

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

Luciane Varini Laporta

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS PEGUILADAS DE
RISPERIDONA EM DIFERENTES ÓLEOS: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E
*IN VIVO***

Santa Maria, RS
2016

Luciane Varini Laporta

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS PEGUILADAS DE
RISPERIDONA EM DIFERENTES ÓLEOS: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E
*IN VIVO***

Tese de Doutorado apresentado ao Curso 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 **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Palma Alves

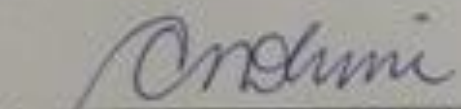
Santa Maria, RS

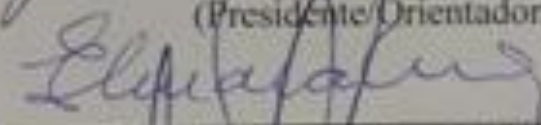
2016

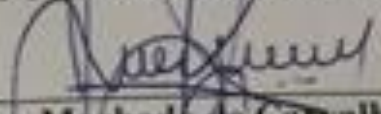
**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS PEGUILADAS DE RISPERIDONA
EM DIFERENTES ÓLEOS: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

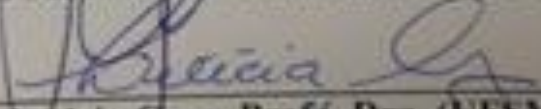
Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

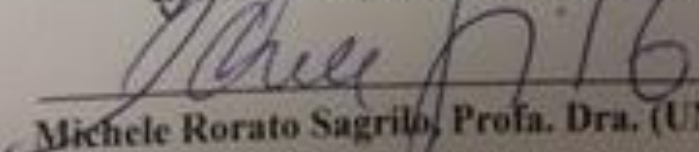
Aprovado em 30 de agosto de 2016.


Clarice Madalena Bueno Rolim, Prof.^a Dr.^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)


Elenara Teixeira Lemos Senna, Profa. Dra. (UFSC)


Leandro Machado de Carvalho, Prof. Dr. (UFSM)


Leticia Cruz, Profa. Dra. (UFSM)


Michele Rorato Sagrilo, Profa. Dra. (UNIFRA)

Santa Maria, 31 de agosto de 2016.

DEDICATÓRIA

“O que se alicerça no verdadeiro amor, tem o poder de renascer e transformar tudo em algo melhor”. Esse trabalho é dedicado as pessoas que me ensinaram o verdadeiro sentido do amor: Amanda, Elaine, Enio (*in memoriam*), Ricardo, Adriane, Mylena e Manuella.

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande, quanto escrever essa tese, e agradecer a todos que me acompanharam nessa trajetória, por isso quero começar agradecendo a Deus, por sempre me proteger e colocar vocês no meu caminho.

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional durante esses quatro anos. Vocês que acreditaram nos meus sonhos e me apoiaram sempre, meu muito obrigado!

Meu agradecimento especial a minha orientadora e amiga, Clarice Madalena Rolim, pela dedicação, paciência, amizade e incentivo durante todo o período de orientação.

A minha co-orientadora, Marta Palma Alves, por toda sua ajuda, amizade, risos, conselhos e troca de nano-ideias!

Às Professoras Leticia Cruz e Margareth Athaide (*in memoriam*) por toda ajuda e carinho ao longo dessa jornada.

Aos amigos da UNIFRA, que muito me auxiliaram em várias etapas desse trabalho: Alexandre Rubim, Marcos Roberto dos Santos, Cristiano Rhoden, Sergio Mortari, Michele Sagrillo, Katia Nascimento, Francine Ianiski Carlos Robalo.

As minhas amigas do coração: Rosimar Leitenberg da Silveira, Juliana Fleck, Maria do Carmo Araujo, Silvana Bertagnolli e Jane Limberger, pela amizade e incentivo constante durante essa “fase”.

As minhas queridas ex-alunas, que hoje são minhas colegas no doutorado, Thiele F. de Brum e Roberta S. Jesus. Obrigado pelas conversas, risadas e toda a ajuda.

À minha orientada Bibiana, com toda sua energia, vontade, vivacidade e alegria!

Sua ajuda foi fundamental e muito importante nesse trabalho.

Ao Professor Marcos Segatto, pela ajuda com os DSC.

Meu muito obrigado a Professora Marilise Burger e Katiane Roversi pela execução dos estudos *in vivo*.

E o meu agradecimento especial ao Professor Celso Bittencourt, que sempre foi incansável em seus incentivos para que eu continuasse estudando. Esse trabalho também é dedicado a esse grande mestre, que eu tenho o prazer de chamar de amigo!

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS PEGULADAS DE RISPERIDONA EM DIFERENTES ÓLEOS: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*

AUTORA: Luciane Varini Laporta
ORIENTADORA: Clarice Madalena Rolim

O presente estudo teve como objetivo desenvolver nanocápsulas peguiladas contendo risperidona (RIS) em diferentes óleos e avaliar a sua performance *in vivo* e *in vitro*. Os óleos utilizados foram gergelim (Ge), linhaça (Li), cártamo (Ca), fígado de bacalhau (Ba) e triglicérides do ácido cáprico/caprílico (Tc), para comparação dos resultados. Nanocápsulas contendo RIS foram elaboradas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, com base no planejamento fatorial 2^3 , sendo o polímero, o fármaco e o óleo as variáveis dependentes. O método validado para a quantificação da RIS, independente do óleo utilizado, se mostrou específico, linear, preciso, exato e robusto, podendo ser utilizado para a determinação quantitativa e estudos predicativos de estabilidade. O fármaco demonstrou afinidade em todos os óleos testados e não causou degradação do polímero escolhido (PCL). O PEG-4000 foi o escolhido para o revestimento das nanocápsulas, por não ter interferido nos parâmetros básicos de caracterização desses sistemas e por ser descrito na literatura, como eficiente em ultrapassar a barreira sangue-cérebro. Todos os óleos estudados mostraram ter capacidade sequestradora do radical DPPH, com exceção do Tc. As nanocápsulas peguiladas de risperidona em diferentes óleos, de uma maneira geral, apresentaram características adequadas de pH, diâmetro médio, PDI, potencial zeta, teor e taxa de associação e os óleos ricos em ômega 3 e ômega 6 se mostraram promissores para o desenvolvimento desses sistemas, sendo superiores em vários aspectos aos triglicérides do ácido cáprico/caprílico. O método fatorial, se mostrou adequado para o desenvolvimento de nanocápsulas de risperidona com diferentes óleos, comprovando a alta capacidade prognóstica da técnica utilizada na otimização dos estudos laboratoriais. As formulações NcTcF7, NcBaF8, NcGeF4, NcCaF4 e NcLiF4 foram selecionadas por apresentarem uma boa taxa de associação, diâmetro e potencial zeta adequados, baixo PDI e um valor predicativo coerente com o prático. Os estudos de liberação das nanocápsulas de risperidona foram conduzidos em tampão pH 1,2, pois foi o meio em que o fármaco apresentou melhor solubilidade e perfil de liberação. O fármaco livre apresentou modelo monoexponencial de liberação e todas as nanocápsulas biexponencial, apresentando um efeito “burst” inicial, seguido de uma liberação sustentada. As formulações NcCa-F4 e NcGe-F4 apresentaram perfil diferenciado, mostrando que as mesmas conseguem prolongar a liberação do ativo da formulação. Com base nos estudos realizados, escolheu-se a formulação NcGe-F4 por ter liberado adequadamente a RIS do sistema e por ter apresentado uma perfil de capacidade anti-oxidante mais consistente, em todas as concentrações avaliadas. As NcGe-F4 e NcTC-F7 não apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células testadas, demonstrando serem seguras para a aplicação *in vivo*. O estudo *in vivo*, que induziu a pseudo-psicose foi realizado com a formulação selecionada e, comparativamente, com as NcTC-F7. Resultados demonstraram diferença significativa entre as formulações e entre o fármaco livre, evidenciando a superioridade das NcGe-F4 em liberar a RIS, ao longo do tempo. Os estudos *in vitro* foram muito semelhantes aos estudos *in vivo*, demonstrando uma boa correlação entre eles. Paralelamente, estudou-se a possibilidade de aumentar a eficiência de encapsulação da RIS no óleo de linhaça, controlando-se o pH da fase aquosa da formulação. Resultados promissores foram obtidos quando o mesmo foi alterado para pH 7,0, conseguiu-se um aumento de 10,15% na eficiência de encapsulação.

Palavras-chave: Nanocápsulas. Óleos com características antioxidantes. Antipsicóticos. Desenvolvimento fatorial.

ABSTRACT

PEGYLATED NANOCAPSULES OF RISPERIDONE IN DIFFERENT OILS: *IN VITRO* AND *IN VIVO* EVALUATION

AUTHOR: Luciane Varini Laporta

ADVISOR: Clarice Madalena Rolim

This study aims to develop PEGylated nanocapsules containing Risperidone (RIS) in different oils and evaluate its performance *in vivo* and *in vitro*. The oils utilized for the results comparison were sesame (Ge), linseed (Li), safflower (Ca), cod liver (Ba) and Caprylic/Capric Triglyceride (Tc). Nanocapsules containing RIS were elaborated by the interfacial deposition of performed polymer method, based on the 2³ factorial design, being the polymer, the drug and the oil the dependent variables. The validated method for RIS quantification, independent of the utilized oil showed itself specific, linear, accurate and robust; and it can be used for quantitative determination and predicative stability studies. The drug showed affinity in all tested oils and did not cause any degradation in the chosen polymer (PCL). PEG-4000 was the one chosen for the nanocapsules covering, due to the fact that it did not interfere in the basic parameters of characterization in these systems, and also because it is described in the literature as efficient in surpassing the blood-brain barrier. All the studied oils showed the capacity of abducing DPPH radical, but Tc. PEGylated nanocapsules of Risperidone in different oils, in a general manner, presented adequate characteristics of pH, mean diameter, PDI, zeta potential, content and rate of association and the oils rich in omega 3 and omega 6 showed themselves promising for the development of these systems, being paramount in several aspects to Caprylic/Capric Triglyceride (Tc). The factorial design showed itself adequate for the development of nanocapsules of Risperidone with different oils, proving the high prognostic capacity of the technique used in the optimization of laboratorial studies. The formulations NcTcF7, NcBaF8, NcGeF4, NcCaF4 e NcLiF4 were selected because they presented a good rate of association, diameter and zeta potential adequate, low PDI and a predicative value coherent with the practical. The studies of liberation of nanocapsules of Risperidone were conducted in a pH 1,2 buffer, since it was the local in which the drug presented better solubility and release profile. The release drug presented a monoexponential model of releasing and all the biexponential nanocapsules, presenting an initial burst effect, followed by a sustained releasing. The formulations NcCa-F4 e NcGe-F4 presented a differentiated profile, showing that they can extend the releasing of the active of the formulation. Based on the carried out studies, it was chosen the NcGe-F4 formulation because it liberated RIS from the system adequately and also because it presented a more consistent antioxidant capacity in all the evaluated concentrations. NcGe-F4 e NcTC-F7 did not present cytotoxic and genotoxic effects in the tested cells, demonstrating to be safe of the *in vivo* application. The *in vivo* study, which induced the pseudo psychosis, was carried out with the selected formulation and comparatively, with NcTC-F7. The results showed a significant difference among the formulations and the released drug, evidencing a superiority of NcGe-F4 in the releasing of RIS, over time. The *in vitro* studies were very similar to the *in vivo* studies, showing a good correlation among them. Besides, it was studied the possibility of raising the encapsulation efficiency of RIS in the linseed oil, controlling the pH in the aqueous phase of the formulation. Promising results were obtained when it was altered for the pH 7,0, obtaining a rise of 10,15% in the encapsulation efficiency.

Key-words: Nanocapsules. Oils with antioxidant characteristics. Antipsychotics. Factorial Design.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 –	Estrutura química da risperidona.....	26
Figura 3.2 –	Sistema de transporte pela barreira sangue-cerébro.....	28
Figura 3.3 –	Desenho ilustrativo representando nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	29
Figura 3.4 –	Nanocápsula revestida com PEG.....	34
Figura 3.5 –	Concentrações sugeridas para comporem a formulação de nanocápsulas, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado.....	36
Figura 4.1 –	Espectros da risperidona, na faixa de 200 a 400 nm, obtidos por cromatografia a líquido de alta eficiência.....	49
Figura 4.2 –	Espectro de absorção na região do infravermelho da risperidona em pastilha de KBr.....	50
Figura 4.3 –	Espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ da risperidona e sua respectiva estrutura química.....	52
Figura 4.4 –	Espectro de RMN ¹³ C em CDCl ₃ da risperidona e sua respectiva estrutura química.....	53
Figura 4.5 –	Representação gráfica da curva de titulação obtida no doseamento da risperidona matéria-prima.....	54
Figura 5.1 –	Solubilidade da risperidona em diferentes óleos.....	61
Figura 5.2 –	Inchamento do polímero policaprolactona (PCL) com diferentes óleos.....	62
Figura 7.1 –	Representação gráfica da capacidade sequestradora do radical DPPH dos óleos e do BHT em diferentes concentrações, expressas em média ± DP.....	73
Figura 7.2 –	Análise estatística da capacidade sequestradora do radical DPPH dos óleos e do BHT em diferentes concentrações, expressas em média ± DP.....	75
Figura 8.1 –	Representação gráfica da interação entre os fatores que alteraram significativamente o pH para as NcTc (a) e NcBa (b).....	86
Figura 8.2 –	Representação gráfica do fator que alterou significativamente o pH para as NcCa (a) e NcLi (b).....	86
Figura 8.3 –	Representação gráfica da interação entre os fatores que alteraram significativamente o pH para as NcGe.....	87
Figura 8.4 –	Representação gráfica do pH obtido nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.....	88
Figura 8.5 –	Representação gráfica do fator que alterou significativamente o diâmetro médio das NcTc (a), NcLi (b) e NcGe (c).....	89
Figura 8.6 –	Representação gráfica do fator que altera significativamente o diâmetro médio das partículas para as NcCa.....	90
Figura 8.7 –	Representação gráfica do fator que altera significativamente o	90

	diâmetro médio das partículas para as NcBa.....	
Figura 8.8 –	Representação gráfica dos diâmetros médios obtidos nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.....	92
Figura 8.9 –	Representação gráfica da interação entre os fatores que influenciaram o PDI para as NcTc (a) e NcBa (b).....	93
Figura 8.10 –	Representação gráfica (3D) da interação entre fármaco-polímero-óleo e sua influência na distribuição do PDI para as NcCa.....	94
Figura 8.11 –	Representação gráfica do fator que altera significativamente o PDI para as NcGe.....	94
Figura 8.12 –	Representação gráfica dos índices de polidispersão obtidos nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.....	95
Figura 8.13 –	Representação gráfica dos fatores que alteram significativamente o potencial zeta para as NcTc (a) e NcBa (b).....	96
Figura 8.14 –	Representação gráfica dos fatores que alteram significativamente o potencial zeta para as NcCa (a) e NcLi.(b).....	96
Figura 8.15 –	Representação gráfica dos fatores que alteram significativamente o potencial zeta para as NcGe.....	97
Figura 8.16 –	Representação gráfica do potencial zeta obtido, nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.....	98
Figura 8.17–	Representação gráfica dos teores obtidos nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.....	99
Figura 8.18 –	Representação gráfica do fator que altera significativamente a taxa de associação para as NcTc.....	100
Figura 8.19 –	Representação gráfica do fator que altera significativamente a taxa de associação para as NcCa.....	100
Figura 8.20 –	Representação gráfica dos fatores que alteram significativamente a taxa de associação para as NcGe (a) e NcBa (b).....	101
Figura 8.21 –	Representação gráfica dos fatores que alteram significativamente a taxa de associação para as NcLi.....	101
Figura 8.22 –	Representação gráfica das taxas de associação, nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.....	103
Figura 9.1–	Representação gráfica dos resultados encontrados no estudo da solubilidade da risperidona em diferentes meios.....	117
Figura 9.2 –	Representação gráfica dos valores médios e dos DP obtidos no estudo de liberação <i>in vitro</i> da risperidona em diferentes meios de liberação.....	118
Figura 10.1 –	Representação gráfica da curva padrão média de risperidona SQR em tampão ácido clorídrico pH 1,2.....	125
Figura 10.2 –	Porcentagem de risperidona liberada no meio, por faixa de tempo..	128
Figura 10.3 –	Representação gráfica dos valores médios e do DP obtidos no estudo de liberação <i>in vitro</i> do fármaco livre e das NcLi-F4 tampão ácido clorídrico pH 1,2.....	128
Figura 10.4 –	Representação gráfica dos valores médios e do DP obtidos no estudo de liberação <i>in vitro</i> do fármaco livre e das NcCa-F4	129

	tampão ácido clorídrico pH 1,2.....	
Figura 10.5 –	Representação gráfica dos valores médios e do DP obtidos no estudo de liberação <i>in vitro</i> do fármaco livre e das NcGe-F4 tampão ácido clorídrico pH 1,2.....	129
Figura 10.6 –	Representação gráfica dos valores médios e do DP obtidos no estudo de liberação <i>in vitro</i> do fármaco livre e das NcTc-F7 tampão ácido clorídrico pH 1,2.....	130
Figura 10.7 –	Representação gráfica dos valores médios e do DP obtidos no estudo de liberação <i>in vitro</i> do fármaco livre e das NcBa-F8 tampão ácido clorídrico pH 1,2.....	130
Figura 10.8 –	Representação gráfica da eficiência de dissolução da risperidona livre e formulações selecionadas no delineamento experimental..	133
ARTIGO 1		
Figura 1 –	Chemical structure of risperidone.....	137
Figura 2 –	Chromatogram of white formulations and RIS with different oils...	146
Figura 3 –	Chromatograms corresponding of risperidone solution SQR.....	147
Figura 4 –	Photolytic degradation of raw material, RIS and nanocapsules in different oils.....	149
Figura 5 –	Graphic representation of the average standard curve reference chemical substance RIS.....	149
Figura 6 –	Chromatograms of the RS (1) and sample (2) when some chromatographic conditions were altered: mobile phase flow rate (1.0 mL/min to 1.1 mL/min) (A). Column temperature (25 °C to 30 °C) (B) and column chromatography (Waters® Bridge C8 (250 x 4.6 mm, 5 µm) to Phenomenex® Luna C8 (250 x 4.6 mm, 5 µm) (C).....	153
ARTIGO 2		
Figura 1 –	Factors that significantly alter the association rate for NCSe.....	168
Figura 2 –	Response surface plots for X2 and X3 on encapsulation efficiency, where X2 = drug concentration, X3 = oil concentration, when X1 = polymer concentration was 1.0% (A). Representation of planar interaction between X2 and X3 when X1=0.8% (B).....	168
Figura 3 –	FT-IR of RIS (A), NCSe (B) and NCSe-DU(C).....	170
Figura 4 –	X-ray diffraction and DSC of RIS and samples. A= RIS; B=NCSe; C=NCSe-DU and D=PCL.....	171
Figura 5 –	Profiles of <i>in vitro</i> RIS release from ethanolic solution (RIS-Et) and NCSe and NCTc.....	173
Figura 6 –	DPPH radical scavenging capacity of sesame oil and BHT. Se: sesame oil; BHT: antioxidant standard. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).....	175
Figura 7 –	MTT assay after 72 h of incubation. Results expressed as a percentage of the negative control (100%). Negative control (C-): cell in culture medium; (C+): cell with H ₂ O ₂ ; Se: sesame oil. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).....	176

Figura 8 –	Test TBARS after 72 h of incubation. Results expressed as mol of MDA. Negative control (C-): cell in culture medium; (C+): cell with H ₂ O ₂ ; Se: sesame oil. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).....	177
Figura 9–	Antipsychotic activity of different formulations of Risperidone (3 mg. kg ⁻¹) on amphetamine (AMPH)-induced stereotyped behavior (8 mg·kg ⁻¹ i.p. each 2 h) in rats (n=7). Data are expressed as mean±S.E.M. of % head movements. Different lowercase letters indicate significant difference between experimental groups that contain RIS; *indicates significant difference to the same formulation without RIS.....	178
ARTIGO 3		
Figura 1 –	Response surface plots for the X2 and X3 on encapsulation efficiency, where X2 = drug concentration, X3 = oil concentration, when X1 = polymer concentration was 0,8% (A). Representation planar interaction between the X2 and the X3 when X1=0,8% (B)..	196
Figura 2 –	Response surface plots for the X2 and X3 on encapsulation efficiency, where X2 = drug concentration, X3 = oil concentration, when X1 = polymer concentration was 1,0% (A). Representation planar interaction between the X2 and the X3 when X1=1,0% (B)..	196
Figura 3 –	DSC and X-ray diffraction of RIS and samples. A= RIS; B=LiF4-PEG/7.0; C=LiF4DU-PEG/7.0 and D=PCL.....	202
Figura 4 –	FT-IR of RIS (A), LiF4-PEG/7.0 (B) and LiF4DU-PEG/7.0 (C)...	203
Figura 5 –	DPPH radical scavenging capacity of linseed oil and BHT. Li: linseed oil; BHT: antioxidant standard. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).....	204
Figura 6 –	MTT assay after 72 h of incubation. Results expressed as a percentage of the negative control (100%). Negative control (C-): cell in culture medium; (C+): cell with H ₂ O ₂ ; Li: linseed oil. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).....	205
Figura 7 –	Test TBARS after 72 h of incubation. Results expressed as mol of MDA. Negative control (C-): cell in culture medium; (C+): cell with H ₂ O ₂ ; Li: linseed oil. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).....	206
Figura 8 –	Test comet after 72 h of incubation. Results expressed as index damage. Negative control (C-): cell in culture medium; (C+): cell with H ₂ O ₂ ; Li: linseed oil. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).....	207

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 –	Ácidos graxos que dão origem a as famílias ômega 3, 6 e 9.....	31
Tabela 3.2 –	Risperidona associada a sistemas nanoparticulados.....	34
Tabela 3.3 –	Métodos encontrados na literatura para quantificação de risperidona em diferentes amostras.....	37
Tabela 4.1 –	Frequências de absorção das principais bandas de absorção da risperidona e suas respectivas atribuições.....	51
Tabela 4.2 –	Resultados obtidos no doseamento da matéria-prima de risperidona por método volumétrico.....	54
Tabela 5.1 –	Composição dos óleos de bacalhau (Ba), cártamo (Ca), linhaça (Li), gergelim (Ge) e coco (Co), segundo o laudo analítico dos produtos.....	57
Tabela 5.2 –	Condições cromatográficas para a determinação da risperidona em óleos.....	59
Tabela 5.3 –	Solubilidade da risperidona em diferentes óleos.....	60
Tabela 5.4 –	Resultados médios obtidos no estudo de inchamento do polímero (PCL), em diferentes óleos.....	62
Tabela 6.1 –	Características dos diferentes PEGs testados no desenvolvimento das nanocápsulas.....	65
Tabela 6.2 –	Resultados obtidos na caracterização das nanocápsulas brancas revestidas com diferentes PEGs.....	66
Tabela 7.1 –	Capacidade sequestradora do radical DPPH dos óleos Tc, Ca e Ge.....	72
Tabela 7.2 –	Capacidade sequestradora do radical DPPH dos óleos e do BHT..	72
Tabela 8.1 –	- Planejamento fatorial e condições experimentais para o preparo das nanocápsulas contendo risperidona.....	79
Tabela 8.2 –	Composição das oito formulações de nanocápsulas de risperidona para um volume final de 100 mL.....	80
Tabela 8.3 –	pH das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos...	82
Tabela 8.4 –	Distribuição do diâmetro médio de partícula das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.....	82
Tabela 8.5 –	Índice de polidispersão das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.....	83
Tabela 8.6 –	Potencial zeta das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.....	84
Tabela 8.7 –	Teor e taxa de associação das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.....	84
Tabela 8.8 –	Taxa de associação das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.....	85
Tabela 8.9 –	Predição dos valores, valores observados e erro de predição para as formulações de NcTc.....	105

Tabela 8.10 –	Predição dos valores, valores observados e erro de predição para as formulações de NcCa.....	106
Tabela 8.11 –	Predição dos valores, valores observados e erro de predição para as formulações de NcGe.....	107
Tabela 8.12 –	Predição dos valores, valores observados e erro de predição para as formulações de NcLi.....	108
Tabela 8.13 –	Predição dos valores, valores observados e erro de predição para as formulações de NcBa.....	109
Tabela 9.1-	Resultados obtidos na determinação das curvas padrão em diferentes diluentes.....	116
Tabela 9.2 -	Resultados obtidos no estudo da solubilidade e condição <i>Sink</i> da risperidona, em diferentes meios.....	116
Tabela 10.1 –	Valores de área obtidos a partir da curva padrão da risperidona SQR por CLAE, em tampão ácido clorídrico pH 1,2.....	124
Tabela 10.2 –	Estabilidade das amostras após teste de liberação.....	126
Tabela 10.3 –	Perfil de liberação <i>in vitro</i> da risperidona livre e das formulações NcLi-F4 e NcCa-F4.....	127
Tabela 10.4 –	Perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações NcGe-F4, NcTc-F7 e NcBa-F8.....	127

ARTIGO 1

Tabela 1 –	Altered parameters for drug extraction from the nanocapsules...	139
Tabela 2 –	Analytical parameters and variations to evaluated the robustness of the chromatographic method for RIS quantification.....	142
Tabela 3 –	Matrix of factors for determination of method robustness.....	143
Tabela 4 –	Physicochemical characteristics of RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension.....	145
Tabela 5 –	Analytical parameters and variations to evaluate the repeatability of the chromatographic method for RIS quantification.....	150
Tabela 6 –	Analytical parameters and variations to evaluate the intermediate precision of the chromatographic method for RIS quantification.	151
Tabela 7 –	Experimental values obtained for the accuracy test.....	152
Tabela 8 –	Combinations tested to evaluate the robustness of the analytical method, evaluating the conditions 1.....	152
Tabela 9 –	Combinations tested to evaluate the robustness of the analytical method, evaluating the conditions 2.....	152

ARTIGO 2

Tabela 1 –	Variables and levels of 2 ³ factorial design for preparation of RIS nanocapsules.....	160
Tabela 2 –	Physicochemical characteristics of RIS nanocapsule suspension.	166
Tabela 3 –	The predicted and observed response variables of the RIS loaded nanocapsule with sesame oil.....	169
Tabela 4 –	Physicochemical characteristics of NCGe and NCGe-DU after	172

	preparation and 2 months of storage (n = 3).....	
Tabela 5 –	Rate constants, correlation coefficients, and MSC obtained byfitting the release profiles of NCSe and NCTc according to the biexponential equation.....	174
ARTIGO 3		
Tabela 1 –	Variables and levels of 2 ³ factorial design for preparation of RIS nanocapsules.....	189
Tabela 2 –	Physicochemical characteristics of RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension.....	195
Tabela 3 –	The predicted and observed response variables of the RIS loaded PEGylated nanocapsule with linseed oil.....	199
Tabela 4 –	Partition and Log P obtained for RIS in <i>n</i> -octanol and water at different pH.....	199
Tabela 5 –	Physicochemical characteristics of RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension prepared with aqueous phase, at different pH.....	201
Tabela 6 –	Physicochemical characteristics of drug-unloaded (DU) PEGylated nanocapsule suspension prepared with aqueous phase, at different pH.....	201

SUMÁRIO

Capítulo 1-	Introdução.....	17
Capítulo 2-	Objetivos.....	21
Capítulo 3-	Revisão de literatura.....	23
Capítulo 4-	Caracterização da substância química de referência.....	45
Capítulo 5-	Determinação da solubilidade da risperidona em diferentes óleos e teste de inchamento do polímero.....	55
Capítulo 6-	Escolha do polietilenoglicol a ser utilizado no revestimento das nanocápsulas poliméricas.....	64
Capítulo 7-	Capacidade antioxidante.....	68
Capítulo 8-	Delineamento experimental e desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas contendo risperidona.....	77
Capítulo 9-	Determinação da condição <i>sink</i> e solubilidade da risperidona em diferentes meios de liberação.....	111
Capítulo 10-	Estudos de liberação <i>in vitro</i>	120
Capítulo 11-	Artigo 1 - Validation of high performance liquid chromatography method for determination of risperidone loaded PEGlated nanocapsules with different oils.....	135
Capítulo 12-	Artigo 2 - Nanoencapsulation risperidone with sesame oil: a study of formulation development and biological evaluation.....	156
Capítulo 13-	Artigo 3 - Influence of variation of pH of the aqueous phase in the encapsulation efficiency of nanocapsules PEGylated risperidone with linseed oil and in vitro evaluation of the toxicity.....	184
Capítulo 14-	Discussão Geral.....	214
Capítulo 15-	Conclusões.....	221
	Referências.....	223

Capítulo 1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma das mais graves doenças neuropsiquiátricas e atinge aproximadamente 1% da população mundial. Além de comprometer pacientes e familiares, representa um grande custo para toda a sociedade. No Brasil, a esquizofrenia ocupa 30% dos leitos psiquiátricos hospitalares, ou cerca de 100 mil leitos-dia. Estima-se que nos Estados Unidos, cerca de 4,75 milhões de indivíduos sofram de esquizofrenia e, anualmente, são diagnosticados de 100.000 a 150.000 novos casos (FROTA et al., 1998; FROTA, 2000). Parece ter uma etiologia multifatorial, com componentes tanto genéticos quanto ambientais, sendo sua incidência maior no sexo masculino (TANDON; KESHAVAN; NASRALLAH, 2010).

A risperidona é um fármaco antipsicótico de segunda geração, utilizado no tratamento da esquizofrenia, esquizofrenia refratária, autismo infantil e na fase depressiva do transtorno bipolar. No entanto, seu uso está associado a efeitos adversos importantes, os quais são dependentes da dose, tais como sintomas extrapiramidais, discinesia, ganho de peso e desenvolvimento de diabetes tipo II (BAPTISTA et al., 2004; CORDIOLI, 2005; FROTA, 2001; SENA et al., 2003).

A risperidona é um fármaco praticamente insolúvel em água e suscetível à luz, umidade e oxidação, o que justifica a sua comercialização sob a forma de comprimidos revestidos, comprimidos oro-dispersíveis e pó para suspensões injetáveis (FDA, 2003; SUTHAR et al., 2009).

A via oral é a preferida dos pacientes para a administração de fármacos, no entanto, com antipsicóticos podem ocorrer alguns problemas, uma vez que estes medicamentos são comumente usados para tratar pessoas com transtornos mentais. Vários estudos relatam a baixa adesão dos pacientes aos tratamentos com medicamentos antipsicóticos orais, na sua maioria, relacionadas a necessidade de administração de doses frequentes, e a existência de efeitos colaterais evidentes (BHANJI; CHOUINARD; MARGOLESE, 2004; CHUE; BINDER, 2004).

A maior dificuldade no tratamento efetivo das doenças do sistema nervoso central (SNC) é a incapacidade da maior parte dos fármacos em ultrapassar a barreira sangue-cérebro de forma eficiente, impossibilitando assim que os mesmos atinjam a concentração adequada no seu local de ação (VOIGT et al., 2014). Para este fim, os sistemas nanoestruturados, constituídos de polímeros biodegradáveis, podem ser utilizados como carreadores de

fármacos, pois são capazes de interagir até com os sistemas biológicos mais complexos, como a barreira sangue-cérebro, com maior seletividade e menor tempo do que as abordagens farmacológicas convencionais, devido ao seu tamanho (10 a 1000 nm) (LOHMANN et al., 2002; MODI et al., 2009).

A funcionalização dos sistemas nanoestruturados consiste em um dos novos desafios no estudo dessas formulações, visando a entrega mais efetiva do fármaco no local adequado. Uma dessas estratégias é revestir as nanocápsulas com polietilenoglicol (PEG), pois além de proporcionar a estabilização estérica, a presença do mesmo na superfície das nanopartículas permite libertar o fármaco no microambiente do cérebro, onde vai ser lentamente biodegradado (GULYAEV et al., 1999).

Pelo fato da risperidona apresentar efeitos colaterais importantes, que são dependentes da dose administrada, possuir instabilidade frente à luz, umidade e processos oxidativos e ser praticamente insolúvel em água, consideramos esse fármaco um bom candidato a ser nanoencapsulado.

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Em humanos, os ácidos linoléico ($\omega 6$) e linolênico ($\omega 3$) são necessários para manter as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular (YOU DIM; MARTINI; JOSEPH, 2000).

Os óleos vegetais e animais apresentam antioxidantes naturais, agindo potencialmente na prevenção de doenças crônicas, pois são capazes de proteger sistemas biológicos contra a ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, responsáveis por danos oxidativos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, além de apresentarem bioatividade no organismo humano. Entre os benefícios reconhecidos para a saúde está a capacidade de reduzir os níveis de glicose, colesterol e triglicérides, entre outros (BARROSO et al., 2014; GALVÃO et al., 2008).

A presença do óleo em nanocápsulas visa aumentar a afinidade de fármacos lipofílicos pela fase orgânica, e conseqüentemente aumentar a encapsulação do mesmo (ALANAZI et al., 2014). Associado a todos esses fatores, a adição de óleos vegetais ricos em ômega 3 e ômega 6 nas formulações, poderá contribuir ainda para a redução dos níveis de glicose e triglicérides, que se encontram aumentados em uma grande parcela dos pacientes tratados com esse fármaco.

Sendo assim, já que não encontramos na literatura pesquisa a risperidona associada a nanocápsulas, o presente estudo teve como objetivo desenvolver nanocápsulas peguiladas contendo risperidona, em diferentes óleos, visando aumentar a estabilidade do fármaco e diminuir a dose e os efeitos colaterais causados por ele.

Capítulo 2. Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanocápsulas peguiladas contendo diferentes óleos para veiculação da risperidona e avaliar a performance *in vivo* e *in vitro* das formulações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar suspensões de nanocápsulas contendo risperidona, pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, utilizando diferentes óleos;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para a quantificação de risperidona nos sistemas nanoestruturados;
- Caracterizar os sistemas nanoestruturados quanto ao teor de fármaco, eficiência de encapsulamento, tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH;
- Selecionar as formulações mais promissoras para o estudo *in vivo*;
- Avaliar a forma de associação da risperidona, bem como possíveis interações com os componentes das formulações;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* e a estabilidade das formulações selecionadas;
- Avaliar o perfil de citotoxicidade e genotoxicidade das formulações escolhidas para o estudo *in vivo*;
- Avaliar, *in vivo*, a ação antipsicótica das suspensões de nanocápsulas contendo risperidona.

Capítulo 3. Revisão de literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é um transtorno do processo mental caracterizado por um ou mais episódios de psicose. Os pacientes podem manifestar transtornos de percepção, pensamento, memória, dicção, emoção e/ou atividade física. Os sintomas esquizofrênicos são divididos em duas amplas categorias. Os sintomas positivos envolvem o desenvolvimento de funções anormais que incluem delírios, alucinações, fala desorganizada e comportamento catatônico. Os sintomas negativos envolvem a redução ou perda das funções normais; esses sintomas incluem afeto embotado, alogia e avolição (TANDON; NASRALLAH; KESHAVAN, 2010; YOUNG et al., 2009).

O modelo mais comumente citado para explicar essa patogenia é a hipótese da dopamina, segundo o qual a doença é causada por níveis elevados ou desregulados de neurotransmissão de dopamina no cérebro. Porém, essa não é a única, existe também a hipótese de um desequilíbrio na transmissão glutaminérgica. Com frequência, os neurônios dopaminérgicos e os neurônios glutaminérgicos excitatórios formam conexões sinápticas recíprocas, o que poderia explicar a eficácia dos antagonistas dos receptores de dopamina na esquizofrenia (GOLAN et al., 2009; WELLS et al., 2006).

Os medicamentos antipsicóticos são a base do tratamento para a esquizofrenia, porém a farmacoterapia sozinha produz apenas uma melhora limitada nos sintomas negativos, função cognitiva, convívio social e qualidade de vida, sendo que poucos pacientes retornam totalmente ao seu estado pré-mórbido (KERN et al., 2009; PATTERSON; LEEUWENKAMP, 2008).

3.2 FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA

A ação terapêutica dos antipsicóticos típicos deve-se ao bloqueio dos receptores D2, especificamente na via dopaminérgica mesolímbica. Esse bloqueio tem o efeito de reduzir à hiperatividade nessa via, que é considerada a causadora dos sintomas positivos da doença. Os

atípicos, que constituem a geração mais nova desses fármacos, possuem antagonismo D2, menos proeminente, ligação com os receptores 5-HT₂ de serotonina, além de ligarem-se, ainda, com receptores muscarínicos e histamínicos H1, entre outros, tendo como principal vantagem, diminuir os sintomas negativos da doença. Os cinco principais antipsicóticos atípicos são a clozapina, olanzapina, quetiapina, ziprasidona e risperidona (CORDIOLI, 2005; GOLAN et al., 2009).

3.3 RISPERIDONA

A risperidona foi originalmente obtida nos laboratórios de pesquisa da Janssen Research Foundation, na Bélgica no final dos anos 80 por Paul Janssen e demais colaboradores como extensão do trabalho de síntese dos antipsicóticos butirofenônicos e difenilbutilpiperidínicos iniciado com o haloperidol em 1958. Com o enorme sucesso de vendas dos novos antipsicóticos de alta potência, a pequena companhia de pesquisa foi incorporada pela Johnson & Johnson em 1961 que criaria a subsidiária norte americana Janssen Pharmaceutica Products, L.P (Janssen-Cilag em outros países) e que se tornou, anos mais tarde, responsável pelo desenvolvimento, licenciamento e comercialização da risperidona (FROTA, 2000).

A risperidona foi introduzida como o primeiro antagonista misto dopamino/serotonérgico balanceado, quase tão intenso em seu bloqueio D2 quanto o haloperidol, embora com menor indução de catalepsia, antecipando boa eficácia antipsicótica com efeitos extrapiramidais mais brandos (MEGENS; AWOUTERS; NIEMEGERES, 1988).

