada, seguido de incubação por 4 horas a 37 °C. Para a análise, a leitura da fluorescência foi conduzida em espectrofluorímetro (Perkin-Elmer LS55), empregando os comprimentos de onda de 530 e 590 nm, correspondentes à excitação e emissão, respectivamente.

A avaliação da citotoxicidade preliminar das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina (OC/Etil10; TCM/Etil10 ou TCM/Etil20), das respectivas formulações sem o fármaco (OC/Etil10_SF; TCM/Etil10_SF ou TCM/Etil20_SF) e da vimpocetina livre (solução), frente às células de fibroblastos (NIH 3T3), correspondendo à dose de 100,0 µg/mL de fármaco, foi realizada. Essas células foram incubadas com as amostras, por 24 horas, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do Alamar Blue.

O controle do experimento correspondeu a 100 % de viabilidade das células (sem tratamento) e o paclitaxel (70 µg/mL) foi usado como controle positivo do método. O experimento foi realizado em triplicata (n=3) nas placas, a partir de um lote de cada formulação, e os resultados foram expressos como média ± erro padrão. Estes ensaios foram realizados na Universidade Federal de Santa Catarina, sob a colaboração da Prof^a. Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa, com auxílio da Dr^a. Adny Henrique Silva.

3.2.12 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA) e teste *t*, a um nível de significância de 5%. Para avaliar os dados de citotoxicidade, empregou-se ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de médias de Dunnett's (GraphPad Prism[®]).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados poliméricos

4.1.1 Teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos de etilcelulose

Para que haja a formação do envoltório polimérico das nanocápsulas, o polímero utilizado deve ser insolúvel tanto no óleo como no meio aquoso (LEGRAND et al., 2007). Estudos empregando TCM (RAFFIN et al., 2003; KULKAMP et al., 2009; SANTOS et al., 2013) ou OC (SANTOS et al., 2014), utilizando diferentes polímeros (PCL ou Eudragit RS[®]), já são encontrados na literatura para a formação de nanocápsulas.

Previamente à preparação das suspensões de nanocápsulas, foi realizado o teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos, com o intuito de verificar se há compatibilidade entre os óleos TCM ou OC com o polímero etilcelulose (Etil10 ou Etil20). Os valores obtidos nas pesagens dos filmes poliméricos (n = 3) imersos por um total de 90 dias podem ser observados na Figura 5.

A partir desses valores, pode-se verificar que os pesos dos filmes imersos no TCM aumentaram levemente com o passar dos dias, cerca de 3,19 % para Etil10 e de 5,65% para Etil20, após 90 dias, sendo que o polímero de massa molecular/viscosidade maior apresentou aumento significativo de peso em relação a Etil10. Este aumento, apesar de pequeno, foi significativo ($p < 0,05$), tanto empregando o polímero de menor massa molecular quanto o de maior, mostrando que o óleo inchou as cadeias poliméricas. Quanto aos filmes imersos no OC, não foi observada diferença significativa nos pesos após o contato com o óleo. Como não houve dissolução, e, sim, apenas um leve aumento, no caso do TCM, os dois óleos foram considerados adequados para a formação das nanocápsulas e continuação deste estudo.

O contrário (redução nos pesos) foi observado no trabalho de Guterres e colaboradores (2000), onde ocorreu a dissolução de filmes de PCL e poli(ácido láctico) quando colocados em contato com benzoato de benzila, ocorrendo, possivelmente, a formação de micelas coloidais ao invés de nanocápsulas, demonstrando a importância de efetuar este teste de pré-formulação no desenvolvimento destes sistemas. Recentemente, Silva e colaboradores (2013), utilizando estes experimentos, inferiram que paredes poliméricas estáveis ao redor do núcleo oleoso,

composto por vitamina K1, seriam obtidas, pois não houve variação nos pesos de filmes de PCL devido ao contato com mesma, durante 30 dias.

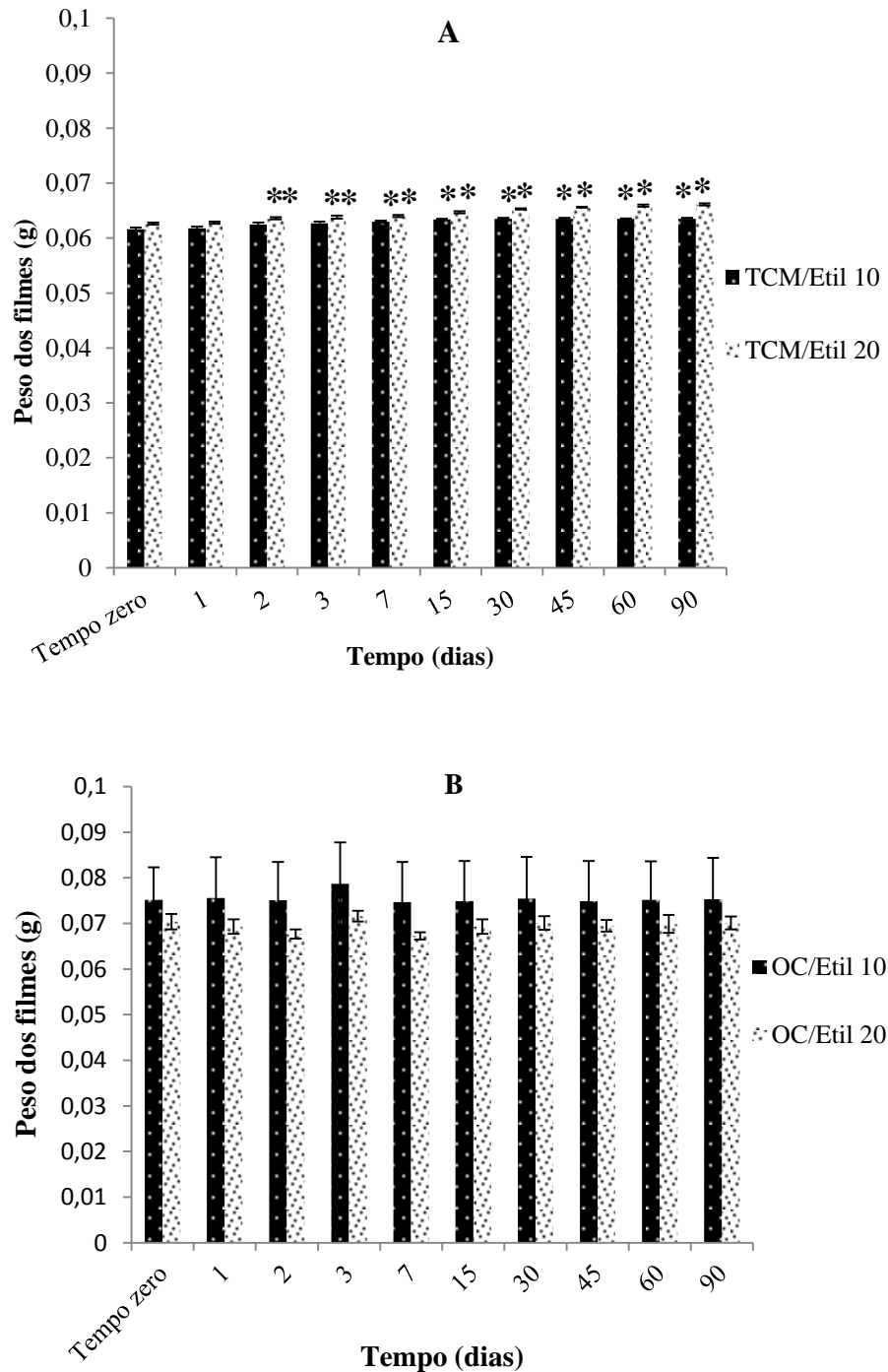


Figura 5 – Gráficos com os pesos dos filmes de etilcelulose após 90 dias de imersão em TCM (A) ou OC (B).
*Diferença significativa em relação ao tempo inicial.

4.1.2 Preparação preliminar dos sistemas nanoestruturados

No início do desenvolvimento das formulações, primeiramente, foram preparadas suspensões de nanocápsulas de PCL (1,0% p/v) contendo óleo de coco (3,0% p/v), Span[®] 60 (0,77% p/v), vimpocetina (0,1 % p/v) e acetona (27 mL) na fase orgânica, e Tween[®] 80 (0,77% p/v) e água (53 mL) na fase aquosa, sendo estas proporções usuais para preparação de nanocápsulas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Logo após a remoção do excesso de solvente e ajuste final (10 mL) no evaporador rotatório, notou-se que essa formulação apresentou precipitados. Com este resultado, pensou-se na possibilidade de preparar essa mesma formulação alterando algumas de suas proporções. A partir disto, foi preparada uma nova suspensão de nanocápsulas aumentando a concentração do Span[®] 60 (1,0% p/v), do Tween[®] 80 (1,0% p/v) e da acetona (53 mL). Após estas modificações, observou-se que a formulação ficou estável por um período de tempo maior (aproximadamente 2 – 3 dias), antes que aparecessem os primeiros precipitados. Com isso, foram feitas as análises de diâmetro médio, PdI e potencial zeta, mas os valores obtidos não foram adequados. Esta formulação apresentou diâmetro médio elevado, distribuição de tamanho não homogênea e potencial zeta próximo de zero.

A partir destes dados, optou-se pela troca do PCL por outro polímero empregado para liberação controlada e com uso permitido para via oral. Foram, então, preparadas formulações nas mesmas concentrações iniciais citadas acima, substituindo somente o polímero PCL pela etilcelulose (Etil10 ou 20; tabela 1). Após as novas preparações, observou-se que estas não apresentaram precipitados visíveis por vários dias. A análise macroscópica dessas suspensões mostrou que apresentaram aspecto homogêneo.

Com a obtenção dos melhores resultados, as formulações utilizando Ethocel[®] 10 ou 20, e OC ou TCM foram as selecionadas para as análises de caracterização, estudo de estabilidade, teste de liberação *in vitro*, processo de liofilização e avaliação preliminar de citotoxicidade.

4.1.3 Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de vimpocetina nas suspensões nanoestruturadas

Para que fosse possível uma correta determinação do teor de vimpocetina nas suspensões, primeiramente, foi realizada a validação do método analítico a ser utilizado.

Sendo que, é essencial utilizar métodos analíticos bem definidos e validados para se obter resultados confiáveis que possam ser interpretados de forma satisfatória.

O termo especificidade nos informa a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da formulação (BRESSOLLE; BROMET-PETIT; AUDRAN, 1996). Ao analisar a sobreposição dos cromatogramas (Figura 6) da formulação sem o fármaco (a) e com a presença da vimopocetina (b), observou-se que não houve interferência dos constituintes da formulação no pico do fármaco e a pureza de pico foi confirmada por avaliar as amostras usando um detector do tipo PDA (índice de pureza de pico foi de 1,0000), indicando que o método é específico para determinação da vimopocetina.

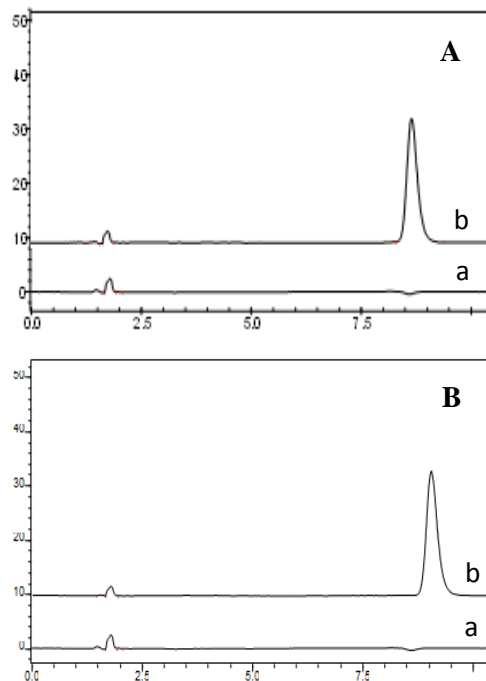


Figura 6 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV; **A**: nanocápsulas de OC com (b) e sem (a) fármaco. **B**: nanocápsulas de TCM com (b) e sem (a) fármaco.

Quanto à linearidade, as curvas analíticas (n=3) descritas pela equação $y = 28.433x - 28.735$ apresentaram coeficiente de correlação maior do que 0,99. Esses resultados demonstraram que o método proposto é linear na faixa de concentração analisada (5,0 – 25,0 $\mu\text{g/mL}$). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 1,324 $\mu\text{g/mL}$ e 4,013 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, demonstrando a sensibilidade do método para baixas concentrações do fármaco.

Os resultados obtidos para a análise da repetibilidade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (precisão inter-dias) estão expressos na Tabela 2, observando-se que ambos os ensaios (intra-dia e inter-dia) obtiveram valores de DPR menores que 2,0 %, demonstrando que o método é preciso. Para as análises de precisão e exatidão foi escolhida a formulação considerada como a matriz mais complexa, contendo óleo de coco (OC) e Etil 20.

Tabela 2 – Análise de precisão

Amostra	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Teor (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	15,00	13,75 ± 0,21	91,65 ± 1,37	1,49
Dia 2 (n=6)	15,00	13,77 ± 0,23	91,77 ± 1,56	1,70
Inter-dias (n=12)	15,00	13,76 ± 0,21	91,71 ± 1,40	1,53

Em relação à exatidão, as amostras foram analisadas em três níveis de concentração do fármaco (baixo, médio e alto), onde os valores de recuperação alcançados para este ensaio estão entre 101 % e 103 % (Tabela 3), o que indica que o método possui exatidão satisfatória na faixa de concentração estudada (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Tabela 3 – Análise de exatidão

Nível de concentração	Amostra conhecida (µg/mL)	Concentração adicionada (µg/mL)	Valor obtido (µg/mL)	Recuperação (%)
Baixo	4,60	2,00	6,79 ± 0,12	102,85 ± 1,76
Médio	4,60	10,00	14,78 ± 0,12	101,21 ± 0,82
Alto	4,60	18,00	23,08 ± 0,03	102,14 ± 0,12

Com esses resultados pode-se observar que o método analítico, adaptado de Elbary e colaboradores (2002), mostrou-se adequado para a quantificação do fármaco nas formulações de nanocápsulas desenvolvidas.

4.1.4 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

A etapa da caracterização das nanoestruturas, em triplicata de lote, envolveu a análise do tamanho médio das partículas, do PDI e do potencial zeta, do pH das suspensões, do teor de fármaco presente e da porcentagem de fármaco encapsulada (EE).

No presente trabalho, foram utilizadas etilceluloses de diferentes viscosidades, a Ethocel™ Premium 10 e a Ethocel™ Premium 20, que estão designadas como Etil10 e Etil 20, respectivamente, onde a Ethocel™ 10 apresenta uma viscosidade que varia de 9 a 11 mPa.s (cP) e a Ethocel™ 20 varia de 18 a 22 mPa.s (cP) (DOW EXCIPIENTS, 2005; ROWE; SHESKEY, QUINN, 2009). Dispersões deste polímero com maior viscosidade tendem a indicar que é composto por cadeias poliméricas mais longas (ROWE; SHESKEY, QUINN, 2009).

Os resultados referentes às avaliações físico-químicas das formulações selecionadas estão disponíveis na Tabela 4, as quais apresentam composição quali-quantitativa descrita na Tabela 1. Os gráficos de distribuição de tamanho de partículas e potencial zeta (n=3) das formulações desenvolvidas podem ser visualizados nas Figuras 7 e 8.