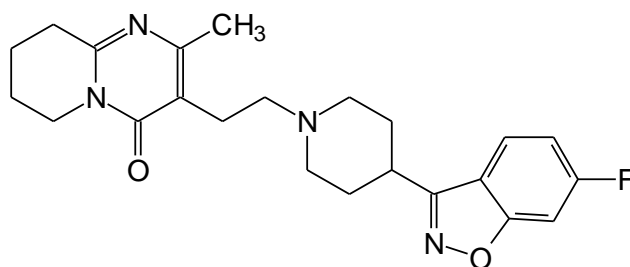
Em 1993, nos Estados Unidos, seu uso foi liberado para o tratamento da esquizofrenia em adultos; em 1995 veio a tornar-se o primeiro antipsicótico aprovado pela FDA para o tratamento de esquizofrenia refratária desde o licenciamento da clozapina, no final de 1989. Em 2006, foi aprovado seu uso para o tratamento da irritabilidade, associada aos pacientes autistas e em 2007 para o tratamento de esquizofrenia em adolescentes e crianças bipolares, maiores de 12 anos (FDA, 2003).

Com menos de dois anos de mercado e antes do advento da olanzapina, a risperidona já passava a responder por 1/5 das prescrições de antipsicóticos naquele país, continuando a crescer sua participação nos anos seguintes. No Brasil, a partir de 21 de setembro de 2000, a risperidona foi incluída na Relação de Medicamentos Excepcionais para dispensação nos

postos do Sistema Único de Saúde elaborada pela Secretaria de Assistência à Saúde do Ministério da Saúde (FROTA, 2000).

A risperidona (figura 3.1) possui a denominação química de 4H-Pirido(1,2-a)pirimidin-4-ona,3-(2-(4-(6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-il)-1-piperidinil)etil)-6,7,8,9-tetraidro-2-metil é registrada no CAS sob o número 106266-06-2, com a seguinte fórmula $C_{17}H_{20}N_4S$ e peso molecular 410,49. Apresenta-se como um pó cristalino branco, com ponto de fusão em torno de 170 °C e dois pKa, o primeiro em 3,11 e o segundo em 8,24. É praticamente insolúvel em água, moderadamente solúvel em etanol e solúvel em diclorometano (THE INDEX MERCK, 2001; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

Figura 3.1- Estrutura química da risperidona. (Fonte: The Index Merck, 2010).



É um fármaco antipsicótico de segunda geração, que possui alta afinidade pelos receptores D2 e 5-HT₂, baixa afinidade pelos receptores H1 e α -1-adrenérgicos e nenhuma afinidade pelos receptores colinérgicos, utilizada no tratamento da esquizofrenia, esquizofrenia refratária, autismo infantil e na fase depressiva do transtorno bipolar. Possui a vantagem de diminuir os sintomas positivos e negativos da esquizofrenia e prevenir as recidivas da fase ativa da doença (CORDIOLI, 2005; GOLAN et al., 2009).

No Brasil é comercializada na forma de comprimidos revestidos e oro-dispersíveis de 0,25 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg e 3 mg, solução oral na concentração de 1 mg/mL e pó para suspensão injetável (IM), nas concentrações de 25 mg/2 mL, 37,5 mg/2 mL e 50 mg/2 mL. Os comprimidos devem ser armazenados em temperatura ambiente e protegidos da luz e da umidade, as soluções orais da luz e as soluções injetáveis devem ser armazenadas no refrigerador. Uma vez reconstituída, a suspensão deverá ser administrada no período máximo de 6 horas (FDA, 2003).

A dose recomendada é de 2 a 3 mg, duas vezes ao dia. A formulação de pó para suspensão injetável, também chamada de *depot*, deve ser administrada a cada 2 meses, somente durante o período que o paciente se recusar a fazer o tratamento por via oral. Há evidências de que estas formulações aumentam o risco de ocorrência de reações extrapiramidais e de discinesia tardia (BECHELLI, 2003; CORDIOLI, 2005).

Os principais efeitos colaterais relatados, com o uso desse fármaco são a insônia, cefaléia, discinesia, sintomas extrapiramidais leves, sedação, ganho de peso (37%), desenvolvimento de diabetes tipo II (7%), aumento nos níveis de triglicérides, hiperprolactinemia e disfunção sexual (43%) (BAPTISTA et al., 2004; CORDIOLI, 2005; FROTA, 2000; SENA et al., 2003).

A risperidona é bem absorvida após a ingestão oral, atingindo pico de concentração plasmática dentro de 1 a 2 horas e apresentando meia-vida de 3 horas. Os alimentos não interferem em sua absorção. Sofre biotransformação hepática (70%), gerando metabólitos com atividade igual ao do fármaco original. Liga-se intensamente às proteínas plasmáticas (88%), sendo excretada principalmente pela via renal (70%).

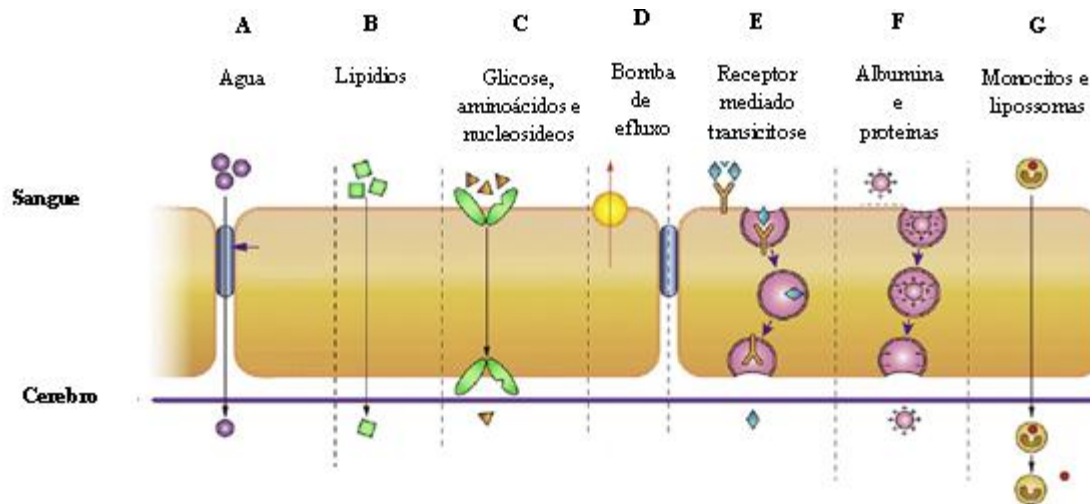
3.4 BARREIRA SANGUE-CÉREBRO

A barreira sangue-cérebro separa o sangue circulante dos líquidos cefalorraquidiano e intersticial cerebral, não permitindo a passagem de algumas macromoléculas que normalmente circulam por outros órgãos e tecidos corporais. Em geral, essa barreira é altamente permeável à água, ao dióxido de carbono, ao oxigênio e à maioria das substâncias lipossolúveis como o álcool e anestésicos; ligeiramente permeável aos eletrólitos e quase totalmente impermeável às proteínas e às macromoléculas orgânicas não lipossolúveis, o que faz com que frequentemente impossibilite a obtenção de concentrações eficazes de fármacos com ação no sistema nervoso central (SNC), que se concentram no líquido cefalorraquidiano e no parênquima cerebral (GOLAN et al., 2009).

Sistemas nanoparticulados como nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas ou nanopartículas lipídicas sólidas, que variam de tamanho entre 10 a 1000 nm, podem apresentar uma grande vantagem na liberação de fármacos através dessa barreira. Esses carreadores nanoparticulados fazem uso dos sistemas de transporte bioquímico na barreira hematoencefálica, entre os quais se pode citar o sistema receptor-LDL (lipoproteínas de baixa

densidade) e o sistema de transcitose que são, geralmente, processos de transporte diferentes daqueles utilizados quando o fármaco é administrado na forma livre (CHEN; LIU, 2012; KREUTER, 2001). Na figura 3.2 podemos destacar as rotas mais utilizadas pelas moléculas de soluto (“a” a “f”); e a rota "g" envolve monócitos, macrófagos e outras células imunes podendo ser utilizado para qualquer fármaco ou fármacos incorporados em lipossomas ou nanopartículas.

Figura 3.2 -Sistema de transporte pela barreira sangue-cérebro.



3.5 NANOTECNOLOGIA E APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS

Nanotecnologia é o conjunto de ações que envolvem pesquisa, desenvolvimento e inovação, sendo obtida graças às propriedades especiais da matéria em se organizar a partir de estruturas de dimensões nanométricas, modificando-se o arranjo de átomos e moléculas, visando-se um produto final mais resistente, leve, preciso e puro. Nesse sentido, a nanotecnologia possui o poder de revolucionar a forma com que se imagina, trata e manuseia a formação de materiais (FERNANDES DE SÁ et al., 2004; PINA et al., 2005). Quando essa tecnologia é aplicada às ciências da vida, recebe o nome de nanobiotecnologia (FRONZA et al., 2007; KHAN et al., 2015).

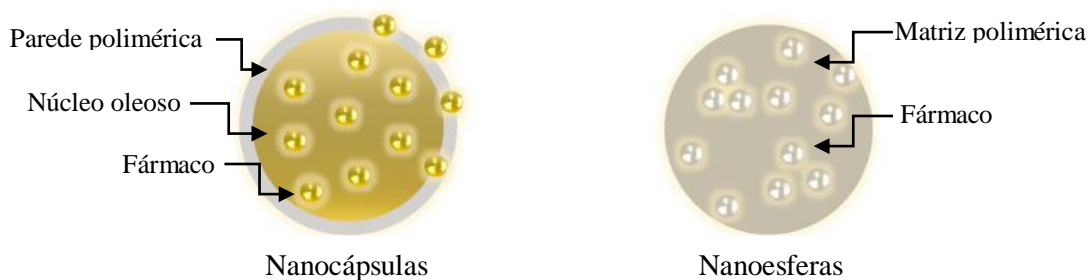
A nanobiotecnologia tem um grande potencial para aplicação, destacando-se as áreas médicas e farmacêuticas. Para superar os problemas associados com a administração de

fármacos, a nanotecnologia tem ganhado destaque crescente nos últimos anos (KHAN et al., 2015). Atualmente, existe um grande interesse no estudo de novas formas farmacêuticas que permitam a liberação controlada de fármacos, com o objetivo de melhorar a seletividade e eficiência das formulações (MONACO, 2000). Microemulsões, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, lipossomas e nanopartículas poliméricas aparecem como opções frente ao uso dos sistemas mais clássicos (ALVAREZ ROMÁN, 2004; MODI et al., 2009).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores que apresentam diâmetros entre 100 e 500 nm e diferem entre si, de acordo com a composição e organização estrutural em nível molecular (SOPPIMATH et al., 2001). As nanoesferas consistem de uma matriz polimérica, onde a substância ativa pode ficar retida, molecularmente dispersa ou adsorvida, não apresentando óleo na sua composição. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico, contendo um sistema reservatório oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido ou retido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Figura 3.3) (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; KAN et al., 1999).

As nanopartículas oferecem vantagens sobre as formas farmacêuticas convencionais, pois podem manter e controlar a liberação do ativo, aumentando assim sua eficácia com menores efeitos colaterais, proteger o fármaco da degradação química e enzimática, direcionar o mesmo para seu local de ação, poder ser utilizado por várias vias de administração, entre outras. Porém, esses sistemas também apresentam desvantagens como a citotoxicidade, inflamação pulmonar, carcinogenicidade pulmonar e dificuldade da interrupção do tratamento, caso se faça necessário (MALI; BAHTE, 2015).

Figura 3.3 - Desenho ilustrativo representando nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



3.5.1 Polímeros

Nas últimas décadas a aplicação de polímeros sintéticos como sistemas carreadores de fármacos possibilitou vários avanços tecnológicos e contornou as limitações da farmacotécnica convencional, em relação às formas farmacêuticas de liberação imediata. Entre os polímeros biocompatíveis e biodegradáveis sintéticos mais utilizados podemos citar o poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) e poli(lactídeo) (PLA) (KUMARI et al., 2010). O PCL se destaca por ser um polímero semicristalino que possui degradação mais lenta quando comparado a outros poliésteres amorfos (GUTERRES et al., 2007). Segundo Yan Chen e Lihong (2012) os polímeros poli(ϵ -caprolactona), o poli(lactídeo), poli(lactídeo-co-glicolídeo), poli(β -benzil L-aspartato) e poli(hexadecilcianocrilato) demonstram ter potencial para liberar os fármacos diretamente no sistema nervoso central, pois possuem peso molecular superior ao das estruturas lipídicas, são estáveis e, além disso, tem-se a possibilidade de escolher o tamanho do comprimento do bloco, oferecendo opções para se desenhar o sistema de entrega mais adequado para cada fármaco.

3.5.2 Óleos

A presença do óleo nas formulações de nanocápsulas é capaz de aumentar a concentração do fármaco nesses sistemas. Os critérios gerais de escolha do óleo são a ausência de toxicidade, elevada estabilidade, incapacidade de solubilizar o polímero e alta afinidade com o fármaco (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). Além das características descritas, alguns autores utilizam os óleos para auxiliar ou potencializar a atividade dos fármacos (BARRIOS, 2010; BENVEGNÚ et al., 2012).

Os óleos vegetais são produtos naturais que apresentam em sua composição certos compostos bioativos com benefícios reconhecidos para a saúde. Segundo a literatura, os óleos de linhaça, coco, fígado de bacalhau, cártamo e gergelim, são ricos em ômega 3 e ômega 6, que são provenientes de alguns ácidos graxos, sendo atribuído a eles a capacidade de reduzir os níveis de glicose, colesterol, triglicérides e os processos oxidativos celulares (BEHELLI, 2003; FAROOQUI et al., 2007; NEVIN; RAJAMOHAN, 2006; SUJA et al., 2004).

Os ácidos graxos se dividem em dois grupos: saturados, que possuem o sufixo anóico e seus carbonos são ligados entre si por ligações simples (σ); e insaturados que são caracterizados pelo sufixo enóico em seu nome e a presença de duplas ligações entre os carbonos (π) (VIANNI; BRAZ-FILHO, 1996).

Percebe-se uma tendência mundial em agrupar os ácidos graxos insaturados em famílias conhecidas como ômega (ω). Entre elas aparecem às famílias ω -9, tendo como principal representante o ácido oleico, ω -6, representada pelo ácido linoleico e ω -3, onde estão incluídos os ácidos α -linolênico, eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA). Os principais ácidos graxos que dão origem a essas famílias estão descritos na tabela 3.1.

Tabela 3.1- Ácidos graxos que dão origem a as famílias ômega 3, 6 e 9.

Ômega	Ácidos graxos
3	Ácido hexadecatrienóico, ácido decatetraenóico, ácido linolênico, ácidoeicosatriênico, ácido eicosatetraenóico, eicosapentaenoico (EPA), decosapentaenóico e decosahexaenóico (DHA).
6	Ácido linoléico, ácido gama linoléico, ácido eicosadienoíco, ácido dihomo-gama linoléico, ácido araquidônico, ácido adrênico e ácido docosapentaenóico.
9	Ácido cis-7 hexadecenóico, ácido oléico, ácido eicosenoico, ácido erúxico, ácido nervônico.

O óleo de gergelim é utilizado na indústria farmacêutica como solvente na preparação de injeções subcutâneas, supositórios, preparações oftálmicas, suspensões, emulsões e em injetáveis de liberação sustentada, como por exemplo, na solução de haloperidol, em que ele é o único veículo e promove a liberação gradativa do fármaco, por um período de 30 dias (DEF, 2012; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

3.5.3 Tensoativos

Os tensoativos são substâncias anfifílicas, que apresentam afinidade por moléculas hidrofílicas e lipofílicas. Quando dissolvidos tendem a acumular-se nas interfaces, por exemplo, entre a água e uma partícula (polímero), ou a água e uma gotícula (óleo), por meio de uma adsorção física orientada. Seu uso não é essencial para a formação de nanopartículas, mas de extrema importância para a estabilidade do sistema, contribuindo para evitar a aglomeração das partículas, durante o armazenamento (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

3.5.4 Revestimento das nanocápsulas poliméricas com polietilenoglicol (PEG)

Nos últimos anos, as nanopartículas poliméricas biodegradáveis em especial as revestidas com um polímero hidrófilo, tais como polietilenoglicol, têm sido utilizadas como potenciais dispositivos de fornecimento de fármacos devido à sua capacidade para circular por um maior período de tempo dentro do organismo (MALI, BATHE, 2015).

Os polietilenoglicóis são um grupo de substâncias utilizadas como adjuvantes farmacêuticos em formulações parenterais, tópicas, oftálmicas e orais. É um polímero produzido pelo método de polimerização catalítica heterogênea, a partir de monômeros de óxido de etileno, utilizando-se catalisadores como carbonato e óxido de metais alcalinos terrosos, hidratos de cloreto, brometo e acetato férrico, entre outros. A massa molar dos polímeros depende do tipo de catalisador utilizado, bem como das condições de polimerização (HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 2009).

A funcionalização dos sistemas nanoestruturados consiste em um dos novos desafios no estudo dessas formulações, visando a entrega mais efetiva do fármaco no local adequado. A funcionalização em si implica em uma compreensão do órgão-alvo, seus mecanismos de transporte e suas funções em relação a condição patológica que se deseja intervir (YAN CHEN; LIHONG, 2012).

Em termos de uma abordagem química o PEG é um bom candidato para promover a funcionalização. Além de proporcionar a estabilização estérica, a presença do mesmo na superfície das nanopartículas permite libertar o fármaco no microambiente do cérebro, onde é lentamente biodegradado (GULYAEV et al., 1999). Um dos mecanismos que justificam a

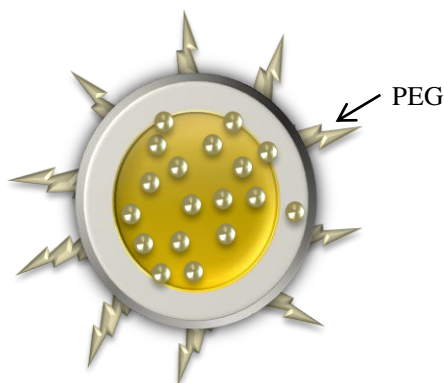
passagem de nanocápsulas peguiladas pela barreira sangue-cérebro é baseado no fato de que quando o PEG apresenta cadeia longa, ele relaxa, de forma temporária, a junção das células epiteliais que formam a BHE, diminuindo a condutância elétrica normal que as mantém unidas (CALVO et al., 2001; LOHMANN et al., 2002). Além disso, o PEG aumenta o tempo de circulação das nanocápsulas no organismo, reduzindo a absorção hepática por formarem o que se denomina de “nanocápsulas furtivas”, devido à hidrofília conferida pelo revestimento na superfície das partículas (FISCHER; HO, 2002; GÖPPERT; MÜLLER, 2003; HARRIS; MARTIN; MODI, 2001; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Alguns autores relatam que nanopartículas com cargas positivas (catiônicas) têm melhor interação com membranas celulares do que as carregadas negativamente, mas são geralmente mais citotóxicas que os sistemas aniônicos ou não iônicos (KUMAR et al., 2003; LV et al., 2006; WONG; WU; BENDAYAN, 2012). A presença do PEG na superfície das nanocápsulas confere a elas carga negativa, porém Hillaireau e Couvreur (2009) descrevem que nanopartículas carregadas negativamente também podem produzir uma eficiente absorção.

O PEG pode se ligar a outros polímeros hidrófobos como, por exemplo, PLGA, PLA, PCL, o que levou ao desenvolvimento de copolímeros em bloco. A ligação do PEG com os polímeros é do tipo covalente, o que evita a remoção do mesmo quando em contato com fluídos biológicos (GREF et al., 1995). Esses polímeros, já associados, estão disponíveis comercialmente. Na figura 3.4, temos uma representação gráfica da associação do PEG com os sistemas nanoestruturados.

Soppimath e colaboradores (2001) obtiveram nanocápsulas peguiladas dissolvendo os copolímeros em solvente adequado (diclorometano, clorofórmio ou acetato de etila) e procederam à técnica de emulsificação, vertendo a fase orgânica em uma fase aquosa contendo um agente emulsificante como o álcool polivinílico. Outra abordagem para o processo de peguilação de sistemas foi descrita por Freddo (2009), na preparação de nanocápsulas, onde o PEG foi adicionando diretamente na fase aquosa. Após verter a fase orgânica sobre a aquosa o sistema deve ficar por agitação por mais uma hora, antes do processo de rota-evaporação.

Figura 3.4 - Nanocápsula revestida com PEG.



3.5.5 Risperidona e sistemas nanoestruturados

Os principais estudos de risperidona associada com sistemas nanoparticulados encontrados na literatura pesquisada, estão descritos na tabela 3.2. A maioria dos autores trabalhou com nanopartículas lipídicas sólidas, utilizado o PLGA como polímero, para as mais diversas vias de administração. Muthu e Singh (2008) foram os únicos pesquisadores que utilizaram o PCL como polímero no desenvolvimento de nanoesferas com risperidona. Nenhuma formulação de nanocápsula foi encontrada.

Tabela 3.2- Risperidona associada a sistemas nanoparticulados.

(continua)

Objetivo do estudo	Autores
Desenvolver nanoesferas de risperidona de liberação prolongada para entrega parenteral (intravenosa) contendo poli (ϵ -caprolactona) e estabilizadores poliméricos (poloxâmeros).	MUTHU; SINGH, 2008.
Preparar nanoemulsão contendo risperidona e avaliar a liberação do fármaco via intranasal.	KUMAR, et al., 2008.
Desenvolver nanopartículas de risperidona de liberação prolongada, com PLGA em situ-gel para uso parenteral	MUTHU et al., 2009.
Desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas contendo risperidona por design experimental a fim de otimizar a melhor formulação.	RAHMAN et al., 2010.

(conclusão)	
Objetivo do estudo	Autores
Caracterizar e comparar métodos de preparação de nanopartículas lipídicas sólidas por homogeneização a alta pressão e ultrassom, para uso oral e avaliar sua biocompatibilidade.	SILVA et al., 2012.
Validar método analítico por CLAE para nanopartículas lipídicas sólidas contendo risperidona e avaliar a sua cinética de liberação, utilizando sacos de diálise.	SILVA et al., 2012.
Preparar e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas de risperidona e incorporá-las a base de hidrogel a fim de avaliar seu potencial para a liberação do ativo na transmucosa oral.	SILVA et al., 2012.

3.5.6 Deposição interfacial do polímero pré-formado

Diferentes métodos estão descritos na literatura para a preparação de nanocápsulas, dentre os quais se destaca o método de deposição interfacial de polímero pré-formado proposto por Fessi e colaboradores (1989). Neste método, utiliza-se um solvente orgânico para dissolver o polímero biodegradável juntamente com o componente oleoso, o tensoativo lipofílico e o ativo a encapsular. A fase oleosa é lentamente vertida sobre a fase aquosa, a qual é composta de água e tensoativo hidrofílico. A partir dessa mistura, ocorre a formação espontânea das nanocápsulas, com diâmetros médios entre 200 a 500 nm (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; WEISS, 2001). As nanocápsulas com núcleo lipídico diferem das nanocápsulas descritas por Fessi e colaboradores (1989), por conter em seu núcleo, além do óleo, um lipídio sólido, como o monoestearato de sorbitano (RIGO et al., 2014).

Segundo Mora-Huertas e colaboradores (2010), as concentrações ideais para o preparo das nanocápsulas, a partir do método de deposição interfacial de polímero pré-formado, estão descritas na figura 3.5.

Figura 3.5 – Concentrações sugeridas para comporem a formulação de nanocápsulas, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado.

Componentes	Quantidades sugeridas
Fase orgânica	
Polímero	0,2 a 0,5%, em relação ao solvente
Óleo	1 a 5%, em relação ao solvente
Tensoativo	0,2 a 0,5%, em relação ao solvente
Substância ativa	10 a 25 mg
Solvente	25 mL
Fase aquosa	
Tensoativo	0,2 a 0,5%, em relação ao não solvente
Não solvente (água)	50 mL

3.5 CARACTERIZAÇÃO

A caracterização estrutural é um parâmetro que desempenha papel importante na determinação de vários atributos de um nanosistema como forma, tamanho, morfologia da superfície, distribuição espacial, arranjo estrutural, característica geométrica etc. A caracterização das suspensões de nanocápsulas engloba a avaliação morfológica, do tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, taxa de associação, análise microscópica, cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento (MALI; BATHE, 2015; WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

3.6 VALIDAÇÃO

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para se proceder ao controle de qualidade de uma substância ativa, como tal, ou sob uma determinada forma farmacêutica e depende de vários fatores, tais como a natureza do fármaco, complexidade da formulação, pureza e quantidade de amostra, bem como o

propósito de quantificação, ou seja, qualitativo, semi-quantitativo ou quantitativo. As disponibilidades econômicas, de equipamentos e reagentes, também devem ser consideradas (ERMER, 2001; MEHTA, 1997).

Encontramos na literatura métodos cromatográficos e espectroscópicos para quantificar a risperidona, em diferentes amostras, conforme descrito na tabela 3.3.

Tabela 3.3- Métodos encontrados na literatura para quantificação de risperidona em diferentes amostras.

Tipo de amostra	Método	Autores
Risperidona em nanopartículas lipídicas sólidas.	Método cromatográfico - UV	SILVA et al., 2012
Risperidona associada à dendrímeros.	Método espectrofotométrico - UV	PRIETO et al., 2011.
Risperidona em comprimidos para dispersão oral.	Método cromatográfico - UV	RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2010.
Risperidona em nanopartículas lipídicas sólidas	Método cromatográfico - UV	RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2010.
Risperidona em nanopartículas com PLGA.	Método espectrofotométrico - UV	MUTHU et al., 2009.
Risperidona em plasma.	Método cromatográfico - massa-massa	LU et al., 2008.
Risperidona em comprimidos e seus produtos de degradação.	Método cromatográfico	BHARATHI et al., 2008.
olanzapina, risperidona, 9-hydroxyrisperidona, clozapina, haloperidol e ziprasidona em cérebro de rato	Método cromatográfico - massa-massa	ZHANG; TERRY JR; BARTLETT, 2007.
Risperidona e seus produtos de degradação em matéria-prima e comprimidos.	Método cromatográfico e densitométrico	ZEINAB; BADR; OLA, 2005.

Além disso, a matéria-prima do fármaco em estudo está descrita na The United States Pharmacopeia (2013), porém não se encontrou referência oficial para a quantificação de nanocápsulas contendo risperidona. Sendo assim, segundo a Legislação Brasileira, se a metodologia analítica para o fármaco ou forma farmacêutica em análise não estiver descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a mesma deverá ser validada (BRASIL, 2003).

3.8 ESTABILIDADE

Os estudos de estabilidade são parte integrante da garantia da qualidade, tendo por finalidade avaliar o comportamento dos fármacos ou medicamentos que se alteram com o tempo, por influência de fatores extrínsecos, como temperatura, umidade, luz, assim como os fatores relacionados ao próprio produto, denominados fatores intrínsecos, como propriedades físico-químicas dos ativos e excipientes, processo de fabricação, embalagem e forma farmacêutica (BRASIL, 2005; GIL, 2007; PALUDETTI, 2004).

Segundo o Guia de Estabilidade da ANVISA, determinar a instabilidade de uma amostra contribui para orientar o desenvolvimento da formulação e adequação do material de acondicionamento. Pode fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações, estimar o prazo de validade, auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos (BRASIL, 2005).

Conforme relatado por Schaffazick e colaboradores (2003), as suspensões coloidais não possuem tendência à separação de fases, pois o processo de sedimentação é lento para partículas de tamanho reduzido, sendo minimizado ainda, pelo movimento Browniano. Porém, com o tempo, as suspensões tendem a sedimentar devido à aglomeração das partículas do sistema.

Problemas de estabilidade associados às nanosuspensões podem ser classificados como físicos e químicos. Os problemas comuns de estabilidade física incluem a sedimentação, formação de aglomerados e a mudança do estado de cristalinidade. Já a estabilidade química está ligada a degradação do polímero ou as características de cada molécula como, por exemplo, seus grupos funcionais tais como éster

e amidas, que são susceptíveis à degradação hidrolítica, e grupamentos amina que podem sofrer degradação oxidativa (WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

Na literatura não estão especificados os testes necessários para assegurar a estabilidade de sistemas nanoparticulados, mas sabe-se que é de fundamental importância avaliar as propriedades químicas dos polímeros utilizados assim como os parâmetros de tamanho médio de partícula, potencial zeta, teor de fármaco e pH (MALI; BATHE, 2015).

3.9 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO

Ao longo da fase de desenvolvimento de produtos nanotecnológicos é indicado empregar procedimentos de liberação *in vitro* para selecionar os melhores excipientes das formulações, proporcionando uma atividade terapêutica adequada (SATO et al., 2007). A liberação do fármaco a partir das nanopartículas depende da desorção do fármaco da superfície das partículas, da difusão do ativo através da matriz e da parede polimérica das nanoesferas, da erosão da matriz polimérica ou da combinação dos processos de difusão e erosão (SOPPIMATH et al., 2001).

Os modelos mais utilizados na literatura para a avaliação da liberação de fármacos são os modelos de primeira ordem chamados: monoexponencial e biexponencial. O nome propriamente já os define, monoexponencial – equação apresentando uma exponencial – e o biexponencial – que apresenta uma adição de duas exponenciais. Uma pesquisa que relaciona estes modelos matemáticos com liberação de fármaco, neste caso por processo de difusão, é dos pesquisadores Cruz e colaboradores (2006), no qual, tentaram estabelecer modelos de liberação para diferentes tipos de nanocarreadores (nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões) através de seu comportamento durante o processo de difusão. As formulações foram preparadas com poli(ϵ -caprolactona) e a substância escolhida foi o éster etílico de indometacina.

Atualmente, existe um grande interesse na liberação seletiva de fármacos, em vista disso, sistemas carreadores têm sido bastante estudados com objetivo de melhorar a seletividade e a eficiência das formulações (MONACO, 2000). Análises farmacocinéticas de liberação *in vitro*, partindo de sistemas nanoestruturados, têm colaborado para o entendimento sistemático e quantitativo de fármacos vetorizados (ALVES et al., 2007). Podemos citar como vantagens dos métodos *in vitro*, o controle das condições de estudo, não havendo interferentes

biológicos, além de não serem dispendiosos e facilmente realizáveis (ALLEN et al., 2007; CHIEN, 2005).

3.10 ESTUDOS *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPSICÓTICO

O foco principal para o diagnóstico correto da esquizofrenia está baseado na caracterização dos sintomas positivos e negativos dos pacientes, partindo-se assim para a escolha da medicação mais adequada (ANDREASEN et al., 1997; HOU et al., 2006; PEARLSON, 2000). Os déficits cognitivos também são observados e reconhecidos como fundamentais para a inclusão desses pacientes na sociedade, porém, a maioria dos medicamentos são eficazes somente nos sintomas positivos da doença, com pouca ação no tratamento dos sintomas negativos ou cognitivos (CARTER, 2005; KEEFE et al., 2007). Os principais domínios cognitivos afetados pela esquizofrenia são a memória, que parece ser a mais prejudicada segundo algumas pesquisas, a atenção, locomoção, emoção, localização espacial, entre outros (GREEN et al., 2004; FOLLEY et al., 2010; MELTZER; MCGURK, 1999).

A maior dificuldade encontrada pelos pesquisadores, no desenvolvimento de modelos animais com perturbação cognitiva, semelhante ao que acontece na esquizofrenia, é o fato de que nenhum dos fármacos disponíveis ter sido aprovado para o tratamento destes sintomas. Os modelos farmacológicos mais utilizados em animais fazem uso de substâncias que induzem a estados psicóticos e alucinações, como os agentes agonistas dopaminérgicos, (anfetamina); antagonistas glutaminérgicos (PCP); e agonistas colinérgicos (escopolamina) (YOUNG; POWELL; GEYER, 2012). Após o tratamento prévio dos animais com essas substâncias, aplicam-se testes que visam comparar o desempenho cognitivo dos mesmos, frente a um grupo controle.

Os testes comportamentais descritos na literatura para a avaliação do desempenho cognitivo estão relacionados à verificação da memória e habilidades locomotoras, sendo esses os mais citados: esQUIVA passiva (SAKAGUCHI et al., 2006), labirinto de Barnes (POMPL et al., 1999), labirinto em Y e em T (SARTER et al., 1988), reconhecimento de objetos (BADO et al., 2011; YOUNG et al., 2009), labirinto aquático de Morris (CHEN et al., 2002; HOU et al., 2006), teste de campo aberto (WALSH; CUMMINS, 1976), habilidades da atividade locomotoras (WALSH; CUMMINS, 1976), Modelo sub-crônico MK-801 (MOURI et al.,

2007; NEILL et al., 2010). Já para a avaliação das atividades motoras, que frequentemente acometem os pacientes tratados com antipsicóticos, podemos citar os testes de discinesia oral e catalepsia (BENVEGNÚ et al., 2011; MUTHU et al., 2009).

Além dos testes comportamentais, locomotores e motores, destacam-se os seguintes efeitos colaterais, quando os pacientes são tratados com risperidona: ganho de peso, desenvolvimento de diabetes tipo II e aumento nos níveis de triglicérides, fatores esses que também devem ser avaliados (SENA et al., 2003).

3.11 NANOTOXICOLOGIA

A nanotecnologia tem aplicações em muitos campos, especialmente na biologia, ciências e medicina. Nanopartículas, tais como nanotubos e polímeros biodegradáveis têm sido estudados tanto para uso em diagnóstico ou tratamento, porém muitas destas nanopartículas podem ter efeitos tóxicos sobre as células (AI et al., 2011). Os nanomateriais têm o potencial de revolucionar a medicina devido a sua capacidade de afetar os órgãos e tecidos nos níveis moleculares e celulares, mas a interação entre as células e esses sistemas necessita de um conhecimento mais aprofundado (LINKOV; SATTERSTROM; COREY, 2008; PUJATLÉ et al., 2011). A toxicidade das nanopartículas parece estar associada a vários parâmetros como tamanho, concentração, tipo de interação físico-química, tipo de atividade, superfície e sua estabilidade (RZIGALINSKI; STROBL, 2009).

As nanopartículas podem atuar no sistema imunológico tanto como inflamatórias ou pré-inflamatórias, causando estresse oxidativo, liberação de citotoxinas nos pulmões, fígado, coração e cérebro (MUHLFELD; GEHR; ROTHEN-RUTISHAUSER, 2008). Também podem causar genotoxicidade, desenvolvimento da carcinogênese e teratogenicidade, bem como dependendo do tamanho da mesma, ultrapassar a barreira hematoencefálica causando toxicidade cerebral (YACOBI et al., 2007).

3.11.1 Estresse oxidativo

O processo de estresse oxidativo provém de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes (BARBOSA et al., 2010), ou seja, ocorre um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e sua degradação (VICENTINO; MENEZES, 2007).

Este processo favorece a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (BARBOSA et al., 2010). Este desequilíbrio ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) está acelerada ou quando os mecanismos envolvidos na proteção contra as EROs encontram-se deteriorados, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. Toda célula viva exposta em uma atmosfera rica em oxigênio é passível de danos causados por EROs que podem ser originadas tanto exógena quanto endogenamente (BARBOSA et al., 2010).

Existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* ou *in vivo*, sendo que os métodos mais utilizados se baseiam nos radicais ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácidosulfônico]) e DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Ambos apresentam uma excelente estabilidade em certas condições, mas também mostram diferenças. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente, sem uma preparação prévia, enquanto que o ABTS origina-se após uma reação, que pode ser química (dióxido de manganês, persulfato de potássio, ABAP); enzimática (peroxidase, mioglobulina), ou também eletroquímica (KUSKOSKI et al., 2005).

3.11.2 Citotoxicidade

Os testes de toxicidade são realizados para determinar os riscos potenciais que novos produtos podem gerar na saúde e no meio ambiente como um todo (CASTAÑO e GÓMENEZ-LECHÓN, 2005).

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso na medicina e foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos e observar as alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO et al., 2003).

A viabilidade celular é um termo geral e pode ser investigada por ensaios que determinam um ou mais parâmetros celulares, tais como: 3-(4,5)-dimetilazolil-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (atividade mitocondrial), enzima lactato desidrogenase (LDH), Azul Tripán entre outros. Estes ensaios são geralmente adequados para medir efeitos tóxicos agudos de células cultivadas (NASCIMENTO, 2013).

3.11.3 Genotoxicidade

A genotoxicidade é a área da genética que estuda as alterações na estrutura físico-química do DNA, processo este classificado de mutagênese, ou na alteração da determinação genética a nível celular, classificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese. Estes três processos podem ser produzidos ao mesmo tempo, como é o caso dos provocados pela radiação gama. Porém, eles apresentam suas complexidades, exigindo serem estudados separadamente com o objetivo de conhecer melhor cada uma destas áreas. Hoje em dia são bastante pesquisadas, pois se relacionam com malformações, doenças congênitas, genéticas e degenerativas, envelhecimento celular e câncer. A genotoxicidade é uma especialidade relativamente recente e se situa na interface entre toxicologia e genética (SILVA et al., 2003).

A maioria dos testes de detecção de danos genéticos busca agentes que possam afetar o genoma de um organismo. Devido à universalidade do código genético, se um agente pode causar danos ao DNA, este tem potencial genotóxico em qualquer tipo de célula (animal, vegetal ou micro-organismo). Porém, diferentes organismos possuem metabolismo, mecanismos de reparação e de detoxificação que variam consideravelmente, tornando diferente a resposta destes organismos a agentes genotóxicos. Para driblar este problema e suprir a necessidade de informações em mutagênese e carcinogênese humana foram criadas estratégias de avaliação com testes *in vitro* e *in vivo* (SILVA et al., 2003).

A técnica de instabilidade cromossômica é uma técnica que indica danos ocorridos no DNA, tais como quebras e rearranjos cromossômicos (SILVA, 2007), que vem sendo utilizada em diversos tipos de células para várias finalidades, como a genética toxicológica, dosimetria biológica e em biomonitoramento, devido a sua ampla sensibilidade, pela riqueza de informações e pela sua taxa espontânea ser relativamente baixa (IAEA, 1986).

As células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) têm sido aplicadas por décadas como biomarcadoras de efeitos cito e genotóxicos, entre outros. Por serem

abundantes na circulação sanguínea, são expostas a qualquer agente mutagênico e são capazes de refletir danos recentes. As CMSP semeadas em cultura tornaram-se o modelo *in vitro* bastante promissor para diversos estudos, o que ressalta a utilidade desta linhagem celular em estudos de cito-genotoxicidade (MALUF et al., 2011). A vantagem de estudar linfócitos humanos é que eles circulam por todo o organismo, bem como são capazes de refletir danos recentes (GARCIA-SAGREDO, 2008).

O emprego desse teste na avaliação de respostas citogenéticas à exposições químicas é comum, e excelentes relações dose-resposta de vários agentes químicos têm sido estabelecidas em uma grande variedade de experimentos *in vitro* e *in vivo*, em humanos e animais de laboratório (TUCKER; PRESTON, 1996).

Outra metodologia que também pode ser aplicada para avaliar a genotoxicidade é o teste cometa, também denominado de ensaio de células individualizadas em gel ou eletroforese de microgel. Esta técnica é destinada a avaliar a presença de lesões no DNA, sendo que as células com material nuclear lesionado se assemelham a um cometa devido sua morfologia, na qual o DNA perde sua integridade, e migra por força da eletroforese (MEZZALIRA; FUNCHAL; DANI, 2014).

Capítulo 4. Caracterização da substância química de referência

4 CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

De acordo com definição da OMS, padrões de referência farmacopeicos são produtos de uniformidade reconhecida, destinados ao uso em ensaios onde uma ou mais de suas propriedades serão comparadas com a da substância em exame (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Existem duas categorias de substâncias químicas de referência (SQR), as de origem farmacopeicas, que são as produzidas por fontes reconhecidas, como Farmacopeia Americana, Farmacopeia Européia, Farmacopeia Brasileira, entre outras e as não-farmacopeicas, que são substâncias com um elevado grau de pureza, entretanto necessitam ser criteriosamente caracterizadas a fim de elucidar sua estrutura química por meios de testes analíticos adequados (FDA, 2000b; SWARTZ e KRULL, 1998). Segundo o Food and Drug Administration (FDA), (2000b) as SQR não-farmacopeicas devem ser caracterizadas, quando aplicável, pelos seguintes métodos analíticos: espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectrometria na região do ultravioleta (UV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa (MS) e análise do grupo funcional.

4.1 SQR DE RISPERIDONA

A matéria-prima de risperidona, com teor declarado de 99,9%, foi gentilmente doada pela Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Para a caracterização da mesma, utilizaram-se as seguintes técnicas: faixa de fusão, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia na região do ultravioleta, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) e volumetria.

4.2 MATERIAIS

Acetato de sódio (Synth[®] – Brasil – Lote 167641); acetonitrila (MERCK[®] – Alemanha – Lote: L631830212); ácido acético - (Synth[®] – Brasil – Lote 168955); ácido clorídrico (Sigma-

Aldrich[®] – Alemanha – Lote: SZBB2230V); brometo de potássio (J.T. Baker[®] – Lote: C49668); filtro de seringa de celulose regenerada 0,45 µm (Sartorius Stedim[®] – Alemanha – Lote: 17765); fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich[®] – Alemanha – Lote: SZBA3560V); hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich[®] – Suíça – Lote: SZBA258AV); tetraidrofurano - (Tedia[®] – EUA – Lote 1105236).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA DE RISPERIDONA COMO SQR

4.3.1 Determinação do ponto de fusão

As análises pelo método do capilar foram realizadas em equipamento Electrothermal - Modelo 9100 (Reino Unido), previamente calibrado. A amostra foi compactada em tubo de capilar, com diâmetro de 1 mm e 7,5 cm de comprimento.

4.3.1.1 Resultados e discussão

Ponto de fusão pode ser definido como o momento, a uma dada temperatura, que uma substância passa do estado sólido para o estado líquido. É uma análise indicativa de pureza e de identificação de compostos, pois cada substância apresenta uma faixa de fusão característica, que pode ser alterada pela presença de contaminantes (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; GIL, 2010).

Daniel e colaboradores (2013) referenciaram uma faixa de fusão de 169 a 173 °C e o The Merck Index (2006) um ponto de fusão a 170 °C, para a risperidona. A amostra analisada fundiu em 170 °C \pm 0,12 (n=3), valor semelhante ao encontrado na literatura pesquisada, sendo um indício de pureza do produto.

4.3.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta

Foram preparadas soluções de risperidona em mistura de acetonitrila e THF (50:50), na concentração de 1000 µg/mL e posteriormente diluídas em acetonitrila, tampão ácido clorídrico pH 1,2, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8, até a concentração de 10 µg/mL.

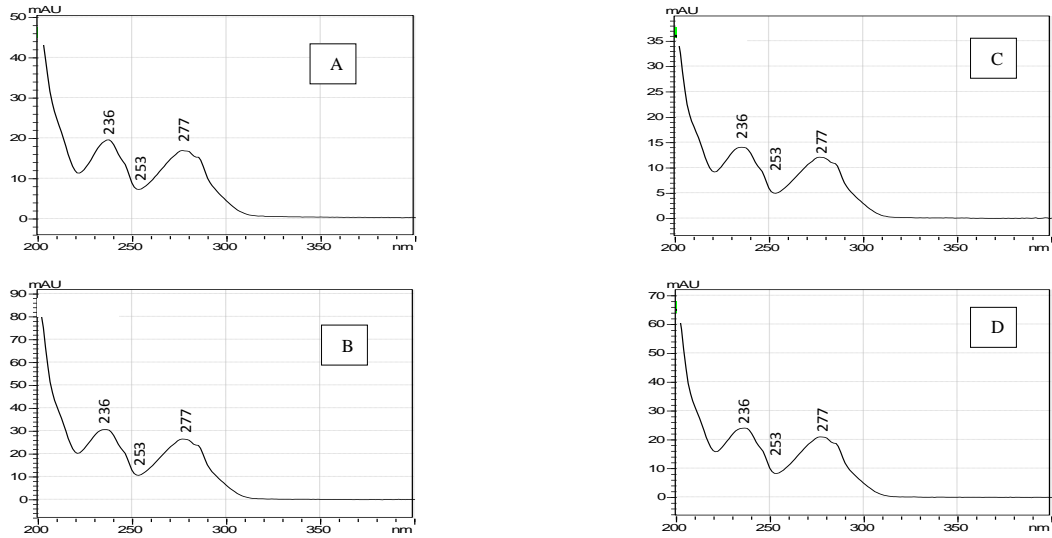
Traçaram-se os espectros da risperidona em cromatógrafo Shimadzu LC (Japão), acoplado com bomba modelo LC-20AT, injetor automático SIL-20A, forno da coluna CTO-20AC, detector de diiodo SPD-M20A e software LC solution, na faixa de 200 a 400 nm, utilizando-se as condições cromatográficas previamente padronizadas.

4.3.2.1 Resultados e discussão

A espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta não é uma técnica conclusiva para a identificação de fármacos, mas pode servir como um parâmetro importante para a escolha das bandas de absorção máxima da risperidona. Os espectros de absorção da risperidona em diferentes meios estão apresentados na figura 4.1.

Os espectros obtidos na análise da risperidona demonstraram perfis similares, independente dos solventes utilizados. Os picos máximos de absorção foram em 277 nm e 236 nm e, o mínimo em 253 nm. A risperidona é classificada como uma base forte, sendo praticamente insolúvel em água, moderadamente solúvel em etanol e acetonitrila, solúvel em diclorometano, tetraidrofurano e em soluções ácidas (BRITISH PHARMACOPEIA, 2012; THE MERCK INDEX, 2001; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013). Devido às variações de solubilidade do fármaco nos diferentes meios testados, podemos observar que a intensidade do sinal sofreu alterações, sendo maior em acetonitrila (A) e tampão ácido clorídrico pH 1,2 (B), onde é mais solúvel, e menor em tampão acetato de sódio pH 4,5 (C) e tampão fosfato pH 6,8 (D), onde é menos solúvel.

Figura 4.1 -Espectros da risperidona, na faixa de 200 a 400 nm, obtidos por cromatografia a líquido de alta eficiência. Condições cromatográficas (coluna Waters® Bridge C₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel:acetonitrila, metanol, tampão fosfato pH 7,0 (45:15:40); vazão: 1mL/min.; volume de injeção: 20 µL). A:acetonitrila; B:tampão ácido clorídrico pH 1,2; C:tampão acetato 4,5; D:tampão fosfato pH 6,8.



Alguns trabalhos encontrados na literatura utilizam o detector na região do UV para a quantificação da risperidona, não somente para métodos espectrofotométricos como para métodos cromatográficos, em diferentes matrizes. Titier e colaboradores (2002) e Lu e colaboradores (2008) analisaram a presença da risperidona no plasma no comprimento de onda de 280 nm e Avenoso e colaboradores (2000), utilizando o mesmo tipo de amostra, detectaram a presença do fármaco em 278 nm. Dong e colaboradores (2012) e Silva e colaboradores (2012), determinaram a risperidona em nanopartículas lipídicas sólidas, em 280 nm. Muthu e colaboradores (2009) e Prieto e colaboradores (2011), utilizaram a espectrofotometria para a determinação do fármaco em estudo em nanopartículas de PLGA e dendrímeros, nos comprimentos de onda de 279 nm e 280 nm, respectivamente. Na figura 4.1, podemos observar que praticamente existe um platô entre os comprimentos de onda que vão de 277 nm até 280 nm, o que explica a variação encontrada nos trabalhos acima citados.

4.3.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A caracterização da matéria-prima de risperidona por espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada por meio da preparação de uma pastilha contendo 1,5 mg da amostra e 150 mg de brometo de potássio (KBr), em espectrofotômetro infravermelho com transformada de fourier, Perkin Elmer - modelo spectrum one - Japão.

4.3.3.1 Resultados e discussão

O espectro de infravermelho é único para cada substância, sendo pouco provável que duas substâncias que não são enantiômeros, apresentem o mesmo espectro nesta região. Uma análise das bandas características de determinados grupos permite a identificação da estrutura de moléculas (SILVERSTAIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

O espectro de absorção do infravermelho obtido para a risperidona está apresentado na figura 4.2 e as suas principais bandas de absorção, com as respectivas frequências estão apresentadas na tabela 4.1. Os resultados encontrados estão de acordo com os dados da literatura, assegurando a identidade da matéria-prima.

Figura 4.2 - Espectro de absorção na região do infravermelho da risperidona em pastilha de KBr.

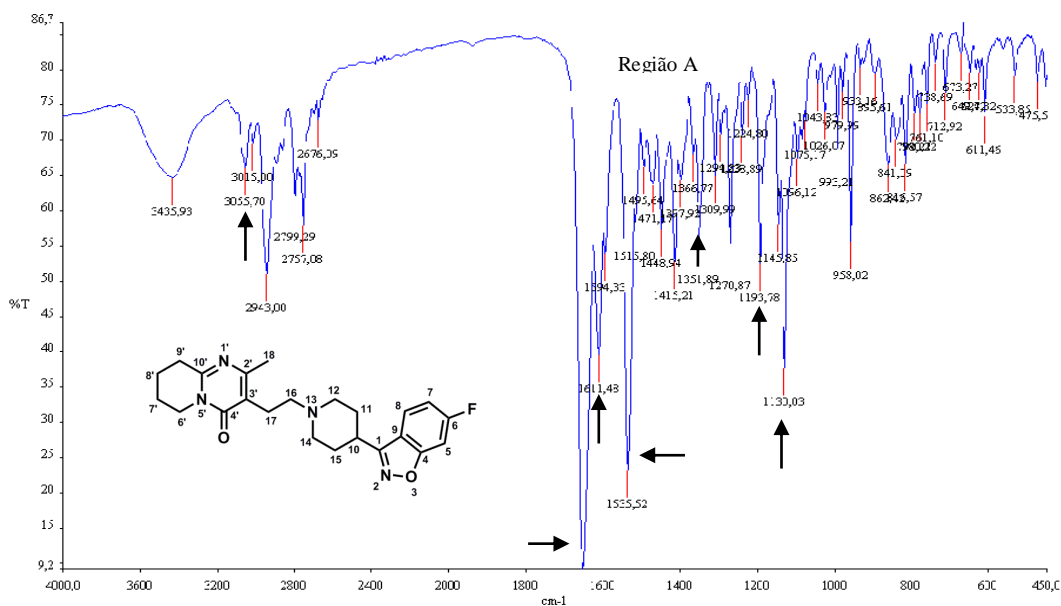


Tabela 4.1- Frequências de absorção das principais bandas de absorção da risperidona e suas respectivas atribuições

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
3055	Banda fraca correspondente a deformação axial C-H aromático.
1643	Banda forte correspondente a deformação axial C=O com estiramento do anel δ -lactama.
1611	Banda de intermediária a forte, correspondente ao estiramento da ligação C=C do anel aromático.
1535 – região A	Banda de intermediária a forte, correspondente ao C-N e C-O, com deformação angular do anel oxazol.
1193	Banda intermediária correspondente a amina terciária do anel piperidina.
1130	Banda forte correspondente ao flúor.

4.3.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C)

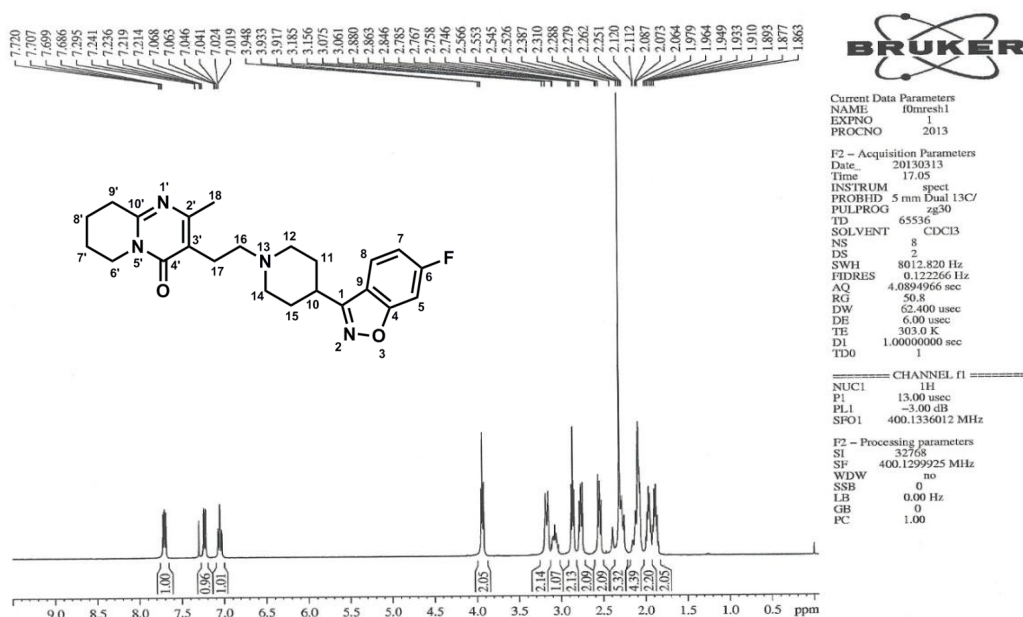
Os espectros de RMN ¹H e de RMN ¹³C da risperidona foram realizados em equipamento Bruker, modelo AM 4000 (Alemanha), utilizando clorofórmio-D (CDCl₃) como solvente.

4.3.4.1 Resultados e discussão

As atribuições dos hidrogênios da molécula de risperidona estão descritas a seguir, com seus respectivos deslocamentos químicos, multiplicidade, número de hidrogênios envolvidos e sua localização, de acordo com a estrutura química e espectro apresentado na figura 4.3. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 1,65 (q, J = 2,20 Hz, 2 H, **H7'**, **8'**), 1,88 (q, J = 2,05 Hz, 2 H, **H 11**, **15**), 2,31 (s, 3 H, **H18**), 2,28 – 2,38 (m, 4 H, **H 12**, **14**), 2,55 (t, J = 2,09 Hz, 2 H, **H 17**), 2,77 (t, J = 2,09 Hz, 2 H, **H 16**), 2,87 (t, J = 2,13 Hz, 2 H, **H 9**), 3,036 – 3,14

(m, 4 H, **H 10**), 3,94 (t, $J = 2,05$ Hz, 2 H, **H 6'**), 7,05 (dt, $J = 1,01$ Hz, 1H, **H 7**), 7,23 (dd, $J = 0,96$ Hz, 1 H, **H 5**), 7,70 (dd, $J = 1,00$ Hz, 1 H, **H 8**) ppm.

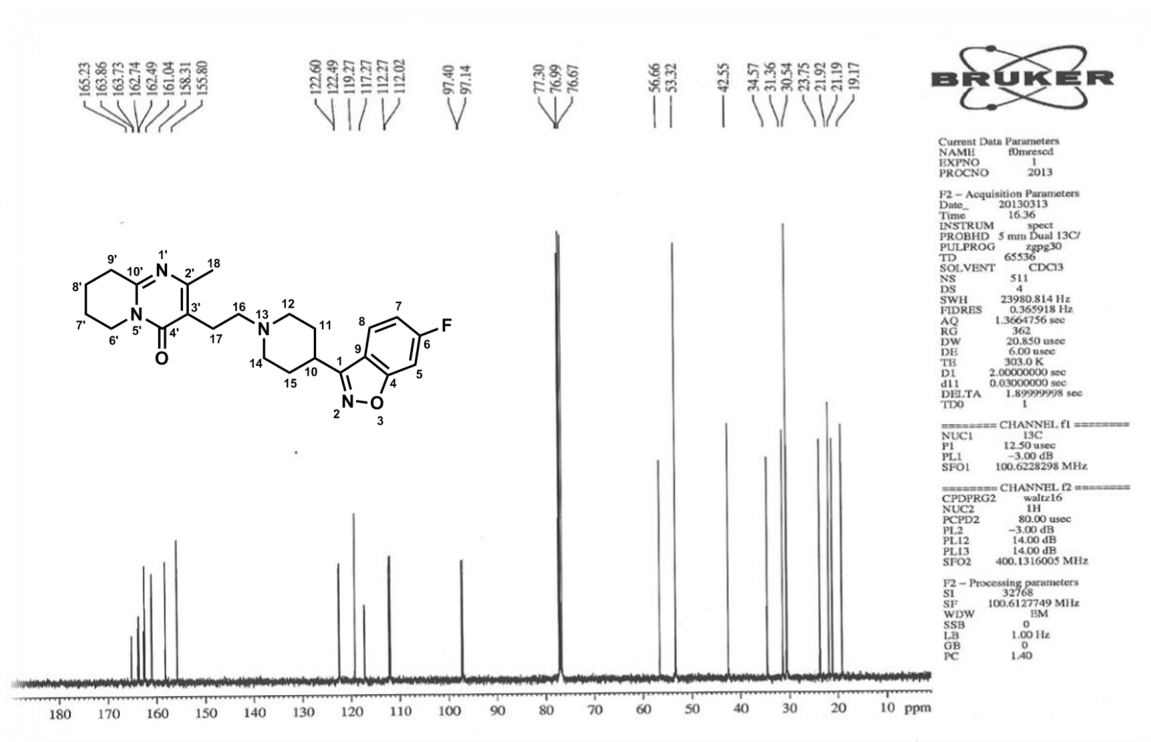
Figura 4.3 - Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 da risperidona e sua respectiva estrutura química.



As atribuições dos carbonos da molécula de risperidona estão descritas a seguir, com seus respectivos deslocamentos químicos, números de carbonos envolvidos e sua localização, de acordo com a estrutura química e espectro apresentado na figura 4.4. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) $\delta = 19,17(\text{C}8')$; $21,19(\text{C}7')$; $21,92(\text{C}18)$, $23,75(\text{C}17)$, $30,54$ (2C, **C11**, **C15**), $31,36(\text{C}9')$, $34,57(\text{C}10)$, $42,55(\text{C}6')$, $53,32$ (2C, **C12**, **C14**), $56,66$ (**C16**), $97,27$ (d, **C5**), $112,45$ (d, **C7**), $117,27$ (**C9**), $119,27(\text{C}3\text{C})$, $122,49$ (d, **C8**), $155,80(\text{C}10)$, $158,31(\text{C}2')$, $162,49(\text{C}1)$, $162,74(\text{C}4')$, $163,79$ (d, **C6**), $165,23(\text{C}4)$ ppm.

De acordo com a literatura consultada, a interpretação dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de risperidona e com os grupamentos químicos presentes (CHUN et al., 2004; DANIEL et al., 2008; SILVERSTAIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Figura 4.4 - Espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 da risperidona e sua respectiva estrutura química.



4.3.5 Quantificação da risperidona

Dissolveu-se 160 mg de risperidona em 70 mL da mistura de ácido acético e metil etil cetona (10:60) e titulou-se com ácido perclórico 0,1 M, previamente padronizado. Determinou-se o ponto final potenciométricamente com auxílio de titulador automático Metrohm 809 titrando (Suíça). Cada mL de ácido perclórico 0,1 M equivale a 20,53 mg de risperidona (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2012).

4.3.5.1 Resultados e discussão

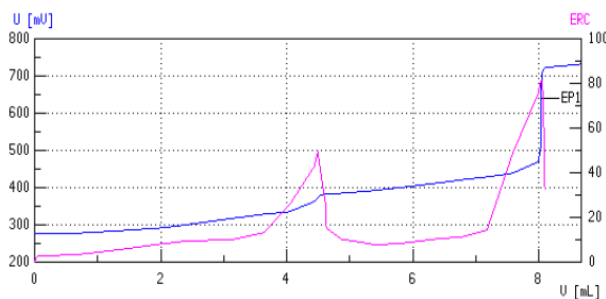
Os valores obtidos no doseamento da risperidona estão descritos na tabela 4.2 e uma imagem da curva de titulação obtida está representada na figura 4.5. O fato de correção encontrado na padronização da solução volumétrica foi de 0,9994.

Tabela 4.2 - Resultados obtidos no doseamento da matéria-prima de risperidona por método volumétrico.

Teor (%)	Média (%)	DP	DPR (%)
100,00			
100,08	99,99	0,085	0,085
99,91			

A British Pharmacopoeia (2012) especifica que a matéria-prima de risperidona deve ter seu teor dentro dos limites de 99,0 a 101,0%. Os resultados encontrados estão dentro dos valores descritos na literatura oficial e coerente ao resultado declarado pelo fornecedor, que foi de 99,9%.

Figura 4.5 - Representação gráfica da curva de titulação obtida no doseamento da risperidona matéria-prima.



4.4 CONCLUSÕES

- A substância candidata a SQR de risperidona apresentou faixa de fusão semelhante à preconizada na literatura;
- A interpretação do espectro no infravermelho demonstrou que as bandas obtidas estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de risperidona;
- A interpretação do espectro de RMN ^1H e de RMN ^{13}C demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a risperidona;
- O teor da risperidona, determinado por método volumétrico, está dentro dos limites farmacopeicos estimados para esse fármaco e de acordo com o declarado pelo fabricante;
- Tendo em vista os resultados obtidos, concluímos que a matéria-prima de risperidona pode ser utilizada como SQR nos estudos propostos.

**Capítulo 5. Determinação da solubilidade da risperidona em diferentes
óleos e teste de inchamento do polímero**

5 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA RISPERIDONA EM DIFERENTES ÓLEOS E TESTE DE INCHAMENTO DO POLÍMERO

Os óleos selecionados para os estudos iniciais são amplamente utilizados no Brasil com a finalidade de reduzir os níveis triglicérides, colesterol, glicose e obter redução de peso, por serem ricos em ácidos graxos insaturados da família ômega.

5.1 MATERIAIS

Acetonitrila (MERCK[®] – Alemanha – Lote: L631830212); clorofórmio (Sigma-Aldrich[®] – EUA – Lote: SHBB1474V); filtro de seringa de celulose regenerada 0,45 µm (Sartorius Stedim[®] – Alemanha – Lote: 17765); metanol (Sigma-Aldrich[®] – Venezuela – Lote: SHBC4053V); óleo de coco – (Pazze[®] – Brasil – Lote: 5206310); óleo de linhaça dourada (Pazze[®] – Brasil – Lote: 470632); óleo de gergelim (Pazze[®] – Brasil – Lote: 471454); óleo de cártamo (Pazze[®] – Brasil – Lote: 710191); triglicerídeos dos ácidos capríco/caprílico - (Delaware – distribuidora – Lote: 050511); óleo de Fígado de bacalhau (All Chemistry do Brasil[®] - distribuidora – Noruega – Lote: 42683); policaprolactona (70.000) (Sigma-Aldrich[®] – EUA – Lote: MKBD9495V).

5.2 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS

Os óleos de cártamo (OCa), linhaça dourada (OLi), gergelim (OGe) e coco (OCo), foram adquiridos no comércio local e a empresa produtora forneceu o laudo analítico dos mesmos. Os principais ácidos graxos encontrados nos referidos óleos foram determinados por cromatografia em fase gasosa seguindo o protocolo estabelecido pelo Instituto Adolfo Lutz (tec.055/IV e 053/IV). Os óleos de fígado de bacalhau e triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico possuem grau farmacêutico.

5.2.1 Resultados e discussão

As gorduras geralmente são classificadas de acordo com grau de insaturação presente em sua estrutura. Ácidos graxos saturados não contêm ligações duplas. Ácidos graxos monoinsaturados contêm uma dupla ligação por molécula e os ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que contêm duas ou mais insaturações. A simbologia muito utilizada para representar ácidos graxos, se baseia em um sistema alfanumérico, iniciado pela letra C, seguido pelo número de átomos de carbono na molécula, o número de ligações duplas entre átomos de carbono e as posições das insaturações na cadeia carbônica com indicação das que forem *cis* ou *trans* (SOUTO; DUARTE, 2006).

Em função da presença de uma insaturação entre átomos de carbono, existe a possibilidade de ocorrência dos dois isômeros geométricos: *cis* e *trans*. Apesar do isômero *cis* ser termodinamicamente menos estável, em virtude da tensão provocada por dois seguimentos volumosos presentes no mesmo lado da dupla ligação, é o mais encontrado na natureza, quando se trata da biossíntese de lipídios (FOX; LILE; ROGGE, 2004; SOLOMONS; FRYHLE, 2005).

Conforme podemos observar na tabela 5.1, os componentes essenciais do óleo de cártamo são o ácido oléico (22,8%) e o ácido linoléico (69,5%), ambos insaturados, da família do ômega 9 e ômega 6, respectivamente. O óleo de linhaça possui ácido linoléico (16,2%), ácido linolênico (19,1%), ambos insaturados e responsáveis pelo fornecimento do ômega 6 e 3, e ácido octadecenóico (22,9%) (saturado). O óleo de gergelim é o que tem a maior concentração de ácido linolênico (43,8%), rico em ômega 3. O principal componente do óleo de coco é o ácido láurico, um ácido graxo saturado que logo após sua metabolização pelo fígado, se transforma em energia não se depositando nos tecidos. Por último, o óleo de fígado de bacalhau, que é rico em vitaminas A (1473 UI/g) e D (158 UI/g), mas também em três compostos, o ácido eicosapentaenóico (9%) e o decosahexaenóico (10%), que são da família ômega 3 e o ácido oléico (15,4%), da família do ômega 9.

Tabela 5.1 – Composição dos óleos de bacalhau (OBa), cártamo (OCa), linhaça (OLi), gergelim (OGe) e coco (OCo), segundo o laudo analítico dos produtos.

Ácidos graxos – (%) (p/p)	(continua)				
	OBa	OCa	OLi	OGe	OCo
Ácido capróico (C6:0) - (%)					<0,8

(conclusão)

Ácidos graxos – (%) (p/p)	OBa	OCa	OLi	OGe	OCo
Ácido caprílico (C8:0) - (%)					2,4
Ácido cáprico (C10:0) - (%)					2,6
Ácido palmítico (C16:0) - (%)	11,2	4,2	5,8	0,8	6,5
Ácido esteárico (C18:0) – (%)	2,4	2,8	3,9	5,3	1,3
Ácido oléico (C18:1 cis 9) - (%)	15,4	22,8			12,0
Ácido mirístico (C14:0) - (%)	4,8		0,1		0,8
Ácido linoléico (C18:2, cis 9, 12) - (%)	2,6	69,5	16,2	43,8	1,0
Ácido linolênico (C18:3, cis9,12,15) – (%)	0,9	0,2	19,1	1	
Ácido araquídico (C20:0) – (%)		0,2	0,1	0,5	
Ácido palmitoléico (C16:1, cis 9) – (%)	7,3		0,1	0,1	
Acido octadecenóico (C18;1, cis9+cis7) – (%)	3,7		22,9	39,6	
Ácido eicosaenóico (C20:1, cis 11) – (%)	6,1			0,1	
Ácido behênico (C22:0) – (%)			0,1	0,1	
Ácido lignocérico (C24:0) – (%)				0,1	
Ácido margárico (C17:0) – (%)			0,1		
Ácido heptadecenóico (C17:1) – (%)			<0,05		
Ácido gadoléico (C20:1) – (%)	4,5				
Ácido erúico (C22:1, Cis 9) – (%)	0,7				
Ácido cetoléico (C22:1, Cis 11) – (%)	7,6				
Ácido decosaheptaenóico (C22:6) – (%)	10,6				
Ácido eicosapentaenóico (C20:5) – (%)	9,0				
Ácido octadecatetraenóico (C18:4) – (%)	2,5				

5.3 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA RISPERIDONA NOS DIFERENTES ÓLEOS

A solubilidade da risperidona foi determinada nos óleos de gergelim (OGe), linhaça (OLi), fígado de bacalhau (OBa), coco (OCo), cártamo (OCa) e triglicérides dos ácidos cáprico/caprílico (OTc). Utilizou-se um excesso de fármaco que ficou em contato com os óleos por 24 horas, sob agitação, a temperatura de 25 °C. As amostras foram centrifugadas a

4.000 rpm, por 25 minutos e uma alíquota do sobrenadante foi diluída em solvente adequado, sendo a última diluição realizada com acetonitrila. Os ensaios foram realizados em triplicata (KELMANN et al., 2007). O teor de risperidona nos diferentes óleos foi determinado por cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na tabela 5.2.

Tabela 5.2- Condições cromatográficas para a determinação da risperidona em óleos.

Coluna	C18 - 25 cm x 4,6 mm, 5 µm
Detector e comprimento de onda	UV; 280 nm
Fase móvel	Metanol e acetonitrila (80:20)
Vazão da fase móvel	1 mL/min.
Volume de injeção	5 µL
Tempo de retenção	4,5 min.

A curva padrão foi preparada em triplicata nas concentrações de 5 a 35 µg/mL de risperidona SQR em acetonitrila. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e avaliada por Análise de Variância (ANOVA).

5.3.1 Resultados e discussão

A curva padrão obtida ($y=75671x-12347$), apresentou coeficiente de correlação de 0,9998 e demonstrou que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, podendo ser utilizada para a interpolação dos valores obtidos como a solução amostra. O estudo da análise de variância (ANOVA) demonstrou que a mesma possui regressão linear significativa, não havendo desvio de linearidade significativo ($p=0,05$), garantindo-se assim a linearidade do método.

Um dos princípios básicos para o desenvolvimento de nanocápsulas e de que o fármaco em estudo tenha afinidade e solubilidade no óleo, a fim de evitar a precipitação do

mesmo, e comprometer a estabilidade da formulação (KELMANN et al., 2007). Os resultados obtidos na determinação da solubilidade da risperidona em diferentes óleos estão descritos na tabela 5.3. Pode-se observar que o fármaco apresentou maior solubilidade nos óleos de gergelim e cártamo (3,8 mg/mL) e menor solubilidade, nos óleos de coco, fígado de bacalhau e triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico, sendo que a diferença entre os que mais e menos solubilizaram o fármaco foi de 44,74%.

Tabela 5.3 - Solubilidade da risperidona em diferentes óleos.

Óleos	Solubilidade (mg/mL) \pm DP*
Óleo de coco	2,1 \pm 0,40
Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico	2,1 \pm 0,66
Óleo de fígado de bacalhau	2,2 \pm 0,53
Óleo de linhaça	3,3 \pm 0,45
Óleo de gergelim	3,8 \pm 0,26
Óleo de cártamo	3,8 \pm 0,70

* n=3

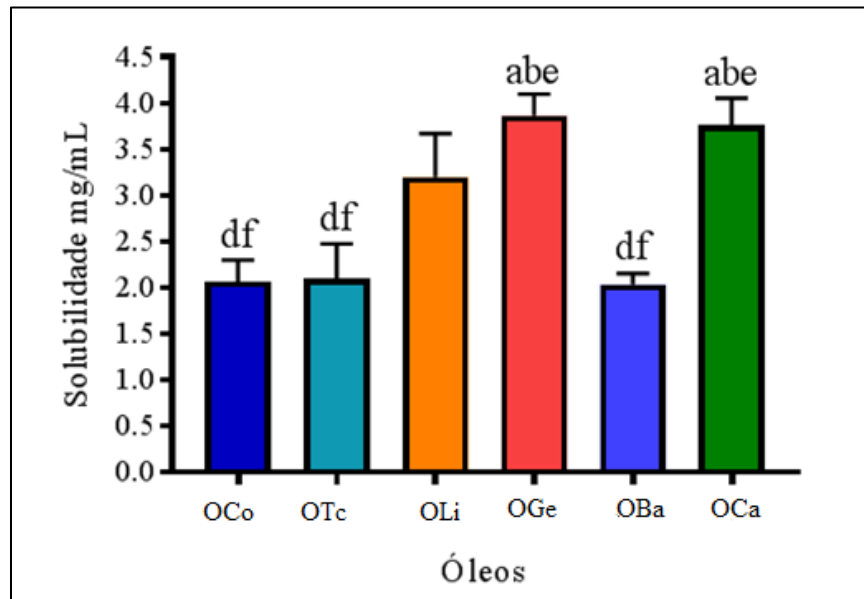
Os valores obtidos foram comparados estatisticamente utilizando ANOVA, seguido do teste de Tukey. Conforme demonstrado na figura 5.1, os óleos de coco, triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico e bacalhau apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a sua solubilidade quando comparados com os óleos de cártamo e gergelim.

5.4 TESTE DE INCHAMENTO DO POLÍMERO

Os filmes de policaprolactona (PCL) foram obtidos através da dissolução completa de 125 mg do polímero em 10 mL de clorofórmio e subsequente evaporação total do solvente orgânico. Os filmes foram imersos nos OGe, OLi, OBa, OCo, OC) e OTc, conforme a solubilidade máxima apresentada. Nos tempos 0, 2, 4, 6, 14, 21, 28, 35 e 60 diasos filmes

foram retirados do contato com as soluções, secos suavemente em papel absorvente e pesados em balança analítica. O teste foi realizado em triplicata (PAESE, 2008).

Figura 5.1 - Solubilidade da risperidona em diferentes óleos. Dados expressos com média \pm desvio padrão (DP), analisados por análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de Tukey, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$.



Legenda: a:diferença significativa do OCo; b:diferença significativa do OTc; c:diferença significativa do OLi; d: diferença significativa do OGe; e:diferença significativa do OGe do OBa e f:diferença significativa do OCa.

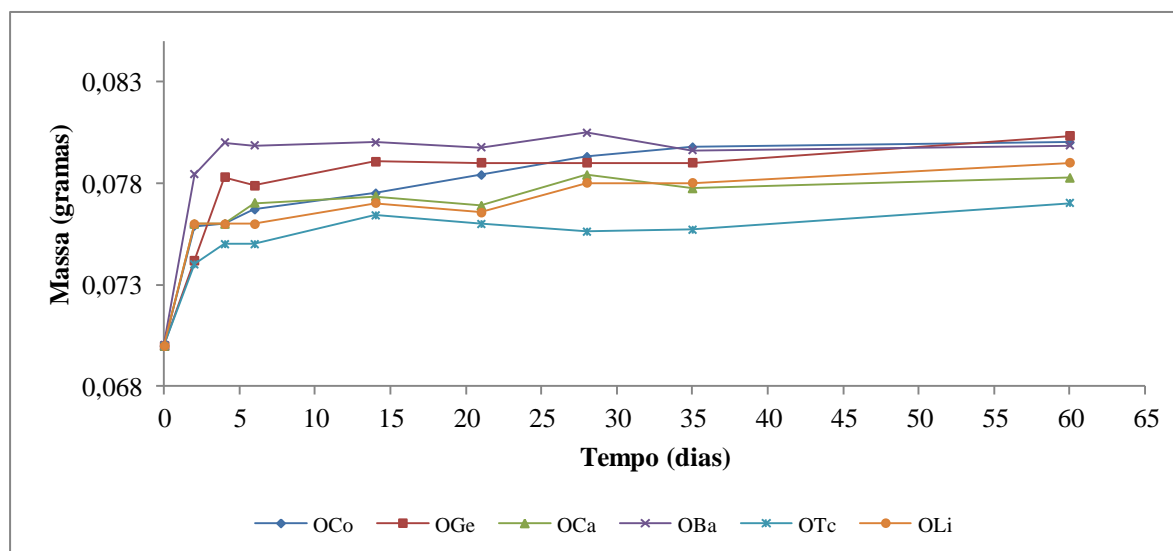
5.4.1 Resultados e discussão

Com o objetivo de verificar se o PCL sofreria inchamento ou seria dissolvido pelos óleos que serão os constituintes do núcleo das nanocápsulas, realizou-se o teste de inchamento do polímero. A média dos valores obtidos em relação a massa dos polímeros após diferentes tempos em contato com os óleos estão representados na tabela 5.4 e na figura 5.2.

Tabela 5.4 – Resultados médios obtidos no estudo de inchamento do polímero (PCL), em diferentes óleos.