Tabela 4 - Características físico-químicas (n=3) das suspensões de nanocápsulas de etilcelulose, empregando TCM ou OC como núcleo e o fármaco vimpocetina (1,0 mg/mL), após a preparação

Formulações	Diâmetro médio (nm)	*PDI	Potencial Zeta (mV)	pH	Teor total (%)
TCM/Etil 10	134 ± 17	0,124 ± 0,07	-20,0 ± 2,2	6,42 ± 0,15	95 ± 0,01
OC/Etil 10	169 ± 09	0,111 ± 0,01	-24,0 ± 1,5	6,69 ± 0,03	95 ± 0,01
TCM/Etil 20	113 ± 06	0,132 ± 0,02	-18,0 ± 1,9	6,65 ± 0,06	95 ± 0,01
OC/Etil 20	154 ± 03	0,113 ± 0,01	-19,5 ± 1,3	6,80 ± 0,10	94 ± 0,02

*PDI: Índice de Polidispersão

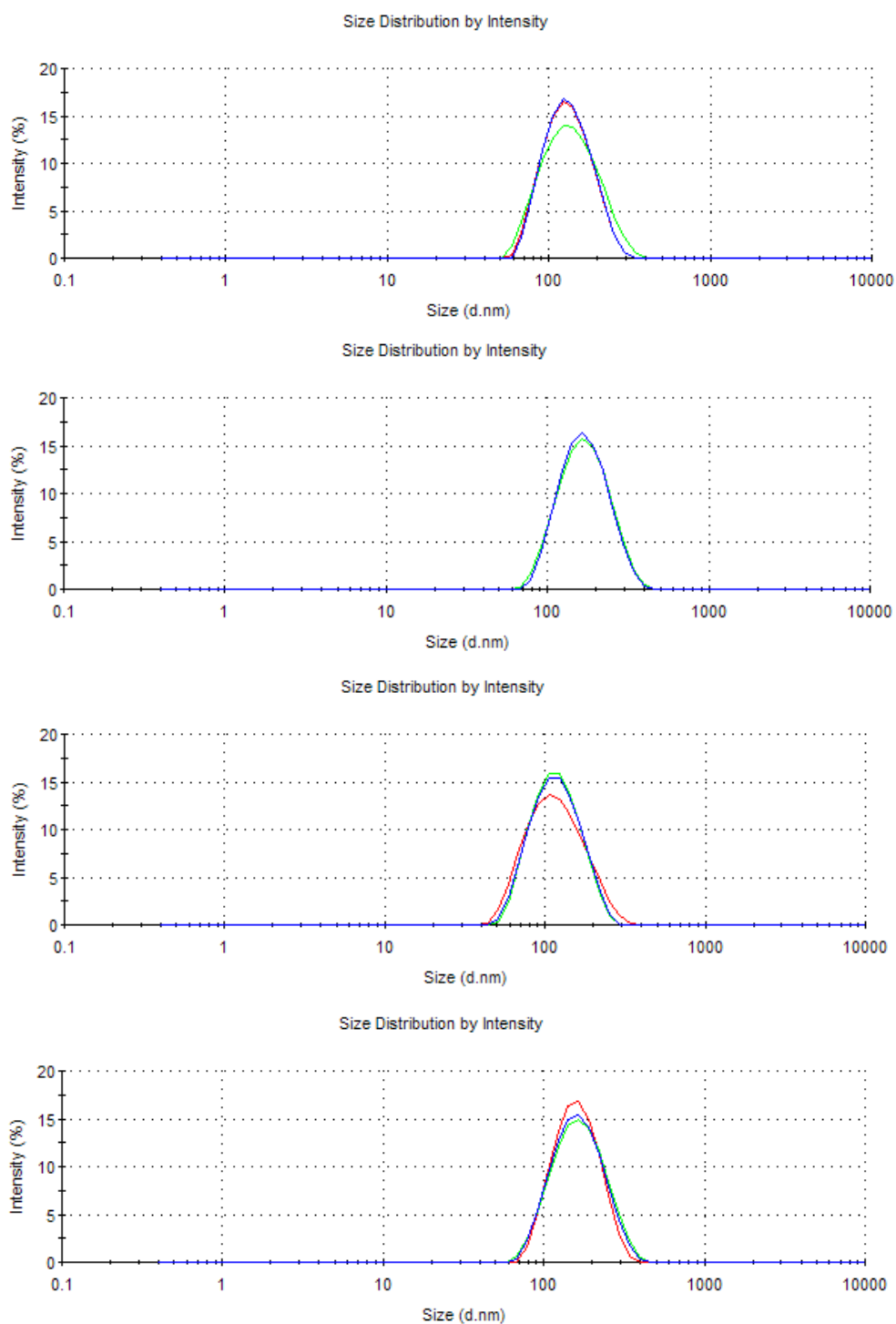


Figura 7 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das formulações (n=3), obtidos através de espalhamento de luz dinâmico (TCM/Etil10, OC/Etil10, TCM/Etil20 e OC/Etil20, respectivamente).

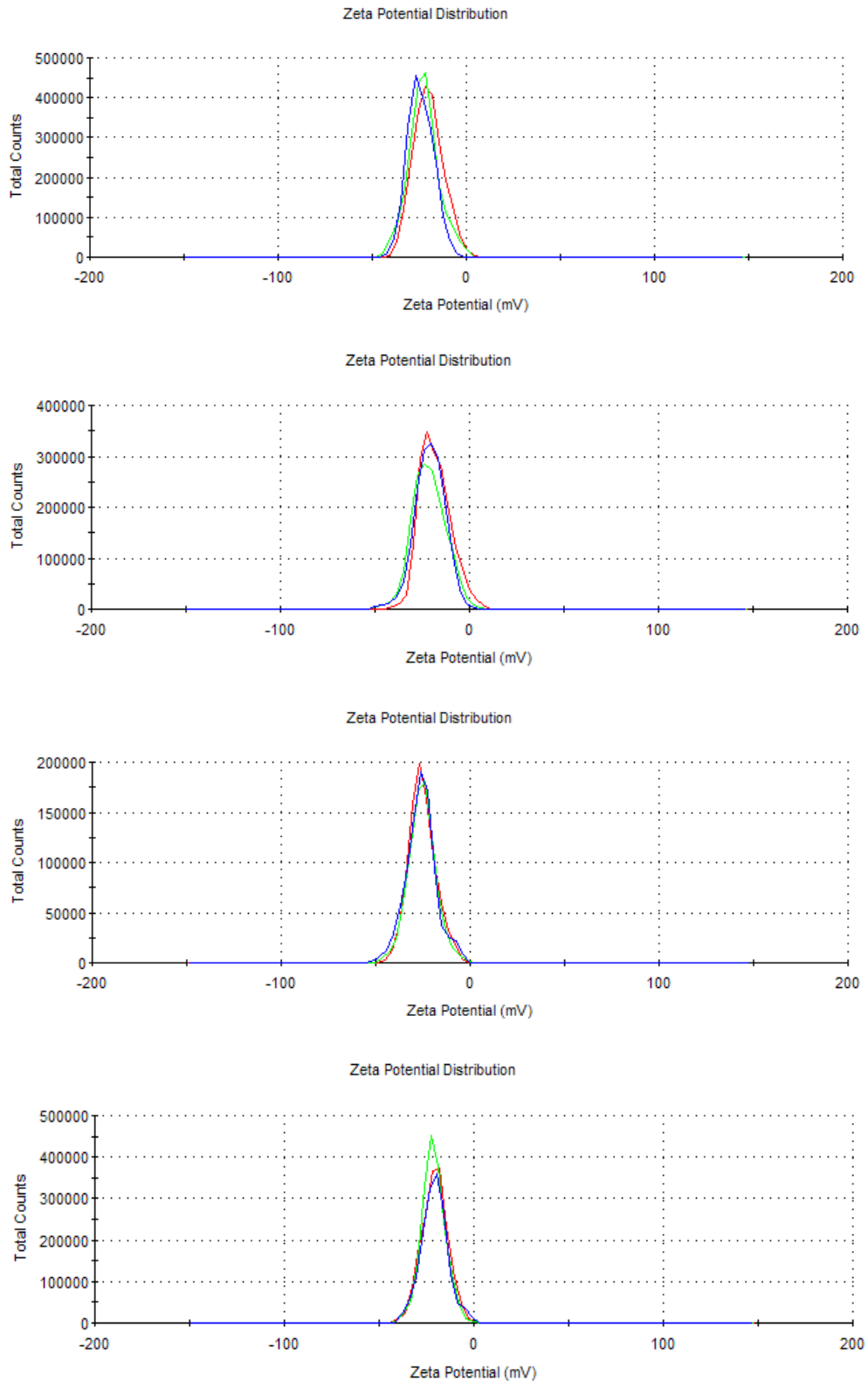


Figura 8 – Gráficos do potencial zeta (n=3) das formulações (TCM/Etil10, OC/Etil10, TCM/Etil20 e OC/Etil20, respectivamente).

Considerando a análise dos resultados, as formulações obtidas apresentaram aspecto macroscópico homogêneo, com coloração leitosa branca e com reflexo azulado (*Efeito Tyndall*), característico dos sistemas coloidais (SANTOS MAGALHÃES et al., 2000; GUTERRES; POHLMANN; SCHAFFAZICK, 2007).

Como pode ser observado na tabela 4, as médias dos diâmetros das suspensões de nanocápsulas variaram entre 113 a 169 nm, estando de acordo com os diâmetros médios das suspensões de nanocápsulas normalmente encontrados quando preparadas a partir de métodos de polímeros pré-formados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; PLAPIED et al., 2011; SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2013; BAZYLINSKA et al., 2014; CHASSOT et al., 2014; SANTOS et al., 2014; VILLALBA et al., 2014; KUMAR; VERMA; SINGH, 2015). Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) somente entre os óleos, de maneira que as formulações com TCM apresentaram menor diâmetro médio de partículas em comparação àquelas com OC, tanto empregando Etil10 quanto Etil20. Isso nos mostra que o óleo pode interferir no tamanho das partículas, já que a natureza do núcleo oleoso das nanocápsulas é descrita como um dos fatores que pode influenciar o diâmetro médio das partículas, atribuído às diferenças de hidrofobicidade, viscosidade e tensão interfacial das substâncias utilizadas (LOSA et al., 1993; MOSQUEIRA et al., 2000). Enquanto que, para o mesmo óleo, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) quando se comparou os polímeros, não havendo influência da viscosidade/massa molecular.

Cabe reforçar que o mecanismo de formação das nanocápsulas poliméricas, através da técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado, ocorre espontaneamente pela rápida difusão do solvente e pode ser explicado pela turbulência interfacial durante a difusão, devido a miscibilidade entre os solventes empregados (FESSI et al., 1989; PLAPIED et al., 2011; BAZYLINSKA et al., 2014; LAI et al., 2014; VILLALBA et al., 2014; KUMAR; VERMA; SINGH, 2015), no caso do presente trabalho, água e acetona.

Assim como a determinação do tamanho de partícula, o PdI, que reflete a homogeneidade de distribuição, é um parâmetro que deve ser cuidadosamente avaliado nas suspensões de nanopartículas (GUTERRES et al, 1995a; CALVO, VILA-JATO e ALONSO, 1996; GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004).

Ao analisar os resultados de PdI, em todas as formulações, os valores foram satisfatórios ficando abaixo de 0,2, o que indica uma estreita distribuição de tamanho, evidenciando, conseqüentemente, homogeneidade adequada desses sistemas (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; FRIEDRICH et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010;

CHASSOT et al., 2014). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações segundo este parâmetro.

Com isso, vale ressaltar que o tamanho médio das partículas e a homogeneidade da população nanométrica são características chave dos sistemas nanoparticulados para se obter uma melhor aplicabilidade, pois influenciam na estabilidade das nanopartículas, além da influência na distribuição *in vivo*, na toxicidade e na capacidade de liberação do fármaco no sítio de ação desejado (MOHANRAJ et al., 2006; JORNADA et al., 2012).

O potencial zeta das nanopartículas reflete o seu potencial de superfície, sendo que quanto maior o potencial zeta, em módulo, maior é a probabilidade da suspensão manter-se estável, pois as partículas se repelem umas às outras superando a tendência natural à agregação. Isso explica a razão de um valor relativamente alto em módulo ser importante para uma boa estabilidade físico-química, onde grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais das nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003a). Segundo alguns autores, o potencial zeta destas estruturas coloidais é influenciado principalmente pela natureza química do polímero, pelos estabilizantes e pelo pH do meio, além da influência da concentração dos componentes da formulação, inclusive do princípio ativo (SCHAFFAZICK et al., 2003a; TEIXEIRA et al., 2005; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). A determinação do potencial zeta é de extrema importância para que se prevejam características das nanoestruturas, pois a carga de superfície das nanopartículas é essencial para a internalização celular destas, para o seu agrupamento no fluxo sanguíneo e na adesão/interação com membranas celulares de cargas opostas (FENG, 2004).

Na tabela 4, pode-se observar que, independente do tipo de óleo utilizado, as suspensões apresentaram potenciais zeta negativos, isso se deve à natureza química do polímero. Os valores de potencial zeta variaram entre -18,0 a -24,0 mV, sendo que somente observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações OC/Etil10 e OC/Etil20, indicando um maior potencial zeta, em módulo, para a formulação com menor massa molecular. As nanocápsulas de etilcelulose preparadas por CHASSOT e colaboradores (2014), com óleo de amêndoas, também apresentaram potencial zeta negativo (-11,7 a -15,9 mV).

A medida do pH é um outro parâmetro importante, pois fornece informações relevantes sobre a estabilidade de formulações nanoparticuladas, visto que alterações no pH podem estar relacionadas com a degradação de algum componente da formulação ou até mesmo difusão da substância ativa da partícula para o meio aquoso (GUTERRES et al., 1995; SCHAFFAZICK

et al, 2003a). Em relação ao polímero, pode fornecer informações como indícios de degradação desta matéria-prima, relaxamento das cadeias poliméricas e ionização de grupos carboxílicos funcionais, quando presentes (SCHAFFAZICK et al., 2003a).

Normalmente, os valores de pH das dispersões de nanopartículas preparadas pelo método de nanoprecipitação encontra-se na faixa de 3,0 a 7,5. O monitoramento do pH, em função do tempo, pode nos informar detalhes relevantes sobre a estabilidade das formulações. Além disso, o pH também parece ser um fator importante na sua biodistribuição (SCHAFFAZICK et al., 2003a; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As formulações, deste estudo, apresentaram valores de pH entre 6,42 e 6,80, sendo que estes valores foram obtidos logo após o preparo das mesmas. Foi observado que a formulação TCM/Etil10 diferiu significativamente em relação à OC/Etil10 quanto ao pH, mostrando leve influência do tipo de óleo nas suspensões preparadas com polímero de menor massa molecular ($p < 0,05$).

Em relação ao teor total de vimpocetina, presente nas suspensões de nanocápsulas (Tabela 4), todas apresentaram teores adequados, entre 94 e 95%, considerando a concentração teórica (1,0 mg/mL), sem diferença significativa entre as formulações ($p > 0,05$).

A EE do fármaco nos sistemas nanoestruturados tem uma enorme importância na avaliação completa dos parâmetros físico-químicos, visto que a quantidade de fármaco encapsulada pode influenciar na performance do sistema (SCHAFFAZICK et al., 2003a).

Os valores de EE obtidos para os 4 tipos de formulação ficaram próximos a 100 % (aproximadamente maior do que 99 %), independentemente da natureza do óleo e da massa molecular do polímero empregado. Em função da natureza da vimpocetina, molécula lipofílica, com baixa solubilidade em água, estes resultados eram esperados pela maior afinidade em relação às nanocápsulas do que pela fase dispersante. Resultados estes similares às EE obtidas para outros sistemas nanoestruturados, lipídicos, contendo vimpocetina, conforme relatado na literatura. Zhuang e colaboradores (2010) prepararam carreadores lipídicos nanoestruturados através do método de homogeneização de alta pressão e obtiveram valores de EE que variaram de 83 a 95%. Já no trabalho de Luo e colaboradores (2006), foi observada uma EE de 97 a 99%. Como mencionado anteriormente, a natureza química do fármaco é um dos principais fatores para determinar a eficiência de encapsulamento, sendo que, em geral, os fármacos mais lipossolúveis tem partição favorecida ao coloide (SHENOY; AMIJI, 2005; STELLA et al., 2007).

4.2 Estudo de estabilidade das formulações contendo vimpocetina

O estudo de estabilidade auxilia na garantia da segurança e eficácia de produtos farmacêuticos, sendo considerado um dos fatores mais importantes a serem avaliados no processo de desenvolvimento das formulações (BRASIL, 2005).

Em relação ao aspecto macroscópico, as formulações se mantiveram homogêneas durante os 90 dias de armazenamento (temperatura ambiente; proteção da luz), sem a presença de precipitados visíveis e sem alteração na coloração.

A análise do diâmetro médio de partículas e sua distribuição são parâmetros importantes na avaliação da estabilidade física das nanoestruturas (WU et al., 2011). Como pode ser observado na Figura 9, o diâmetro médio das partículas se manteve submicrométrico para todas as formulações durante os 90 dias de armazenamento, apresentando um aumento significativo ($p < 0,05$) apenas no período de 60 dias para a formulação OC/Etil20, quando comparada ao tempo inicial.

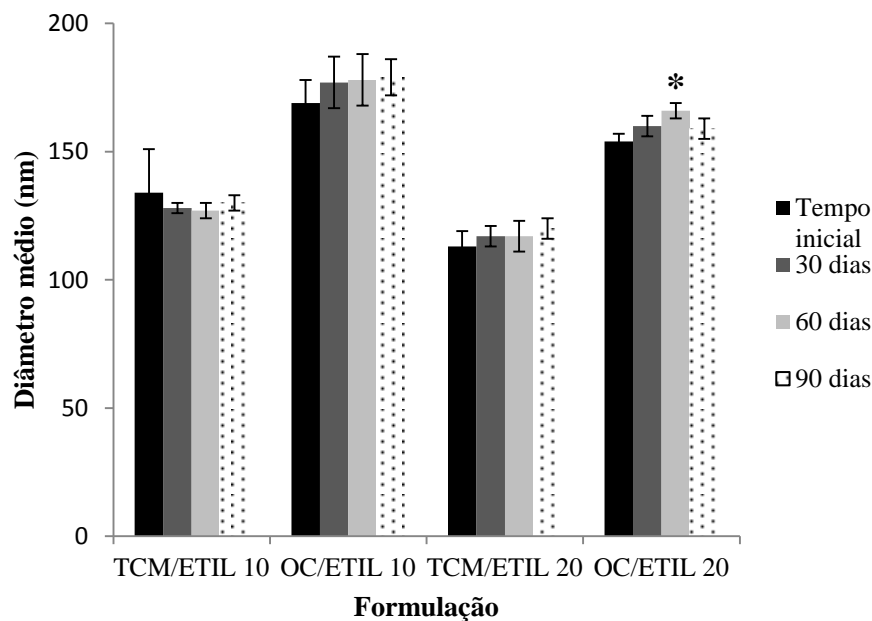


Figura 9 – Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias.

*Diferença significativa em relação ao tempo inicial.

Por sua vez, quanto à distribuição de tamanho de partículas, avaliada através do PDI, os valores médios mantiveram-se abaixo de 0,14 e não se observou nenhuma alteração significativa ($p > 0,05$) para todas as formulações, durante o período do estudo (Figura 10).

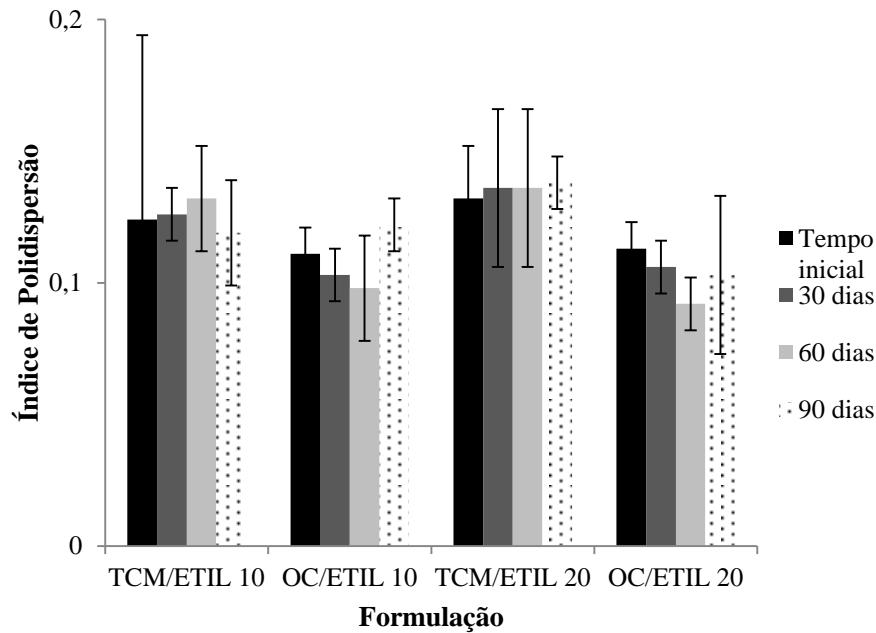


Figura 10 – Índice de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias.

Ainda, outros parâmetros que podem fornecer informações importantes, na avaliação da estabilidade dos sistemas nanoestruturados, são o potencial zeta e o pH das formulações.

O potencial zeta reflete a carga de superfície das partículas, sendo importante que seu valor em módulo seja relativamente alto, para reduzir a agregação das partículas, possibilitando uma melhor tendência à estabilidade físico-química das suspensões coloidais (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003a; BAZYLINSKA et al., 2014). Os valores de potencial zeta podem variar bastante dependendo do tipo e da composição de cada formulação (WU; ZHUANG; WATANABE, 2010).

Na Figura 11, pode-se verificar que, no geral, os valores de potencial zeta variaram de -24,0 a -14,5 mV, sendo observada redução significativa ($p < 0,05$), em módulo, apenas para as formulações contendo OC, tanto com Etil 10 quanto com Etil 20, após 90 dias em relação ao tempo inicial.

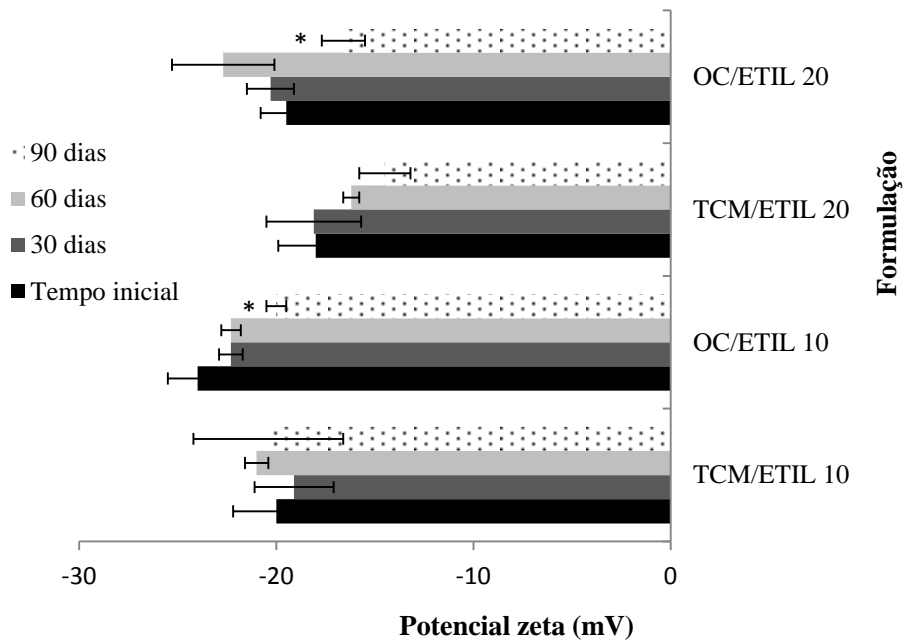


Figura 11 – Valores de potencial zeta das suspensões de nanocápsulas contendo vimeocetina, armazenadas por 90 dias. *Diferença significativa em relação ao tempo inicial.

Em relação ao pH, foi observado um decaimento significativo ($p < 0,05$) para todas as formulações a partir de 30 dias (Figura 12). Diminuição deste parâmetro também já foi reportado durante o armazenamento de suspensões de nanocápsulas preparadas com outros polímeros e fármacos, em função de provável degradação de componentes (SCHAFFAZICK et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009; SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2014), como degradação de polímeros (ex: PCL) ou de triglicerídeos (óleo), liberando ácidos graxos, ou, ainda, relaxamento de cadeias poliméricas.

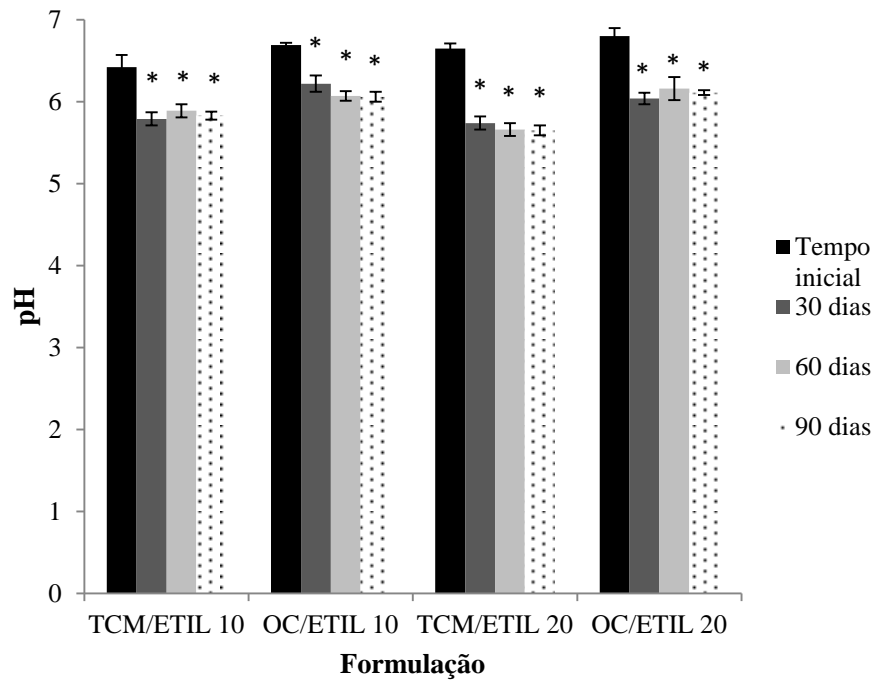


Figura 12 – Valores de pH das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, armazenadas por 90 dias.

*Diferença significativa em relação ao tempo inicial.

Conforme o teor total de fármaco (Figura 13), foi observado que, durante o período de armazenamento, as formulações TCM/Etil10 e OC/Etil20 não apresentaram alteração significativa no teor de vimpocetina. Por sua vez, a formulação OC/Etil10 apresentou redução significativa no teor após 30 e 60 dias de armazenamento. Já para a formulação TCM/Etil20, essa diferença ocorreu após 60 e 90 dias da preparação, como mostra a Figura 13. Apesar destas alterações nos teores, os valores mantiveram-se acima de 90% para todas as formulações.

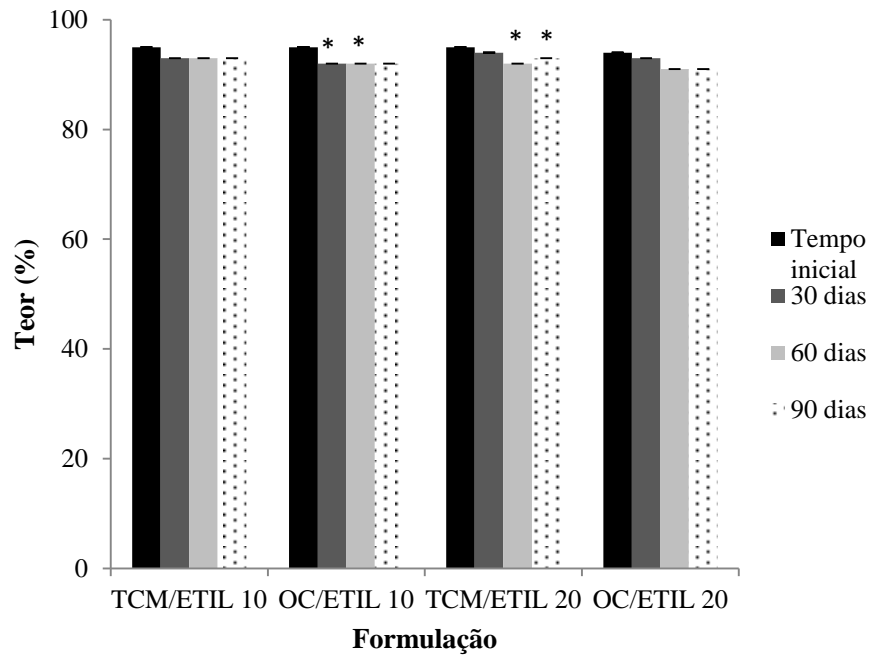


Figura 13 – Teor de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas armazenadas por 90 dias. *Diferença significativa em relação ao tempo inicial.

4.3 Estudo da cinética de liberação da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas

O perfil de liberação *in vitro* de um fármaco associado a nanocápsulas depende de uma variedade de fatores como, natureza, massa molecular e concentração do polímero, biodegradabilidade, concentração e características físico-químicas do fármaco, condições do método de preparação, natureza do núcleo oleoso, tamanho das nanopartículas, condições do ensaio de liberação (pH do meio, temperatura, tempo de experimento), entre outros. Sendo assim, para a determinação do perfil de liberação *in vitro*, é importante uma boa avaliação das condições estabelecidas para a realização de cada estudo (MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2010).

O estudo de liberação foi realizado através da técnica de difusão em sacos de diálise a 37 °C, a qual é bastante usual para a avaliação da cinética de liberação de fármacos a partir de sistemas nanoestruturados (MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2010; ZHUANG et al., 2010; SANTOS et al., 2014). Neste trabalho, o experimento foi conduzido durante 72 horas para as suspensões de nanocápsulas desenvolvidas e 16 horas para a solução metanólica do fármaco livre (controle), sendo obtidos os perfis de liberação da vimpocetina no meio de liberação tampão fosfato pH 6,8:etanol (70:30, v/v). Para garantir o processo difusivo ao

longo do estudo de liberação, a manutenção de condição *sink* foi respeitada durante todo o período de experimento. Esta é uma situação fundamental para a realização da modelagem matemática dos dados, uma vez que as equações de difusão tornam-se de difícil resolução em condições de acúmulo de fármaco no meio de liberação, sendo que para este estudo a solubilidade determinada no meio empregado foi de 99,8 µg/mL (WASHINGTON, 1990; SAARINEN-SAVOLAINEN et al., 1997). Ainda, o método mostrou-se específico, já que o meio de liberação (tampão fosfato:etanol) não interferiu na quantificação do fármaco, e linear na faixa de concentração de 0,125 a 16,00 µg/mL (ANOVA, $p < 0,05$), sendo a equação $y = 65.278x + 11.153$ ($r = 0,9991$), obtida a partir da construção de três curvas analíticas.

Conforme pode-se observar na figura 14, todas as suspensões de nanocápsulas (TCM/Etil 10; TCM/Etil 20; OC/Etil 10; OC/Etil 20) apresentaram uma liberação controlada do fármaco, quando comparadas à difusão do fármaco livre. As formulações onde se utilizou o óleo de coco, como núcleo oleoso, apresentaram liberação média de $57,97 \pm 2,39$ % em associação com a Etil 10 e de $64,47 \pm 3,60$ % com a Etil 20, após as 72 horas de experimento. Enquanto que essa porcentagem foi menor para as formulações onde se utilizou TCM, apresentando liberação de $50,83 \pm 1,11$ % para Etil 10 e de $44,71 \pm 1,39$ % para Etil 20, após o mesmo período. Ao comparar a influência do tipo de óleo, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) tanto com o uso da Etil 10 quanto 20, no tempo de 72 h. Por sua vez, ao comparar a influência do tipo de etilcelulose, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) somente entre as formulações preparadas com TCM. Já a solução de vimocetina (fármaco livre) completou sua difusão em 16 h, indicando a influência do sistema nanoestruturado em fornecer uma liberação lenta e gradual, interessante para futuros tratamentos crônicos empregando o fármaco associado.

Segundo a diferença de peso molecular desse polímero, alguns estudos já foram realizados e indicaram que, ao utilizar etilcelulose de peso molecular menor, a velocidade de liberação se tornara mais acelerada, quando comparada à utilização de uma etilcelulose de maior peso molecular (GRATTARD et al., 2002; MURTAZA, 2012).