Tempo (dias)	Óleos					
	OCo (média ± DP)	OGe (média ± DP)	OCa (média ± DP)	OBa (média ± DP)	OTc (média ± DP)	OLi (média ± DP)
0	0,070±0,000	0,070±0,000	0,070±0,000	0,070±0,000	0,070±0,000	0,070±0,000
2	0,076±0,004	0,074±0,001	0,076±0,004	0,078±0,010	0,074±0,002	0,076±0,002
4	0,076±0,003	0,078±0,003	0,076±0,009	0,080±0,012	0,075±0,002	0,076±0,003
6	0,077±0,002	0,078±0,001	0,077±0,004	0,080±0,001	0,075±0,008	0,076±0,001
14	0,077±0,004	0,079±0,005	0,077±0,005	0,080±0,003	0,076±0,001	0,077±0,008
21	0,078±0,000	0,079±0,003	0,077±0,005	0,080±0,002	0,076±0,005	0,077±0,003
28	0,079±0,003	0,079±0,002	0,078±0,004	0,080±0,004	0,076±0,007	0,078±0,017
35	0,080±0,001	0,079±0,001	0,078±0,002	0,080±0,005	0,076±0,002	0,078±0,001
60	0,080±0,003	0,080±0,004	0,078±0,003	0,080±0,000	0,077±0,004	0,079±0,007

Figura 5.2 - Inchamento do polímero policaprolactona (PCL) com diferentes óleos.



Em estudo que avaliou a adequabilidade das matérias-primas para a formulação de nanocápsulas, Guterres e colaboradores (2000) testaram a ação de dois diferentes óleos, benzoato de benzila e Mygliol 810[®], nos polímeros policaprolactona e poli(ácido láctico). Após 48 horas verificaram que o óleo de benzoato de benzila promoveu a total dissolução dos

polímeros, o que não aconteceu com o Mygliol 810[®]. Em contrapartida, Rigo e colaboradores (2014) desenvolveram nanocápsulas com núcleo lipídico utilizando os óleos de arroz, soja e girassol e PCL como polímero. Os óleos utilizados não foram capazes de dissolver o PCL, em um período de 30 dias.

No presente trabalho, observou-se que as massas dos filmes poliméricos sofreram um aumento de peso que variou, no máximo, 14,28% (p/p) para os óleos de coco, bacalhau e gergelim e, no mínimo, de 11,0% (p/p) para o triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico. Esse acréscimo ocorreu, possivelmente devido a quantidade residual de óleo aderido ao filme, que não pode ser totalmente retirado com papel absorvente. A partir da terceira pesagem as massas dos filmes permaneceram praticamente constantes, indicando que nenhum dos núcleos oleosos propostos foram capazes de dissolver o polímero. Os filmes poliméricos não apresentaram diferença de peso significativa, quando avaliados por ANOVA ($p > 0,05$) após 60 dias em contato com os óleos.

5.5 CONCLUSÕES

- A risperidona mostrou-se mais solúvel nos de gergelim e cártamo, seguida do óleo de linhaça e menos solúvel nos óleos de fígado de bacalhau, triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico e coco, sendo sua solubilidade superior a 2,0 mg/mL, em todos os casos;
- Os filmes poliméricos de PCL permaneceram estáveis na presença dos diferentes óleos, o que possibilita em tese, a formação de uma parede polimérica em torno do núcleo oleoso.
- Com base nos resultados obtidos podemos concluir que todos os óleos selecionados poderão ser testados como constituintes do núcleo lipofílico na produção das nanocápsulas de risperidona, já que o fármaco demonstrou afinidade pelos mesmos e a combinação de ambos não causou a degradação do polímero escolhido (PCL).
- O óleo de coco será excluído dos experimentos, pois apresentou menor afinidade pelo fármaco.

**Capítulo 6. Escolha do polietilenoglicol a ser utilizado no revestimento das
nanocápsulas poliméricas**

6 ESCOLHA DO POLIETILENOGLICOL A SER UTILIZADO NO REVESTIMENTO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

6.1 MATERIAIS

Água Milli-Q[®]; PEG 1500 (Synt[®] – Brasil – Lote: 84562); PEG 4000 (Galena[®] – Brasil – Lote: VO906CB-02); PEG 6000 (BASF[®] – Alemanha - Lote: 5611938); policaprolactona (70.000) (Sigma-Aldrich[®] – EUA – Lote: MKBD9495V); span 60(Sigma-Aldrich[®] – EUA – Lote: 010M0128); triglicerídeos dos ácidos capríco/caprílico - (Delaware[®] - distribuidora – EUA – Lote:050511); tween 80 (Synth[®] – Brasil – Lote 144694).

6.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS POLIETILENOGLICÓIS UTILIZADOS

Os polietilenoglicóis (PEGs) são polímeros de óxido de etileno, com peso molecular que variam de 200 g a 300.000 g. Os PEGs com maiores pesos moleculares têm uma viscosidade maior e uma menor solubilidade em água (LEUNER; DRESSMAN, 2000). As principais características dos PEGs utilizados no presente trabalho estão descritas na tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Características dos diferentes PEGs testados no desenvolvimento das nanocápsulas.

Características	PEG 1500	PEG 4000	PEG 6000
Ponto de fusão (°C)	44-48	50-58	50-58
Viscosidade (cps)	34-50	110-170	200-270
pH	4 a 7	4 a 7	5 a 7
Peso molecular (g/mol)	1350 a 1650	3600 a 4400	6000

6.3 PREPARO DAS NANOCÁPSULAS BRANCAS REVESTIDAS COM DIFERENTES PEGs

Nanocápsulas poliméricas brancas (sem fármaco) foram preparadas em triplicata, de acordo com o descrito no capítulo 8 e os diferentes polietilenoglicóis (PEG) incorporados diretamente na fase aquosa, na concentração de 0,7% (p/v) (FREDDO, 2009). No presente estudo testaram-se inicialmente os PEGs 6000, 4000 e 1500. As nanocápsulas foram avaliadas em relação ao pH, potencial zeta, distribuição do tamanho médio das partículas e índice de polidispersão.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios obtidos com os diferentes PEGs testados estão apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 - Resultados obtidos na caracterização das nanocápsulas brancas revestidas com diferentes PEGs.

Parâmetros avaliados	Formulação com PEG 6000	Formulação com PEG 4000	Formulação com PEG 1500	Formulação sem PEG
	(média \pm DP) (n=3)	(média \pm DP) (n=3)	(média \pm DP) (n=3)	(média \pm DP) (n=3)
pH	5,7 \pm 0,06	5,4 \pm 0,03	5,8 \pm 0,03	6,1 \pm 0,01
Tamanho (nm)	350 \pm 7,4	275 \pm 2,5	210 \pm 2,0	277 \pm 4,1
PDI	0,272 \pm 0,02	0,100 \pm 0,01	0,110 \pm 0,01	0,130 \pm 0,01
Potencial (mV)	-30,57 \pm 0,6	-33,00 \pm 0,7	-32,14 \pm 0,2	-31,71 \pm 0,5

PEG:polietilenoglicol; DP:desvio padrão.

As formulações com PEG 6000 foram as que apresentaram maior distribuição do diâmetro médio das partículas (>300 nm) e maior índice de polidispersão ($>0,250$), o que indica a não homogeneidade do sistema, o que pode ser explicado pela sua menor solubilidade na água, o que talvez tenha dificultado a formação de uma camada homogênea ao redor do polímero. As nanocápsulas com PEG 4000 e 1500 têm valores adequados de tamanho médio de partículas (<500 nm) e baixo índice de polidispersão ($<0,250$) (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; WU; ZHANG; WATANABE, 2011). Todas as formulações com PEG apresentaram potencial zeta negativo, conforme o esperado, e acima de 30 mV, o que é um bom indicio de estabilidade do sistema, já que dificulta a agregação e o aumento indesejável do tamanho de partícula (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

Com base nos dados obtidos optou-se por excluir o uso do PEG 6000, já que a formulação mostrou um índice de polidispersão acima do esperado. As nanocápsulas contendo PEG 1500 e 4000 apresentaram boas características para o desenvolvimento das formulações em estudo, sendo possível a utilização de ambas.

Tosi e colaboradores (2008) conduziram estudos para entender a importância do peso molecular do PEG e sua interação com as proteínas plasmáticas. Os melhores resultados foram obtidos com os PEGs de 2000 a 5000 Da, pois foram capazes de prolongar a meia-vida das nanopartículas poliméricas, evitando o ataque dos macrófagos. Sendo assim, optou-se por trabalhar com o PEG 4000 já que no futuro pretende-se incorporar as nanocápsulas obtidas em formas farmacêuticas sólidas de uso oral.

6.5 CONCLUSÕES

- As nanocápsulas brancas com PEG 6000 foram as que apresentaram maior tamanho de partícula e maior índice de polidispersão, sendo esse PEG excluído do estudo;
- Tendo em vista as vantagens descritas na literatura sobre os PEGs com cadeia na faixa de 2000 a 5000 Da, optou-se trabalhar com o PEG 4000.

Capítulo 7. Capacidade antioxidante

7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-OXIDANTE FRENTE AO RADICAL 2, 2-DIFENIL-1-PICRIHIDRAZILA (DPPH)

7.1 MATERIAIS

Clorofórmio (Sigma-Aldrich[®] – EUA – Lote: SHBB1474V); BHT (Alpha Química[®] – Brasil - Lote: 397MTG2110); DPPH (Sigma Aldrich[®] – Alemanha - Lote: STBB0719); etanol (Química moderna[®] – Brasil – Lote: 171); óleo de gergelim (Pazze[®] – Brasil – Lote: 471454); óleo de cártamo (Pazze[®] – Brasil – Lote: 710191); triglicerídeo dos ácidos capríco/caprílico (Delaware[®] - distribuidora – Lote: 050511); óleo de linhaça dourada (Pazze[®] – Brasil – Lote: 4700632); óleo de fígado de bacalhau (All Chemistry do Brasil[®]- distribuidora – Noruega – Lote: 42683); Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich[®] – França - Lote: SZBB1040V) tampão fosfato de potássio monobásico (Sigma Aldrich[®] – Alemanha - Lote: SZBA3560V).

7.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-OXIDANTE DO RADICAL DPPH

7.2.1 Preparação da amostra

Para a avaliação da capacidade antioxidante dos óleos foi utilizado o método colorimétrico do DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazila), segundo Choi e colaboradores (2002). Preparou-se uma solução-mãe do óleo a 10% (v/v), em clorofórmio, e diluiu-se até as concentrações de 0,3%, 0,6%, 1,2%, 1,6%; 2,5% e 3% (v/v), em etanol. O ensaio foi realizado em triplicata.

7.2.2 Preparação do padrão

Preparou-se uma solução-mãe do BHT a 10% (p/v), em clorofórmio, e diluiu-se até as concentrações de 0,3%, 0,6%, 1,2%, 1,6%, 2,5% e 3% (v/v), em etanol. O ensaio foi realizado em triplicata.

7.2.3 Procedimento

Transferiu-se para tubos de ensaio 2,5 mL de cada uma das concentrações das amostras e do padrão e adicionou-se 1,5 mL de DPPH. As amostras e o padrão foram armazenadas ao abrigo da luz, por 30 minutos e as absorvâncias das mesmas determinadas por espectrofotometria na região do visível (518 nm). Simultaneamente preparou-se um branco, para cada uma das concentrações, adicionando-se 2,5 mL da amostra e 1,5 mL de etanol. Para o controle negativo, transferiu-se 2,5 mL de etanol e 1 mL do DPPH. A leitura do controle deve ficar na faixa de 0,8 a 0,9.

7.2.4 Cálculo da porcentagem de inibição

A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada através da equação 7.1, descrita a seguir:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{[(\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco}) \times 100]}{\text{Absorbância do controle}} \quad (7.1)$$

Onde,

absorbância da amostra: absorbância da fração contendo o óleo; absorbância do branco: absorbância da fração contendo o óleo sem adição do DPPH; absorbância controle: absorbância da solução de DPPH em etanol.

7.2.5 Avaliação estatística

Os óleos e o BHT foram comparados por Análise de Variância (ANOVA) ($p \leq 0,05$), seguida do teste de Tukey, para cada concentração de óleo utilizada.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existe uma variedade de métodos para se determinar a capacidade antioxidante de ativos presentes em alimentos, fluidos biológicos, vegetais, entre outros. A maioria dos métodos *in vitro*, tem como reagente um radical livre, o qual é capturado ou neutralizado pelos compostos antioxidantes, inibindo a formação de produtos de oxidação (ROGINSKY; LISSI, 2005). Devido aos diferentes tipos de radicais livres e de suas diferentes formas de atuação em organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente (ALVES et al., 2010).

Segundo Roginsky e Lissi (2005) um dos métodos mais conhecidos para determinar a atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas é o método do DPPH. Por ação de um antioxidante o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, alterando a coloração apresentada para amarelo, reação essa monitorada pelo decréscimo da absorbância em 518 nm.

Originalmente, o ensaio utilizava metanol como solvente para o preparo do DPPH e das amostras, no entanto, como o metanol não dissolve óleos comestíveis foram necessárias adaptações para os compostos lipofílicos dos óleos vegetais, por meio da utilização de solventes apropriados para essas amostras. O ensaio do DPPH pode ser aplicado para classificar as amostras de óleo quanto à sua capacidade antioxidante, porém apenas de uma maneira qualitativa, já que essa atividade pode ser afetada pelo sinergismo destes compostos com as interfaces ar-óleo, ar-água e/ou óleo-água presentes no meio (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011).

A capacidade antioxidante dos óleos de gergelim, cártamo, triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico, bacalhau e linhaça foi avaliada pelo método do DPPH e os dados estão apresentados nas tabelas 7.1 e 7.2 e representados graficamente na figura 7.1.

Tabela 7.1 – Capacidade sequestradora do radical DPPH dos óleos OTc, OCa e OGe.

Concentração do óleo (%)	OTc		OCa		OGe	
	CS* _±	DP	CS* _±	DP	CS* _±	DP
0,3	1,05	± 0,37	10,96	± 0,55	23,87	± 0,67
0,6	1,13	± 0,50	19,38	± 1,06	33,21	± 0,70
1,2	1,25	± 0,28	30,78	± 0,93	48,02	± 0,19
1,6	1,29	± 0,18	44,30	± 0,12	58,82	± 0,55
2,5	1,21	± 0,24	67,31	± 0,69	76,09	± 0,24
3,0	1,49	± 0,25	72,82	± 0,64	85,84	± 0,67

*CS= capacidade sequestradora do radical DPPH; DP = desvio padrão

Tabela 7.2 – Capacidade sequestradora do radical DPPH dos óleos e do BHT.

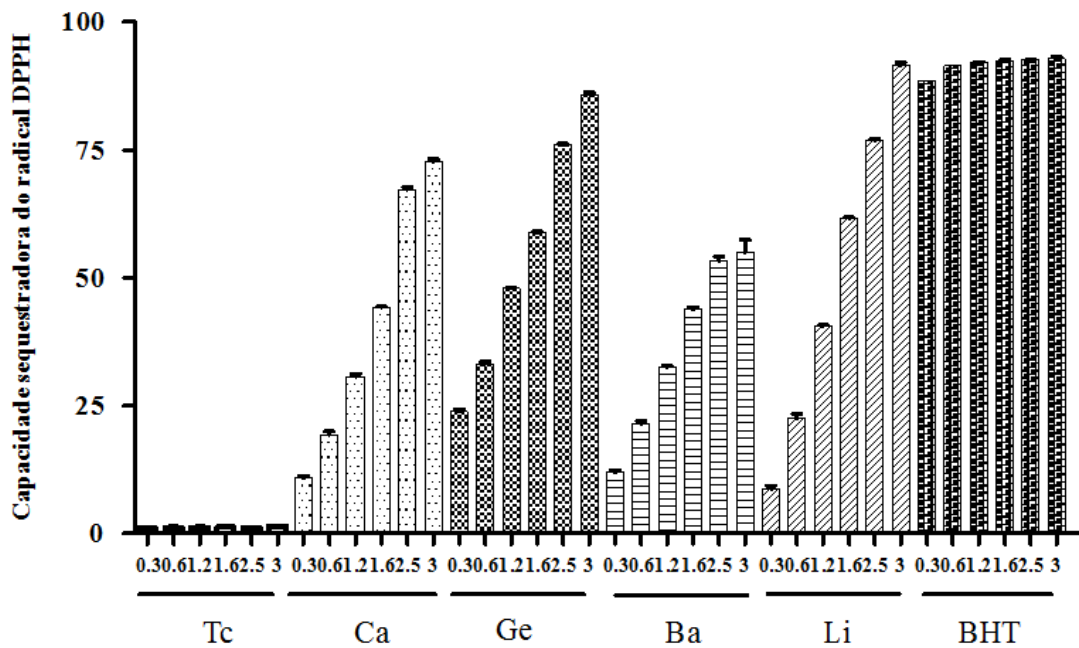
Concentração do óleo (%)	OBa		OLi		BHT	
	CS* _±	DP	CS* _±	DP	CS* _±	DP
0,3	12,06	± 0,67	8,79	± 1,03	88,41	± 0,03
0,6	21,44	± 1,12	22,65	± 1,29	91,50	± 0,02
1,2	32,56	± 0,49	40,57	± 0,31	92,11	± 0,20
1,6	43,89	± 0,67	61,65	± 0,36	92,50	± 0,20
2,5	53,44	± 1,33	77,02	± 0,31	92,70	± 0,20
3,0	59,71	± 0,12	91,63	± 0,76	92,83	± 0,74

*CS= capacidade sequestradora do radical DPPH; DP = desvio padrão

Os óleos vegetais constituem-se predominantemente por triacilgliceróis, frequentemente ricos em ácidos graxos poli-insaturados. Também estão presentes alguns lipídios formados durante o processamento, ácidos graxos livres, esteróis, tocoferóis, tocotrienóis, compostos fenólicos, pigmentos (carotenóides e clorofilas) e metais de transição como ferro e cobre (CHAIYASIT et al., 2007). Eles são a principal fonte de tocóis da alimentação, sendo os tocoferóis a principal forma de tocol encontrada na maioria dos óleos. Os tocóis constituem um grupo de moléculas que apresentam atividade de vitamina E. Existem natureza quatro formas (α , β , γ e δ) e são potentes antioxidantes lipofílicos. O α - e o γ -tocoferol são os mais encontrados nos óleos vegetais. Há evidências de que a capacidade antioxidante dos óleos vegetais pode ser influenciada pelo teor de tocóis totais, bem como

pela concentração de alguns tocoferóis individuais como γ - e δ -tocoferóis (SALDEEN; SALDEEN, 2005).

Figura 7.1 – Representação gráfica da capacidade seqüestradora do radical DPPH dos óleos e do BHT em diferentes concentrações, expressas em média \pm DP.



Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas, que exibem uma variedade de ações biológicas, especialmente devido a suas propriedades antioxidantes. Assim como ocorre para os tocois, a atividade antioxidante varia sensivelmente entre os diferentes compostos fenólicos. Os fenólicos mais comumente detectados nos óleos vegetais fazem parte da classe dos ácidos fenólicos, especialmente os ácidos cafeico, vanílico, *p*-cumárico, sirínico, *p*-hidroxibenzoicos, além de oleuropeína, 3-hidroxifenil-etanol e 3,4-dihidroxifenil-etanol (GUTFINGER, 1981). No entanto, em geral esses compostos são encontrados em baixas concentrações nos óleos refinados devido à sua baixa estabilidade ao processo de refino, comprovado após um estudo com o óleo de oliva, que apresentou redução de 50% na sua capacidade antioxidante, que foi associada com a redução dos compostos fenólicos totais, mas não com a redução de α -tocoferol. É possível que os óleos vegetais prensados a frio apresentem teores igualmente elevados de compostos fenólicos, os quais podem ter um papel determinante na sua capacidade antioxidante (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011; SZYDTOWSKA-CZERNIAK et al., 2008).

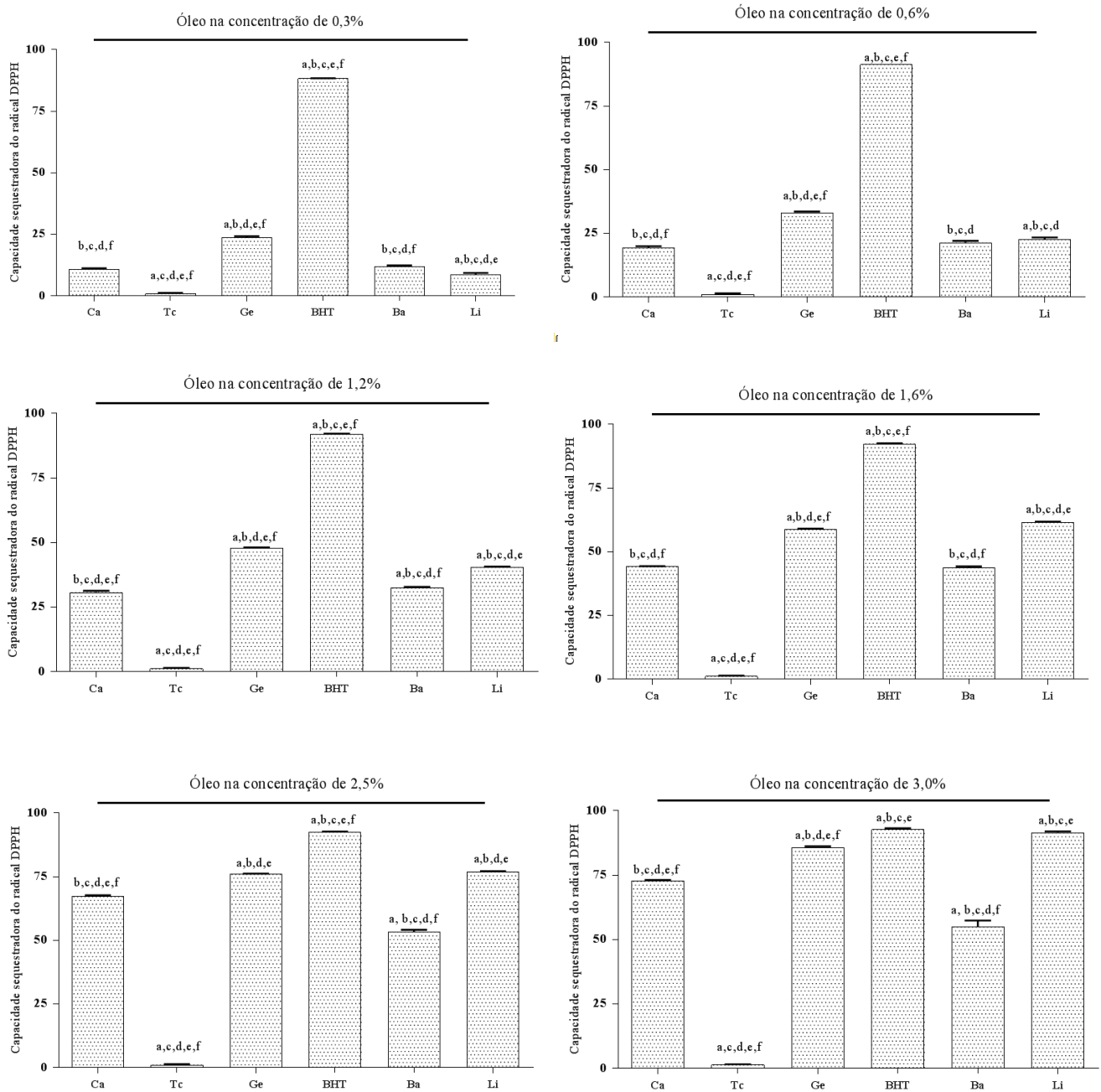
Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Em humanos, os ácidos linoléico (ω 6) e linolênico (ω 3) são necessários para manter as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular (YOUUDIM; MARTINI; JOSEPH, 2000). Os ácidos graxos das famílias ω -6 e ω -3 são obtidos por meio da dieta ou produzidos pelo organismo a partir dos ácidos linoléico e linolênico, pela ação de enzimas alongase e dessaturase. As alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis* (MARTINI et al., 2006).

A peroxidação lipídica envolve complexas reações radicalares autopropagantes, resultantes das interações químicas entre os ácidos graxos insaturados e espécies reativas de oxigênio que podem causar a perda de ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico) e dos antioxidantes naturais, além da produção de diversos compostos, com potenciais efeitos adversos à saúde humana, implicando diretamente na segurança dos óleos vegetais utilizados (CHOE; MIN, 2006).

O óleo de gergelim contém uma classe de compostos conhecidos como sesamim, sesamolim e uma pequena quantidade de sasamol, que são os principais compostos responsáveis por suas características antioxidantes (LEE; LEE; CHOE, 2008; WU, 2007). O óleo de cártamo é extraído do açafrão, planta rica em polifenóis e α -tocoferol (CHO et al., 2011). O óleo de linhaça é um alimento de origem vegetal rico em ácidos graxos ω -3 e ω -6, ácido octadecenoico, além de um elevado teor de fibras, proteínas e compostos fenólicos (BARROSO et al., 2014; GALVÃO et al., 2008; THOMPSON; CUNNANE, 2003).

De acordo com os dados apresentados nas tabelas 7.1 e 7.2, podemos observar que as melhores capacidades sequestradoras do radical DPPH foram obtidas com os óleos de linhaça, cártamo e gergelim, o que pode ser justificado pela composição dos mesmos, conforme descrito anteriormente. Para todos os óleos, com exceção dos triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico, a capacidade sequestradora do radical DPPH foi dependente da dose, sendo que até a concentração utilizada, não foi verificado a formação de um platô (Figura 7.1).

Figura 7.2 – Análise estatística da capacidade sequestradora do radical DPPH dos óleos e do BHT em diferentes concentrações, expressas em média \pm DP.



Legenda: a:OCa; b:OTc; c:OGe; d:BHT; e:OBa f:OLi. Letras superiores indicam que existe diferença estatística ($p \leq 0,05$) na capacidade de sequestrar radicais de DPPH

Quando os valores médios da capacidade de sequestrar os radicais de DPPH dos óleos e do BHT foram comparados por ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$), verificamos que os somente o óleo de linhaça (OLi), na concentração de 3,0%, não apresentou diferença significativa em relação ao padrão (BHT). O óleo de gergelim (OGe) foi o que apresentou

maior atividade antioxidante nas concentrações de 0,3%, 0,6%, 1,2% e 2,5%, somente sendo inferior ao óleo de linhaça na concentração mais alta (Figura 7.2).

A capacidade antioxidante tem sido utilizada como indicador da bioatividade dos óleos vegetais no organismo humano. Através dos valores de capacidade antioxidante *in vitro* é possível ranquear os óleos vegetais quanto a seu potencial efeito benéfico no organismo humano. Entretanto, é razoável supor que a ação dos principais antioxidantes dietéticos de importância biológica *in vivo* dependa de fatores como, o nível de estresse oxidativo ao qual o organismo é exposto, a composição e as quantidades de antioxidantes e pró-oxidantes habitualmente ingeridos, assim como da biodisponibilidade e do metabolismo dos compostos antioxidantes no organismo humano (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2009).

7.4 CONCLUSÕES

- O método do DPPH se mostrou adequado para determinar a atividade antioxidante dos óleos vegetais e dos triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico utilizados no presente estudo.
- A capacidade dos óleos em sequestrar os radicais livres do DPPH foi concentração dependente, com exceção do Tc.
- Os triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico, não demonstraram capacidade de sequestrar os radicais livres do DPPH.
- Somente o óleo de linhaça, na concentração de 3,0%, teve sua atividade antioxidante comparável a do BHT, quando avaliados por ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).
- O óleo de gergelim foi o que apresentou maior capacidade de sequestrar os radicais livres do DPPH nas concentrações de 0,3%, 0,6%, 1,2% e 2,5%, somente sendo inferior ao óleo de linhaça na concentração de 3,0%.

Capítulo 8. Delineamento experimental e desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas contendo risperidona

8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DESENVOLVIMENTO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO RISPERIDONA

8.1 MATERIAIS

Água Milli-Q[®]; brometo de potássio (J.T. Baker[®] – Lote: C49668); dispositivo de ultrafiltração (Amicon[®] Ultra – 500 µL) de celulose regenerada 10000 daltons (MERCK[®] – Irlanda – Lote:R2KA56412); óleo de coco – (Pazze[®] – Brasil – Lote:5206310); óleo de linhaça dourada (Pazze – Brasil – Lote:470632); óleo de gergelim (Pazze[®] – Brasil – Lote:471454); óleo de cártamo (Pazze[®] – Brasil – Lote:710191); triglicerídeo dos ácidos capríco/caprílico - (Delaware - distribuidora – EUA – Lote:050511); óleo de Fígado de bacalhau (All Chemistry do Brasil[®] - distribuidora – Noruega – Lote:42683); PEG 4000 (Galena – Brasil – Lote: VO906CB-02); policaprolactona (70.000) (Sigma-Aldrich[®] – EUA – Lote: MKBD9495V); span[®] 60 - (Sigma-Aldrich[®] – EUA – Lote: 010M0128); tween 80 (Synth[®] – Brasil – Lote 144694).

8.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os lotes de nanocápsulas contendo risperidona foram elaborados com base no planejamento fatorial 2³, sendo o polímero, o fármaco e o óleo as variáveis dependentes, conforme demonstrado na Tabela 8.1. As concentrações das três variáveis foram previamente testadas, seguindo-se as faixas sugeridas por Mora-Huertas e colaboradores (2010).

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por Análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$, utilizando-se o software Design Expert[®] (versão 9.0, Stat-Ease Inc, Minneapolis, MN). A comparação entre as nanocápsulas peguiladas de risperidona com diferentes óleos foi realizada por ANOVA – duas vias sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Tabela 8.1 - Planejamento fatorial e condições experimentais para o preparo das nanocápsulas contendo risperidona.

Fator	Nível	
	Baixo	Alto
Concentração do polímero (%)	0,8	1
Concentração do fármaco (%)	0,08	0,1
Concentração do óleo (%)	3,1	3,5

8.3 MÉTODO DE PREPARAÇÃO

O método utilizado para a obtenção das suspensões de nanocápsulas de risperidona foi o de deposição interfacial do polímero pré-formado, descrito por Fessi e colaboradores (1989). Para a obtenção das nanocápsulas revestidas com polietilenoglicol (PEG), utilizamos a mesma metodologia descrita anteriormente, com a adição do PEG diretamente na fase aquosa, a uma concentração de 0,7% (p/v) (FREDDO, 2009). As suspensões foram desenvolvidas em triplicata, de acordo com a matriz 2^3 (2 níveis de variação x 3 variáveis (óleo, polímero e fármaco), conforme descrito na tabela 8.2, sendo que as quantidades de acetona (250 mL), Span 60[®] (0,8 g), polissorbato 80 (0,8 g) e água (500 mL) foram constantes.

Os componentes da fase orgânica foram pesados, transferidos para béquer e mantidos sob agitação magnética em banho-maria à temperatura de 40 °C até a completa dissolução de todos os componentes. A fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa, com auxílio de um funil, e mantida sob agitação mecânica moderada. A suspensão foi agitada durante 1 hora e concentrada a um volume final de 100 mL em evaporador rotatório Fisatom - Modelo 801 (Brasil), para eliminação do solvente orgânico e ajuste da concentração final de risperidona. As nanocápsulas brancas, nanoesferas e nanoemulsões foram preparadas da mesma maneira, excluindo-se a adição do ativo, do óleo e do polímero, respectivamente. As formulações foram produzidas somente para comparação dos resultados com os das nanocápsulas em estudo.

Tabela 8.2 - Composição das oito formulações de nanocápsulas de risperidona para um volume final de 100 mL.

Formulação	1	2	3	4	5	6	7	8
Fase orgânica								
Policaprolactona (PCL) (g)	1	1	0,8	0,8	1	1	0,8	0,8
Span 60® (g)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Óleo (g)*	3,1	3,5	3,1	3,5	3,1	3,5	3,1	3,5
Fármaco (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,08	0,08	0,08	0,08
Acetona (mL)	250	250	250	250	250	250	250	250
Fase aquosa								
Polissorbato 80	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
PEG 4000	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Água ultra-pura	500	500	500	500	500	500	500	500

* Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico; cártamo; fígado de bacalhau; coco; linhaça e gergelim.

8.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

8.4.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada diretamente nas amostras, utilizando-se potenciômetro Denver Instrument – Modelo ultrabasic (Estados Unidos da América) previamente calibrado a 25 °C, com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

8.4.2 Distribuição do diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão

As determinações do tamanho médio das partículas e índice de polidispersão foram realizadas pelo método de espalhamento de luz dinâmico. As amostras foram diluídas em água ultra-pura e analisadas em equipamento Zetasizer®, Nano-ZS da Malvern instrument (Estados Unidos da América).

8.4.3 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado através da técnica de mobilidade eletroforética no aparelho Zetasizer[®], Nano-ZS da Malvern instrument (Estados Unidos da América). As amostras foram diluídas em água ultra-pura. Os resultados foram expressos em milivolts (mV) a partir da média de três determinações (BALZEAU et al., 2013; HE et al., 2013; SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

8.4.4 Teor de ativo nas nanocápsulas

A quantidade de fármaco foi determinada por cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando-se método previamente validado.

8.4.5 Determinação da taxa de associação

O teor de ativo livre, presente nas suspensões de nanocápsulas foi determinado utilizando-se a técnica de ultrafiltração-centrifugação. Uma pequena quantidade da amostra (400 µL) foi transferida para filtro Microcron[®] - Millipore 10,000 Å, e microcentrífuga refrigerada Novatécnica[®], modelo Nt805 (Brasil) por 10 minutos a 10.000 rotações por minuto (rpm). A quantidade de fármaco não incorporado a nanocápsula foi determinado no ultracentrifugado, por cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando-se método previamente validado. A quantidade de risperidona associada às nanocápsulas foi determinada pela diferença entre o teor encontrado no doseamento e a concentração de fármaco livre.

8.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.5.1 Caracterização das nanocápsulas de risperidona

Nas tabelas de 8.3 a 8.8 estão apresentados os valores obtidos na caracterização das nanocápsulas de risperidona com os óleos de cártamo (NcCa), gergelim (NcGe), linhaça NcLi), fígado de bacalhau (NcBa) e triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (NcTc). Os valores médios das triplicatas estão descritos no Apêndice A.

Tabela 8.3 – pH das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.

Formulação	pH				
	Média (n=3) ± DP				
	NcTc	NcCa	NcGe	NcLi	NcBa
1	7,2±0,06	7,2±0,10	6,8±0,05	7,4±0,10	7,5±0,06
2	7,3±0,15	7,1±0,12	6,9±0,01	7,5±0,06	7,4±0,01
3	7,1±0,15	7,3±0,15	6,8±0,07	7,3±0,12	7,0±0,12
4	7,0±0,12	6,8±0,12	6,7±0,08	7,5±0,06	7,4±0,13
5	6,8±0,06	6,9±0,10	6,8±0,06	7,2±0,12	7,3±0,19
6	7,1±0,15	7,0±0,10	6,7±0,06	7,4±0,06	7,3±0,04
7	7,1±0,06	7,0±0,00	6,8±0,05	7,3±0,06	7,0±0,18
8	7,0±0,00	7,0±0,06	6,7±0,08	7,2±0,12	6,8±0,06

Tabela 8.4 – Distribuição do diâmetro médio de partícula das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.

(continua)

Formulação	Diâmetro médio de partícula (nm)				
	Média (n=3) ± DP				
	NcTc	NcCa	NcGe	NcLi	NcBa
1	249±2,3	293±16,1	299±8,7	334±15,3	311±6,4
2	231±10,4	357±10,2	349±14,1	349±14,7	349±8,3
3	313±14,6	361±9,6	247±16,1	283±14,4	283±4,6

(conclusão)

Diâmetro médio de partícula (nm)					
Média (n=3) ± DP					
	NcTc	NcCa	NcGe	NcLi	NcBa
4	330±5,3	320±18,0	291±11,4	289±14,4	289±7,0
5	298±20,1	263±12,4	281±16,3	339±3,2	226±4,6
6	252±22,6	234±4,2	305±8,5	376±4,6	226±3,6
7	317±6,27	257±5,7	302±5,9	257±5,5	218±9,3
8	300±23,6	348±14,1	340±3,5	324±13,9	234±12,9

Tabela 8.5 – Índice de polidispersão das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.

Formulação	Índice de polidispersão				
	Média (n=3) ± DP				
	NcTc	NcCa	NcGe	NcLi	NcBa
1	0,191±0,02	0,159±0,01	0,313±0,02	0,198±0,07	0,195±0,01
2	0,187±0,01	0,204±0,02	0,192±0,01	0,171±0,03	0,313±0,05
3	0,185±0,00	0,264±0,01	0,222±0,01	0,177±0,02	0,201±0,07
4	0,145±0,02	0,153±0,01	0,150±0,00	0,168±0,00	0,175±0,05
5	0,136±0,00	0,167±0,01	0,355±0,01	0,167±0,00	0,138±0,07
6	0,157±0,01	0,151±0,01	0,256±0,01	0,141±0,05	0,126±0,03
7	0,202±0,01	0,107±0,00	0,159±0,01	0,207±0,06	0,107±0,01
8	0,203±0,02	0,176±0,02	0,207±0,00	0,174±0,06	0,174±0,01

Tabela 8.6 – Potencial zeta das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.

Formulação	Potencial zeta (mV)				
	Média (n=3) ± DP				
	NcTc	NcCa	NcGe	NcLi	NcBa
1	-38,8±1,98	-35,5±1,08	-38,0±1,86	-34,6±1,17	-46,7±3,01
2	-33,4±2,13	-36,4±0,85	-39,9±0,25	-34,0±0,78	-33,1±3,08
3	-34,9±2,47	-34,0±0,21	-36,4±0,74	-33,1±0,50	-33,2±1,95
4	-36,8±1,93	-35,6±0,75	-37,8±0,91	-34,2±2,29	-36,2±1,88
5	-31,8±0,73	-34,6±0,17	-43,7±1,76	-32,8±0,59	-35,3±0,96
6	-29,7±1,80	-35,6±0,26	-36,3±0,69	-38,1±1,05	-34,1±1,78
7	-35,8±3,01	-29,8±0,70	-40,6±0,76	-35,1±1,66	-29,2±2,39
8	-33,8±2,30	-36,9±0,66	-36,9±1,66	-30,8±1,31	-29,9±0,28

Tabela 8.7 – Teor e taxa de associação das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.