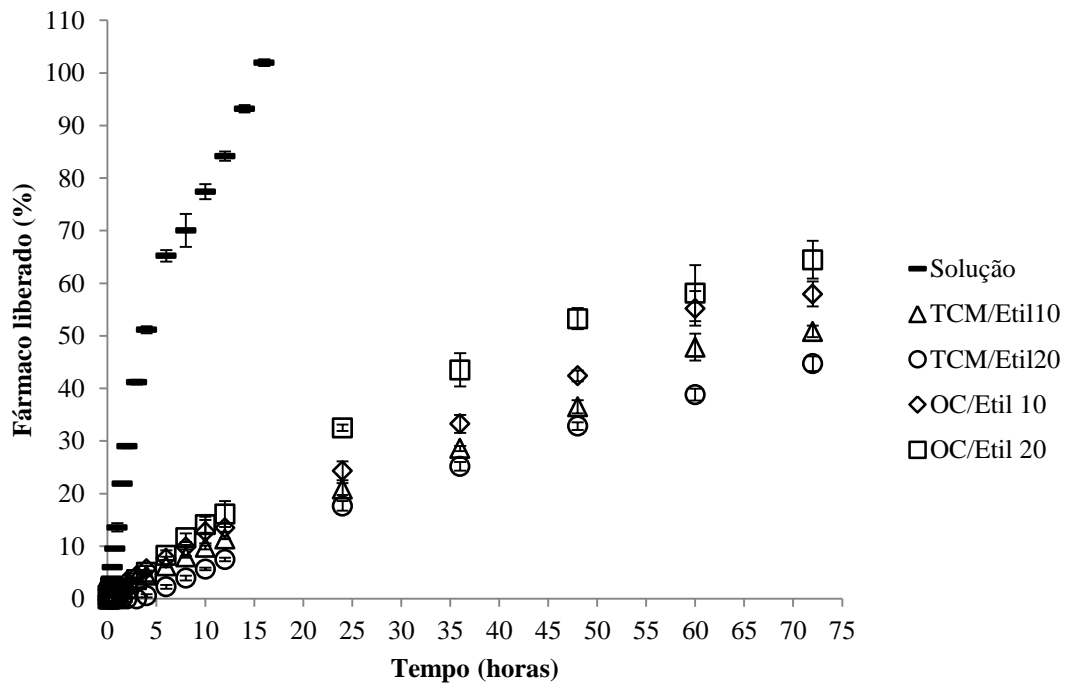


Figura 14 - Perfil de liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das diferentes nanocápsulas (TCM/Etil10; TCM/Etil20; OC/Etil10; OC/Etil20) em comparação à difusão do fármaco livre (solução metanólica).

As nanocápsulas poliméricas são consideradas sistemas reservatórios, pelo fato do fármaco encontrar-se separado do meio de dissolução por um revestimento, uma membrana ou uma interface, devendo transpor essa barreira para ser liberado para o meio (OLIVEIRA et al., 2002). Com isso, diferentes comportamentos cinéticos poderão ser esperados para um fármaco dissolvido no núcleo oleoso destas estruturas ou retido/adsorvido em sua parede polimérica (SOARES, 2003; MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2010). Frente ao exposto, é de fundamental importância uma análise adequada da liberação do ativo (ABDEL-MOTTALEB, NEUMANN, LAMPRECHT, 2011), no sentido da proposição da localização do fármaco nos sistemas coloidais, a qual poderá influenciar a performance dos sistemas desenvolvidos.

Para a melhor escolha do modelo matemático dos dados obtidos, foram observados o melhor ajuste gráfico (figura 19), o maior critério de seleção do modelo (MSC) e o maior coeficiente de correlação (r). A modelagem dos perfis de liberação de vimpocetina indicou que o modelo que melhor descreveu o comportamento dos dados de liberação obtidos foi o monoexponencial, descrito na página 44 (equação 4). Esse modelo nos fornece a constante de velocidade observada do processo (k). Esses valores fazem a correlação da dissolução do fármaco diretamente com o tempo, onde chamamos esta relação de constante cinética de primeira ordem (DOMINGUES, 2006). Como é possível observar na tabela 5, as constantes

cinéticas para a liberação do ativo para todos os lotes de suspensões e solução de fármaco livre foram calculadas e estão ordenadas de maneira crescente: TCM/Etil 20 ($k = 0,0080 \text{ h}^{-1}$), TCM/Etil 10 ($k = 0,0100 \text{ h}^{-1}$), OC/Etil 10 ($k = 0,0121 \text{ h}^{-1}$), OC/Etil 20 ($k = 0,0151 \text{ h}^{-1}$), Solução ($k = 0,1677 \text{ h}^{-1}$). Considerando análise estatística, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas as formulações quanto aos valores de K (constante de velocidade), havendo influência do tipo de óleo e da massa molecular do polímero.

Desta forma, observa-se que, com a utilização do TCM como núcleo oleoso, a formulação contendo Etil10 apresentou uma velocidade de liberação mais rápida comparada a Etil20, conforme apontado em outros estudos onde uma maior massa molecular apresentou maior controle de liberação (GRATTARD et al., 2002; MURTAZA, 2012). Já com o uso do óleo de coco, a velocidade de liberação da vimpocetina foi levemente mais rápida para a Etil20 em relação à Etil10.

Estas influências observadas nos perfis devem-se, provavelmente, a um conjunto de fatores, como às diferentes massas moleculares do polímero, viscosidade do componente oleoso e/ou diferentes interações óleo/polímero ou mesmo distintas áreas superficiais/número de partículas dos sistemas. Ressalta-se que o experimento de liberação foi realizado em uma temperatura de 37°C e ambos os óleos estão no estado líquido. A partir desses dados, se correlacionarmos o teste de liberação com o inchamento polimérico, observou-se que apesar dos filmes de Etil20 terem apresentado um percentual de inchamento levemente maior (5%) em TCM, em relação aos filmes de Etil10 (3%), as nanocápsulas preparadas com polímero de maior massa molecular mantiveram um maior controle de liberação da vimpocetina.

A partir dos valores das constantes (k) do modelo monoexponencial, foram calculados os tempos de meia-vida (equação 5, página 44), onde se obteve os seguintes valores: 86,62 horas para TCM/Etil 20; 69,3 horas para TCM/Etil 10; 57,27 horas para OC/Etil 10; 45,89 horas para OC/Etil 20; e 4,13 horas para a solução de fármaco livre. Quanto à análise estatística, os valores de k obtidos para as formulações desenvolvidas, e, conseqüentemente, os tempos de meia-vida de liberação dos mesmos, apresentaram diferença significativa em relação aos mesmos parâmetros calculados para a vimpocetina em solução ($p < 0,05$). As nanocápsulas desenvolvidas apresentaram valores de tempo de meia-vida de liberação de aproximadamente 11 a 21 vezes maiores do que a solução do fármaco livre, indicando o controle da liberação, que foi dependente da composição núcleo/massa molecular do polímero.

Como já relatado, o modelo que melhor descreveu os perfis de liberação foi o monoexponencial ($r > 0,99$), ou seja, a liberação dependeu apenas da concentração do fármaco (cinética de primeira ordem), sendo descrito por uma equação constituída por um único termo exponencial, indicando que a liberação da vimpocetina ocorreu em uma única etapa, sem haver liberação rápida inicial (efeito *burst*). A obtenção desses resultados sugere que, possivelmente, toda a fração de vimpocetina presente nas nanoestruturas esteja confinada no interior das nanocápsulas (núcleo baseado em TCM ou OC), corroborando com os resultados de eficiência de encapsulamento, que foram superiores a cerca de 99%.

Tabela 5 – Parâmetros calculados através dos modelos de primeira ordem e Lei da Potência para as nanocápsulas (TCM/Etil10, TCM/Etil 20, OC/Etil 10 e OC/Etil 20) e a solução do fármaco (n = 3)

	Nanocápsulas (TCM/Etil 10)	Nanocápsulas (TCM/Etil 20)	Solução
Monoexponencial			
r	0,9964 ± 0,0014	0,9977 ± 0,0002	0,9966 ± 0,0003
k (h ⁻¹)	0,0100 ± 0,0004	0,0080 ± 0,0003	0,1677 ± 0,0033
Lei das Potências			
r	0,9969 ± 0,0013	0,9967 ± 0,0005	
a	0,0267 ± 0,0019	0,0145 ± 0,0016	
n	0,8565 ± 0,0161	0,9999 ± 0,0221	
	Nanocápsulas (OC/Etil 10)	Nanocápsulas (OC/Etil 20)	
Monoexponencial			
r	0,9978 ± 0,0012	0,9984 ± 0,0016	
k (h ⁻¹)	0,0121 ± 0,0008	0,0151 ± 0,0014	
Lei das Potências			
r	0,9982 ± 0,0008	0,9955 ± 0,0017	
a	0,0312 ± 0,0020	0,0369 ± 0,0029	
n	0,8189 ± 0,0148	0,7858 ± 0,0158	

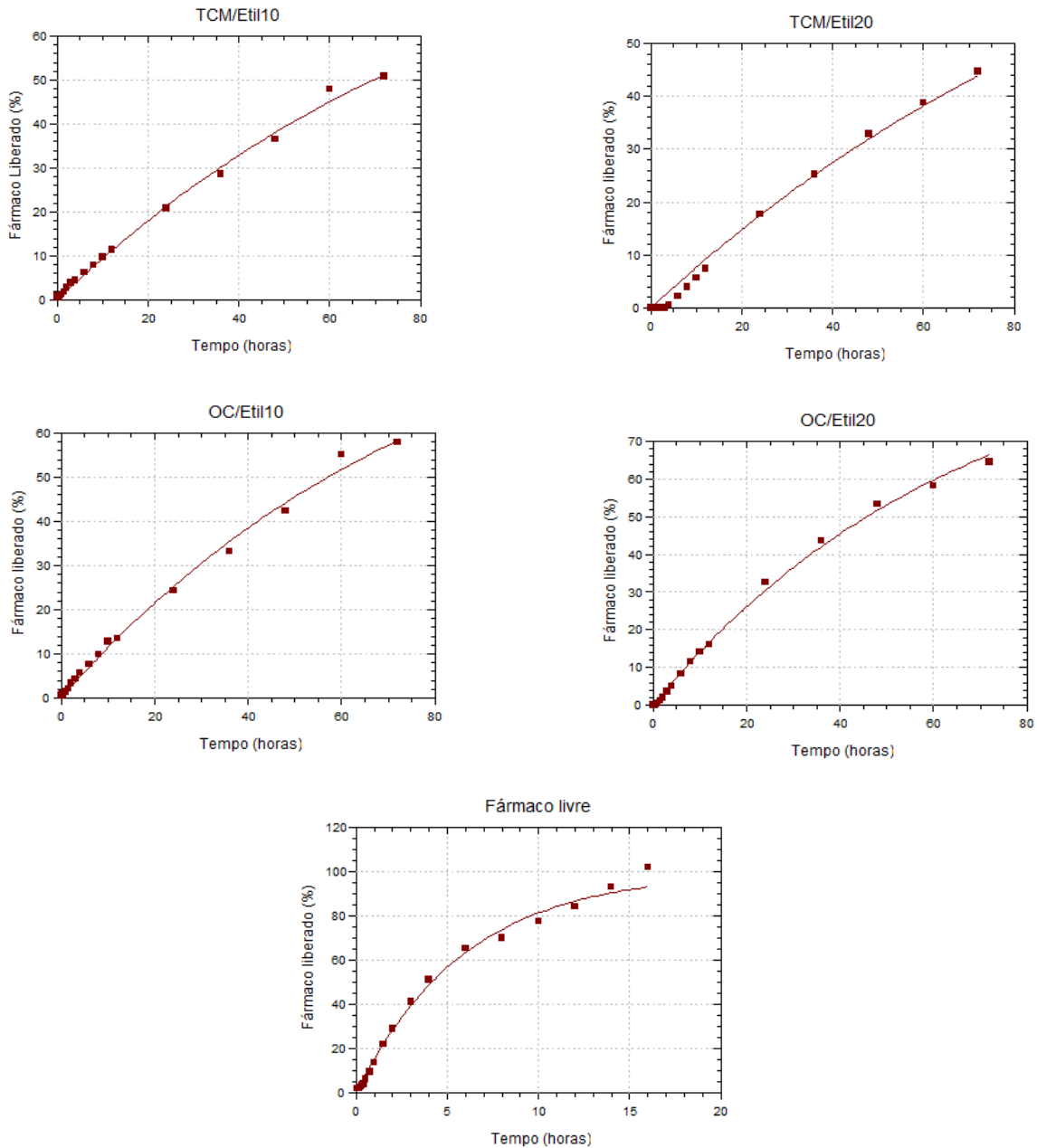


Figura 15 – Gráficos indicando o melhor ajuste ao modelo monoexponencial para os dados da liberação da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas e fármaco livre.

Após, foi avaliado o mecanismo de liberação da vimpocetina a partir dos sistemas nanoparticulados poliméricos desenvolvidos (tabela 5), empregando a Lei da Potência (Korsmeyer-Peppas). O modelo de Korsmeyer-Peppas é utilizado para analisar o processo de liberação de formas farmacêuticas poliméricas, no qual o mecanismo de liberação não seja bem conhecido ou, ainda, quando possa haver o envolvimento de mais de um tipo de mecanismo de liberação. Esses processos podem ser classificados como difusão Fickiana (caso I) ou Não-Fickiana (transporte anômalo e caso II) (COSTA, 2002; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

A partir da aplicação desse modelo foi possível a obtenção dos parâmetros a e n , que correspondem à constante que incorpora as modificações estruturais e as características geométricas do sistema e ao expoente de liberação difusional, relacionado ao mecanismo de liberação de fármaco, respectivamente (RITGER; PEPPAS, 1987).

Para os sistemas com geometria esférica, são considerados alguns limites para o expoente de liberação (n), os quais estão descritos abaixo (RITGER; PEPPAS, 1987):

$$n \leq 0,43 \quad \rightarrow \quad \text{Difusão Fickiana}$$

$$0,43 < n < 0,85 \quad \rightarrow \quad \text{Transporte Anômalo}$$

$$n \geq 0,85 \quad \rightarrow \quad \text{Transporte de Caso II}$$

Conforme os resultados obtidos, os valores de n são 0,79 e 0,82 para as suspensões contendo OC, apresentando, assim, uma liberação do tipo transporte anômalo, onde a liberação do princípio ativo ocorreu através do relaxamento das cadeias poliméricas, seguida por difusão da vimopcetina. Enquanto que, para as formulações onde se utilizou TCM, os valores de n são 0,89 e 0,99, indicando uma liberação do tipo transporte de caso II, que está relacionado aos fenômenos de intumescimento (relaxamento) do gel, envolvendo a transição de um estado semirrígido a outro mais flexível (RITGER; PEPPAS, 1987; PEPPAS; SAHLIN, 1989; COSTA, 2002; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; VIER; SILVA, 2011), sendo que ambos os transportes (anômalo e caso II) são comportamentos do modelo não-Fickiano. Geralmente, o processo de difusão não-fickiana é mais usual em polímeros vítreos, quando a temperatura do dispositivo de liberação é inferior à temperatura de transição vítrea (T_g) (AGNES; ORTEGA, 2003). A T_g da etilcelulose é 129 a 133 °C (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), bem acima da temperatura ambiente ou de 37°C, corroborando com o presente trabalho.

A difusão Fickiana é caracterizada por apresentar uma elevada velocidade de difusão do solvente para o interior da matriz e uma baixa velocidade de relaxamento, induzindo a formação de um gradiente de penetração do solvente. Por outro lado, no processo de difusão não-fickiana as cadeias poliméricas não possuem mobilidade suficiente para permitir uma rápida penetração do solvente no interior da matriz polimérica. O processo de difusão não-

fickiana, como já mencionado, apresenta dois modelos: transporte anômalo e transporte caso II, onde a diferença baseia-se, sobretudo, na velocidade de difusão do solvente. O transporte anômalo apresenta uma velocidade de difusão e de relaxamento na mesma ordem de magnitude, enquanto que no transporte caso II a velocidade de difusão do solvente é maior que o relaxamento do polímero (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; AGNES; ORTEGA, 2003; STEINGRÄBER; SHTOLTZ; RODRIGUES, 2008; SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

A interação óleo/polímero influenciou o mecanismo de liberação, independentemente da massa molecular da etilcelulose. Considerando as formulações preparadas com OC, em que não foi detectado inchamento dos filmes poliméricos (Etil10 ou Etil20) pelo óleo, o transporte anômalo foi indicado como mecanismo de liberação. Por sua vez, para as nanocápsulas preparadas com TCM, o mecanismo baseou-se em transporte de caso II, que poderia corroborar com a pequena tendência ao inchamento dos filmes a nível macroscópico, fato que, à escala coloidal, em hipótese, explicaria a maior velocidade de entrada de solvente em relação ao relaxamento das cadeias poliméricas, as quais provavelmente estariam mais distanciadas em função do óleo.

Rigo e colaboradores (2014) verificaram que o tipo de óleo (farelo de arroz, girassol ou soja) influenciou a liberação do propionato de clobetasol, a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico, preparadas com PCL e monoesterato de sorbitano. Houve uma correlação entre o índice de consistência do núcleo lipídico (óleo/monoestearato) e a velocidade de liberação do fármaco, de maneira que quanto maior este índice maior foi o controle de liberação em ambas as fases (*burst* e sustentada).

Ainda, deve-se ressaltar que os resultados obtidos para o estudo da cinética de liberação *in vitro* corroboram com a literatura, uma vez que estudos demonstram a capacidade de nanocápsulas em promover a liberação controlada de diversos fármacos (FONTANA et al. 2009; SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2014; BRENDLE, 2013). CHASSOT e colaboradores (2014) verificaram que houve liberação controlada do dipropionato de beclometasona a partir de nanocápsulas de etilcelulose, sendo o mecanismo de liberação do fármaco do tipo transporte anômalo. Cabe ressaltar que o óleo utilizado, de amêndoas, não causou inchamento de filmes poliméricos ao ficarem imersos no mesmo durante 60 dias, similarmente ao observado com os resultados obtidos, no presente trabalho, com o OC (Etil10 ou 20).

4.3.1 Estudo comparativo da cinética de liberação da vimpocetina a partir das suspensões e de comprimidos comerciais

Nesta etapa do trabalho, objetivou-se comparar os perfis de liberação das suspensões de nanocápsulas, com o perfil de difusão do comprimido comercial de vimpocetina – Vicog[®] (Comprimidos contendo 5 mg de vimpocetina; excipientes: celulose microcristalina, lactose monoidratada, amidoglicolato de sódio, estearato de magnésio e dióxido de silício).

Para isso, o estudo foi realizado nos mesmos parâmetros citados anteriormente: utilizou-se a técnica de difusão em sacos de diálise a 37 °C, durante 72 horas tanto para as suspensões quanto para os comprimidos comerciais, no meio de liberação tampão fosfato pH 6,8:etanol (70:30, v/v), respeitando-se a condição *sink*. Deve-se ressaltar que não houve interferência dos adjuvantes do comprimido no pico de retenção do fármaco, demonstrado através da pureza do pico (maior do que 0,999), empregando o mesmo método analítico usado para as nanocápsulas (CLAE-UV).

Inicialmente, foi feita a extração da vimpocetina a partir dos comprimidos comerciais e conforme os resultados, o teor de fármaco nos comprimidos foi de 90 % \pm 0,01 (n=9), sendo o valor empregado no cálculo do experimento de liberação.

A figura 16 demonstra os perfis de liberação/difusão da vimpocetina a partir dos comprimidos comerciais (n=3) dispersos, através da técnica dos sacos de diálise, em comparação com as nanocápsulas que tiveram o maior (TCM/Etil 20) e o menor (OC/Etil20) controle de liberação, em relação ao fármaco em solução, anteriormente descritos. As suspensões de nanocápsulas (Figura 14) apresentaram liberação média que variou de 44,71% a 64,47%, enquanto que para o comprimido comercial houve uma difusão menor, representando 39,55% do teor inicial em 72 h de experimento. Quanto à significância estatística, considerando o percentual liberado no final do estudo (72 h), observou-se diferença neste parâmetro para todas as suspensões de nanocápsulas em relação ao comprimido ($p < 0,05$).

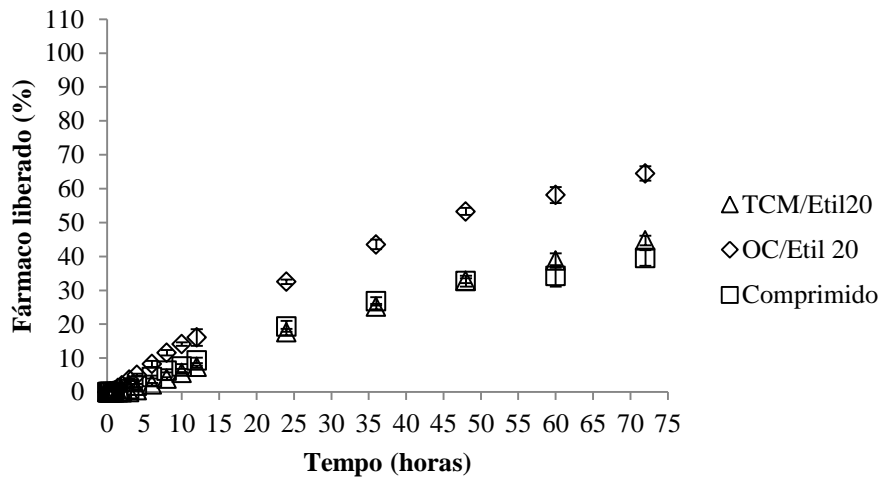


Figura 16 - Perfil de liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das nanocápsulas TCM/Etil 20 e OC/Etil20 em comparação ao comprimido comercial disperso (Vicog[®]).

Quanto à modelagem dos perfis de liberação de vimpocetina para essa técnica, o que melhor descreveu o comportamento dos dados obtidos foi, como anteriormente, o monoexponencial. Ao calcular a constante cinética para a liberação/dissolução do ativo para todos os lotes de suspensões e para o comprimido comercial, observou-se que para as suspensões os k variaram de $0,0151 \text{ h}^{-1}$ a $0,0080 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 5), enquanto que para o comprimido comercial o valor de k foi de $0,0076 \text{ h}^{-1}$, possibilitando concluir que o comprimido comercial foi o que apresentou uma velocidade de dissolução, portanto de difusão, mais lenta.

A partir dos valores das constantes (k) do modelo monoexponencial, foram calculados os tempos de meia-vida, onde foi observado que para as suspensões de nanocápsulas os valores variaram de 45,89 horas a 86,62 horas, enquanto que para o comprimido comercial esse tempo foi de 91,18 horas. Quanto à análise estatística, os valores de k obtidos para as formulações TCM/Etil10, OC/Etil10 e OC/Etil20 e os tempos de meia-vida de liberação dos mesmos, apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos mesmos parâmetros calculados para o comprimido comercial disperso (Vicog[®]). Como se pode observar nas figuras 15 e 17, tanto para os comprimidos quanto para as formulações TCM/Etil20, houve um pequeno tempo de latência no início dos perfis de liberação do fármaco, o que não ocorreu com as demais formulações.

Tabela 6 – Parâmetros calculados através dos modelos de primeira ordem para o comprimido comercial disperso em água (n = 3)

Comprimido	
Monoexponencial	
r	0,9924 ± 0,0046
k (h ⁻¹)	0,0076 ± 0,0004

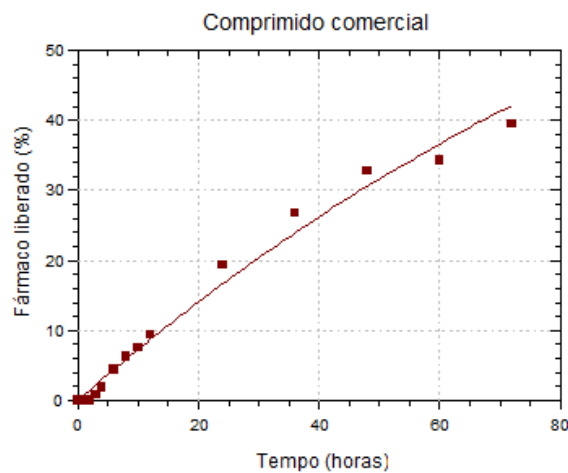


Figura 17 – Gráfico indicando o melhor ajuste ao modelo monoexponencial para os dados da liberação da vimpocetina a partir do comprimido comercial disperso em água.

Ao concluir a análise dos dados, pode-se observar que os resultados obtidos, para o estudo da cinética de liberação *in vitro*, comparando as suspensões desenvolvidas com o comprimido comercial, corroboraram com a literatura, principalmente aquelas preparadas com óleo de coco, que mais se diferenciaram. Zhuang e colaboradores (2010) demonstram que a liberação de uma suspensão, feita a partir de comprimidos comerciais, apresentou-se mais lenta (menos de 5 %) em relação aos carreadores lipídicos nanoestruturados (menos de 20 %), em tampão pH 6,8, após 48 h, empregando a técnica de difusão em sacos de diálise reversa. A partir disto, foi realizado um estudo *in vivo*, utilizando ratos Wistar, onde se observou que os carreadores promoveram uma biodisponibilidade relativa oral de 322%, em relação aos comprimidos comerciais, sendo que o sistema coloidal também mostrou liberação controlada da vimpocetina, sem efeito *burst*.

4.4 Liofilização das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

Após avaliar a viabilidade tecnológica da preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo vimpocetina, utilizando o OC ou TCM e etilcelulose, foi feito um estudo sobre a conversão dessas formulações em formas farmacêuticas sólidas, tendo em vista a obtenção de produtos secos redispersíveis, capazes de manter ou melhorar a estabilidade dessas formulações. O método de desidratação a baixas temperaturas (liofilização) foi o empregado para este estudo, e, como crioprotetor, escolheu-se a trealose a 10 % (p/v).

A trealose é um açúcar redutor, solúvel em água (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), muito utilizada para obtenção de produtos liofilizados, como crioprotetor de suspensões de nanocápsulas, na maioria das vezes utilizada nas concentrações de 5 a 10% (HIRSJÄRVI; PELTONEN; HIRVONEN, 2009; ALI; LAMPRECHT, 2014; BRENDLE, 2013; DADPARVAR et al., 2014). Sacarídeos, como é o caso da trealose, apresentam boa capacidade de promover um espaçamento entre as partículas, dificultando a desestabilização das mesmas (VAN WINDEN; TALSMA; CROMMELIN, 1998; DADPARVAR et al., 2014).

Primeiramente, foram estudados os parâmetros para a caracterização dos produtos secos, para analisar a conversão dos mesmos em sistemas adequados. Esses parâmetros incluíram tamanho médio das partículas após redispersão em água, avaliação morfológica e teor de fármaco. Em relação ao aspecto macroscópico dos liofilizados, estes se apresentaram como sólidos aglomerados, o que é bastante característico para esses sistemas (SCHAFFAZICK et al., 2003a; BAZYLINSKA et al., 2014; KUMAR; GOKHALE; BURGESS, 2014), sem odor e apresentando coloração branca.

Quando as nanopartículas passam pelo processo de liofilização, seu tamanho, após a ressuspensão em água, pode ser alterado, principalmente na ausência de crioprotetores, por esse motivo, a análise do tamanho médio das partículas dessas amostras é importante para observar se essa característica se manteve durante o processo (ABDELWAHED et al., 2006; KUMAR; GOKHALE; BURGESS, 2014). A relação do diâmetro médio das partículas antes e após a liofilização pode ser realizada através do cálculo do índice de ressuspensão, descrito no item 3.2.8.1 (página 46, equação 7). Para indicar que o diâmetro das partículas não sofreu alteração importante durante o processo de liofilização, é necessário que o índice calculado apresente um valor próximo a 1,0. Caso contrário, se o valor do índice de ressuspensão distanciar-se muito da unidade, pode-se dizer que tenha ocorrido a formação de agregados de partículas (CHACÓN et al., 1999).

O diâmetro médio foi analisado, por espectroscopia de correlação de fótons, através dos pós ressuspensos em água purificada e os valores obtidos podem ser observados na tabela 7. Conforme os resultados, verificou-se que para as formulações preparadas com Etil10 (TCM/Etil 10 e OC/Etil10) não se observou alteração no diâmetro das partículas ressuspensas em relação às suspensões desenvolvidas (S_f/S_i de 0,93 e 1,05, respectivamente; $p > 0,05$). Índices de ressuspensão maiores foram obtidos quando foi empregado polímero de maior viscosidade/massa molecular (TCM/Etil20 e OC/Etil20; S_f/S_i de 1,33 e 1,21, respectivamente), sendo que para OC/Etil20 houve diferença significativa em relação às suspensões ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Características físico-químicas dos liofilizados de nanocápsulas de etilcelulose (10 e 20) empregando TCM ou OC como núcleo, contendo o fármaco vimopocetina (n=3)

Formulações Liofilizados	Diâmetro médio (nm)	Teor (%)
TCM/ETIL 10	125 ± 13	98,8 ± 3,6
OC/ETIL 10	178 ± 3	96,2 ± 3,7
TCM/ETIL 20	150 ± 13	96,6 ± 2,7
OC/ETIL 20	186 ± 6	97,8 ± 3,0
Trealose	290 ± 29	-

Comparativamente, também foi realizada a análise de diâmetro de uma amostra de trealose liofilizada, objetivando avaliar se este adjuvante poderia influenciar na análise do tamanho de partículas das formulações após a redispersão. Neste sentido, o carboidrato liofilizado e ressuspensão, em água, apresentou diâmetro médio maior (290 nm) em comparação aos obtidos para as formulações nanoestruturadas (125 a 186 nm), inferindo que o crioprotetor empregado não influenciou de forma importante os valores de diâmetro obtidos para as formulações.

Após o cálculo dos índices de ressuspensão, os valores obtidos variaram de 0,93 a 1,33, ficando próximos da faixa encontrada na literatura (CHACÓN et al., 1999; HIRSJÄRVI; PELTONEN; HIRVONEN, 2009; SWARNAKAR et al., 2011; KHAYATA, et al., 2012; BAZYLINSKA et al., 2014; DADPARVAR et al., 2014), conforme observados na figura 18.

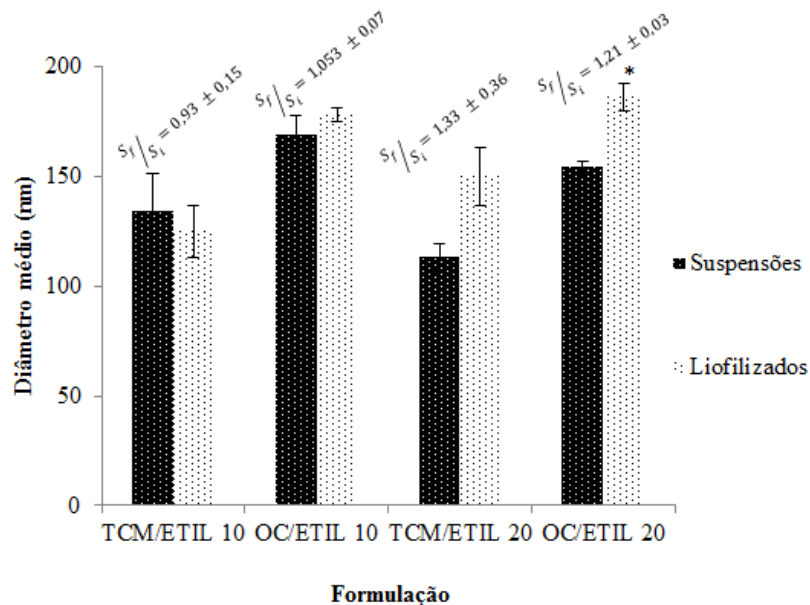


Figura 18 – Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas e das respectivas amostras liofilizadas, após a ressuspensão em água, além dos índices de ressuspensão correspondentes (S_f/S_i). *Diferença significativa em relação às suspensões originais.

Para que um liofilizado seja considerado adequado, ele deve preservar as características físico-químicas do produto de origem, manter o diâmetro das partículas e a estabilidade de armazenamento, entre outros fatores. A partir disso, a avaliação microscópica do produto liofilizado é importante para analisar se as nanopartículas se mantiveram íntegras (ABDELWAHED et al., 2006).

Dessa forma, através da caracterização morfológica dos produtos secos desenvolvidos (figuras 19, 20 e 21), por microscopia eletrônica de varredura (MEV), obteve-se microfotografias das amostras. Para a trealose liofilizada, consegue-se observar uma superfície lisa, com ausência de partículas esféricas na estrutura formada pelo agente crioprotetor. Por sua vez, as microfotografias das amostras das suspensões de nanocápsulas liofilizadas (TCM/Etil 10, TCM/Etil 20, OC/Etil 10 e OC/Etil 20) mostram nitidamente uma superfície rugosa devido à presença de estruturas de formato aproximadamente esférico. As

nanoestruturas, geralmente, têm esse formato e, quando em contato com o crioprotetor, para o processo de liofilização, é normal a formação de uma matriz amorfa do crioprotetor ao redor das nanopartículas, conforme já relatado na literatura (LOKHANDE et al., 2013).