Formulação	Teor (%)				
	Média (n=3) ± DP				
	NcTc	NcCa	NcGe	NcLi	NcBa
1	99,37±0,74	99,91±1,03	98,94±0,77	99,93±0,74	99,13±0,97
2	99,61±0,33	99,09±0,57	99,05±1,23	97,48±1,16	98,06±0,89
3	98,75±0,90	99,04±0,30	99,28±0,67	99,69±1,19	98,28±0,77
4	99,56±1,16	99,05±1,17	98,76±0,23	99,80±0,44	99,12±0,85
5	98,34±0,31	98,53±0,83	98,33±0,26	99,79±0,30	100,20±1,21
6	98,56±0,30	99,08±0,85	98,66±0,52	100,73±0,54	99,84±1,28
7	99,80±0,88	99,28±0,58	99,98±0,04	100,00±0,10	99,85±1,11
8	98,95±0,48	99,09±0,35	99,49±0,87	98,95±0,15	98,85±1,08

Tabela 8.8 – Taxa de associação das nanocápsulas contendo risperidona em diferentes óleos.

Formulação	Taxa de associação (%)				
	NcTc	NcCa	NcGe	NcLi	NcBa
1	64,66	82,49	86,58	78,50	66,89
2	72,58	83,38	86,78	78,65	65,93
3	66,93	87,35	89,04	80,06	67,44
4	69,48	88,25	89,54	83,38	73,87
5	72,37	83,97	85,30	70,16	72,37
6	74,06	85,13	91,16	81,52	71,27
7	74,92	86,26	84,96	74,90	75,14
8	73,88	86,84	90,30	76,17	75,35

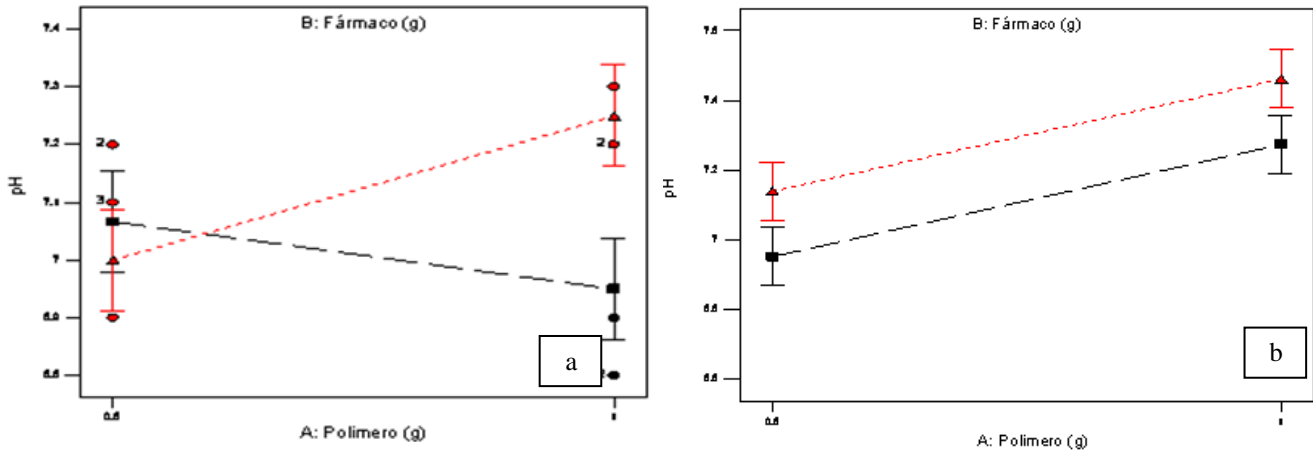
8.5.2 Escolha do modelo matemático para análise dos resultados

Para a interpretação dos resultados obtidos no estudo da interação entre fármaco-óleo-polímero, utilizou-se o software Desig Expert[®]. O modelo matemático que mais se ajustou aos parâmetros avaliados foi o fatorial ($F < 0,1$).

8.5.3 Análise dos fatores que influenciaram no pH

Entre os fatores estudados, a concentração do fármaco e a associação de polímero e fármaco foram os que afetaram significativamente o pH para as NcTc e NcBa ($p \leq 0,05$). Conforme demonstrado na figura 8.1. Quanto maior a concentração do fármaco e do polímero utilizado, maior foi o pH da formulação.

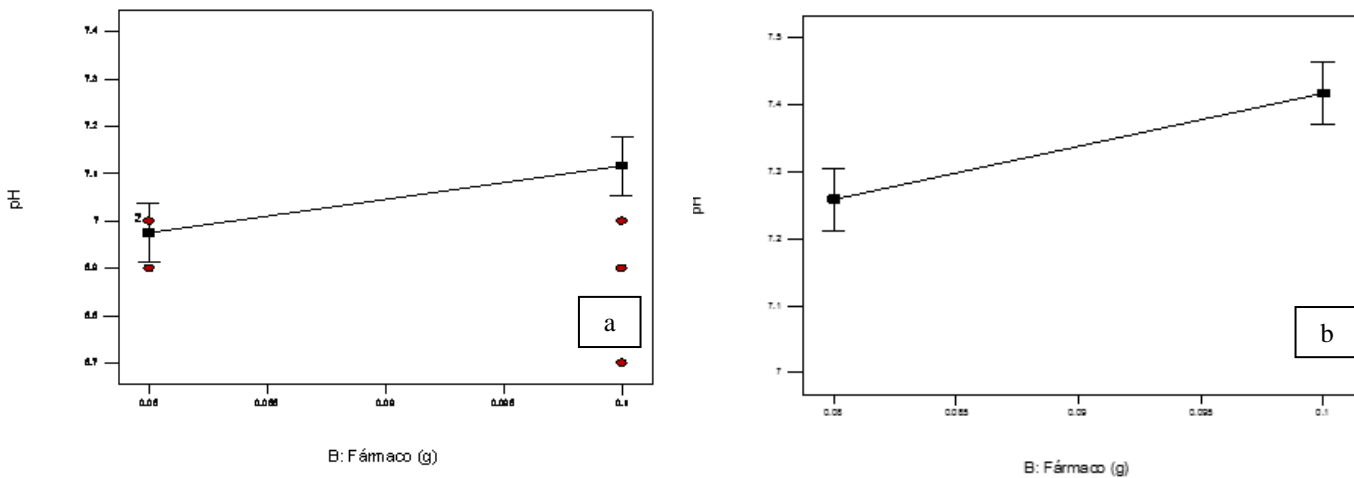
Figura 8.1 – Representação gráfica da interação entre os fatores que alteraram significativamente o pH para as NcTc (a) e NcBa (b).



Legenda: linha vermelha = (fármaco a 0,1%); linha preta = (fármaco a 0,08%).

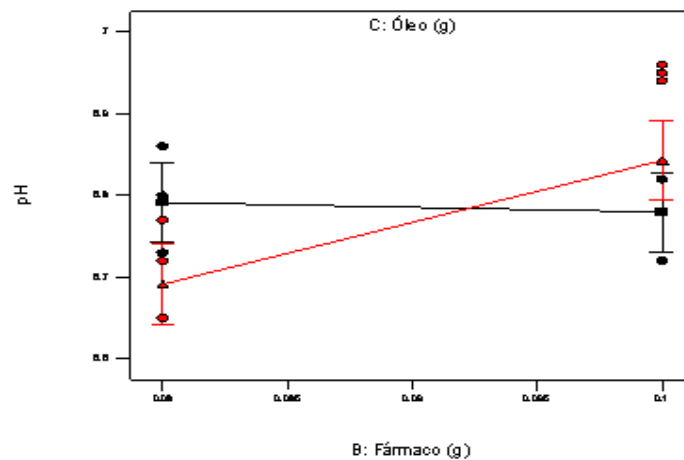
Para as NcCa e NcLi, o único parâmetro que influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) no pH foi a concentração do fármaco. O aumento do mesmo elevou o pH das suspensões, independente da concentração do polímero e do óleo utilizado, conforme demonstrado na figura 8.2.

Figura 8.2 – Representação gráfica do fator que alterou significativamente o pH para as NcCa (a) e NcLi (b).



A concentração do fármaco e a associação fármaco-óleo foram os fatores que afetaram significativamente o pH nas NcGe ($p \leq 0,05$). Quando a concentração do óleo e do fármaco são maiores o pH aumenta, mas quando são menores, o pH se mantém praticamente inalterado (Figura 8.3).

Figura 8.3 – Representação gráfica da interação entre os fatores que alteraram significativamente o pH para as NcGe.



Legenda: linha vermelha = (óleo a 3,5%); linha preta = (óleo a 3,0%).

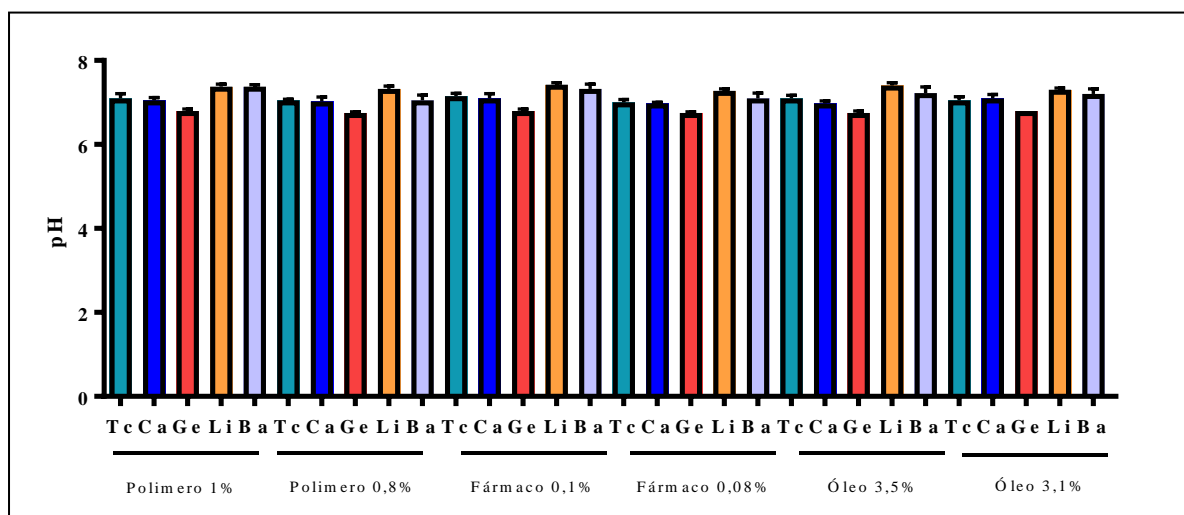
Os valores de pH encontrados nas formulações estudadas (Tabela 8.3) estão de acordo com o descrito na literatura para os métodos de nanoprecipitação, que, em termos gerais, estão na faixa de 3,0 a 7,5. Para as NcTc, NcCa, NcGe, NcLi e NcBa os valores ficaram entre 6,8 a 7,4; 6,7 a 7,4; 6,6 a 7,0; 7,2 a 7,5 e 6,8 a 7,5, respectivamente. As variações de pH estão dentro de uma faixa estreita de valores sendo a concentração do fármaco foi o fator que mais contribuiu para a elevação do mesmo. Os valores de pH obtidos nas nanocápsulas peguilhadas de risperidona com Tc, Ca, Ge, Li e Ge foram comparados estatisticamente em relação à concentração do polímero, óleo e fármaco, e não apresentaram diferença entre si ($p \leq 0,05$) (Figura 8.4).

O pH é um parâmetro importante a ser avaliado, já que o mesmo pode interferir no potencial zeta das formulações, que por sua vez, influencia na estabilidade das mesmas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Também parece ser fator importante no controle de tamanho de partículas e, conseqüentemente na sua biodistribuição, pois dependendo do tamanho elas poderão ultrapassar as aberturas das barreiras endoteliais

chamadas de janelas (GAUMET et al., 2008). Segundo Lopes e colaboradores (2000) e Sinha e colaboradores (2004), valores de pH ácidos poderiam ocasionar o relaxamento das cadeias poliméricas do PCL, levando a uma maior exposição dos grupos ácidos carboxílicos terminais, causando a hidrólise do poliéster. Sendo assim, podemos concluir que o pH relativamente neutro, encontrados no estudo, poderá contribuir para a estabilidade das suspensões de nanocápsulas de risperidona.

Külkamp e colaboradores (2009) atribuíram os valores levemente ácidos de pH encontrados em suas suspensões de nanocápsulas a dois fatores: a presença do fármaco com caráter ácido e a do polímero poli(ϵ -caprolactona). Como a risperidona é uma base forte, devemos pensar que talvez parte dela esteja aderida a superfície do polímero, contribuindo para deixar as nossas suspensões com pH próximo a neutralidade.

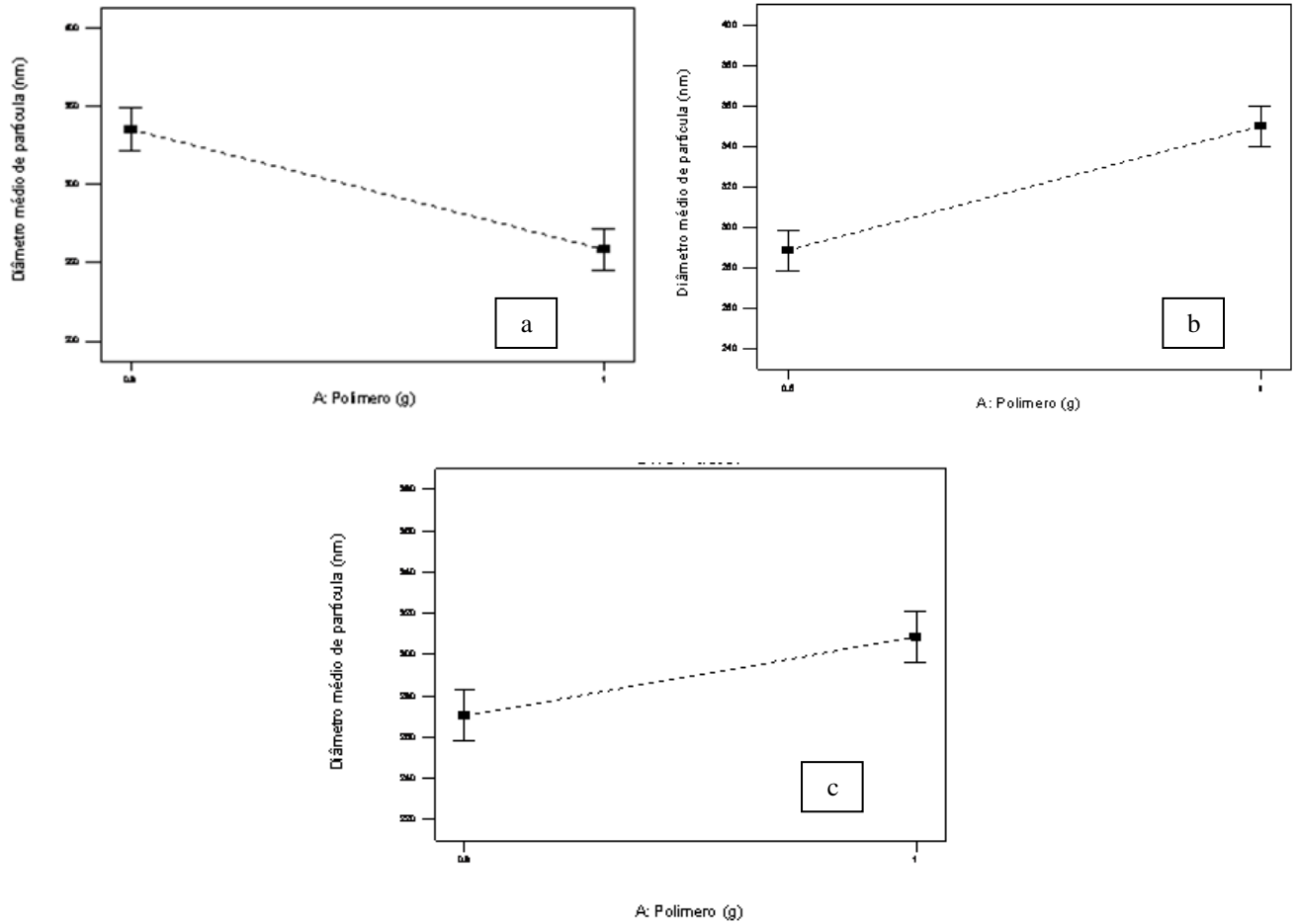
Figura 8.4 – Representação gráfica do pH obtido nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.



8.5.4 Análise dos fatores que influenciaram na distribuição do diâmetro médio

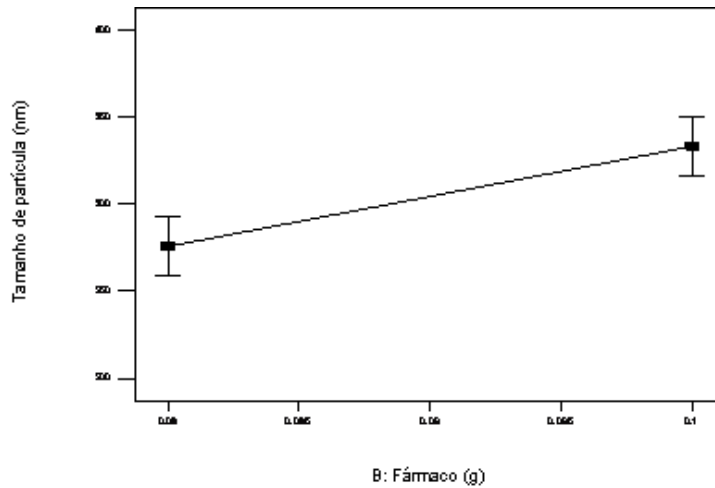
Quando analisamos a distribuição do diâmetro médio de partícula, a concentração do polímero foi a única variável que afetou significativamente ($p \leq 0,05$) esse parâmetro para as NcTc, NcGe e NcLi. Quanto maior a concentração do polímero, menor o diâmetro de partícula encontrado para as NcTc e para as NcLi e NcGe, quanto menor a concentração do polímero, menor o tamanho encontrado, conforme demonstrado na figura 8.5.

Figura 8.5 – Representação gráfica do fator que alterou significativamente o diâmetro médio das NcTc (a), NcLi (b) e NcGe (c).



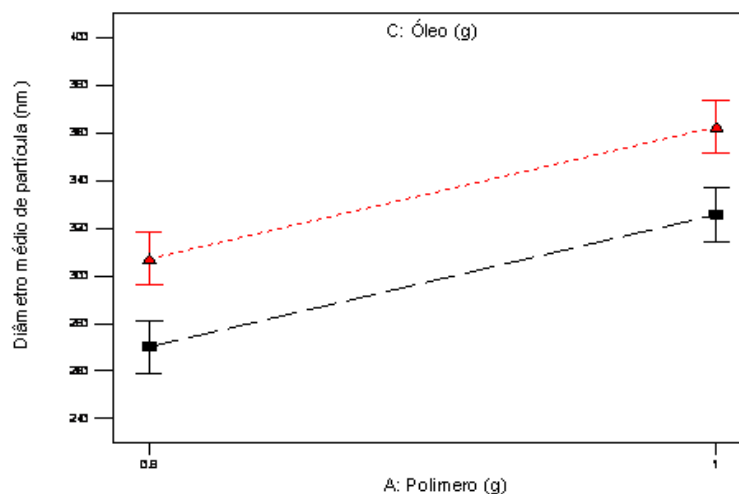
Para as NcCt, a concentração do fármaco foi o único fator que alterou significativamente ($p \leq 0,05$) na distribuição do diâmetro médio de partícula. Na figura 8.6, podemos perceber que o tamanho do diâmetro médio aumenta quando a concentração do fármaco está mais elevada.

Figura 8.6 – Representação gráfica do fator que altera significativamente o diâmetro médio das partículas para as NcCa-PEG.



A interação entre óleo e polímero alterou significativamente ($p \leq 0,05$) na distribuição do diâmetro médio das partículas nas NcBa, conforme demonstrado na figura 8.7. Quanto maior a concentração do polímero e do óleo, maior foi o tamanho médio das nanocápsulas.

Figura 8.7 – Representação gráfica do fator que altera significativamente o diâmetro médio das partículas para as NcBa.



Legenda: (linha vermelha = (óleo a 3,5%); linha preta = (óleo a 3,0%).

Os valores de distribuição do diâmetro médio de partícula encontrados no presente estudo estão de acordo com o descrito na literatura, que ficam na faixa de 250 a 500 nm, para as nanocápsulas obtidas a partir de polímeros pré-formados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Para as NcTc, NcCa, NcGe, NcLi e NcBa os valores de diâmetro médio estão entre 220 a 386 nm; 231 a 371 nm, 231 a 365 nm, 275 a 376 e 218 nm a 349 nm respectivamente (Tabela 8.4).

Entre os principais fatores que podem alterar o diâmetro das partículas estão a natureza e concentração do polímero na fase orgânica, a polaridade dos solventes, a natureza e proporção das fases interna/externa e a natureza e concentração dos tensoativos (ZILI; SFAR; FESSI, 2005). Alguns autores não encontraram correlação entre a natureza e concentração do fármaco com o diâmetro de partícula (GUTERRES et al., 1995; JOO et al., 2008), mas para outros essa correlação pode ser percebida (DALENÇON et al., 1997; FESSI et al., 1989; QUINTANAR et al., 1998; STELLA et al., 2007). Almeida e colaboradores (2009) estudaram a viabilidade da preparação de nanocápsulas com óleo de semente de uva e de amêndoas e relataram que o óleo utilizado influenciou no tamanho médio e no potencial zeta das formulações.

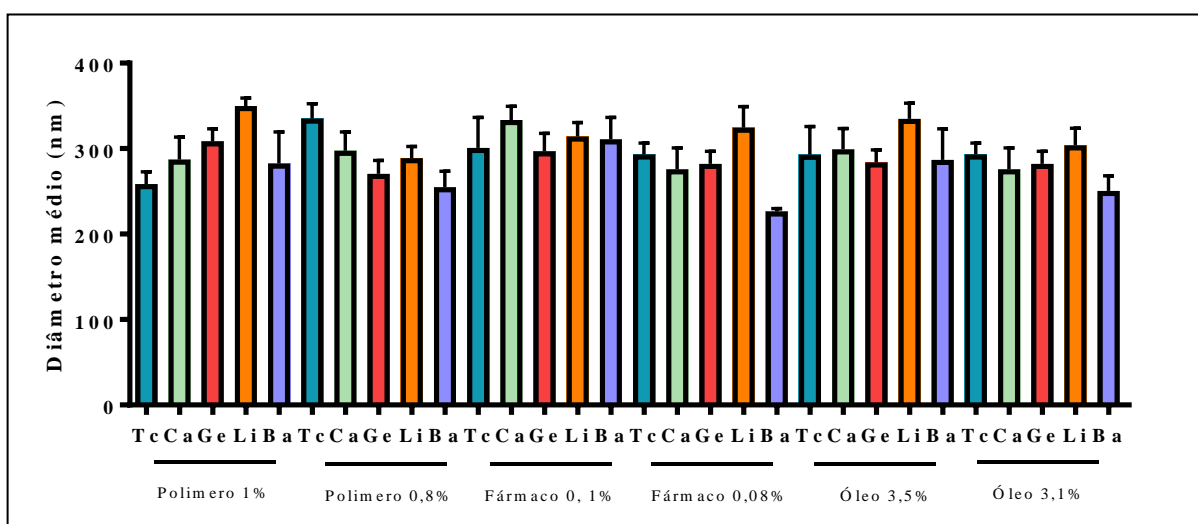
A utilização de monômeros ou polímeros também pode influenciar nesse parâmetro. Os monômeros podem conduzir à diminuição de tamanho de partícula em relação à emulsão devido, provavelmente, à redução da energia livre interfacial do sistema, já os polímeros podem ter um efeito estabilizador ao redor das gotículas. Outra situação a ser considerada quando utilizamos polímeros é a presença do fármaco na fase orgânica, antes da precipitação do mesmo, podendo esse fator aumentar ou diminuir o diâmetro médio (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Para as NcTc, NcLi e NcGe, a concentração do polímero foi o fator que influenciou significativamente no tamanho médio, sendo que para as NcCa, foi a quantidade de fármaco presente na formulação e para as NcBa, foi a associação de fármaco e óleo. Os valores de diâmetro médio obtidos nas nanocápsulas peguiladas de risperidona com Tc, Ca, Li, Ba e Ge foram comparados por ANOVA, e não apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre si, em relação à concentração do polímero, óleo e fármaco (Figura 8.8). Estudos mais aprofundados sobre a interação dos componentes da formulação se fazem necessários, tendo em vista que o único diferencial entre as nanocápsulas era o óleo e esse componente, apesar de não ter aparecido como um fator impactante pode alterar a viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias empregadas (SCHAFFAZICK et al., 2003), interferindo assim de maneira indireta no resultado final.

Gao e Jiang (2006) avaliaram a influência do tamanho de partícula no transporte de metotrexato pela barreira hematoencefálica (BHE). Os autores concluíram que as nanopartículas de metotrexato desenvolvidas com poli(cianoacrilato de butila) e revestidas com polissorbato 80, que apresentavam diâmetro inferior a 100 nm tiveram melhor desempenho. Em contrapartida, Bernardi e colaboradores (2012) avaliaram a ação de nanocápsulas lipídicas de indometacina (226 nm) no tratamento do Alzheimer e Ianiski e colaboradores (2012), avaliaram a ação do meloxicam (283 a 285 nm) sobre a memória e comprovaram a ação *in vivo* dos fármacos, com nanopartículas maiores do que 100 nm. Voigt e colaboradores (2014), em um estudo recente, testaram a passagem de diversos tamanhos de nanopartículas poliméricas pela BHE, que variaram de 67 a 464 nm, e concluíram que, ao contrário do que se pensava, as nanopartículas com menor diâmetro tiveram um pior desempenho, que as de maior tamanho.

Sendo assim, acredita-se que o diâmetro médio obtido com as nanocápsulas de risperidona em diferentes óleos, não será um fator limitante para a penetração das mesmas pela BHE.

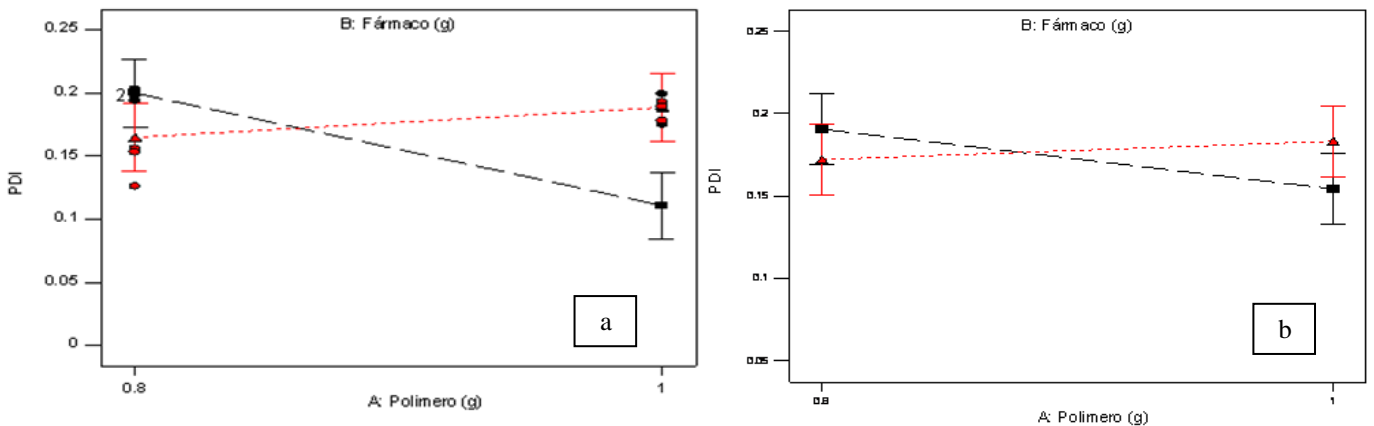
Figura 8.8 – Representação gráfica dos diâmetros médios obtidos nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.



8.5.5 Análise dos fatores que influenciaram no índice de polidispersão

Os índices de polidispersão (PDI) para as NcTc, NcLi e NcBa, foram alterados significativamente pela combinação de polímero-fármaco ($p \leq 0,05$). Quando o polímero está na concentração de 1% nas formulações e o fármaco na sua concentração mais baixa, o PDI diminui significativamente, porém quando o fármaco está na concentração de 0,1%, pouca variação ocorre (Figura 8.9).

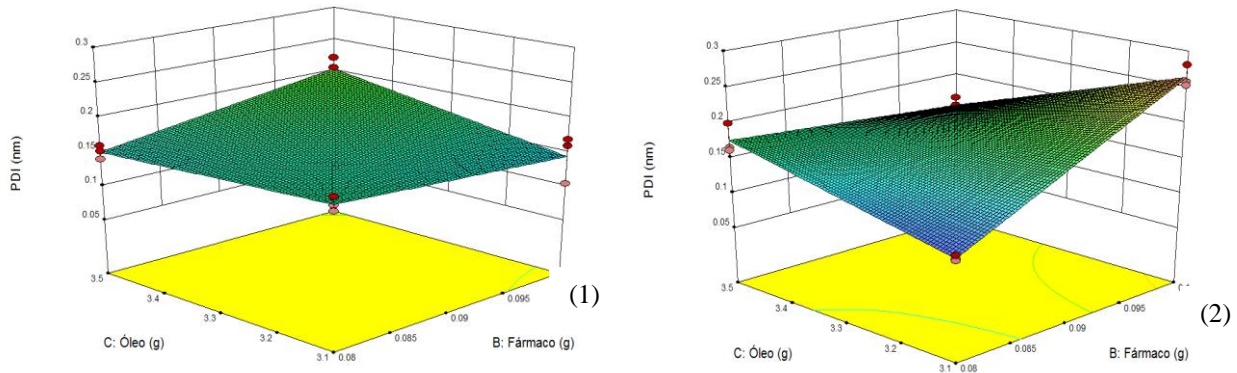
Figura 8.9 – Representação gráfica da interação entre os fatores que influenciaram o PDI para as NcTc (a) e NcBa (b).



Legenda: linha vermelha = (fármaco 0,1%); linha preta = (fármaco a 0,08%).

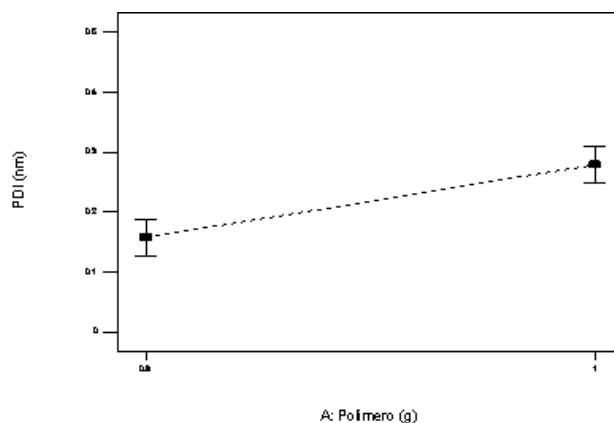
A combinação dos três fatores, fármaco, óleo e polímero, alteraram significativamente ($p \leq 0,05$) os valores de PDI para as NcCa. Quando o polímero está a 1% na formulação (Figura 8.10.1), o aumento na concentração do fármaco e do óleo (3,5%) fez o mesmo aumentar, o que não aconteceu quando o óleo estava a 3,1%. Na figura 8.10.2, quando o polímero está a 0,8%, o inverso ocorre, o PDI aumenta quando diminuimos a concentração do óleo e aumentamos a do fármaco.

Figura 8.10 – Representação gráfica (3D) da interação entre fármaco-polímero-óleo e sua influência na distribuição do PDI para as NcCa.



Legenda: (1) = polímero na concentração de 1%; (2) = polímero na concentração de 0,8%.

Figura 8.11– Representação gráfica do fator que altera significativamente o PDI para as NcGe.

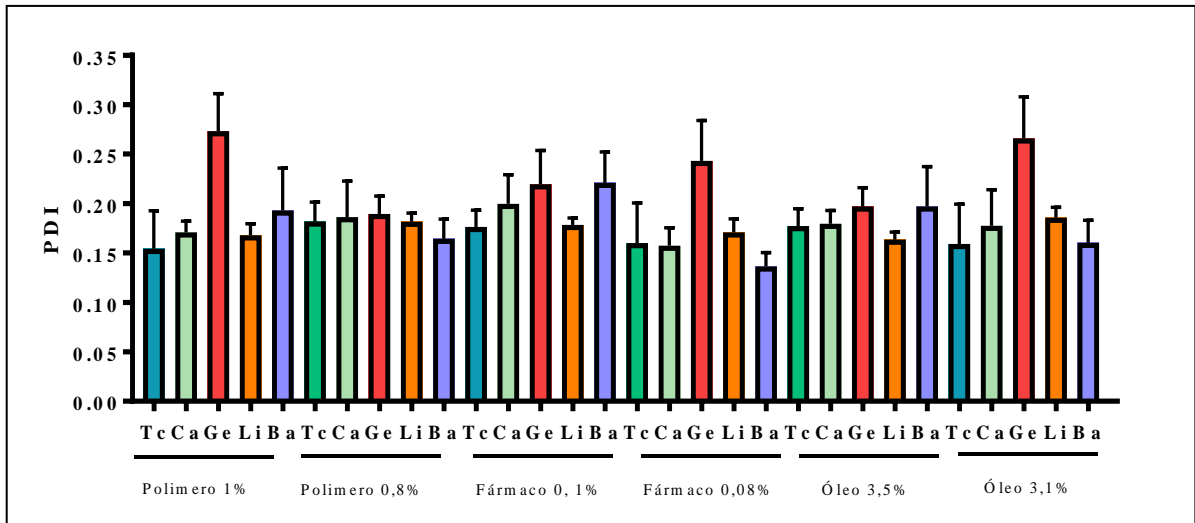


Segundo Wu e colaboradores (2011), valores de índice de polidispersão (PDI) entre 0,1 a 0,25, indicam uma faixa estreita distribuição e valores acima de 0,5, uma ampla faixa. O PDI das NcTc, NcCa, NcGe, NcLi e NcBa variou de 0,136 a 0,203, de 0,107 a 0,264, de 0,150 a 0,355, 0,141 a 0,207 e 0,107 a 0,201, respectivamente. (Tabela 8.5). De uma forma geral, a diminuição na concentração do polímero foi determinante para a diminuição do índice de polidispersão, com exceção para a formulação contendo óleo de gergelim e bacalhau.

Os valores de PDI obtidos nas nanocápsulas peguladas de risperidona com Tc, Ca, Li, Ba e Ge foram comparados por ANOVA, e não apresentaram diferença estatística

significativa ($p \leq 0,05$) entre si, em relação à concentração do polímero, óleo e fármaco (Figura 8.12).

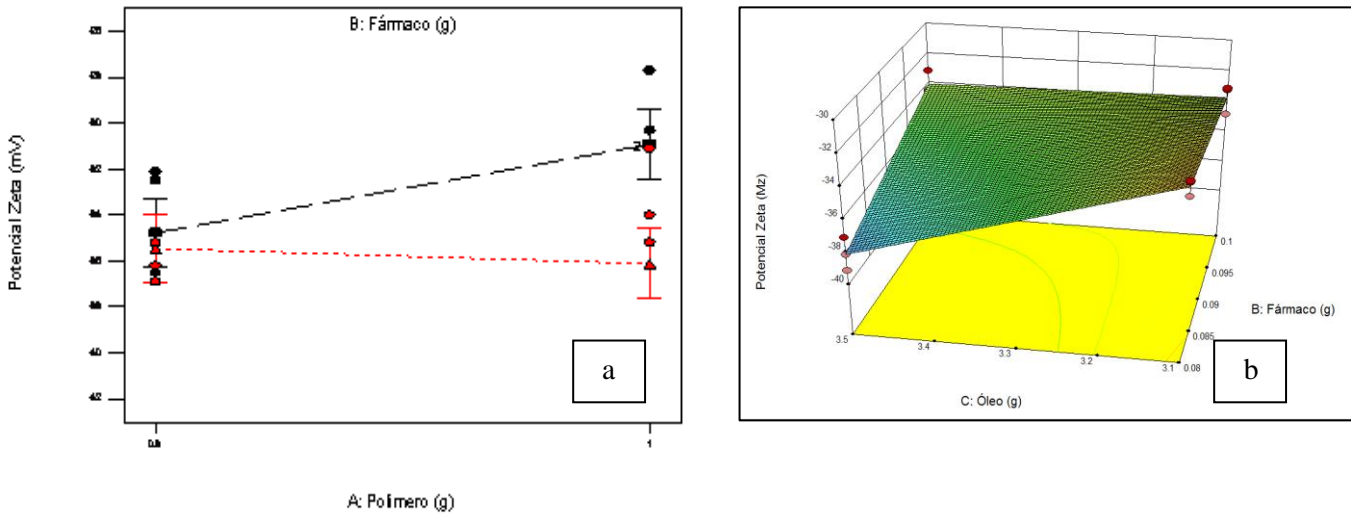
Figura 8.12 – Representação gráfica dos índices de polidispersão obtidos nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.



8.5.6 Análise dos fatores que influenciaram no potencial zeta

Para as NcTc e NcBa, os fatores que alteraram significativamente ($p \leq 0,05$) o potencial zeta foi a associação de polímero-fármaco, sendo que quando o fármaco está na concentração de 0,08%, o acréscimo na quantidade de polímero fez o potencial diminuir consideravelmente. Praticamente não houve alteração quando o fármaco está na concentração de 0,1% (Figura 8.13).