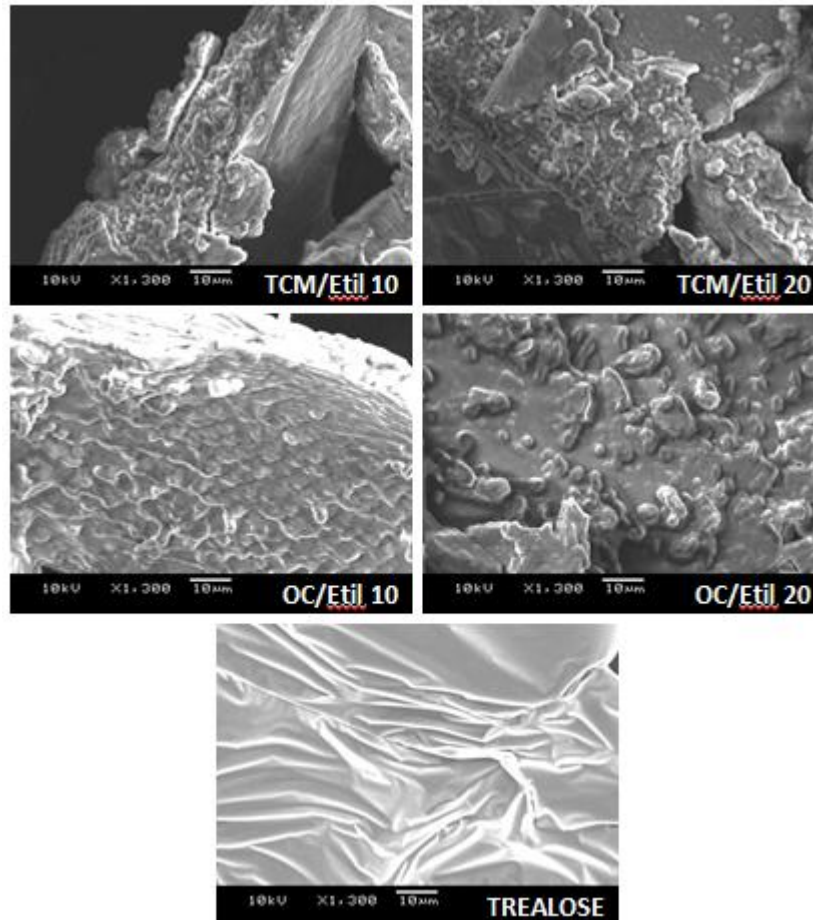


Figura 19 – Imagens obtidas por MEV a partir das amostras de liofilizados (aumento de 1.300X – barra corresponde a 10 µm), em comparação ao crioprotetor trealose (solução aquosa, a 10% p/v, liofilizada).

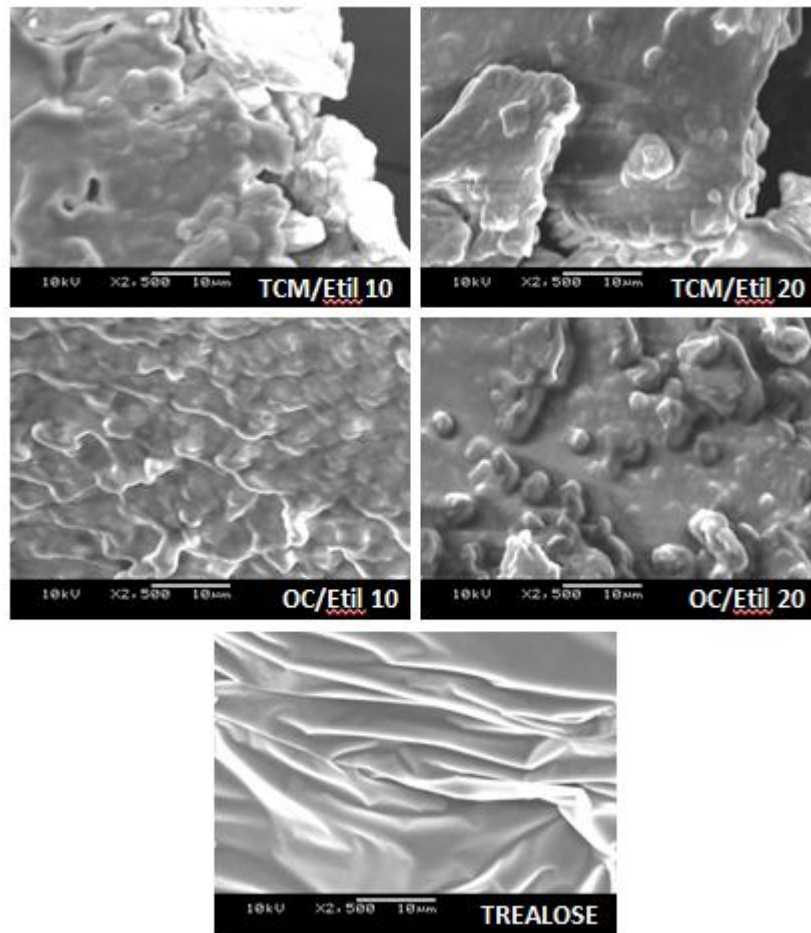


Figura 20 – Imagens obtidas por MEV a partir das amostras de liofilizados (aumento de 2.500X – barra corresponde a 10 µm), em comparação ao crioprotetor trealose (solução aquosa, a 10% p/v, liofilizada).

No estudo de Lokhande e colaboradores (2013), foram preparadas nanopartículas de etilcelulose e, através da microscopia dos liofilizados das suspensões originais, foi possível observar a presença de partículas esféricas dispersas na matriz amorfa formada pelo crioprotetor. O mesmo foi observado para os liofilizados originados a partir de nanopartículas de PCL no trabalho de Abselwahed e colaboradores (2006).

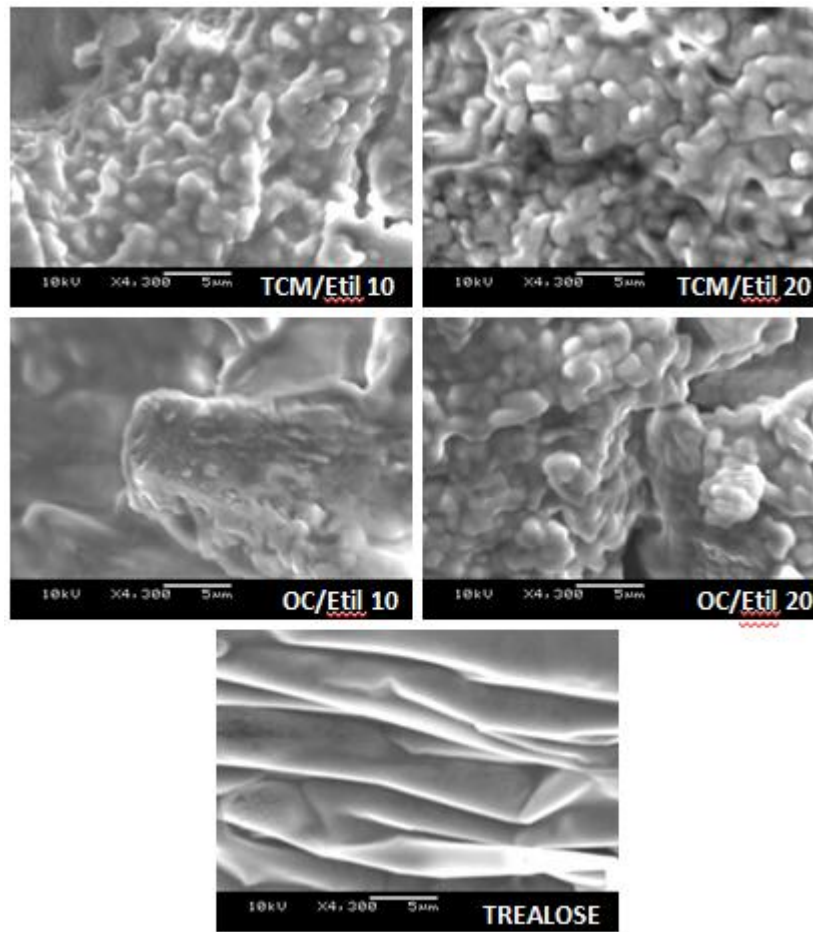


Figura 21 – Imagens obtidas por MEV a partir das amostras de liofilizados (aumento de 4.300X – barra corresponde a 5 µm), em comparação ao crioprotetor trealose (solução aquosa, a 10% p/v, liofilizada).

Outro fato importante a ser observado é a comparação do diâmetro das partículas obtido pela espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer[®], tabela 4) em relação às imagens obtidas pela MEV. Analisando essa comparação, pode-se observar que as imagens das microfotografias mostram a presença de estruturas de tamanho coloidal. Com esses resultados, é possível inferir sobre a provável manutenção da integridade das nanocápsulas contendo vimopocetina, após o processo de liofilização das suspensões de origem.

Quanto à análise do teor de vimopocetina nos liofilizados, inicialmente, é importante informar que as suspensões de nanocápsulas foram congeladas logo após a preparação. Retiradas do liofilizador, as amostras passaram pelo processo de quantificação da vimopocetina nos pós. Os valores médios obtidos variaram entre 96 e 99%, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre os liofilizados e as suspensões de origem, e apresentaram-se adequados, considerando o valor teórico.

Cabe enfatizar que o método analítico utilizado foi o mesmo empregado para as suspensões de nanocápsulas e que a trealose não influenciou na análise, mantendo-se específico para o fármaco.

4.4.1 Estudo de estabilidade dos liofilizados

Durante o período de 90 dias, foi realizado um estudo de estabilidade dos liofilizados, obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas de origem. Para este estudo, o armazenamento dos liofilizados foi em temperatura ambiente, protegidos da luz e da umidade. Nos tempos 30, 60 e 90 dias de armazenamento, foram realizadas análises de teor de vimpocetina.

Como se pode observar na figura 22, o teor de vimpocetina nas formas sólidas/liofilizadas não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), durante todo o período de armazenamento, em relação ao tempo inicial, evidenciando que a liofilização promoveu a manutenção da estabilidade química do fármaco nos sistemas, podendo ser uma estratégia para potencial aplicação futura destes sistemas.

Durante um longo período de armazenamento, é possível que as nanoestruturas (formas líquidas) sofram instabilidade físico-química devido à degradação química do polímero, fármaco ou outros componentes, devido à agregação das partículas e sedimentação, ou também pode ocorrer a passagem do ativo para a fase aquosa, levando à precipitação, entre outras desvantagem, quando comparadas às formas sólidas. Todavia, o processo de liofilização, ao promover a retirada da água do meio, pode promover proteção do sistema contra reações entre os componentes e da proliferação de micro-organismos (SCHAFFAZICK et al., 2003a,b; ABDELWAHED et al., 2006a,b).

Ao analisar esse último conjunto de resultados, pode-se concluir que o processo de liofilização pode oferecer vantagem em manter a estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, além de apresentar diâmetros médios de partículas aceitáveis, após a ressuspensão em água, principalmente para as formulações preparadas com Etil10.

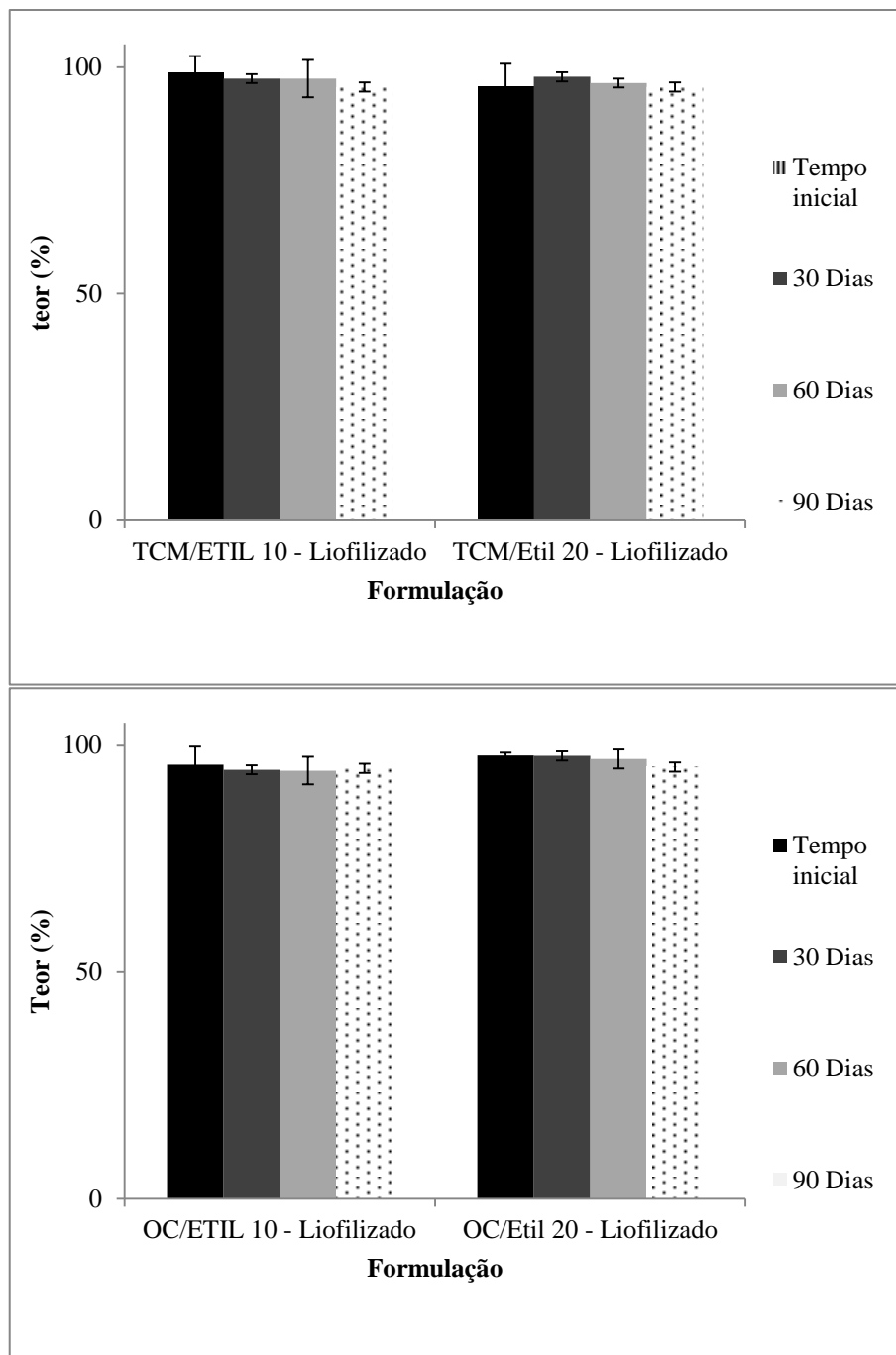


Figura 22 – Teor de vimepocetina nos liofilizados, preparados a partir das suspensões de nanocápsulas, no período de 90 dias.

Contudo, é importante enfatizar que não foram encontrados estudos na literatura relacionados com o desenvolvimento de liofilizados de nanopartículas contendo vimepocetina, apenas de micelas poliméricas no estudo de EL-DAHMY e colaboradores, como já citado anteriormente.

4.5 Avaliação preliminar da citotoxicidade *in vitro* das suspensões de nanocápsulas utilizando linhagem celular de fibroblastos (NIH 3T3)

Neste trabalho, a citotoxicidade *in vitro* das nanocápsulas contendo o neuroprotetor vimpocetina foi avaliada preliminarmente em células de fibroblastos, empregando o corante alamar blue. Diversos pesquisadores (PARK et al., 2008; HUANG et al., 2009; STECANELLA et al., 2013; MENG et al., 2014; CHASSOT et al., 2014) têm se preocupado em avaliar a toxicidade de nanoestruturas, sendo que, inicialmente, são realizados os estudos de citotoxicidade *in vitro*, para que posteriormente sejam direcionados os testes *in vivo*.

Através de variações na morfologia celular/viabilidade celular, a citotoxicidade dos fármacos pode ser estabelecida em culturas celulares de várias linhagens. Para isso, utilizam-se corantes como o azul de tripan e a eosina, que são baseados na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis, causando a captação do corante, ensaios clonogênicos, contagem celular, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos e/ou métodos colorimétricos, como o caso dos seguintes ensaios: Cristal violeta, Alamar Blue, MTT e SRB (sulforrodamina B). São várias as linhagens estudadas, podendo ser linhagens celulares normais ou neoplásicas, para verificar a seletividade do fármaco, por exemplo (MACIEL et al., 2002; HENRIKSSON et al., 2006; HOUGHTON et al., 2007).