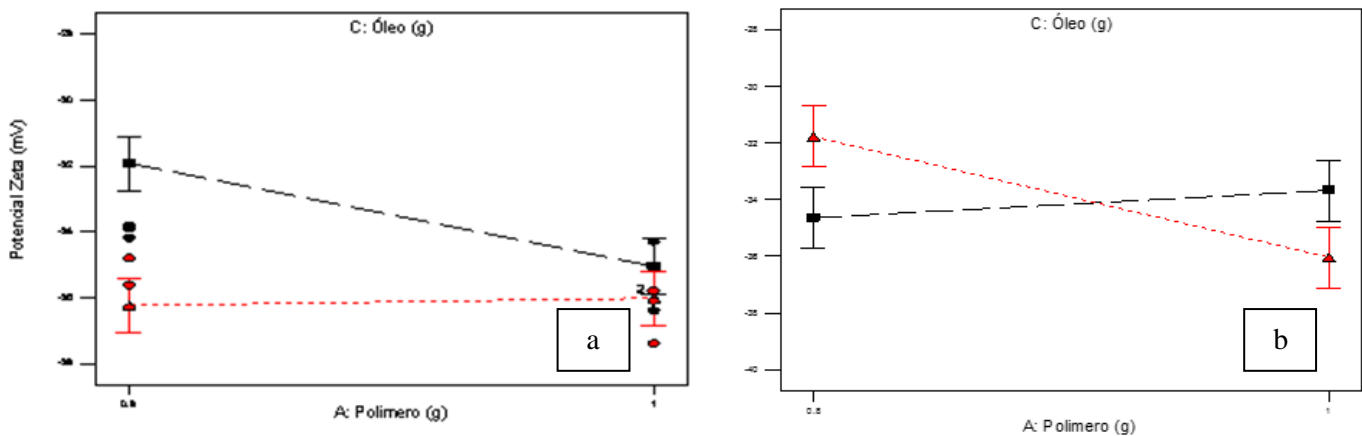
Figura 8.13 – Representação gráfica dos fatores que alteram significativamente o potencial zeta para as NcTc (a) e NcBa (b).



Legenda: linha vermelha = (fármaco 0,1%); linha preta = (fármaco a 0,08%).

Quando avaliamos estatisticamente o potencial zeta obtidos para as NcCa e NcLi verificamos que a combinação de óleo e polímero alterou significativamente ($p \leq 0,05$) esse parâmetro, porém de forma diferenciada. Para as NcCa (a) a menor concentração do óleo (3,1%) e a maior concentração do polímero contribuiu para um aumento no potencial, sendo que o inverso ocorreu com as NcLi (b), conforme demonstrado na Figura 8.14.

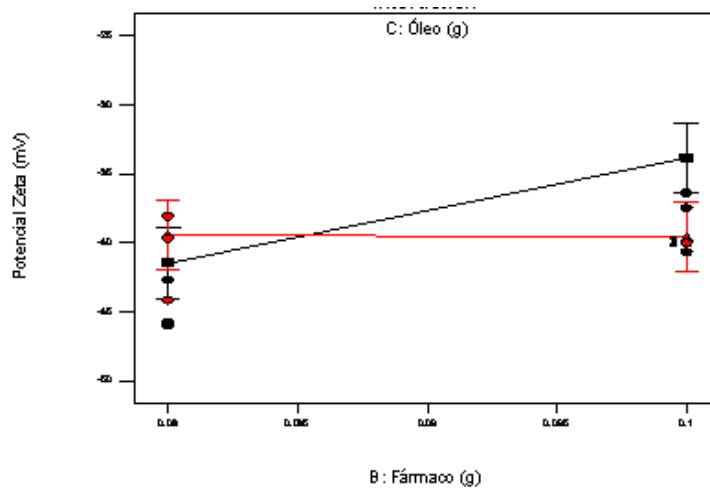
Figura 8.14 – Representação gráfica dos fatores que alteram significativamente o potencial zeta para as NcCa (a) e NcLi (b).



Legenda: linha vermelha = (óleo 3,5%); linha preta = (óleo 3,1%).

Conforme demonstrado na figura 8.15, o fármaco e a associação fármaco-óleo alteraram significativamente ($p \leq 0,05$) os valores de potencial para as nanocápsulas de risperidona com Ge. Quando o óleo está na concentração de 3,1% e o fármaco a 0,1%, o potencial zeta diminui, sendo praticamente constante quando o óleo está na sua maior concentração.

Figura 8.15 – Representação gráfica dos fatores que alteram significativamente o potencial zeta para as NcGe.



Legenda: linha vermelha = (óleo 3,5%); linha preta = (óleo 3,1%).

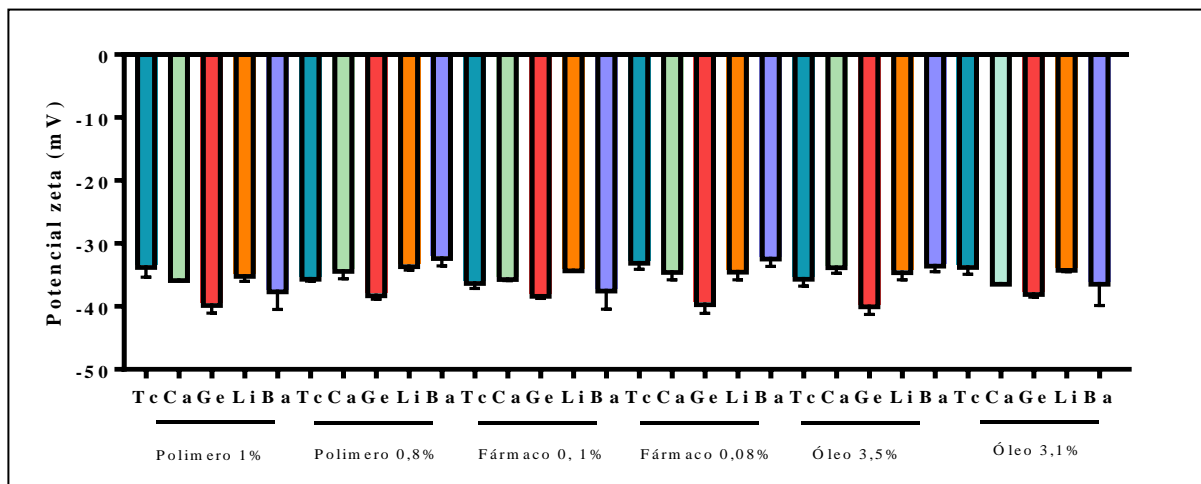
O potencial zeta das NcTc, NcCa, NcGe, NcLi e NcBa variou de -29,7 a -38,8, -29,8 a -36,9, -36,4 a -43,7, -30,9 a -38,1 e de -28,2 a -46,7, respectivamente (Tabela 8.6). O potencial de superfície das partículas apresentou valores negativos, semelhantes aos relatados na literatura para nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com PEG. Os valores negativos são devidos às características estruturais dos componentes da interface das partículas, poli(ϵ -caprolactona) e especialmente o polissorbato 80, que promove a formação das micelas, mas também estabiliza as partículas por impedimento estérico (KÜLKAMP et al., 2009).

A presença de PEG na superfície das nanocápsulas não reduziu os valores do potencial zeta, quando comparado com as formulações branco (NcTcB= -33,00; NcCa = -33,33; NcGe = -30,2, NcLi = -33,4 e NcBa = -34,5). Artigos que descrevem o potencial zeta de nanocápsulas revestidas com PEG têm sido publicados com as mesmas conclusões, sendo

relatado que somente os PEGs de cadeia longa diminuem o potencial (AMELLER et al., 2003; MOSQUEIRA et al., 2001).

A presença do óleo nas formulações contribuiu para a alteração do potencial nas NcCa, NcGe e NcLi. Resultados semelhantes foram relatados por Calvo e colaboradores (1996), onde os autores sugerem que a camada polimérica, que reveste as gotículas do óleo, é um filme delgado ou, segundo Losa e colaboradores (1993), que essa camada possa não ser contínua. Esse fato pode estar relacionado com a composição química dos óleos, já que o Ca, Li e Ge são óleo vegetais, ricos em gorduras insaturadas, podendo modificar a interação com os demais componentes da formulação. Rigo e colaboradores (2014), que também trabalharam com óleos vegetais, não tiveram diferenças em relação ao índice de polidispersão, mas não fizeram a comparação com um óleo de outra origem. Os valores obtidos no estudo do potencial zeta, nas nanocápsulas peguiladas de risperidona com Tc, Ca, Li, Ba e Ge foram comparados por ANOVA, e não apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre si, em relação à concentração do polímero, óleo e fármaco (Figura 8.16).

Figura 8.16 – Representação gráfica do potencial zeta obtido, nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.



8.5.7 Teor

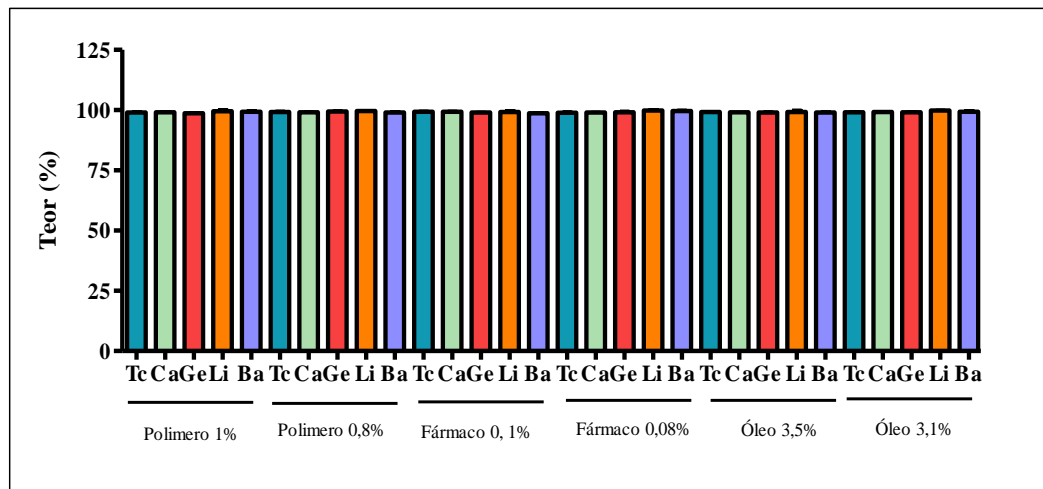
Os teores obtidos para as NcTc, NcCa, NcGe, NcLi e NcBa ficaram todos na faixa de 97,48 a 100,73%, sendo que nenhum dos fatores estudados interferiu significativamente neste

parâmetro. Quando os valores obtidos entre as nanocápsulas foram comparados por ANOVA, não apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre si, em relação à concentração do polímero, óleo e fármaco (Figura 17).

Não encontramos na literatura pesquisada uma faixa ideal de teor para os sistemas nanoestruturados, mas de uma maneira geral, as farmacopeias preconizam um limite de variação de 10%, para os produtos comerciais, o que resultaria numa faixa de variação de 90 a 110%, o que nos permite concluir que os valores encontrados são satisfatórios.

Consideramos o resultado positivo, demonstrando que o fármaco não sofreu degradação no processo de preparação das nanocápsulas e que o método de extração do ativo foi eficiente.

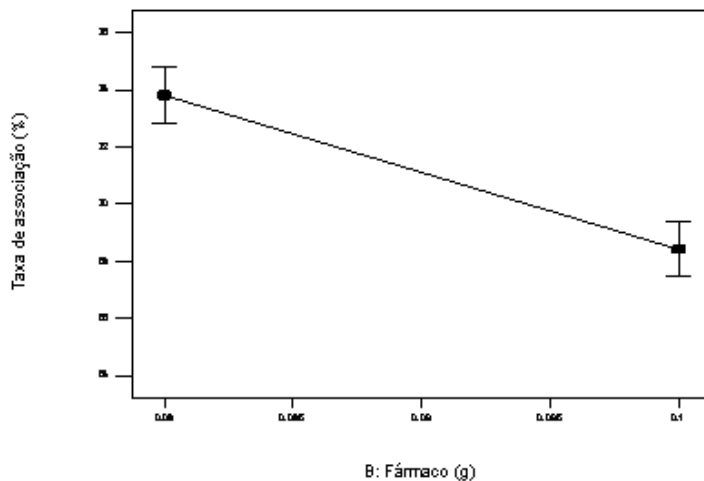
Figura 8.17 – Representação gráfica dos teores obtidos nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.



8.5.8 Taxa de associação

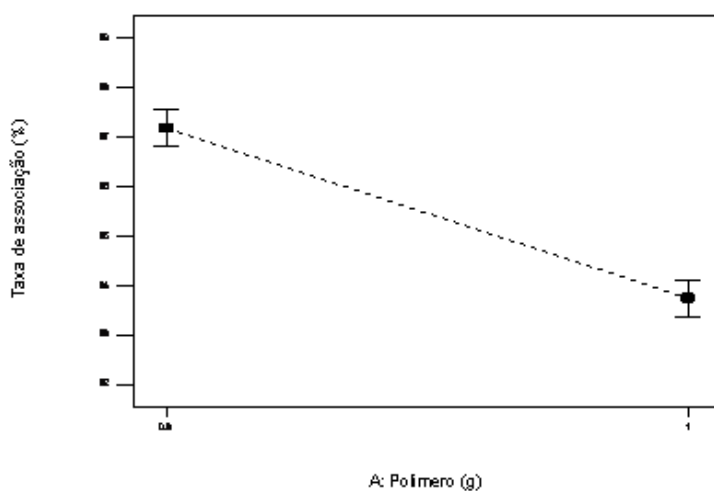
Quando avaliamos estatisticamente os valores obtidos nas taxas de associação para as NcTc, verificamos que somente a variável fármaco alterou significativamente esse parâmetro ($p \leq 0,05$). Quando a concentração do fármaco é menor, melhor é a taxa de associação, conforme demonstrado na figura 8.18.

Figura 8.18 – Representação gráfica do fator que altera significativamente a taxa de associação para as NcTc.



Para as NcCa, o polímero foi o único fator que alterou significativamente a taxa de associação ($p \leq 0,05$), sendo que quanto menor a concentração de polímero foi utilizada, maior foi a taxa de associação obtida.

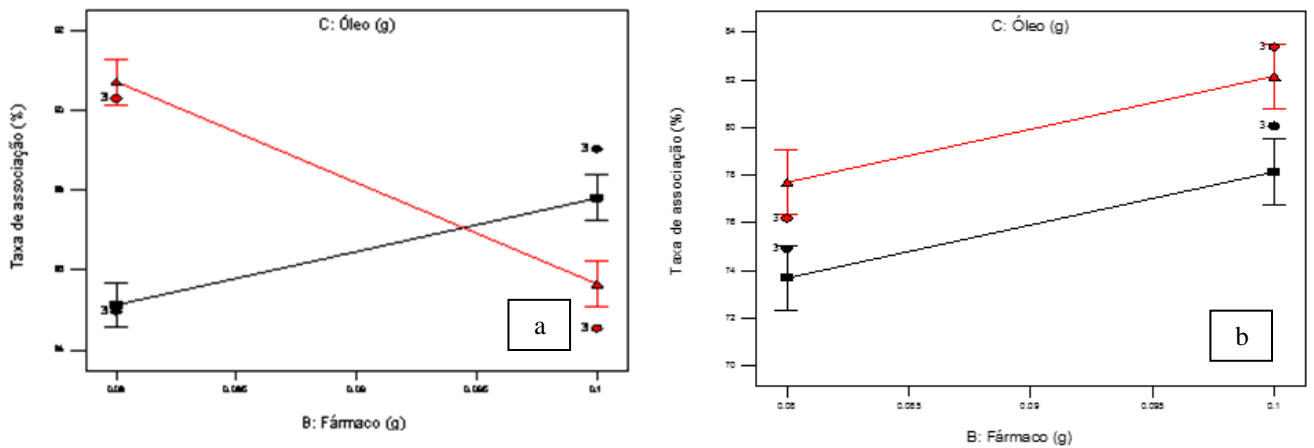
Figura 8.19 – Representação gráfica do fator que altera significativamente a taxa de associação para as NcCa.



Conforme demonstrado na figura 8.20, o fármaco e o óleo contribuíram para alterar significativamente a taxa de associação ($p \leq 0,05$) das NcGe e NcBa, porém de forma diferente.

Para as NcGe, de uma maneira geral, as melhores taxas foram obtidas com a menor concentração de fármaco e a maior concentração de óleo, porém para as NcBa, as melhores taxas foram obtidas com a maior concentração de fármaco e óleo.

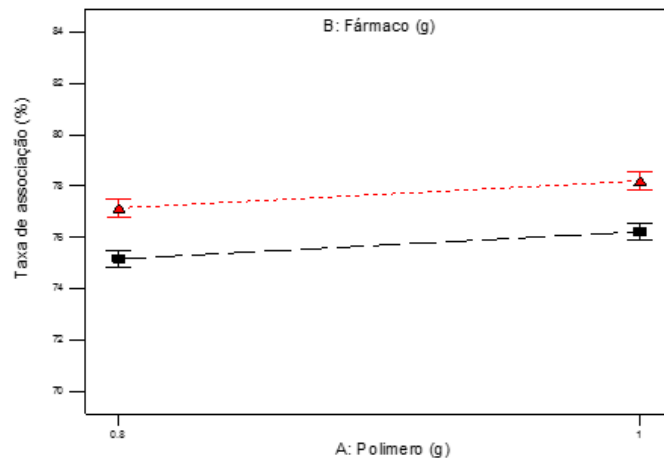
Figura 8.20 – Representação gráfica dos fatores que alteram significativamente a taxa de associação para as NcGe (a) e NcBa (b).



Legenda: linha vermelha = (óleo 3,5%); linha preta = (óleo 3,1%).

Para as NcLi, o polímero e o fármaco alteraram significativamente a taxa de associação ($p \leq 0,05$), sendo que quanto maior a concentração do fármaco, melhores foram os resultados obtidos (Figura 8.21).

Figura 8.21 – Representação gráfica dos fatores que alteram significativamente a taxa de associação para as NcLi.

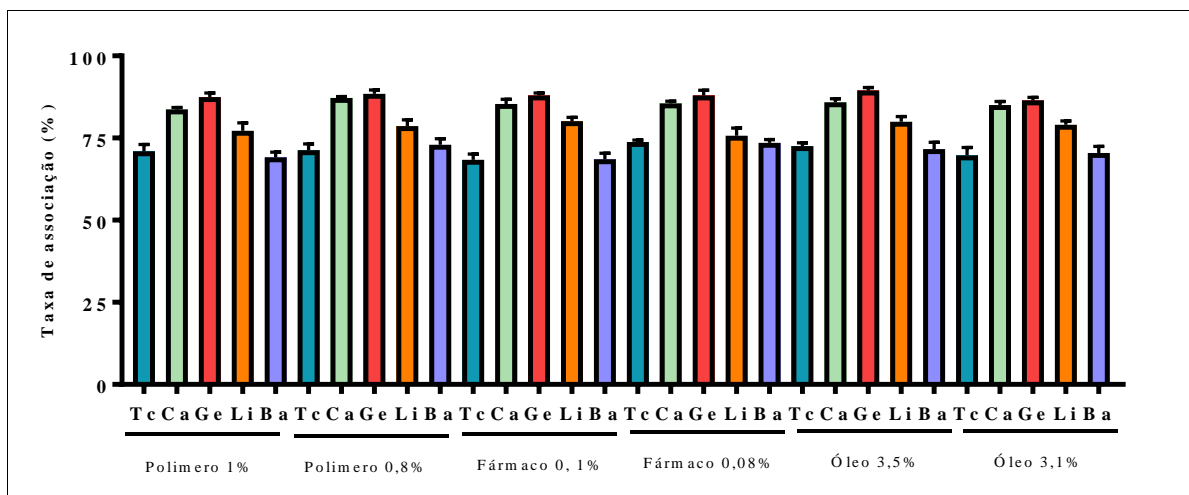


Diversos fatores podem interferir na quantidade de fármaco associado ao sistema nanoestruturado, como por exemplo, as propriedades físico-químicas do fármaco, pH do meio, características da superfície da partícula, quantidade de fármaco adicionado a formulação (MOHANRAJ; CHEN, 2006). A utilização do PEG praticamente não tem influência sobre a taxa de associação (PERACCHIA et al., 1997). A taxa de associação para as NcTc ficou entre 64,66 a 74,92%, para as NcCa de 82,49 a 88,25%, de NcGe de 84,96 a 91,16%, de NcLi 70,52 a 83,38% e de 65,93 a 75,35% para as NcBa. (Tabela 8.8).

Mora-Huertas e colaboradores (2010) relatam que quando utilizamos o método de precipitação os compostos lipofílicos têm maior taxa de encapsulação, que os hidrofílicos, ficando com valores superiores a 70%. Nestes métodos, um dos critérios mais importantes é a solubilidade do ativo no óleo utilizado. A risperidona apresentou solubilidade de 2,1mg/mL, no TC, de 3,8 mg/mL no Ca, 3,3 mg/mL no Ge, 3,3 mg/mL no Li e 2,2 mg/mL no Ba. Apesar de trabalharmos em concentrações inferiores a saturação do óleo, podemos observar que esses fatores influenciaram diretamente na taxa de associação, para as NcGe e NcBa, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparados por ANOVA, nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis. A concentração do fármaco influenciou a taxa de associação das NcTc e as variáveis fármaco e polímero as NcLi. Esses três fatores foram selecionados como variáveis do estudo, pois são os mais citados na literatura por influenciarem esse parâmetro, o que se confirmou nesse estudo (Figura 8.22). A taxa de associação não permite determinar se o fármaco está dissolvido no óleo e/ou adsorvido à parede polimérica, mas o pH neutro das formulações nos leva a acreditar que há mais de uma forma de interação entre os componentes da formulação e que a presença do fármaco livre, ou aderido a superfície da parede polimérica contribuiu para esses valores.

Quando mais de um fator é alterado simultaneamente em uma formulação a interação entre eles pode produzir uma resposta diferente da esperada (MAHAJAN, TATIYA e NERKAR, 2012). Segundo descrito por Montgomery (2001), esses valores podem ser calculados e o estudo dessas interações é a chave para obter as condições ideais do estudo. O delineamento experimental utilizado foi o método fatorial, a fim de investigar as variáveis do processo que têm o maior impacto no produto final, com o número mínimo de ensaios experimentais.

Figura 8.22 – Representação gráfica das taxas de associação, nos 2 níveis de variação e suas 3 variáveis.



Por meio da análise de variância (ANOVA – 3 vias) estabeleceram-se as equações para a predição de valores, baseadas nas respostas obtidas por cada fator, sendo utilizada a seguinte codificação para as variáveis dependentes: (A) polímero, (B) fármaco e (C) óleo. A união de letras representa a interação entre dois ou mais fatores. As equações do pH, PDI, diâmetro médio de partícula, potencial zeta e taxa de associação estão descritas abaixo, para as NcTc (Equações de 8.1 a 8.5), NcCa (Equações de 8.6 a 8.10), NcGe (Equações de 8.10 a 8.15), NcLi (Equações de 8.16 a 8.20) e NcBa (Equações de 8.21 a 8.25), respectivamente.

- NcTc

$$\text{pH} = 7,07 + 0,03A + 0,058B - 3,028^{-16} + 0,092AB \quad (8.1)$$

$$\text{PDI} = 0,17 - 0,016A + 0,011B + 0,028AB \quad (8.2)$$

$$\text{Diâmetro médio de partícula} = 296,94 - 38,38A + 3,75B \quad (8.3)$$

$$\text{Potencial zeta} = -4,31 + 0,80A - 1,47B - 1,13AB \quad (8.4)$$

$$\text{Taxa de associação} = 71,11 - 2,70B \quad (8.5)$$

- NcCa

$$\text{pH} = 7,05 + 0,071B \quad (8.6)$$

$$\text{PDI} = 0,17 - 0,00245A + 0,022B - 0,0017C - 0,011AB + 0,00879AC - 0,015BC + 0,030ABC \quad (8.7)$$

$$\text{Diâmetro médio de partícula} = 304,60 + 28,78B \quad (8.8)$$

$$\text{Potencial zeta} = -34,81 - 0,7A - 1,32C + 0,84AC \quad (8.9)$$

$$\text{Taxa de associação} = 85,46 - 1,72A \quad (8.10)$$

- NcGe

$$\text{pH} = 6,80 + 0,034A + 0,034B - 0,012AC + 0,045BC \quad (8.11)$$

$$\text{PDI} = 0,22 + 0,061A \quad (8.12)$$

$$\text{Diâmetro médio de partícula} = 290,50 + 20,62A + 7,07B + 8,88C + 18,46BC \quad (8.13)$$

$$\text{Potencial zeta} = -38,60 + 1,87B - 0,92C - 1,96BC \quad (8.14)$$

$$\text{Taxa de associação} = 87,33 - 0,60B + 0,86C - 1,94BC \quad (8.15)$$

- NcLi

$$\text{pH} = 7,34 + 0,079B \quad (8.16)$$

$$\text{PDI} = 0,18 - 6^{-3}A + 2,91^{-3}B + 0,01AB \quad (8.17)$$

$$\text{Diâmetro médio de partícula} = 319,31 + 30,62A \quad (8.18)$$

$$\text{Potencial zeta} = -34,03 - 0,8A + 0,13C - 1,31AC \quad (8.19)$$

$$\text{Taxa de associação} = 77,92 + 2,23B + 2,01C \quad (8.20)$$

- NcBa

$$\text{pH} = 7,21 + 0,16A \quad (8.21)$$

$$\text{PDI} = 0,17A + 0,037B \quad (8.22)$$

$$\text{Diâmetro médio de partícula} = 268,67 + 42,27B \quad (8.23)$$

$$\text{Potencial zeta} = -34,63 - 2,63A - 2,53B \quad (8.24)$$

$$\text{Taxa de associação} = 71,03 - 1,92A - 2,5B \quad (8.25)$$

Conforme demonstrado nas equações de 8.1 a 8.25, a interação entre os fatores ocorreu de várias formas, indicando que resposta nem sempre é linear. Quando mais de um fator é alterado simultaneamente e utilizado em uma mesma formulação, podem ocorrer diferentes graus de respostas, sendo eles positivos ou não (MAHAJAN, TATIYA e NERKAR, 2012).

Os resultados apresentados nas tabelas de 8.9 a 8.13 expressam a comparação entre os valores observados e os valores previstos para todas as formulações estudadas, indicando uma boa correlação entre eles. Pode-se concluir que as equações descrevem adequadamente a influência das variáveis independentes das respostas em estudo, indicando que a técnica de otimização se mostrou adequada para o desenvolvimento de nanocápsulas de risperidona com diferentes óleos, comprovando a alta capacidade prognóstica da técnica utilizada.

Com base nos resultados obtidos, escolhemos as formulações que apresentaram melhor taxa de associação, mas com um diâmetro e potencial zeta adequados, baixo PDI e que

o valor predicativo estivesse coerente com o prático. Sendo assim selecionamos as seguintes formulações: NcTc-F7, NcBa-F8, NcGe-F4, NcCa-F4 e NcLi-F4 para prosseguir com os estudos de liberação *in vitro*.

Tabela 8.9 – Predição dos valores, valores observados e erro de predição para as formulações de NcTc.

Formulação	PV	VO	EP (%)		PV	VO	EP (%)
1	7,3	7,2	-0,7	pH	0,188	0,191	1,596
2	7,3	7,3	0,7		0,188	0,187	-0,532
3	7,0	7,1	1,4		0,164	0,185	12,805
4	7,0	7,0	0,0		0,164	0,145	-11,585
5	7,0	6,8	-2,2		0,140	0,136	-2,857
6	7,0	7,1	2,2		0,140	0,157	12,143
7	7,1	7,1	0,4		0,200	0,202	1,000
8	7,1	7,0	-1,0		0,200	0,203	1,500
1	262	249	-4,73	Diâmetro médio de partícula	-36,11	-38,8	7,45
2	262	231	-11,86		-36,11	-33,4	-7,50
3	339	313	-7,63		-35,45	-34,9	-1,55
4	339	330	-2,64		-35,45	-36,8	3,81
5	254	298	16,95		-30,91	-31,8	2,88
6	254	252	-1,02		-30,91	-29,7	-3,91
7	331	317	-4,39		-34,77	-35,8	2,96
8	331	300	-9,46		-34,77	-33,8	-2,79
1	68,41	64,66	-5,48	Taxa de associação (%)	99,37	99,37	0,00
2	68,41	72,58	6,10		99,61	99,61	0,00
3	68,41	66,93	-2,16		98,75	98,75	0,00
4	68,41	69,48	1,56		99,56	99,56	0,00
5	73,81	72,37	-1,95		98,33	98,34	0,01
6	73,81	74,06	0,34		98,56	98,56	0,00
7	73,81	74,92	1,50		99,63	99,8	0,17
8	73,81	73,88	0,09		98,94	98,95	0,01

PV = predição do valor; VO = valor observado; EP (%) = erro de predição (valor observado – predição do valor)/ predição do valor x 100%.

Tabela 8.10 – Predição dos valores, valores observados e erro de predição para as formulações de NcCa.

Formulação		PV	VO	EP (%)		PV	VO	EP (%)
1	pH	7,1	7,2	1,12	PDI	0,159	0,159	0,00
2		7,1	7,1	-0,14		0,203	0,204	0,49
3		7,1	7,3	2,53		0,264	0,264	0,00
4		7,1	6,8	-4,49		0,153	0,153	0,00
5		7,0	6,9	-1,00		0,167	0,167	0,00
6		7,0	7,0	0,43		0,15	0,151	0,67
7		7,0	7,0	0,43		0,107	0,107	0,00
8		7,0	7,0	0,43		0,176	0,176	0,00
1	Diâmetro médio (nm)	333	293	-11,83	Potencial zeta (mV)	-35,05	-35,5	1,28
2		333	357	7,20		-36,02	-36,4	1,05
3		333	361	8,52		-31,92	-34,0	6,52
4		333	320	-3,89		-36,24	-35,6	-1,77
5		275	263	-4,54		-35,05	-34,6	-1,28
6		275	234	-15,16		-36,01	-35,6	-1,14
7		275	257	-6,53		-31,92	-29,8	-6,64
8		275	348	26,21		-36,24	-36,9	1,82
1	Taxa de associação (%)	83,74	82,49	-1,49	Teor (%)	99,91	99,91	0,00
2		83,74	83,38	-0,43		99,08	99,09	0,01
3		87,17	87,35	0,21		99,02	99,04	0,02
4		87,17	88,25	1,24		99,04	99,05	0,01
5		83,74	83,97	0,27		98,53	98,53	0,00
6		83,74	85,13	1,66		99,08	99,08	0,00
7		87,17	86,26	-1,04		99,28	99,28	0,00
8		87,17	86,84	-0,38		99,09	99,09	0,00

PV = predição do valor; VO = valor observado; EP (%) = erro de predição (valor observado – predição do valor)/ predição do valor x 100%.

Tabela 8.11 – Predição dos valores, valores observados e erro de predição para as formulações de NcGe.

Formulação	PV	VO	EP (%)		PV	VO	EP (%)
1	6,8	6,8	0,29	pH	0,279	0,313	12,19
2	6,8	6,9	0,88		0,279	0,192	-31,18
3	6,8	6,8	0,29		0,187	0,222	18,72
4	6,8	6,7	-2,05		0,187	0,150	-19,79
5	6,8	6,8	0,15		0,279	0,355	27,24
6	6,7	6,7	0,15		0,279	0,256	-8,24
7	6,8	6,8	0,15		0,187	0,159	-14,97
8	6,7	6,7	0,15		0,187	0,207	10,70
1	308	299	-2,99	Diâmetro médio (mm)	-37,17	-38	2,23
2	308	349	13,28		-37,89	-39,9	5,30
3	270	247	-8,42		-37,17	-36,4	-2,07
4	270	291	7,66		-37,89	-37,8	-0,24
5	308	281	-8,85		-43,05	-43,7	1,51
6	308	305	-0,88		-36,46	-36,3	-0,47
7	270	302	11,92		-43,05	-40,6	-5,69
8	270	240	-11,19		-36,46	-36,9	1,21
1	86,47	86,58	0,13	Taxa de associação (%)	98,74	98,94	0,20
2	89,44	86,78	-2,97		98,75	99,05	0,30
3	86,47	89,04	2,97		99,46	99,28	-0,18
4	89,44	89,54	0,11		99,46	98,76	-0,70
5	86,47	85,33	-1,32		98,74	98,33	-0,42
6	89,44	91,16	1,92		98,74	98,66	-0,08
7	86,47	84,96	-1,75		99,46	99,98	0,52
8	89,44	90,3	0,96		99,46	99,49	0,03

PV = predição do valor; VO = valor observado; EP (%) = erro de predição (valor observado – predição do valor)/ predição do valor x 100%.

Tabela 8.12 – Predição dos valores, valores observados e erro de predição para as formulações de NcLi.

Formulação		PV	VO	EP (%)		PV	VO	EP (%)
1	pH	7,4	7,4	0,00	PDI	0,184	0,198	7,61
2		7,4	7,5	1,35		0,184	0,171	-7,07
3		7,4	7,3	-1,35		0,172	0,197	14,53
4		7,4	7,5	1,35		0,172	0,168	-2,33
5		7,3	7,2	-1,37		0,154	0,167	8,44
6		7,3	7,4	1,37		0,154	0,141	-8,44
7		7,3	7,3	0,00		0,190	0,207	8,95
8		7,3	7,2	-1,37		0,190	0,174	-8,42
1	Diâmetro médio (nm)	349	334	-4,41	Potencial zeta (mV)	-33,67	-34,6	2,76
2		349	349	-0,21		-36,03	-34,0	-5,63
3		288	283	-1,90		-34,63	-34,2	-1,24
4		288	289	0,35		-31,77	-32,8	3,24
5		349	339	-2,87		-33,67	-32,8	-2,58
6		349	376	7,48		-36,03	-38,1	5,75
7		288	257	-10,94		-34,63	-35,1	1,36
8		288	324	12,47		-31,77	-30,8	-3,05
1	Taxa de associação (%)	78,13	78,50	0,47	Teor (%)	99,54	99,93	0,39
2		82,16	78,65	-4,27		99,54	97,48	-2,07
3		78,13	80,06	2,47		99,54	99,69	0,15
4		82,16	83,38	1,48		99,54	99,79	0,25
5		73,67	70,16	-4,76		99,54	99,79	0,25
6		77,70	81,52	4,92		99,54	100,73	1,20
7		73,67	74,90	1,67		99,54	100,00	0,46
8		77,70	76,17	-1,97		99,54	98,95	-0,59

PV = predição do valor; VO = valor observado; EP (%) = erro de predição (valor observado – predição do valor)/ predição do valor x 100%.

Tabela 8.13 – Predição dos valores, valores observados e erro de predição para as formulações de NcBa.

Formulação		PV	VO	EP (%)		PV	VO	EP (%)
1	pH	7,4	7,5	1,35	PDI	0,211	0,154	-27,01
2		7,4	7,4	0,00		0,211	0,313	48,34
3		7,0	7,0	0,00		0,211	0,202	-4,27
4		7,0	7,4	5,71		0,211	0,175	-17,06
5		7,4	7,3	-1,35		0,136	0,138	1,47
6		7,4	7,3	-1,35		0,136	0,126	-7,35
7		7,0	7,0	0,00		0,136	0,107	-21,32
8		7,0	6,8	-2,86		0,136	0,174	27,94
1	Diâmetro médio (nm)	310	293	-5,64	Potencial zeta (mV)	-39,80	-46,7	17,34
2		310	383	23,24		-39,80	-33,1	-16,83
3		310	264	-14,94		-34,50	-33,2	-3,77
4		310	302	-2,65		-34,50	-35,8	3,77
5		226	226	0,09		-34,70	-35,3	1,73
6		226	226	0,22		-34,70	-34,1	-1,73
7		226	218	-3,71		-29,50	-29,2	-1,02
8		226	234	3,44		-29,50	-29,9	1,36
1	Taxa de associação (%)	66,61	66,89	0,42	Teor (%)	99,13	99,13	0,00
2		66,61	65,93	-1,02		99,13	98,06	-1,08
3		70,45	67,44	-4,27		99,13	98,28	-0,86
4		70,45	73,87	4,85		99,13	99,12	-0,01
5		71,61	72,37	1,06		99,13	100,20	1,08
6		71,61	71,27	-0,47		99,13	99,84	0,72
7		75,45	75,14	-0,41		99,13	99,85	0,73
8		75,45	75,35	-0,13		99,13	98,85	-0,28

PV = predição do valor; VO = valor observado; EP (%) = erro de predição (valor observado – predição do valor)/ predição do valor x 100%.

8.6 CONCLUSÕES

- As nanocápsulas peguiladas de risperidona em diferentes óleos, de uma maneira geral, apresentaram características adequadas de pH, diâmetro médio, PDI, potencial zeta, teor e taxa de associação.
- Os óleos ricos em ômega 3 e ômega 6 se mostraram promissores para o desenvolvimento de nanocápsulas, sendo superiores em vários aspectos aos triglicerídeos do ácido capríco/caprílico, óleo usualmente utilizado na preparação desses sistemas.
- O método fatorial, se mostrou adequado para o desenvolvimento de nanocápsulas de risperidona com diferentes óleos, comprovando a alta capacidade prognóstica da técnica utilizada na otimização dos estudos laboratoriais.
- As formulações NcTc-F7, NcBa-F8, NcGe-F4, NcC-aF4 e NcLi-F4 foram selecionadas por apresentarem uma boa taxa de associação, diâmetro e potencial zeta adequados, baixo PDI e um valor predicativo coerente com o prático.

**Capítulo 9. Determinação da condição *sink* e solubilidade da risperidona
em diferentes meios de liberação**

9 DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO *SINK* E SOLUBILIDADE DA RISPERIDONA EM DIFERENTES MEIOS DE LIBERAÇÃO

9.1 MATERIAIS

Água Milli-Q[®]; acetato de sódio (Synth[®] – Brasil – Lote 167641); acetonitrila (MERCK[®] – Alemanha – Lote: L631830212); ácido clorídrico (Sigma-Aldrich[®] – Alemanha – Lote: SZBB2230V); ácido acético - (Synth[®] – Brasil – Lote 168955); cloreto de potássio (Nuclear[®] – Brasil – Lote: 11060674); fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich[®] – Alemanha – Lote: SZBA3560V); hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich[®] – Suíça – Lote: SZBA258AV); metanol (Sigma-Aldrich[®] – Venezuela – Lote: SHBC4053V); tetraidrofurano - (Tedia[®] – EUA – Lote 1105236); filtro de seringa de celulose regenerada 0,45 µm (Sartorius Stedim[®] – Alemanha – Lote: 17765).

9.2 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA RISPERIDONA EM DIFERENTES MEIOS DE LIBERAÇÃO

9.2.1 Preparo dos meios de liberação

Tampão ácido clorídrico pH 1,2

Adicionou-se 50 mL de cloreto de potássio 0,2 M e 85 mL de ácido clorídrico 0,2 M e completou-se o volume para 200 mL com água (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Tampão acetato de sódio pH 4,5

Foram pesadas 2,99 g de acetato de sódio triidratado e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL, adicionou-se 14 mL de ácido acético 2 *M* e completou-se o volume com água (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Tampão fosfato pH 6,8

Transferiu-se 50 mL de fosfato de potássio monobásico 0,2 *M* e 22,4 mL de hidróxido de sódio 0,2 *M* para balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume com água (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

9.2.2 Preparo das curvas padrão

Solução estoque

Transferiu-se, analiticamente, 25 mg de risperidona SQR para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de acetonitrila e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se solução estoque na concentração de 1000 µg/mL. Diluiu-se 2,5 mL da solução anterior para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com acetonitrila (50 µg/mL).

Curvas padrão

Alíquotas de 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 mL da solução estoque foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume com tampão ácido clorídrico pH 1,2, tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e água, obtendo-se soluções com concentrações de 1, 3, 5, 7 e 9 µg/mL. Cada concentração da curva foi injetada em triplicata, utilizando-se método previamente validado.

A curva padrão foi realizada em triplicata e, com a área absoluta média obtida, construiu-se um gráfico plotando-se área média *versus* concentração do fármaco ($\mu\text{g/mL}$). A curva padrão e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

9.2.3 Solubilidade da risperidona

A solubilidade da risperidona foi determinada em água, tampão ácido clorídrico pH 1,2, tampão acetato de sódio pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8. Os estudos foram conduzidos de acordo com a Guia do FDA para a isenção de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência (FDA, 2000a).

Transferiu-se 25 mL de cada um dos meios selecionados para erlenmeyer e adicionou-se um excesso de risperidona. As amostras foram agitadas a 130 rpm, continuamente por 48 horas, a temperatura de 37 °C, utilizando-se incubadora shaker, Novatecnica® – Modelo NT 712 (Brasil). As soluções saturadas foram filtradas em membranas com porosidade de 0,45 μm , diluídas quando necessário no mesmo meio e analisadas por cromatografia a líquido de alta eficiência, conforme método previamente validado. O ensaio foi realizado em triplicata.

9.4 DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO SINK

A condição Sink foi determinada utilizando-se a seguinte equação (9.1):

$$\text{Valor de S} = \frac{\text{Valor dissolvido} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}{\frac{\text{dosagem máxima do fármaco (4 mg)}}{\text{Volume do meio de dissolução (500 mL)}}} \quad (9.1)$$

A dosagem máxima comercial do fármaco foi retirada do seu registro no FDA e o volume de meio de dissolução da The United States Pharmacopeia (2013).

9.5 ESTUDO PRELIMINAR DA LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Realizou-se o estudo preliminar de liberação *in vitro* em aparelho de dissolução, Pharma Test – Modelo PTWS 3E (Alemanha), provido com o aparato pá e utilizando-se sacos de diálise de membrana de celulose (peso molecular 14000), Sigma-aldrich (EUA), onde foram inseridos 3 mL de risperidona solubilizada previamente em etanol. Os sacos foram fechados e imersos em 500 mL do meio receptor (tampão ácido clorídrico pH 1,2; tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8), mantidos a 37 °C, com agitação contínua a velocidade de 50 rpm, respeitando-se a condição *sink*. Alíquotas de 3 mL foram coletadas do compartimento receptor, em tempos pré-determinados, e o meio retirado foi repostado. As amostras foram filtradas em filtros de seringa com porosidade de 0,45 µm e o teor de risperidona liberado nos meios foi quantificado por cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando-se as curvas padrão descritas em 9.2.2. O procedimento foi realizado em triplicata para cada um dos meios estudados.

Os valores obtidos no estudo foram comparados estatisticamente, utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey, para avaliar se existe diferença significativa na liberação da risperidona nos diferentes meios.

9.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As equações da reta, obtidas pelo método dos mínimos quadrados, o coeficiente de correlação e as áreas médias, encontram-se na tabela 9.1. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,999, demonstrando relação linear entre área e concentração. A análise de variância (ANOVA) das curvas obtidas demonstrou que houve regressão linear significativa, não havendo desvio significativo da linearidade ($p < 0,05$), para todos os meios testados. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através do intercepto e inclinação das curvas obtidas e os valores se encontram descritos na tabela 9.1.

Tabela 9.1- Resultados obtidos na determinação das curvas padrão em diferentes diluentes.

Diluentes	Tampão pH 1,2		Tampão pH 4,5		Tampão pH 6,8		Água	
Conc. (µg/mL)	Área (n=3)	DPR (%)	Área (n=3)	DPR (%)	Área (n=3)	DPR (%)	Área (n=3)	DPR (%)
1	28203	0,83	28754	0,77	29568	0,88	28772	1,29
3	92816	1,84	87717	0,98	88481	1,20	86762	0,63
5	156046	1,65	148435	0,71	148689	1,41	147447	0,85
7	218588	0,69	208891	0,44	212378	0,71	207880	0,25
9	279891	1,34	270637	1,03	267787	1,59	268283	0,26
Equação da reta	y=31457-2079		y=30437-2937		y=29207-1101		y=30007-2206	
r	0,999		0,999		0,999		0,999	
LD	0,23		0,23		0,18		0,11	
LQ	0,68		0,70		0,55		0,32	

Desvio padrão relativo; r = coeficiente de correlação; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.

A risperidona é um fármaco de natureza lipofílica, sendo pH dependente e segundo a classificação biofarmacêutica de fármacos, pertence a classe II, possuindo baixa solubilidade em água e alta permeabilidade intestinal, sendo portanto a dissolução do fármaco um fator limitante para a sua absorção (AMIDON et al., 1995; SILVA et al., 2012). Possui dois pKa, o primeiro em 3,11 e o outro em 8,24, sendo considerada uma base forte, tendo assim uma baixa solubilidade em valores de pH mais altos (SANTANA; SEVERINO; SOUTO, 2012).

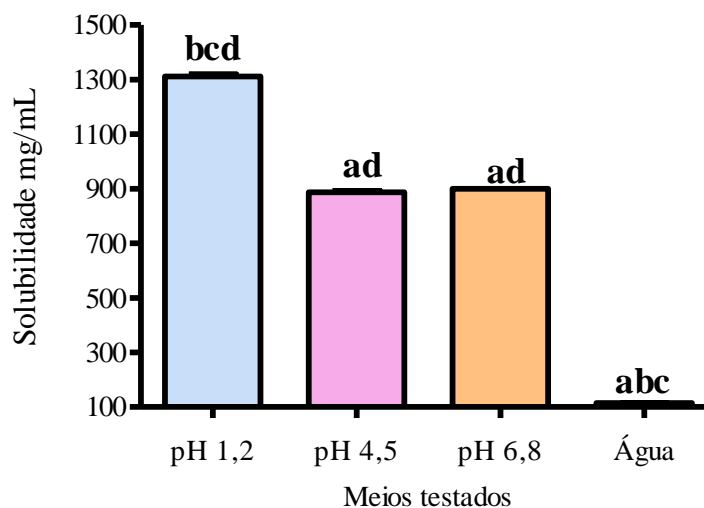
Os dados referentes a solubilidade e condição *Sink* da risperidona, em diferentes meios, estão demonstrados na tabela 9.2 e figura 9.1.

Tabela 9.2 – Resultados obtidos no estudo da solubilidade e condição *Sink* da risperidona, em diferentes meios.

Meio	Solubilidade* (mg/mL ± DP)	Condição <i>Sink</i> (Cs/Cd ± DP)
Tampão ácido clorídrico pH 1,2	1310 ± 0,02	163,61 ± 2,06
Tampão acetato pH 4,5	900 ± 0,02	112,35 ± 2,09
Tampão fosfato pH 6,8	888 ± 0,03	110,57 ± 0,42
Água	120 ± 0,02	14,63 ± 0,27

Cs - Saturação da risperidona em 500 mL de meio; Cd – maior dose de risperidona comercializada na forma farmacêutica de comprimidos (4 mg); * média de 3 repetições.

Figura 9.1– Representação gráfica dos resultados encontrados no estudo da solubilidade da risperidona em diferentes meios.



Legenda: a=diferença significativa do tampão ácido clorídrico pH 1,2; b=diferença significativa do tampão acetato pH 4,5; c=diferença significativa do tampão fosfato pH 6,8; d=diferença significativa da água.

Conforme os valores apresentados na tabela 9.2, observamos que o fármaco foi mais solúvel em tampão ácido clorídrico pH 1,2 (1310 mg/mL), seguido dos tampões acetato pH 4,5 e fosfato pH 6,8 (880 e 900 mg/mL) e água (120 mg/mL). Segundo Santana e colaboradores (2012), a risperidona, em pH ácido, fica na forma diprotonada RH_2^{2+} e mais solúvel no meio, na faixa de pH entre 5 e 7 passa para a sua forma protonada e tende a ficar menos solúvel. Shukla e colaboradores (2009), descrevem a risperidona como solúvel em ácido clorídrico 0,1 M, ligeiramente solúvel em pH 4,0, muito pouco solúvel em soluções com pH de 7,0 a 10 e insolúvel em água. Sendo assim, podemos concluir que os dados obtidos no estudo estão de acordo com o descrito na literatura e justificam a escolha do tampão ácido clorídrico pH 1,2, como meio de dissolução. A The United States Pharmacopeia (2013) também utiliza um meio ácido (ácido clorídrico 0,1 M) como meio de dissolução para os comprimidos de risperidona, o que também corrobora com a escolha.

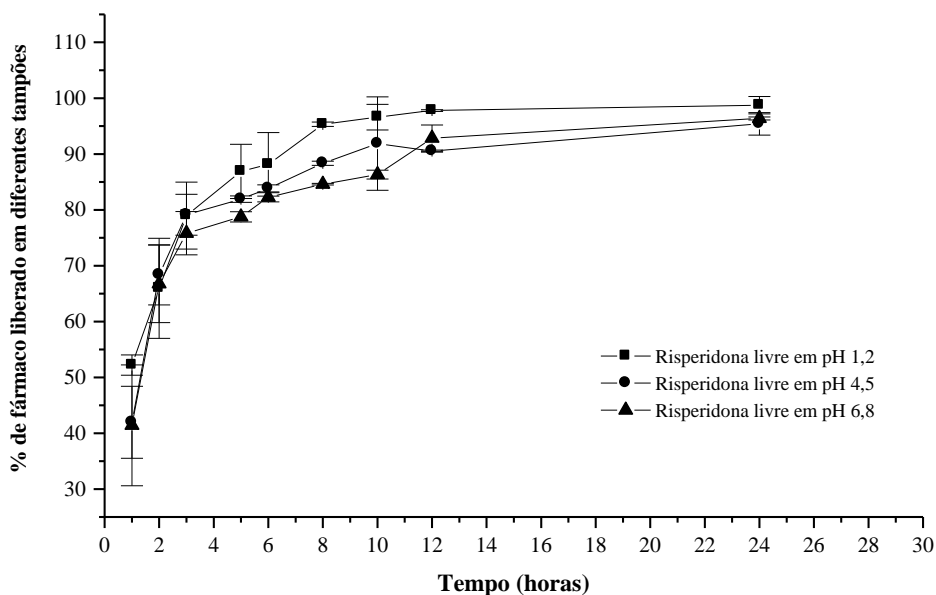
Os valores obtidos foram comparados estatisticamente utilizando ANOVA, seguido do teste de Tukey. Conforme demonstrado na figura 9.1, o tampão ácido clorídrico pH 1,2 e a água apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a sua solubilidade quando

comparados com os outros meios. Somente o tampão acetato pH 4,5 e o tampão fosfato pH 6,8 não apresentaram diferença significativa em relação a solubilidade da risperidona.

De acordo com a The United States Pharmacopeia (2013), a quantidade de meio utilizado em ensaios *in vitro* deve ser maior do que três vezes a quantidade de fármaco necessária para causar a saturação do mesmo. A proporção de saturação de solubilidade da dose, em 500 mL de meio (CS/CD) foi maior ou igual a 3 para o tampão HCl pH 1,2; tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e água.

No sentido de garantir a passagem do fármaco pela membrana de celulose, realizou-se um estudo prévio da liberação *in vitro*, o que nos permitiu concluir que, apesar dos perfis de liberação serem semelhantes, o tampão ácido clorídrico pH 1,2 foi o que possibilitou a maior passagem de fármaco para o meio receptor, o que corrobora com os valores encontrados no estudo de solubilidade (Figura 9.2). Os valores obtidos foram comparados estatisticamente utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey, que demonstrou não haver diferença significativa entre os perfis de liberação ($p < 0,01$).

Figura 9.2 – Representação gráfica dos valores médios e dos DP obtidos no estudo de liberação *in vitro* da risperidona em diferentes meios de liberação.



9.7 CONCLUSÕES

- A risperidona mostrou-se mais solúvel no tampão ácido clorídrico pH 1,2, seguida do tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato pH 6,8 e água.
- A proporção de saturação de solubilidade da dose em 500 mL de meio (CS/CD) foi maior ou igual a 3 para tampão HCl pH 1,2; tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8, sendo assim, os estudos de liberação podem ser efetuados em qualquer um dos meios propostos no estudo.
- Os estudos de liberação das nanocápsulas de risperidona serão conduzidos em tampão pH 1,2, pois foi o meio em que o fármaco apresentou melhor solubilidade e perfil de liberação.

Capítulo 10. Estudos de liberação *in vitro*

10 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

10.1 MATERIAIS

Água Milli-Q; Acetonitrila (MERCK – Alemanha – Lote: L631830212); Ácido clorídrico (Sigma-Aldrich – Alemanha – Lote: SZBB2230V); Cloreto de potássio (Nuclear – Brasil – Lote: 11060674); Metanol (Sigma-Aldrich – Venezuela – Lote: SHBC4053V); Tetraidrofurano - (Tedia – EUA – Lote 1105236); Filtro de seringa de celulose regenerada 0,45 µm (Sartorius Stedim – Alemanha – Lote: 17765); Sacos de diálise de membrana de celulose peso molecular 14000 (Sigma-Aldrich – Estados Unidos da América – Lote: 3110).

10.2 PREPARO DO MEIO DE LIBERAÇÃO

Tampão ácido clorídrico pH 1,2

Adicionou-se 50 mL de cloreto de potássio 0,2 M e 85 mL de ácido clorídrico 0,2 M e completou-se o volume para 200 mL com água (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

10.3 CURVA PADRÃO

Transferiu-se, analiticamente, 25 mg de risperidona SQR para balão volumétrico de 25 mL, com auxílio de acetonitrila e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se solução estoque na concentração de 1000 µg/mL. Diluiu-se 2,5 mL da solução anterior para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com acetonitrila (50 µg/mL). Alíquotas de 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume com tampão ácido clorídrico pH 1,2, obtendo-se soluções com

concentrações de 1, 3, 5, 7 e 9 µg/mL. Cada concentração da curva foi injetada em triplicata, utilizando-se o método previamente validado descrito no capítulo 7.

A curva padrão foi realizada em triplicata e, com a área absoluta média obtida, construiu-se um gráfico plotando-se área média *versus* concentração do fármaco (µg/mL). A curva padrão e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

10.4 LIBERAÇÃO *IN VITRO*

10.4.1 Procedimento para o estudo de liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado em aparelho de dissolução, Pharma Test – Modelo PTWS 3E (Alemanha), provido com o aparato pá, utilizando-se sacos de diálise de membrana de celulose (peso molecular 14000), Sigma-aldrich (EUA), onde foram inseridos 3 mL de cada uma das amostras. Os sacos foram fechados e imersos em 500 mL do meio receptor, tampão ácido clorídrico pH 1,2; mantidos a 37 °C, com agitação contínua a velocidade de 50 rpm. Alíquotas de 3 mL foram coletadas do compartimento receptor, em tempos pré-determinados, e o meio retirado foi repostado. As amostras foram filtradas em filtros de seringa com porosidade de 0,45 µm e a quantidade de risperidona liberada no meio foi quantificado por cromatografia a líquido de alta eficiência. O procedimento foi realizado em triplicata.

10.4.2 Estabilidade das nanocápsulas de risperidona no meio de liberação

As amostras coletas nos tempos de 1, 12 e 48 horas tiveram sua área determinada por CLAE, logo após foram armazenadas a temperatura de 37 °C, por mais 24 horas. Novamente procedeu-se a quantificação das mesmas, a fim de avaliar possíveis alterações na estabilidade.

10.4.2 Análise estatística do estudo de liberação

A modelagem matemática utilizada para determinar a influência dos óleos vegetais na liberação da risperidona das nanocápsulas foi realizada utilizando o programa Scientist® (MicroMath ScientificSoftware, Inc.), de acordo com metodologia adaptada de Cruz e colaboradores (2006), conforme cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem monoexponencial ou biexponencial utilizando as seguintes equações (eq. 10.1 a 10.2):

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} - \text{cinética de primeira ordem monoexponencial (eq. 10.1)}$$

$$C = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} - \text{cinética de primeira ordem biexponencial (eq. 10.2)}$$

onde

A: quantidade de fármaco degradado na velocidade α ; B: quantidade de fármaco degradado na velocidade β ; α e k : constantes de degradação; t : tempo; C_0 : concentração do fármaco no tempo zero; C : concentração do fármaco após o tempo de reação.

Todos os perfis de degradação foram testados para os dois modelos e o modelo mais adequado foi escolhido baseando-se no valor de Critério de Seleção de Modelo (MSC).

A área sob a curva (ASC) foi calculada a partir das curvas de porcentagem de fármaco liberado versus tempo, obtendo-se a área sob a curva (ASC) e a área total do gráfico (KHAN, 1975). Os valores foram comparados estatisticamente por ANOVA, seguida do teste de Tukey.

10.5 AMOSTRAS

Para o teste de liberação *in vitro* foram utilizadas as formulações NcLi-F4; NcCa-F4; NcGe-F4; NcTc-F7; NcBa-F8, previamente selecionadas no delineamento experimental e a risperidona solubilizada em etanol.

10.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.6.1 Curva padrão

A linearidade do método foi determinada a partir da construção de 3 curvas padrão da SQR nas concentrações de 1,0 a 9,0 µg/mL em tampão ácido clorídrico pH 1,2 conforme item 10.3. A tabela 10.1 apresenta os valores das áreas obtidas para cada nível de concentração da curva padrão.

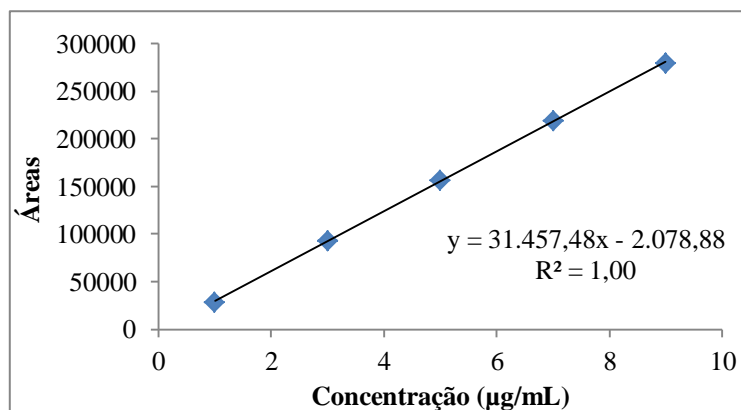
Tabela 10.1 – Valores de área obtidos a partir da curva padrão da risperidona SQR por CLAE, em tampão ácido clorídrico pH 1,2.

Concentração (µg/mL)	Área*	Média das áreas ± epm	DPR (%)
1	28167	28203 ± 175,86	1,08
	27918		
	28524		
3	92572	92816 ± 259,32	0,48
	93334		
	92541		
5	156973	156046 ± 310,92	0,34
	154441		
	156724		
7	221392	218588 ± 1739,13	1,38
	215404		
	218968		
9	280522	279891 ± 1654,70	1,02
	276763		
	282390		

* Valor médio da triplicata; epm - erro padrão da média; DPR – desvio padrão relativo.

A curva padrão média para o método foi obtida a partir de cinco concentrações e está representada na figura 10.1, assim como seu coeficiente de determinação (r^2) e equação da reta, determinados através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

Figura 10.1 – Representação gráfica da curva padrão média de risperidona SQR em tampão ácido clorídrico pH 1,2.



A curva padrão não apresentou desvio de linearidade e apresentou regressão linear significativa ($p < 0,05$), quando avaliada estatisticamente utilizando-se análise de variância (ANOVA). Estes resultados, juntamente com o coeficiente de correlação ($r=1$), demonstram que esta curva média padrão, na faixa de concentração de 1 a 9 $\mu\text{g/mL}$, pode ser utilizada para a interpolação dos valores experimentais, visando à determinação quantitativa desta substância.

10.6.2 Estabilidade das nanocápsulas de risperidona no meio de liberação

Após o teste de estabilidade das amostras, utilizando tampão ácido clorídrico pH 1,2 como meio de liberação, podemos perceber que as mesmas permaneceram estáveis por mais 24 horas, quando armazenadas a temperatura de 37 °C. Todos os resultados obtidos durante os tempos de análise apresentaram-se de forma muito próximas ao valor iniciais, conforme descrito na tabela 10.2, sendo que nenhum produto de degradação foi observado através da análise com detector DAD.

Tabela 10.2 – Estabilidade das amostras após teste de liberação.

Tempos de análise	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
	(1 h)	(24 h)	(12 h)	(36 h)	(48 h)	(72 h)
Amostras	Área	Área	Área	Área	Área	Área
NcLi-F4	69617	69518	182279	181954	186548	186120
NCCa-F4	55000	54987	140987	141054	146972	145987
NcGe-F4	52794	52841	166823	167069	182129	182098
NcTc-F7	63128	63025	138724	139102	146784	147068
NcBa-F8	69468	69214	143695	143546	148584	147965

10.6.3 Perfis de liberação *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* de uma substância ativa associada a nanocápsulas depende de uma variedade de fatores, tais como: concentração e características físico-químicas do fármaco (principalmente sua solubilidade e coeficiente de partição óleo/água); peso molecular e concentração do polímero; microestrutura do polímero sólido, quando reprecipitado; a natureza do núcleo oleoso; tamanho das nanocápsulas; condições do método de preparação e condições do ensaio de liberação (pH do meio, temperatura e tempo de contato). Neste contexto, as condições estabelecidas para a realização de cada estudo é fundamental na determinação do perfil de liberação *in vitro* da substância ativa (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Os valores obtidos no estudo de liberação *in vitro*, do fármaco livre das formulações NcLi-F4 e NcCa-F4 em tampão ácido clorídrico pH 1,2 estão apresentados na tabela 10.3, e os das formulações NcGe-F4, NcTc-F7 e NcBa-F8, na tabela 10.4. Os valores médios estão expressos em % \pm DP (n=3).

Tabela 10.3–Perfil de liberação *in vitro* da risperidona livre edas formulações NcLi-F4 e NcCa-F4.

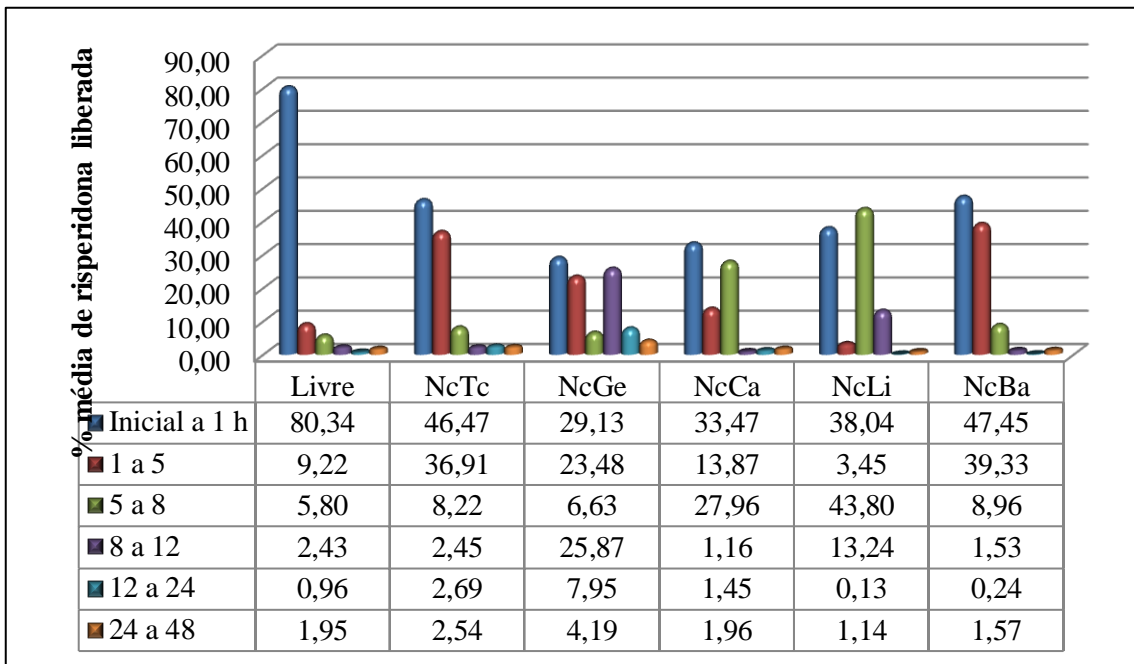
Tempo (h)	Risperidona Livre	NcLi-F4	NcCa-F4
	Média*±DP	Média*±DP	Média*±DP
0,05	10,08 ±0,23	9,25 ±2,73	9,86 ±0,55
0,10	11,90 ±0,65	13,38 ±0,98	14,52 ±1,52
0,15	21,89 ±1,26	16,77 ±2,02	17,96 ±0,89
0,20	29,39 ±5,55	21,65 ±0,29	21,75 ±2,11
0,30	41,39 ±1,61	25,76 ±0,52	23,21 ±2,10
0,40	52,80 ±3,14	29,22 ±2,93	27,77 ±2,26
1 h	80,34 ±0,60	38,04 ±0,18	33,47 ±4,49
2 h	79,38 ±2,28	53,84 ±0,52	30,54 ±2,24
3 h	81,70 ±2,18	61,93 ±0,59	43,12 ±0,26
5 h	89,55 ±1,08	72,49 ±2,31	47,34 ±1,30
6 h	90,81 ±1,93	78,59 ±0,78	54,07 ±1,98
8 h	95,35 ±0,41	85,29 ±0,52	75,30 ±0,23
10 h	96,61 ±2,29	94,29 ±0,45	75,98 ±0,18
12 h	97,78 ±0,15	98,52 ±0,33	76,46 ±0,22
24 h	98,74 ±1,56	98,65 ±0,37	77,91 ±1,52
48 h	100,59 ±0,23	98,72 ±0,29	77,28 ±0,03

DP=desvio padrão; *média de três determinações.

Tabela 10.4 – Perfil de liberação *in vitro* das formulações NcGe-F4, NcTc-F7 e NcBa-F8.

Tempo (h)	NcGe-F4	NcTc-F7	NcBa-F8
	Média*±DP	Média*±DP	Média*±DP
0,05	8,12 ±1,13	19,16 ±1,56	13,45 ±0,16
0,10	13,63 ±1,34	23,48 ±1,23	16,88 ±0,89
0,15	16,22 ±1,25	26,47 ±1,34	21,67 ±0,31
0,20	23,31 ±2,06	29,75 ±2,13	26,93 ±0,73
0,30	26,50 ±1,57	37,57 ±1,89	32,27 ±0,88
0,40	27,90 ±1,06	41,95 ±3,12	38,09 ±0,45
1 h	29,13 ±2,78	46,47 ±4,55	47,45 ±0,53
2 h	38,79 ±3,86	66,90 ±4,35	61,11 ±0,61
3 h	46,74 ±3,32	78,36 ±4,58	74,74 ±0,67
5 h	52,60 ±3,83	83,38 ±3,42	86,78 ±0,64
6 h	57,68 ±4,37	87,08 ±0,94	90,76 ±0,92
8 h	59,24 ±1,67	91,60 ±1,78	95,73 ±0,83
10 h	73,73 ±6,72	94,10 ±0,80	97,07 ±0,69
12 h	85,10 ±6,94	94,04 ±0,23	97,26 ±0,93
24 h	93,05 ±6,20	96,73 ±1,62	97,51 ±0,99
48 h	94,53 ±4,36	97,33 ±0,17	96,06 ±0,43

Figura 10.2- Porcentagem de risperidona liberada no meio, por faixa de tempo.



Nas figuras de 10.3 a 10.7 estão representados graficamente os perfis de liberação das NcLi-F4, NcCa-F4, NcGe-F4, NcTc-F7, NcBa-F8, respectivamente.

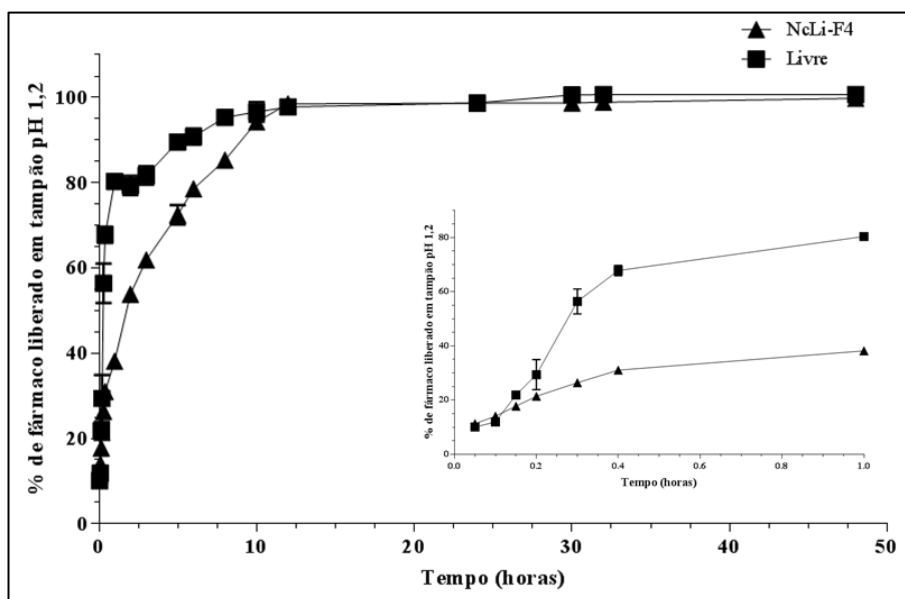
Figura 10.3 – Representação gráfica dos valores médios e do DP obtidos no estudo de liberação *in vitro* do fármaco livre e das NcLi-F4 tampão ácido clorídrico pH 1,2.

Figura 10.4 – Representação gráfica dos valores médios e do DP obtidos no estudo de liberação *in vitro* do fármaco livre e das NcCa-F4 tampão ácido clorídrico pH 1,2.

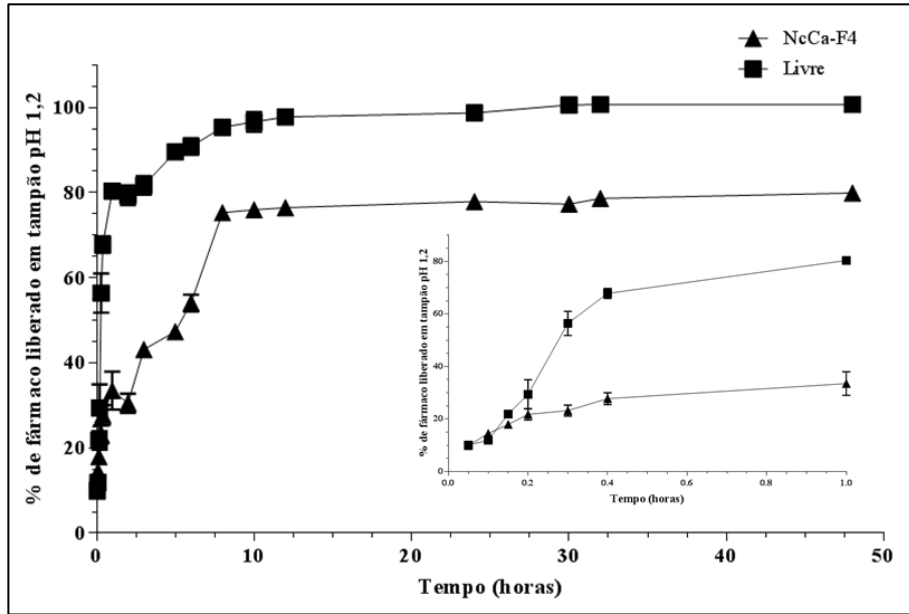


Figura 10.5 – Representação gráfica dos valores médios e do DP obtidos no estudo de liberação *in vitro* do fármaco livre e das NcGe-F4 tampão ácido clorídrico pH 1,2.

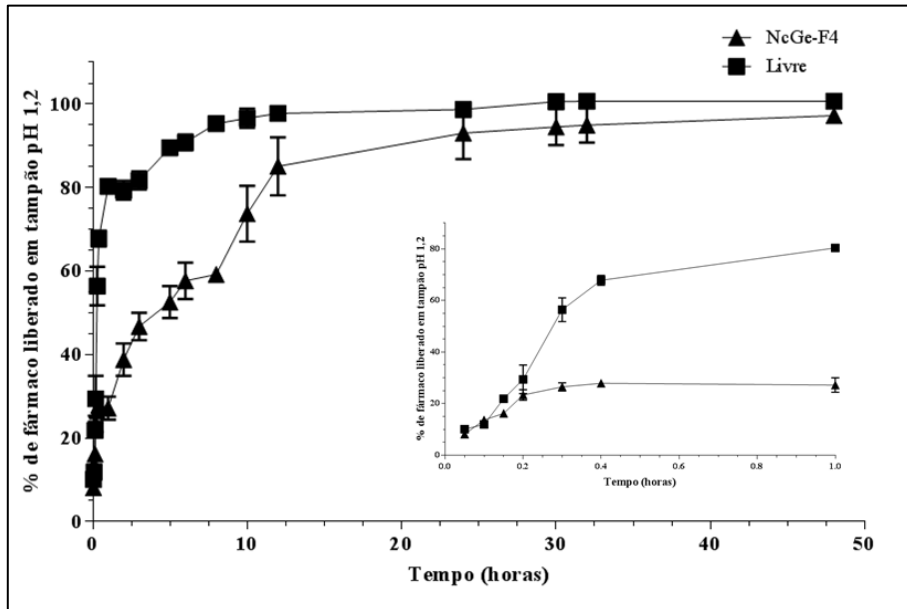


Figura 10.6 – Representação gráfica dos valores médios e do DP obtidos no estudo de liberação *in vitro* do fármaco livre e das NcTc-F7 tampão ácido clorídrico pH 1,2.

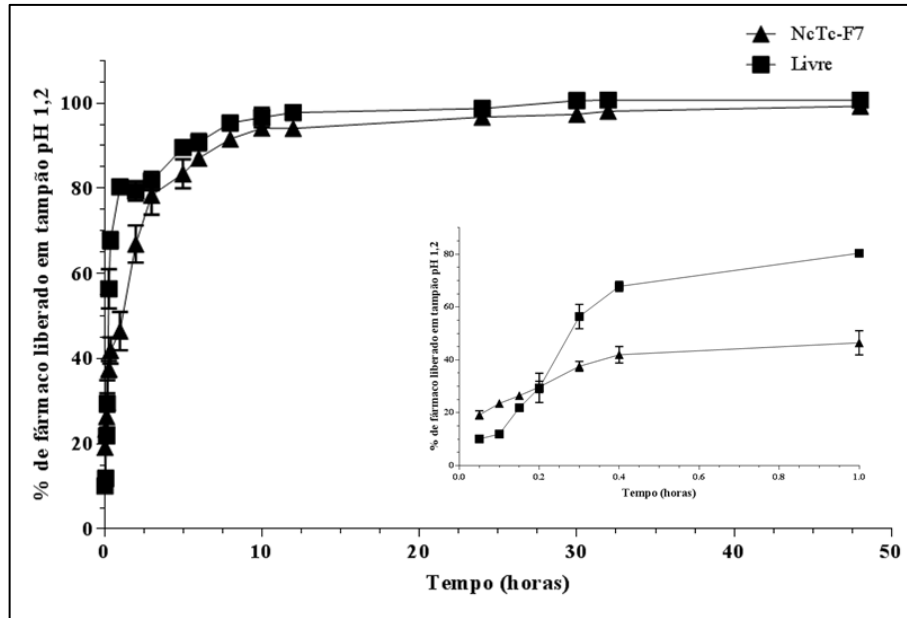
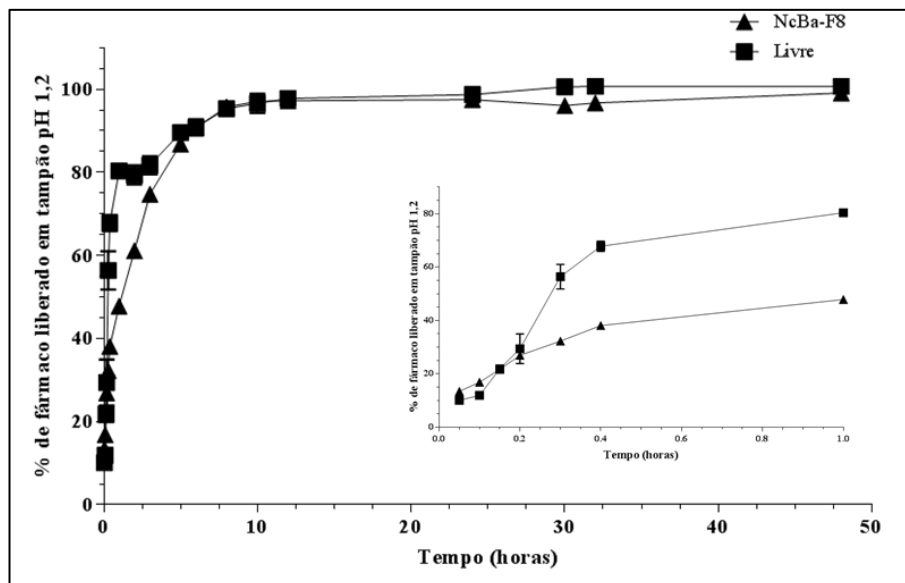


Figura 10.7 – Representação gráfica dos valores médios e do DP obtidos no estudo de liberação *in vitro* do fármaco livre e das NcBa-F8 tampão ácido clorídrico pH 1,2.