O ensaio Alamar Blue envolve a adição de um indicador redox fluorogênico para células crescendo em cultura. O Alamar Blue na cor azul indica sua forma oxidada, e apresenta pouca fluorescência intrínseca. Ao passar para a coloração rósea, indica que o corante está na sua forma reduzida, apresentando uma alta fluorescência (NAKAYAMA et al., 1997; AL-NASIRY et al., 2007). É um ensaio que apresenta várias vantagens importantes, sendo relativamente simples, onde o indicador é adicionado diretamente às células, em cultura, no final do período de incubação. Este ensaio não necessita de manipulação ou eliminação de métodos especiais, sendo menos dispendioso do que os ensaios tradicionais. Não apresenta toxicidade para as células e pode ser utilizado em larga escala *in vitro* (NAKAYAMA et al., 1997). O método do Alamar Blue baseia-se na detecção da atividade metabólica celular por meio da redução de um indicador azul índico para rosa fluorescente, em resposta à redução química do meio de cultura pelas células vivas (AL-NASIRY et al., 2007).

Um exemplo de estudo com este corante é o trabalho de Yamaguchi e colaboradores (2013), em que foi avaliado o potencial citotóxico dos óleos essenciais das folhas e dos galhos de *Endlicheria citriodora* pelo ensaio Alamar Blue. Essa avaliação foi realizada em três

linhagens celulares distintas (fibroblastos murinos-NIH 3T3, melanoma murinho-B16F10 e adenocarcinoma gástrico humano-ACP02), na concentração 50 µg/mL, por um período de 72 horas. A avaliação da citotoxicidade forneceu um parâmetro de segurança na utilização desses compostos e foi possível observar ação citotóxica inespecífica do extrato para as células neoplásicas e normais, já que houve uma baixa toxicidade em todas as linhagens estudadas.

Para o presente estudo, foram escolhidas três formulações, com intuito de comparar a influência da massa molar da etilcelulose (TCM/Etil 10 e TCM/Etil 20) e a influência do tipo de óleo (TCM/Etil 10 e OC/Etil 10). A citotoxicidade (Figura 23) dessas suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, das respectivas formulações sem o fármaco (OC/Etil 10_SF; TCM/Etil 10_SF e TCM/Etil 20_SF) e da vimpocetina em solução foi avaliada frente à linhagem celular de fibroblastos (NIH 3T3).

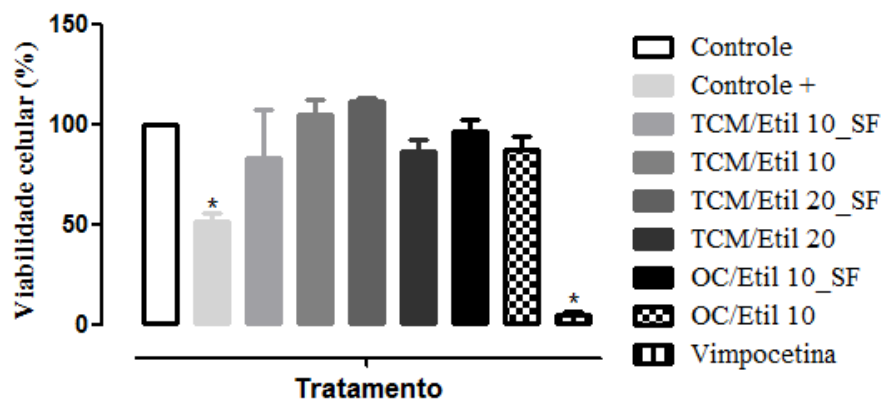


Figura 23 – Citotoxicidade preliminar das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina (preparadas com OC ou TCM e Etil 10 ou 20), das respectivas formulações sem o fármaco (SF) e da vimpocetina livre (solução), frente às células de fibroblastos (NIH 3T3), correspondendo à dose de 100,0 µg/mL de fármaco. *Diferença significativa em relação ao Controle.

A partir do controle negativo (que apresenta 100% de viabilidade para células sem tratamento) e do controle positivo (células tratadas com paclitaxel, comercialmente conhecido como Taxol[®] usado no tratamento do câncer), pôde-se fazer um comparativo com as formulações de nanocápsulas, observando que tanto aquelas com fármaco quanto as sem vimpocetina apresentaram percentual de viabilidade celular próxima ao controle negativo ($p > 0,05$; Figura 23). Por outro lado, o controle positivo e a vimpocetina livre apresentaram percentagem de viabilidade celular significativamente inferior a do controle negativo ($p < 0,05$). Esses dados mostram o potencial das nanoestruturas em proteger as células contra o efeito tóxico apresentado pelo fármaco na dose e nas condições empregadas neste ensaio.

No estudo de Chassot e colaboradores (2014), também foi verificado que nanocápsulas de etilcelulose contendo dipropionato de beclometasona, preparadas com óleo de amêndoas, apresentaram baixa citotoxicidade *in vitro*, em células de fibroblastos (3T3), empregando o método do MTT, não havendo diferença significativa na viabilidade celular em relação aos grupos controles (DMSO e nanocápsulas sem fármaco) e nem às nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona). Estes resultados foram confirmados *in vivo*, uma vez que as formulações não provocaram lesão pulmonar aguda, em ratos.

No presente trabalho, quando analisada a influência da massa moleculares da etilcelulose, não se observou alteração significativa ($p>0,05$) entre a Etil 10 e 20. O mesmo ocorreu na comparação dos óleos, sendo que não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre ambos, considerando o ensaio de citotoxicidade realizado. Por sua vez, se compararmos esses resultados com os dados obtidos no teste de liberação *in vitro*, também é possível o entendimento de que essa tendência de as nanocápsulas serem capazes de reduzir a citotoxicidade pode estar relacionada com a lenta liberação do fármaco (de 17 a 24% em 24 horas), reduzindo o contato da vimpocetina com os fibroblastos, fato que não ocorreu quando a substância ativa estava com a dose totalmente disponível, no caso da solução.

Cabe ressaltar que este estudo teve apenas caráter preliminar, sendo necessário avaliar outras linhagens celulares e métodos (como MTT), além de estudar diferentes tempos de incubação, para confirmar a real capacidade destes sistemas na redução de possíveis efeitos citotóxicos do fármaco livre em cultura de células não-tumorais. Além disto, um estudo mais completo, avaliando-se várias concentrações do fármaco livre, em comparação às nanoestruturas, faz-se necessário para verificar a janela de proteção, em doses mais baixas e menos tóxicas. Também seria fundamental avaliar mais do que um lote de cada formulação, para confirmar os dados, pois muitos fatores podem influenciar estes experimentos, segundo relatado na literatura (KROLL et al., 2009; ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012).

Por fim, os resultados demonstraram que as nanocápsulas de etilcelulose contendo vimpocetina, desenvolvidas neste trabalho, apresentam potencial para a veiculação deste fármaco neuroprotetor lipofílico. Como perspectivas da continuação deste trabalho, tem-se, principalmente, a avaliação da capacidade destes sistemas em aumentar a biodisponibilidade oral da vimpocetina, bem como estudos relacionados à citotoxicidade destes sistemas, em comparação ao fármaco não-encapsulado.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

- ✓ Foi observada a viabilidade da preparação de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo vimpocetina, empregando OC ou TCM e etilcelulose, com as duas viscosidades/massas moleculares estudadas, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, apresentando adequadas características físico-químicas [diâmetro inferior a 200 nm, potencial zeta negativo e alta eficiência de encapsulamento (>99%)];
- ✓ A metodologia analítica, baseada em cromatografia líquida em fase reversa (CLAE-UV), mostrou-se específica, linear, precisa e exata para a quantificação do neuroprotetor vimpocetina nos sistemas nanoestruturados desenvolvidos;
- ✓ Em relação à influência do tipo de óleo utilizado, observou-se que as formulações preparadas com TCM apresentaram diâmetro inferior às preparadas com OC, independente da massa molecular do polímero;
- ✓ As suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina permaneceram estáveis quanto ao diâmetro médio de partículas e PdI, durante 90 dias de armazenamento, e o teor de fármaco permaneceu acima de 90% no mesmo período;
- ✓ Todas as suspensões de nanocápsulas apresentaram liberação controlada da vimpocetina, quando comparadas à difusão do fármaco livre, em tampão fosfato pH 6,8:etanol (70:30 v/v). Houve influência do tipo de óleo/massa molecular do polímero na velocidade e no mecanismo de liberação da vimpocetina;
- ✓ O modelo que melhor descreveu os perfis de liberação, para todas as formulações, foi o monoexponencial, indicando que a liberação dependeu apenas da concentração do fármaco (cinética de primeira ordem) e em uma única etapa, sem haver liberação rápida inicial (efeito *burst*), sugerindo que a vimpocetina esteja confinada no interior dos sistemas (núcleo);
- ✓ As constantes cinéticas para a liberação da vimpocetina foram: TCM/Etil 20 ($k = 0,0080 \text{ h}^{-1}$), TCM/Etil 10 ($k = 0,0100 \text{ h}^{-1}$), OC/Etil 10 ($k = 0,0121 \text{ h}^{-1}$), OC/Etil 20 ($k = 0,0151 \text{ h}^{-1}$), Solução ($k = 0,1677 \text{ h}^{-1}$). Considerando a análise estatística, verificou-se diferença significativa entre todas as formulações quanto aos valores de k ($p < 0,05$), havendo influência do tipo de óleo e da massa molecular do polímero;
- ✓ A modelagem dos dados sugeriu que o mecanismo de liberação da vimpocetina, a partir das nanocápsulas com OC, ocorreu através de transporte anômalo, envolvendo relaxamento das cadeias poliméricas, seguida por difusão da vimpocetina. Por sua vez, o mecanismo indicado para a liberação do fármaco, a partir das nanocápsulas contendo TCM, foi baseado no transporte de caso II. Estas diferenças de comportamento foram correlacionadas com o leve inchamento dos filmes macroscópicos de etilcelulose ocorrido em contato com TCM, o

que não aconteceu com o OC, podendo, em hipótese, levar a diferenças no relaxamento das cadeias poliméricas, resultando, a nível coloidal, em comportamentos distintos de interação com o solvente;

✓ A liberação/dissolução do fármaco a partir de um comprimido comercial disperso foi mais lenta ($t_{1/2}$ de 91 h) em relação às formulações nanoestruturadas ($t_{1/2}$ de 46 a 87 h), o que poderia, em hipótese, favorecer a biodisponibilidade oral do fármaco. As formulações preparadas com OC parecem mais promissoras neste sentido;

✓ Os liofilizados, obtidos a partir das suspensões, contendo trealose como crioprotetor, apresentaram teores entre 96 e 98 %, os quais se mantiveram inalterados após 90 dias de armazenamento, independente da composição das formulações. Através de microscopia eletrônica, verificou-se a presença de estruturas esféricas coloidais nos produtos secos e os índices de ressuspensão, em água, ficaram entre 0,93 e 1,33, dependendo principalmente da massa molecular do polímero. Os menores índices foram alcançados quando se empregou a etilcelulose de menor viscosidade, para ambos os óleos;

✓ Em ensaio preliminar *in vitro*, as suspensões de nanocápsulas apresentaram tendência em reduzir a citotoxicidade do fármaco na dose avaliada, em fibroblastos. Entretanto, estes dados necessitam de confirmação mediante mais experimentos;

✓ Finalmente, os sistemas desenvolvidos são considerados promissores para a liberação controlada de vimpocetina, por via oral, tendo em vista suas potencialidades terapêuticas em doenças neurológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOTTALEB, M.M.A., DIRK NEUMANN,D., LAMPRECHT, A.. Lipid nanocapsules for dermal application: A comparative study of lipid-based versus polymer-based nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 79, 36–42, 2011.
- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery**, v. 58, p. 1688-1713, 2006.
- AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Effect of plant oils on *Candida albicans*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 43 (5), p 447-451, 2010.
- AGNES, E.J.; ORTEGA, G.G. Modelos matemáticos e físicoquímica da difusão. **Cad. Farm.**, v.19, n.1, p.9-19, 2003.
- ALI, M. E.; LAMPRECHT. A. Spray freeze drying for druy powder inhalation of nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 87, p. 510-517, 2014.
- ALMEIDA, J.S; JEZUR, L.; FONTANA, M.C; PAESE, K.; SILVA, C.B.; POHLMANN,A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (Grape Seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28 (2), p. 165-172, 2009.
- ALMEIDA, J. S.; LIMA, F.; ROS, S. D.; BULHÕES, L.O.; CARVALHO, L. M.; BECK, R.C. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1603-1610, 2010.
- AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M. LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, 22, nº. 5, p. 1304-1309, 2007.
- ALONSO, M. J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.58, p.168-172, 2004.

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

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

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

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pahrmacology*, 258, p. 151-165, 2012.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; KARYDAS, A. G.; ITHAKISSIOS, D. S.; J. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 123, 2002.

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

BAZYLINSKA, U.; LEWINSKA, A.; LAMCH, L.; WILK, K. A. Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 442, p. 42-49, 2014.

BONOCZK, P.; GULYÁS, B; ADAM-VIZI, V.; NEMES, A.; KÁRPÁTI, E.; KISS, B.; KAPÁS, M.; SZÁNTAY, C.; KONCZ, I.; ZELLES, T.; VAS, A. Role of sodium channel inhibition in neuroprotection: Effect of vinpocetine. **Brain Research Bulletin**, 53, nº. 3, p. 245-254, 2000.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H.; BONNET, I.; ZYDOWICZ, N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(etherurethane) nanocapsules using

a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 89-100, 2004.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. **Guia para a realização de estudos de estabilidade**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005.

BRENDLE, M.G **DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE SUSPENSÕES E LIOFILIZADOS DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS PARA A VEICULAÇÃO DO NEUROPROTETOR IDEBENONA**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: Applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatograph B: Biomedical Applications**, 686, p. 3-10, 1996.

DE BRUM, T.; FIEL, L. A.; CONTRI, R. V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules Have Diverse Skin Penetration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 15, p. 773-780, 2015.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO., M.J. Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, 1996.

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

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

CHASSOT, J. M.; RIBAS, D.; SILVEIRA, E. F.; GRÜNSPAN, L. D.; PIRES, C. C.; FARAGO, P. V.; BRAGANHOL, E.; TASSO, L.; CRUZ, L. Beclomethasone Dipropionate-Loaded Polymeric Nanocapsules: Development, In Vitro Cytotoxicity, and In Vivo Evaluation of Acute Lung Injury. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1-10, 2014.

CHIU, P.J., TETZLOFF, G., AHN, H.S., SYBERTZ, E.J. Comparative effects of vinpocetine and 8-Br-cyclic GMP on the contraction and ^{45}Ca -fluxes in the rabbit aorta. **Am. J. Hypertens.** 1, 262–268, 1988.

COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 38, nº. 2, 2002.

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

CRUZ, L.; SOARES, L.U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA N.P.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198, 2006.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R.; CUNHA, E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

DABBAGH, M. A.; FORD, J. L.; RUBINSTEIN, M. H.; HOGAN, J. E. Effects of polymer particle size, compaction pressure and hydrophilic polymers on drug release from matrices containing ethylcellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 140, p. 85-95, 1996.

DADPARVAR, M.; WAGNER, S.; WIEN, S.; WOREK, F.; BRIESEN, H. V.; KREUTER, J. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 88, p. 510-517, 2014.

DOMB, A.J.; TABATA, Y.; RAVI KUMAR M.N.V.; FARBER, S. (Eds.). Nanoparticles for Pharmaceutical Applications. **American Scientific Publishers**, 2007.

DOMINGUES, G. S. **Caracterização físico-química e avaliação dos perfis de liberação in vitro de micropartículas revestidas com nanocápsulas poliméricas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2006.

DOW EXCIPIENTS. **Trademark of The Dow Chemical Company**, nº. 198, 02075-0906 AMS, 2005.

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

ELBARY, A. A.; FODA, N.; EL-GAZAYERLY, O.; EL KHATIB, M. Reversed phase liquid chromatographic determination of vinpocetine in human plasma and its pharmacokinetic application. **Analytical letters**, v. 35, p. 1041-1054, 2002.

EL-DAHMY, R. M.; ELSAYED, I.; ELSHAFFEEY, A. H.; GAWAD, N. A. A. E.; EL-GAZAYERLY, O. N. Optimization of long circulating mixed polymeric micelles containing vinpocetine using simple lattice mixture design in vitro and in vivo characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, 477, p. 39-46, 2014.

FENG, S. S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. **Expert Review of Medical Devices**, v. 1, p. 115-125, 2004.

FERREIRA, H.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n°. 7, p. 1860-1870, 2009.

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent** 274961, 1988.

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

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

FONTANA, M. C.; BECKENKAMP, A.; BUFFON, A.; BECK, R. C. R. Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on in vitro antiproliferative activity of human breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, 9, p. 2979-2991, 2014.

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

FRIEDRICH, R.B.; FONTANA, M.C.; BECK, R.C.R. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, p. 1131-1136, 2008.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p.1428, 2004.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.199, p. 95, 1999.

GRATTARD, N.; PERNIN, M.; MARTY, B.; ROUDAUT, G.; CHAMPION, D.; MESTE, M. L. Study of release kinetics of small and molecular weight substances dispersed into spray-dried ethylcellulose microspheres. **Journal of Controlled Release**, 84, p. 125-135, 2002.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Containing Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Gastrointestinal Tolerance Following Intravenous and Oral Administration. **Pharmaceutical Research**, 12, nº. 10, p. 1-3, 1995a.

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.

HAMSI, M. A.; OTHMAN, F.; DAS, S.; KAMISAH, Y.; THENT. Z. C.; QODRIYAH, H. M. S.; ZAKARIA, Z.; EMRAN, A.; SUBERMANIAM, K.; JAARIN, K. Effect of consumption of fresh and heated virgin coconut oil on the blood pressure and inflammatory biomarkers: An experimental study in Sprague Dawley rats. **Alexandria Journal of Medicine**, 2014.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WAHLBERG, P.; WENNERBERG, J.; KJELLSTRÖM, J. H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. **Bio One Research Evolved**, 42(10), p. 320-323, 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, end tangential flow filtration on the freeze-drying of poly (lactic acid) nanoparticles. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, p. 488-494, 2009.

HOUGHTON, P.; FRANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G. HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities relates to reputed anticancer activity. **Science Direct – Methods**, 42, p. 377-387, 2007.

HUANG, J.; ZHOU, W.; DONG, W.; WATSON, A. M.; HONG, Y. Directed, efficient, and versatile modifications of the Drosophila genome by genomic engineering. V. 106, n°. 20, p. 8284-8289, 2009.

HUANG, ER-W.; XUE, S-J.; ZHANG, Z; ZHOU, J-G.; GUAN, Y-Y.; TANG, Y-Bo. Vinpocetine inhibits breast cancer cells growth in vitro and in vivo. **Apoptosis**, v. 17, p. 1120–1130, 2012.

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

IRACHE, J. M.; ESPARZA, I.; GAMAZO, C.; AGÜEROS, M.; ESPUELAS, S. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary Therapeutics. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 47-71, 2011.

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

JINCAI, W.; TINGFANG, D.; YONGHENG, Z.; ZHONGMIN, L.; KAIHUA, Z.; XIAOHONG, L. Effects of vinpocetine and ozagrel on behavioral recovery of rats after global brain ischemia. **Journal of Clinical Neuroscience**, 21, p. 661-663, 2014.

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

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

KONAN, Y.; GURNY, R.; ALLÉMANN. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. **INTERNATIONAL JOURNAL OF Pharmaceutics**, 55 (1) p. 233-239, 2002.

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

KROLL, A.; PILLUKAT M. H.; HAHN, D.; SCHNEKENBURGER. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 72, p. 370-377, 2009.

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

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

KUMAR, R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 234-258, 2000.

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**, 471, p. 303-311, 2014.

KUMAR, V. D.; VERMA, P. R. P.; SINGH, S. K. Development and evaluation of biodegradable polymeric nanoparticles for the effective of quercetin using a quality by design approach. **LWT – Food Science and Technology**, 61, p. 330-338, 2015.

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

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

LAI, H.L.; PITT, K.; CRAIG, D. Q. M. Characterization of the thermal properties of ethylcellulose using differential scanning and quasi-isothermal calorimetric approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, p. 178-184, 2010.

LAI, P.; DAEAR, W.; LÖBENBERG, R.; PRENNER, E. J. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 154-163, 2014.

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

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

LIN, C.; CHEN, F.; YE, T.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; LIU, D.; XIONG, W.; YANG, X.; PAN, W. A novel oral delivery system consisting in “drug-in cyclodextrin-in nanostructures lipid carriers” for poorly water-soluble drug: Vinpocetine. **International Journal of Pharmaceutics**, 465, p. 90-96, 2014.

LOBATO, K. B. S.; PAESE, K.; FORGEARINI, J. C.; GUTERRES, S. S.; JABLONSKI, A.; RIOS, A. O. Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating. **LWT – Food Science and Technology**, 60, p. 8-14, 2015.

LOKHANDE, A. B.; MISHRA, S.; KULKARNI, R. D.; NARK, J. B. Preparation and characterization of repaglinide loaded ethylcellulose nanoparticles by solvent diffusion technique using high pressure homogenizer. **Journal of pharmacy research**, 7, p. 421-426, 2013a.

LOKHANDE, A. B.; MISHRA, S.; KULKARNI, R. D.; NARK, J. B. Influence of different viscosity grade ethylcellulose polymers on encapsulation and in vitro release study of drug loaded nanoparticles. **Journal of pharmacy research**, 7, p. 414-420, 2013b.

LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metipranolol. **Pharmaceutical Research**, v.10, p. 80, 1993.

LUO, Y.; CHEN, Da W.; REN, L.; ZHAO, X.; QIN, J. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 53-59, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C; VEIGA, V. F. J. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares, **Química Nova**, 25, nº. 3, p. 429-438, 2002.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 38, nº. 4, 2002.

MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 1-14, 2008.

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

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

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

MAYER, F. Q.; ADOME, M. D.; BENDER, E. A.; DE CARVALHO, T. G.; DILDA, A. C.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U.; POHLMANN, A. R. Laronidase-Functionalized Multiple-Wal l Lipid-Core Nanocapsules: Promising Formulation for a More Effective Treatment of Mucopolysaccharidosis Type I. **Pharm. Res.**, 32, p. 941-954, 2015.

MENG, H.; XU, K.; XU, Y.; LUO, P.; DU, F.; HUANG, J.; LU, W.; YU, J.; LIU, S.; MUIR, B. Nanocapsules based on mPEGylated artesunate prodrug and its cytotoxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 115, p. 164-169, 2014.

MISHRA, B.; PATEL B.B.; BPharm; TIWARI, S.; MPharm. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, p. 9-24, 2010.

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

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

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

MORA-HUERTAS, C. E.; GARRIGUES, O.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 80, p. 235-239, 2012.

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

MURTAZA, G.; Ethylcellulose microparticles: a review. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, 69, n° 1, p. 11-22, 2012.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, 204, p. 205-208, 1997.

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**, 119, 2608-2614, 2008.

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

OGBOLU, D. O.; ONI, A. A.; DAINI, O. A.; OLOKO, A. P. In vitro antimicrobial properties of coconut oil on candida species in Ibadan, Nigeria. **Journal of Medicinal Food**, v. 10 (2), p. 384-387, 2007.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CERA, L. F. R. Microemulsões II: Aplicações de liberação de fármacos. **Infarma**, v.14, p.76-80, 2002.

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

PALMEIRA, C. M.; SANTOS, M. S.; OLIVEIRA, C. R. Membrane lipid peroxidation induces changes in the γ -[³H]amino butyric acid transport and Ca²⁺ uptake in synaptosomes. **Brain Research**. v. 609, p. 117-123, 1993.

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

PAN-IN, P.; BANLUNARA, W.; CHAICHANAWONGSAROJ, N.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Ethyl cellulose nanoparticles: Clarithromycin encapsulation and eradication of H. pylori. **Carbohydrate Polymers**, 109, p. 22-27, 2014.

PARANJPE, M.; FINKE, J. H.; RICHTER, C.; GOTHSCH, T.; KWAVE, A.; BÜTTGENBACH, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of sildenafil-loaded solid lipid nanoparticle dispersions (SLN) for pulmonary application. **International Journal of Pharmaceutics**, 476, p. 41-49, 2014.

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

PARK, I-H.; ARORA, N.; HUO, H.; MAHERALI, N.; AHFELDF, T.; SHIMAMURA, A.; LENSCH, M. W.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K.; DALEY, G. Q. Disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells. **National of Health Institutes**, 134(5), p. 877-889, 2008.

PATYAR, S.; PRAKSH, A.; MODI, M.; MEDHI, B. Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases. **Pharmacological Reports**, 63, p. 618-628, 2011.

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

PEREIRA,C.; AGOSTINHO, P.; MOREIRA, P.I.; DUARTE, A.I.; SANTOS, M.S.; OLIVEIRA, C.R. Estratégias de neuroprotecção: efeito da vimpocetina em modelos *in vitro* de estresse oxidativo. **Acta Médica Portuguesa**, 16, p. 401-406, 2003.

PETERSEN, S.; STEINIGER, F.; FISCHER, D.; FAHR, A.; BUNJES, H. The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cel viability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 79, p. 150-161, 2011.**Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 234-258, 2011.

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

POLETTTO, F. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Uma pequena grande revolução. **Ciência Hoje**, v. 43, p. 26-31, 2008.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: Perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n.º. 6, p. 1028-1029, 2004.

RAFFIN, R.P.; OBACH, E.S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrointestinal em Ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.22, p.163-172, 2003.

RIBEIRO, L.S.S.; FALCÃO, A.C.; PATRÍCIO, J.A.B., FERREIRA, D.C.; VEIGA, F.J.B. Cyclodextrin multicomponente complexation and controlled release delivery strategies to optimize the oral bioavailability of vinpocetine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 2018, 2007.

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

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.

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

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

ROUSSAKI, M.; GAITANAROU, P. Ch.; VOUYIOUKA, S.; PAPASPYRIDES, C.; KEFALAS, P.; DETSI, A. Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles. **Polymer Degradation and Stability**, 108, p. 182-187, 2014.

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

SAARINEN-SAVOLAINEN, P.; JÄRVINEN, T.; TAIPALE, H.; URTTI, A. Method for evaluating drug release from liposomes in sink Conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.159, p.27–33, 1997.

SAEZ, M.; GUZMAN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R.; Eur. 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**, 50, 379, 2000.

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

SANTOS, M. S.; DUARTE, A. I.; MOREIRA, P. I.; OLIVEIRA, C. R. S. Synaptosomal response to oxidative stress: effect of vinpocetine. **Free Radical Research**, v. 32, p. 57-66, 2000.

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

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

SANTOS, S.S.; LORENZONI, A.; PEGORARO, N.S.; DENARDI, L.B.; ALVES, S.H.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. 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, 2014.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.

SAVIAN, A. L.; RODRIGUES, D.; WEBER, J.; RIBEIRO, R. F.; MOTTA, M.; SCHAFFAZICK, S. R.; ADAMS, A. I. H. ; ANDRADE, D. F. ; BECK, R. C. R.; SILVA,

C.B. 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**, v. 46, p. 69-76, 2015.

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

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

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

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

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

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

SHENOY, D. B.; AMIJI, M. M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 261-270, 2005.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, 64, p. 163-174, 2012.

SITGES, M., SANCHEZ-TAFOLLA, B.M., CHIU, L.M., ALDANA, B.I., GUARNEROS, A. 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.

SILVA, A.L.M; CONTRI, R.V; JORNADA, D.S; POHLMANN, A.R.; GUTERRES,S.S. Vitamin K1-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and in vitro skin permeation. **Skin Research and Technology**, v. 19, p. e223-e230, 2013.

SOARES, L. U. **Estudo cinético da hidrólise do éster etílico de indometacina associado a nanopartículas de poli(ε-caprolactona)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2003.

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

SOUTO, E.B; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II. **Polímeros**, vol. 22, n. 1, p. 101-106, 2012b.

SOUTO, E.B; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros - Parte I. **Polímeros**, vol. 22, n. 1, p. 96-100, 2012a.

SOZANSKI, T.; MAGDALAN, J.; TROCHA, M.; SZUMNY, A.; MERWID-LAD, A.; SLUPSKI, W.; KARAZNIEWICZ-LADA, M.; KIELBOWICZ, G.; KSIADZYNA, D.; SZELAG, A. Omeprazole does not change the oral bioavailability or pharmacokinetics of vinpocetine in rats. **Pharmacological Reports**, v. 63, p. 1258-1263, 2011.

STECANELLA, L. A.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N.; VALADARES, M. C.; VIEIRA, M. S.; KATO, M. J.; LIMA, E. M. Development and characterization of PLGA nanocapsules of grandisin isolated from *Virola surinamensis*: in vitro release and cytotoxicity studies. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 23(1), p. 153-159, 2013.

STEINGRÄBER, T.; SHTOLTZ, T.; RODRIGUES, P. O. Avaliação da influência de adjuvantes não-poliméricos solúveis na liberação do nimodipino a partir de formulações

matriciais de liberação prolongada. **Revista Colomb. Cienc. Quím. Farm.**, 37(2), p. 122-132, 2008.

STELLA, B.; ARPICCO, S.; ROCCO, F.; MARSAUD, V.; RENOIR, J.M.; CATTEL, L.; COUVREUR, P. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 71, p. 344, 2007.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**, 21, n.º. 2, 2004.

SUWANNATEEP, N.; WANICHWECHARUNGRUANG, S.; HAAG, S. F.; DEVAHASTIN, S.; GROTH, N.; FLUHR, J. W.; LADEMANN, J.; MEINKE, M. C. Encapsulated curcumin results in prolonged curcumin activity in vitro and radical scavenging activity ex vivo on skin after UVB-irradiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 82, p. 485-490, 2012.

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

TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 491-500, 2005.

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

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemical, drugs, and biological. 14th ed. **Whitehouse Station (NJ): Merck Research Laboratories**, 2006, p. 9994.

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

TOMODA, K.; TERASHIMA, H.; SUZUKI, K.; INAGI, T.; TERADA, H.; MAKINO, K. Enhanced transdermal delivery of indomethacin using combination of PLGA nanoparticles and iontophoresis in vivo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 92, p. 50-54, 2012.

TORCHILIN V.P.(Ed.). Nanoparticles as Pharmaceutical carriers. **Imperial College Press**, Londres, 2006.

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

VAUTHIER, C.; DUBERNET C.; FATTAL, E.; PINTO-ALPHANDARY, H.; COUVREUR, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 519-48, 2003.

VIER, N. V.; LUCINDA-SILVA, R. M. Influence of coating on the triamcinolone release of alginate chitosan beads for colonic drug delivery. **Natural Science**, 3, nº. 11, p. 955-962, 2011.

VILLALBA, B. T.; IANISKI, F. R.; WILHELM, E. A.; FERNANDES, R. S.; ALVES, M. P.; LUCHESE, C. Meloxicam-loaded nanocapsules have antinociceptive and antiedematogenic effects in acute models of nociception. **Life Sciences**, 115, p. 36-43, 2014.

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

VYSAKH, A.; RATHEESH, M.; RAJMOHANAN, T. P.; PRAMOD, C.; PREMLAL, S.; KUMAR, B. G.; SIBI, P. I. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. **International Immunopharmacology**, 20, p. 124-130, 2014.

WANG, H.; ZHANG, K.; ZHAO, L.; TANG, J.; GAO, L.; WEI, Z. Anti-inflammatory effects of vinpocetine on the functional expression of nuclear factor-kappa B and tumor necrosis factor-alpha in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury. **Neuroscience Letters**, 566, p. 247-251, 2014.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, 58, 1-12, 1990.

WU, P-C.; HUANG, Y-B.; CHANG J-I.; TSAI, M-J.; TSAI, Y-H. Preparation and evaluation of sustained release microspheres of potassium chloride prepared with ethylcellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 115-121, 2003.

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

XU, H.; HE, L.; NIE, S.; GUAN, J.; ZHANG, X.; YANG, X.; PAN, W. Optimized preparation of vinpocetine proliposomes by a novel method and in vivo evaluation of its pharmacokinetics in New Zealand rabbits. **Journal of Controlled Release**, 140, p. 61-68, 2009.

YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, 36, nº. 6, p. 826-830, 2013.

YONG J. W. H.; GE L.; NG Y. F.; TAN S. N. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. **Molecules**, v. 14, p. 5144-5164, 2009.

ZHUANG, C-Y.; LI, N.; WANG, M.; ZHANG X-N; PAN, W-S; PENG, J-J; PAN Y-S.; TANG, X. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, 394, p. 179-185, 2010.