Na figura 10.2 estão apresentados os valores de risperidona dissolvida no meio, por faixa de tempo, nas formulações testadas. Os dados apresentados nos mostram que após o período de 5 e 8 horas, 89,56% e 95,36% da risperidona estava livre no meio receptor, respectivamente. No mesmo período, as formulações desenvolvidas liberaram 83,38% e 89,10% (NcTc-F7), 52,61% e 59,24% (NcGe-F4), 47,34% e 75,57% (NcCa-F4), 41,19% e 85,29% (NcLi-F4), e 86,78% e 95,74% (NcBa-F8).

Muthu e colaboradores (2009) avaliaram a liberação de nanoesferas de risperidona produzidas com PLGA e do fármaco livre em tampão PBS (pH 7,4). Neste estudo obtiveram 90% do fármaco liberado das nanoesferas após 24 horas e essa mesma porcentagem foi obtida após 4 horas, com o fármaco livre. Em outro trabalho de Muthu e Singh (2008) avaliaram a liberação de nanoesferas de risperidona produzida com PCL, e observaram que 80% do fármaco estava dissolvido no meio, após 20 horas, muito próximo ao encontrado no nosso trabalho (Figura 10.2).

Nanocápsulas obtidas pelo método de precipitação do polímero pré-formado representam um sistema bifásico com uma liberação rápida inicial (*burst*), seguida por uma fase de liberação mais lenta (CAUCHETIER et al., 2003). A fase de liberação inicial pode ser atribuída ao fármaco que se encontra adsorvido na superfície da nanocápsula (CRUZ et al., 2006) ou a degradação da fina membrana polimérica (CAUCHETIER et al., 2003). A segunda fase corresponde à difusão da substância ativa a partir do núcleo oleoso sendo determinado pelo coeficiente de partição do fármaco entre o núcleo oleoso e o meio aquoso externo, pelos volumes relativos das duas fases, pela existência de interações entre o polímero e o ativo e pela concentração de surfactantes (TEXEIRA et al., 2005; LIMAYEM et al., 2006).

Neste contexto, a partir dos resultados obtidos na liberação *in vitro*, foi realizado um estudo baseado no ajuste de curvas dos perfis cinéticos segundo os modelos monoexponencial (fornece uma constante cinética para o processo) e biexponencial (constituído de duas constantes cinéticas). O ajuste de curvas para as cinco formulações seguiu a metodologia adaptada por Cruz e colaboradores (2006). Para a escolha do modelo matemático adequado aos pontos experimentais, foram observados os melhores ajustes gráficos, os maiores coeficientes de correlação e os valores de critério de seleção do modelo (MSC). Os perfis de liberação foram construídos plotando-se a concentração de risperidona liberada em função do tempo (Figuras de 10.3 a 10.7).

Através do programa Micromath Scientist®, o ajuste de curva obtido pelo perfil de liberação da risperidona livre mostrou que a equação monoexponencial foi a que melhor descreveu o comportamento dos dados experimentais, com coeficiente de correlação (r)

próximo a 0,9974; $k = 0,17$ e $MSC = 4,82$. Quanto ao perfil de liberação da risperidona a partir de nanocápsulas, o modelo biexponencial apresentou valores superiores aos obtidos pelo modelo monoexponencial, conforme demonstrado na tabela 10.5. Esse modelo é caracterizado por possuir uma primeira etapa de liberação rápida (*efeito burst*), e uma segunda de liberação lenta. Sendo assim, todas as formulações de nanocápsulas apresentaram a capacidade para controlar a taxa de liberação do fármaco. O tipo de óleo vegetal utilizado influenciou o controle liberação da risperidona. Após 48 h, a concentração de fármaco no meio receptor foi de 0,98 mg/mL (NcLi-F4), 0,77 mg/mL (NcCa-F4), 0,94 mg/mL (NcGe-F4), 0,97 mg/mL (NcTc-F7) e 0,96 mg/mL (NcBa-F8).

Os perfis de dissolução não apresentaram diferenças significativas entre si, quando avaliados por (ANOVA) ($p=0,05$). Por outro lado, as constantes de velocidade para a fase de liberação rápida (α) e as da fase sustentada (β) mostraram diferenças estatísticas entre as formulações ($p=0,05$), com exceção das NcGe-F4 e NcBa-F8, para a constante α . Essas duas formulações foram as que apresentaram os maiores valores de α . Na análise do β a NcGe-F4 e NcCa-F4 apresentaram as menores constantes de velocidades na fase sustentada.

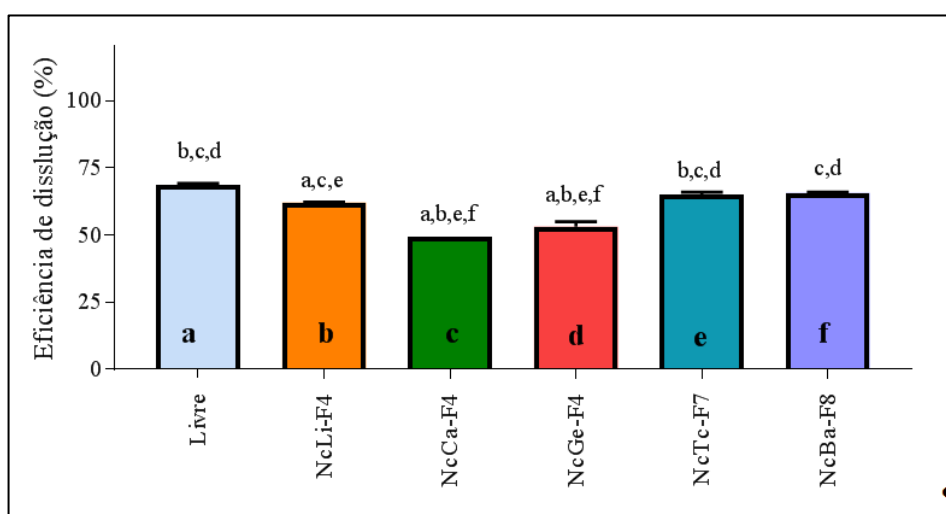
Os diferentes comportamentos encontrados nos meios de liberação avaliados podem ser decorrentes das interações entre fármaco-polímero-óleo, do tamanho de partícula, do índice de polidispersão, da tensão interfacial entre outros parâmetros, que poderão influenciar diretamente na liberação do ativo, e precisam ser estudados caso a caso (ALMEIDA et al., 2009). Os sistemas de liberação de fármaco das nanocápsulas estão diretamente relacionados à solubilidade do fármaco no óleo e esta solubilidade está ligada ao tamanho das partículas incorporadas. Dependendo do tipo de óleo incorporado no polímero a curva será diferente, podendo obter sistemas mais controlado do que outros (PIRES, 2011).

A risperidona apresentou solubilidade diferente nos óleos, o que fica muito claro nos valores de liberação das NcTc-F7, em que muita pouca quantidade de ativo ficou no núcleo oleoso da nanocápsula. Dados semelhantes foram descritos por Rigo e colaboradores (2014), quando estudavam a influência dos diferentes óleos vegetais na liberação de ativos a partir de nanocápsulas lipídicas.

A determinação da área sob a curva vem sendo utilizada como um parâmetro de confiança nos estudos de perfis de dissolução e em estudos *in vivo*, como as avaliações farmacocinéticas (COSTA e LOBO, 2001). Uma das principais vantagens desse método é obtermos um valor geral da dissolução ou liberação do produto e não apenas um valor pontual, em determinado tempo.

A eficiência de dissolução foi comparada por análise de variância (ANOVA), ($p = 0,05$), seguida do teste de Tukey. Conforme demonstrado na figura 10.8, as formulações NcGe-F4 e NcCa-F4, só não apresentaram diferença significativa entre si, e tiveram a menor eficiência para liberar o ativo da formulação, sendo assim, podemos concluir que ambas foram capazes de controlar a liberação do fármaco, confirmando os resultados descritos anteriormente.

Figura 10.8 – Representação gráfica da eficiência de dissolução da risperidona livre e formulações selecionadas no delineamento experimental.



Legenda: a: Livre; b: NcLi-F4; c: NcCa-F4; d: NcGe-F4; e: NcTc-F7 e f: NcBa-F8. Letras superiores indicam que existe diferença estatística ($p \leq 0,05$) na eficiência de dissolução.

10.3 CONCLUSÕES

- O ajuste de curva obtido pelo perfil de liberação da risperidona livre mostrou que a equação monoexponencial foi a que melhor descreveu o comportamento dos dados experimentais.
- Para as cinco formulações de nanocápsulas, o modelo biexponencial, caracterizado por possuir uma primeira etapa de liberação rápida (*efeito burst*), e uma segunda de liberação lenta, foi quem mais se ajustou aos perfis de liberação.
- O tipo de óleo vegetal utilizado influenciou no controle de liberação da risperidona, destacando-se o óleo de cártamo e gergelim.

- As formulações NcCa-F4 e NcGe-F4 apresentaram um perfil de liberação diferenciado, mostrando que as mesmas conseguem prolongar a liberação do ativo da formulação.
- O estudo de eficiência de dissolução também demonstrou que essas duas formulações foram as que menos liberaram o ativo no meio receptor conseguindo prolongar a liberação do mesmo na formulação.

Capítulo 11. Artigo 1

Validation of high performance liquid chromatography method for determination of risperidone loaded PEGlated nanocapsules with different oils

(Revista Pretendida: Analytical Methods)

Validation of high performance liquid chromatography method for determination of risperidone loaded PEGlated nanocapsules with different oils

L.V. Laporta^{a,b*}; A. M. Rubim^{a,b}; F. R. Ianiski^a; M. R. dos Santos^a; M. P. Alves^b; C. M. Rolim^b

^aGraduate program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria

^bLaboratory of Control of Drug Quality, Franciscan University Center

*Correspondence: L. V. Laporta. Centro Universitário Franciscano. Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos. Rua dos Andradas, 1614. CEP: 97010-032 – Santa Maria – RS. E-mail: luciane.laporta@gmail.com

A simple reverse-phase (RP) high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed and validated, according to the ANVISA Resolution RE n° 899 and International Conference on Harmonization (ICH), for the determination of risperidone (RIS) from nanocapsules (NC), with different oils. Chromatographic runs were performed on a C8 column, using an isocratic mobile phase of acetonitrile, methanol, buffer phosphate pH 7.0 (45:15:40). The flow rate was 1 mL/min, and the RIS absorbance was measured at 275 nm, using UV detection. A linear response was obtained for a RIS concentration range of 10 - 30.00 µg/mL ($R^2 = 0.9999$), with a detection and quantification limits of 0.66 and 1.97 µg/mL, respectively. The method was shown to be specific, precise at the intra-day (RSD < 0.69%) and inter-day (RSD < 0.32%) levels, and accurate with recoveries between 99.90 - 100.74%. Method robustness was observed as well. Moreover, suspensions showed monomodal size distributions and low polydispersity index indicating high homogeneous of formulations with narrow size distributions, and appropriate pH and zeta potential. Extraction process was efficient for release of RIS from nanostructured system.

INTRODUCTION

Risperidone (RIS) is belonging to the chemical class of benzisoxazole derivatives and chemically. It is 4-(2-(4-(6-Fluorobenzo[d]isoxazol-3-yl)1-piperidyl) ethyl]-3-methyl-2,6-diazabicyclo-deca-1,3-dien-5-one¹ with molecular formula $C_{23}H_{27}FN_4O_2$ was presented in Fig. 1. RIS is an antipsychotic agent², which acts through selective antagonism of serotonin 5HT₂, dopamine D₂ receptors, used in the treatment of schizophrenia and other psychoses³.

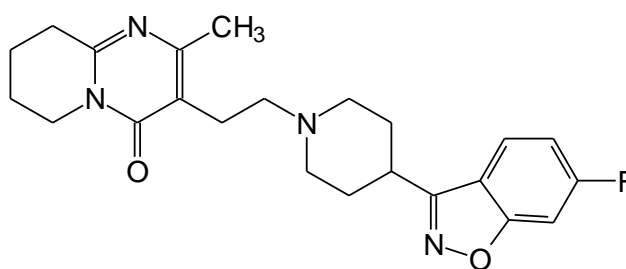


Fig. 1 Chemical structure of risperidone.

The oral route is known as the most popular for drug administration among patients in general. However, with antipsychotics some problems may occur, since these drugs are commonly used to treat people with mental disorders, like schizophrenia. Several studies report low patient compliance in treatments with oral antipsychotic drugs, like RIS. The reasons for this are mostly related with the need of frequent dose administration, the resistance to swallow tablets and the existence of unfavorable side effects^{2,4}. Nonetheless, since RIS target site is brain, the adverse effects are mainly related with non targeting events⁵. Therefore, alternative oral formulations for RIS are required.

The employment of nanocapsulas (NC) to improve delivery of drugs emerges as a good alternative. The advantages that these systems have been showed over the traditional pharmaceutical forms, for example: ability to encapsulate lipophilic drugs, protection of molecules against degradation on the GIT environment, and drug absorption enhancement; due to the presence of physiological lipids; modified drug release profile^{6,7}. The success of NC as drug delivery systems should be evaluated by means of important pharmaceutical parameters, such as drug content and release. For this, the development of rapid and efficient analytical quantification techniques is necessary. To create a new analytical method is essential to check its ability to determine reliable and reproducible values for long-term use. Therefore, method validation is always required^{8,9}. The analyst should identify the most relevant parameters for the particular process, plan the validation studies and evaluate the

quality of the results obtained. The International Conference on the Harmonisation (ICH) provides the guidelines that must be followed for the validation of analytical procedures¹⁰.

In the literature, there are several descriptions of analytical high performance liquid chromatography (HPLC) methods for the determination of RIS in plasma from conventional pharmaceutical forms, such as tablets¹¹, injections¹², oral solutions or suspensions,^{13,14} solid lipid nanoparticles¹⁵ and also from colloidal carriers, such as micelles¹⁶. In the present work, a simple, rapid, sensitive, accurate and efficient HPLC method using UV detection at 280 nm was developed and validated for the determination of RIS from NC, according to the ANVISA Resolution RE n° 899 and International Conference on Harmonization (ICH). The suitability of method application was demonstrated by the assessment of drug content and encapsulation efficiency, regardless of used oil in the production of nanocapsules.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and chemicals

The raw material Risperidone (RIS) batch: 01192/2011 (purity 99.9%) was supplied by Cristália[®]. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL, $M_n = 70.000 - 90.000$), sorbitan monostearate 60 (Span[®] 60) and dialysis bag cellulose membrane ($M_w = 14\ 000$) (Sigma-Aldrich[®], USA), sesame oil, linseed and safflower oil (Pazze[®], Brazil). Caprylic/capric triglyceride (Crodamol[®] GTCC) (Alpha Química[®], Brazil). Cod liver oil (All Chemistry[®], Brazil). Polysorbate 80 (Tween[®] 80) and acetone (Synth[®], Brazil). Polyethylene glycol 4000 (Galena, Brazil). HPLC grade acetonitrile, methanol and tetrahydrofuran (Merck[®], Brazil). All other reagents and solvents used were of analytical grade.

Preparation of loaded PEGylated nanocapsules

RIS-PEGNC were prepared by interfacial deposition of preformed polymer according to Fessi et al. (1989)¹⁷. Risperidone was dissolved in acetone (62.5 mL) with the polymer (PCL) (0.20 g), the oil (caprylic/capric triglyceride (Tc), sesame oil (Se), linseed (Li), cod liver oil (Co) or safflower (Sa) (0.875 g)) and sorbitan monostearate (0.2 g) at 40 °C. This organic phase was poured into an aqueous phase composed of polysorbate 80 (0.02 g) and PEG (0.125 g) under stirring, leading to the immediate formation of a milky dispersion. After 1 hour, acetone was removed and the suspension concentrated by evaporation (bath at 40 °C) under reduced pressure. The RIS-PEGNC was concentrated to 1 mg/mL and a fixed volume

of 25 mL. The placebo suspension (drug-unloaded) was prepared as described above, without adding risperidone, with different oils. RIS-PEGNC containing Tc, Se, Cl, Li or Sa were coded as TcRIS-PEGNC, SeRIS-PEGNC, CoRIS-PEGNC, LiRIS-PEGNC, SaRIS-PEGNC, respectively. All formulations were prepared in triplicate, stored in a refrigerator ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) and protected from light (amber glass flasks).

Extraction of risperidone from nanocapsules

After preparation, several tests were performed for drug extraction from nanocapsules with change of solvents, ultrasound, agitation, heating and centrifugation time (Table 1). The amount of RIS was determined by the straight-line equation of the standard curve obtained.

Table 1 Altered parameters for drug extraction from the nanocapsules.

Parameters	Variations
Solvents (used alone or mixed in various proportions)	Methanol, acetonitrile, ethanol, tetrahydrofuran and dimethyl sulfoxide
Initial ultrasound time and after shaking	10, 20, 30, 40 and 60 minutes
Shaking time	30, 60, 10, 150 and 180 minutes
Centrifugation time	20, 30 and 60 minutes
Heating time at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$	20, 30 and 60 minutes

Physico-chemical characterization, drug content and encapsulation efficiency of RIS-PEGNC

The particle size, polydispersity were measured by photon correlation spectroscopy (3 measurements/batch; 3 runs of 30 s/measurement $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) after adequate dilution of an aliquot of the suspensions in purified water (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments). Zeta potentials were determined using the same instrument at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, after the dilution of the samples in purified water (3 measurements/batch; 12 runs/measurement, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

The pH values of the formulations were measured directly in the dispersions using a calibrated potentiometer (Denver Instrument, Model Ultrabasic, USA).

The amount RIS in the suspension was assayed by the HPLC method as previously validated. Free amount of RIS in the nanocapsules was determined by measuring the non-incorporated drug present in the aqueous phase after ultrafiltration/centrifugation using Microcon® centrifugal filter devices (100,000 NMWL; Millipore, USA). The RIS associated

with emulsions was calculated from the difference between the total and the free drug concentrations.

Equipment and Chromatographic conditions

The development and validation of the assay was performed on a Shimadzu LC system (Kyoto Japan), with an LC-20AT pump, SIL-20A ht automatic injector, CTO-20AC column oven, SPD-M20A photodiode array detector (PDA) and CBM-20A controller with LC solution software. Chromatographic separation C8 (250 x 4.6 mm, 5 μ m) column. The mobile phase was composed per methanol:acetonitrile:buffer phosphate pH 7.0 (15:45:40), respectively, flow 1.0 mL/min., PDA detection at 280 nm. The injection volume was 20 μ L and the column temperature was set at 25 $^{\circ}$ C.

Validation of the analytical method

The technical validation process was carried out according to the ANVISA Resolution RE n $^{\circ}$ 899¹⁸ and International Conference on Harmonization (ICH)¹⁹. The evaluated parameters included selectivity, linearity, detection and quantification limit, accuracy, precision and robustness. To the validity of the method used form the nanocapsules TcRIS-PEGNC.

System suitability. The performance of some chromatographic parameters should be estimated to guarantee that the developed method is able to produce acceptable results. Tests were done by injecting ten replicates of the reference standard (RS) solution 20 μ g/mL and calculating each following parameters: column efficiency, assessed by the number of theoretical plates (N), risperidone retention time (t_R), tailing factor (T), and asymmetry.

Specificity. White nanocapsules containing five different oils were prepared as described in *Preparation of loaded PEGylated nanocapsules*, and analyzed to evaluate the possible influence of excipients in the formulation. Moreover, the specificity was evaluated for stress testing (ICH, 2005). The stress conditions follow:

Hydrolytic Conditions. Individually, 25.0 mg of RIS reference substance were dissolved in a 25 mL volumetric flask with acetonitrile to generate a concentration of 1.0 mg/mL. Then 2.5 mL aliquots were transferred to a 25 mL volumetric flask and dissolved in HCl 0.1 M and NaOH 0.1 M. After 1, 2, 4 and 6 hours, aliquots of 2.0 mL were transferred to a 10 mL volumetric flask and neutralized with NaOH 0.1 M and HCl 0.1 M, respectively.

Oxidative Condition. The equivalent of 25.0 mg of RIS reference substance was dissolved in a 25 mL volumetric flask with acetonitrile to generate a concentration of 1 mg/mL. After that, 2.5 mL aliquots were transferred to a 25 mL volumetric flask and dissolved in a 5.0 mL hydrogen peroxide 3%. After, 1, 2, 4 and 6 hours, 2.0 mL aliquots were transferred to a 10 mL volumetric flask dissolved in acetonitrile (20 µg/mL).

Photolytic degradation. The equivalent of 25.0 mg of RIS reference substance was dissolved in a 25 mL volumetric flask with acetonitrile to generate a concentration of 1 mg/mL. After that, 2.5 mL aliquots were transferred to a 25 mL volumetric flask and dissolved with the same diluent. This solution was exposed to UV light ($\lambda = 254$ nm) for 1, 4, 6 and 24 hours. Then a 2.0 mL aliquot was transferred to a 10 mL volumetric flask and dissolved in acetonitrile (20 µg/mL). All the solutions were analyzed in triplicate.

For comparison of results, the raw material of risperidone and nanocapsules in the five oils were also exposed to UV light ($\lambda = 254$ nm) and measured at the same times and conditions. For the extraction of risperidone of the nanocapsules, they used the conditions described in *Extraction of risperidone from nanocapsules*.

Thermal stress. The equivalent of 25.0 mg of RIS reference substance was dissolved in a 25 mL volumetric flask with acetonitrile to generate a concentration of 1 mg/mL. The solution was stored in a pre-heated oven at 80 °C and evaluated on after 1, 2, 4 and 6 hours. After the established time, 2.0 mL aliquot was transferred to 10 mL volumetric flask and volume obtained with acetonitrile (20 µg/mL).

Linearity and range. The linearity was determined by constructing three independent analytical curves, with five concentrations of RIS RS (10.0; 15.0; 20.0; 25.0; and 30.0 µg/mL), using acetonitrile as a diluent. The linear working range was obtained by plotting the area ratio of risperidone as a function of the RIS concentration, and a least square linear regression analysis was conducted.

Detection limit and quantification limit. The LD and LQ of the method were determined from the calibration curve and were calculated as $3x\sigma / S$ and $10x\sigma / S$, respectively, where σ

is the standard deviation of the y-axis intercept with the three calibration curves and S is slope of the analytical curve^{17,18}.

Precision and Accuracy. The precision assay was investigated with respect to repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). The repeatability was evaluated by assaying three determinations at concentrations of 10.0, 20.0 and 30.0 µg/mL, during same day and under the same experimental conditions. The intermediate precision was assessed by carrying out the same analysis on three different days. The precision was expressed as % of relative standard deviation (RSD).

Accuracy was evaluated by the amount of RIS reference substance recovered. The study was performed by adding a known amount of RIS standard solution to sample solution, to obtain the final concentrations of 14.0; 20.0; 24.0 and 30.0 µg/mL. The actual and the measured concentration were then compared. The experiments were repeated three times.

Robustness. The robustness evaluation of the chromatographic method for RIS was performed using the method proposed by Youden and Steiner (1975)²⁰. Four analytical parameters were selected and small variations were induced in the nominal values of the method. The four analytical parameters employed, as well as the variations introduced are shown in Table 2.

Table 2 Analytical parameters and variations to evaluated the robustness of the chromatographic method for RIS quantification.

Parameter	Variation	
Volume of acetonitrile in the first dilution	A - 6 mL	a - 4 mL
Time of ultrasonic bath for preparation sample	B - 35 min	b - 25 min
Time of shake for preparation sample	C - 2h15min	c - 1h45min
Filters	D - Cromafil Xtra	d - Ministrat RC

Then, eight runs were performed aiming to determine the influence of each parameter in the final results, according to a matrix of factors in Table 3.

Table 3 Matrix of factors for determination of method robustness.

Value of factor	Combination assayed							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A or a	A	A	A	A	a	a	a	a
B or b	B	B	b	b	B	B	b	b
C or c	C	c	C	c	C	c	C	c
D or d	D	D	d	d	d	d	D	D
Results	s	t	u	v	w	x	y	z

The parameters A, a, B, b, C, c, D, d, were calculated according to equations (Equations 1-8) as follows:

$$A = (s + t + u + v) / 4 \quad (1) \quad a = (w + x + y + z) / 4 \quad (5)$$

$$B = (s + t + w + x) / 4 \quad (2) \quad b = (u + v + y + z) / 4 \quad (6)$$

$$C = (s + u + w + y) / 4 \quad (3) \quad c = (t + v + x + z) / 4 \quad (7)$$

$$D = (s + t + y + z) / 4 \quad (4) \quad d = (u + v + w + x) / 4 \quad (8)$$

According to Nogueira et al. (2011)²¹, this method will be robust if conditions 1 and 2 are met:

Condition 1: (for factor A and other factors) content of RIS – 5% ≤ A ≤ content of RIS + 5%.

Condition 2: (for factor A and other factors) A – a ≤ 3% involving the RIS content.

An appropriate amount was transferred into an individual 10 mL volumetric flask, diluted to volume with diluents, and filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore, Bedford, USA), obtaining the final concentration of 20.0 μg/mL of the active pharmaceutical ingredient. The concentrations of RIS presented in samples were determined from the standard curve.

In addition to the parameters mentioned previously studied the possible variations in the response of the sample and RS when some chromatographic conditions were altered: mobile phase flow rate (1.0 mL/min to 1.1 mL/min). Column temperature (25 °C to 30 °C) and column chromatography (Waters® Bridge C8 (250 x 4.6 mm, 5 μm) to Phenomenex® Luna C8 (250 x 4.6 mm, 5 μm).

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction of RIS-PEGNC

Several tests were performed for the extraction of RIS of the nanocapsules. The best way to mine RIS in several tests was by adding 400 μL nanocapsules in suspension in a 10 mL volumetric flask with 5 mL acetonitrile and subjected to ultrasound for 30 minutes, followed to shaking for 120 minutes and adjusted the volume with tetrahydrofuran. This solution was diluted with acetonitrile, to a concentration 20 $\mu\text{g/mL}$.

The acetonitrile was used to solubilize the polymer and allow the release of the RIS in the medium, which occurred only after 30 minutes of ultrasonic and mechanical stirring 2 hours, this step being essential for the relaxation of the polymer links. To complete extraction of RIS was necessary to supplement the volumetric flask to volume TFH. The heating and the spin did not affect the result.

Physico-chemical characterization, drug content and encapsulation efficiency of nanocapsules

The suspensions and your placebo were prepared by interfacial deposition of preformed polymer and did not require subsequent purification. All suspensions, with different oils, were macroscopically homogeneous bluish-white opalescent liquids.

The particle size results showed (Table 4) that all sample were in the nanometric range, from 289.7 to 330.1 nm and are described according to the literature nanocapsules obtained from preformed polymers which are in the range of 250-500 nm, indicating the homogeneity of the particle size distribution²². Furthermore, particle sizes lower than 500 nm and composed of biocompatible materials are very important characteristics for therapeutic applications²³. According to Kreuter²⁴, for pharmaceutical purposes nanoparticles ranging in size from 1 to 1000 nm consist of macromolecular materials in which the active principle is dissolved, entrapped, or encapsulated, or to which the active principle is adsorbed or attached.

The suspensions showed monomodal size distributions and a polydispersity index in the range 0.145 to 0.175, indicating that the formulations were highly homogeneous with narrow size distributions. Accordingly, nanoparticles produced by the nanoprecipitation method feature a well-defined size and are characterized by an instantaneously formed narrow distribution²⁵. The pH values found in the formulations studied, between 7.2 and 7.5, are in agreement with literature reports for the nanoprecipitation methods, which in general, are in a range from 3.0 to 7.5²¹. The negative zeta potential were observed, between -34.2 and -37.8,

for all formulations and are consequence of the particle coating with polysorbate 80 acting as a physical stabilizer at the particle/water interface. There are two approaches to stabilizing colloidal systems such as nanocapsules: electrostatic and steric. In these formulations, the nanocapsules were sterically stabilized by polysorbate layer around the particles²⁶.

Physicochemical analyses demonstrated that suspensions showed homogeneity with a narrow distribution of mean diameter and low polydispersity. Additionally, suspensions demonstrated appropriate zeta potential and pH. According to a study by Win and Feng (2005)²⁷, nanoparticles were found stable in a state of dispersion, possessing high absolute values of zeta potential and having negative surface charges.

Table 4 Physicochemical characteristics of RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension.

Formulation	TcRIS- PEGNC	SaRIS- PEGNC	SeRIS- PEGNC	LiRIS- PEGNC	CoRIS- PEGNC
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Particle size (nm)	330.1 \pm 5.3	320.4 \pm 9.0	291.2 \pm 11.4	289.7 \pm 4.4	289.7 \pm 7.0
PDI	0.145 \pm 0.0	0.153 \pm 0.0	0.150 \pm 0.0	0.168 \pm 0.0	0.175 \pm 0.1
Zeta potential (mV)	-36.8 \pm 1.9	-35.6 \pm 0.7	-37.8 \pm 0.9	-34.2 \pm 2.3	-36.2 \pm 1.9
pH	7.0 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	6.7 \pm 0.1	7.5 \pm 0.1	7.4 \pm 0.1
Drug content (%)	99.56 \pm 1.2	99.05 \pm 1.2	98.76 \pm 0.2	99.80 \pm 0.4	99.12 \pm 0.8
Encap. Efficiency (%)	74.06 \pm 0.6	88.25 \pm 1.1	91.16 \pm 0.8	83.38 \pm 0.9	73.87 \pm 1.0

The values obtained for the drug content were in the range of 98.76% to 99.80%, demonstrating that the drug does not suffer degradation of the nanocapsules process of preparation and the active extraction method was efficient.

The calculation of the difference between total amount of drug present in the suspension and free drug found in the supernatant after centrifugation was used to check the encapsulation efficiency RIS. The encapsulation efficiency was in the range 73.87 and 91.16.

Validation study

System suitability. To obtain the best chromatographic method, the mobile phase containing acetonitrile, methanol and buffer phosphate pH 7.0 (45:15:40) was utilized to provide adequate peak and satisfactory results according to criteria evaluated. A 250 mm length

octylsilane column was able to obtain a resolution and peak asymmetry and short analysis time.

Specificity. The chromatograms obtained with of specificity test (Fig. 2), showed that none of the excipients and oils of the formulation eluted in the same retention time that the RIS. Therefore none of them interfered in its determination. With the help of diode array detector (DAD) it was the purity of chromatographic peak related to the drug. For this analysis the purity of the risperidone peak was 1.0.

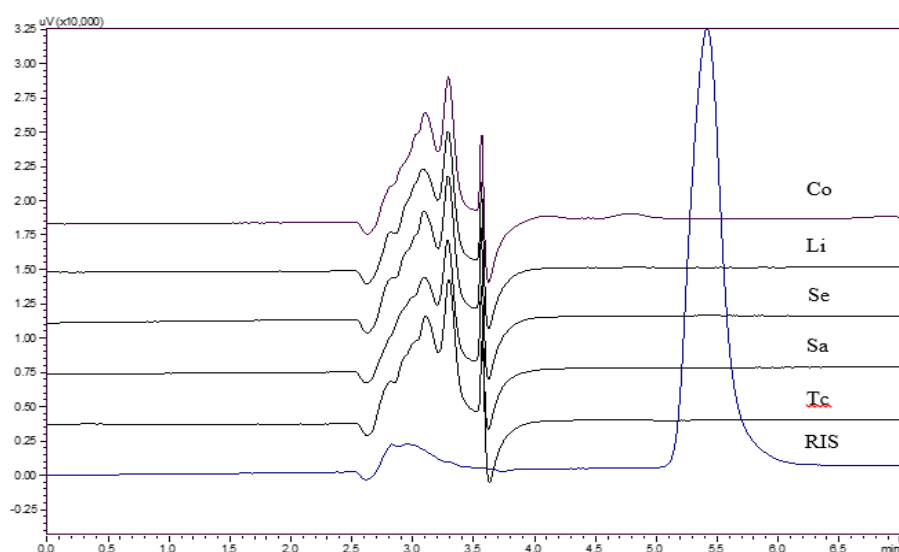


Fig. 2 Chromatogram of white formulations and RIS with different oils.

Furthermore, the interference of potential degradation products was investigated through a forced degradation test. These studies were performed to identify the key factors which will impact the drug stability, as well as verify that the method is useful for stability studies. Usually the range of degradation is 10% to 30%²⁸.

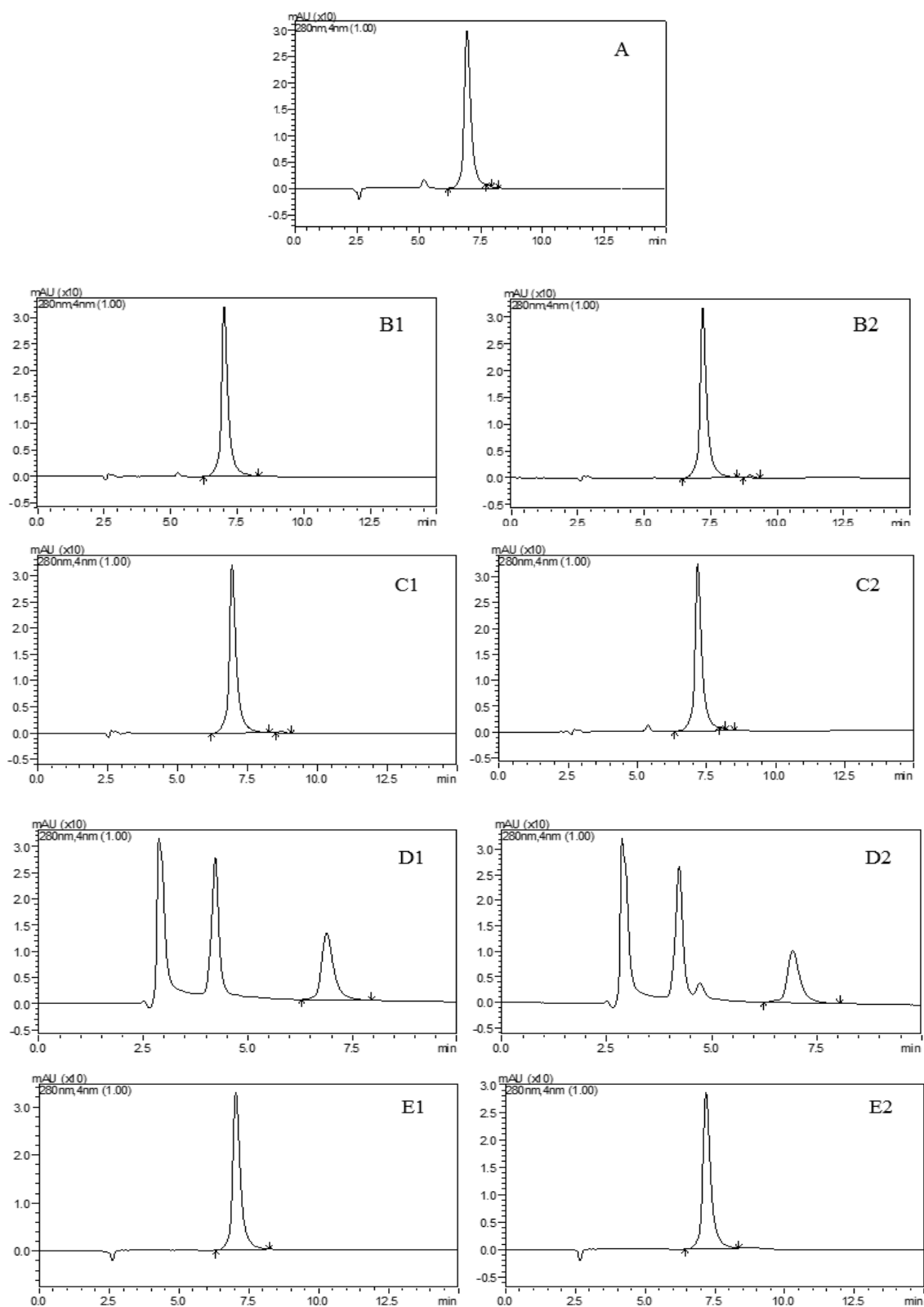


Fig. 3 Chromatograms corresponding of risperidone solution SQR. Time initial (A); Alkaline hydrolysis: (B1) time 1 hour and (B2) time 6 hours; Acid hydrolysis: (C1) time 1 hour and (C2) time 6 hours; Oxidative hydrolysis: (D1) time 1 hour and (D2) time 6 hours and Thermal stress: (E1) time 1 hour and (E2) time 6 hours.

After alkali and acid hydrolysis, the concentration remained constant and no degradation of the RIS reference substance was found. The stress test did not show the formation of secondary peaks in the chromatograms (Fig. 3). For this analysis the purity of the peak of risperidone was 0.99, at all times. The thermal stress test did not show the formation of side peaks on the chromatogram, moreover, the mean area of the RIS reference peak, only declined 4.44% at the time of 6 hours, maintaining constant in other times. For this analysis the purity of the risperidone peak was 0.99 at all times.

After chemical oxidation with H₂O₂ 3% during a 6 hours period, a reduction of area around 53.8%, 54.9% and 61.3% occurred at 2, 4 and 6 hours respectively, according to Fig.3. The absence of secondary peaks can be justified due to the absence chromophoric group in possible degradation products, very low concentration of possible product degradation was not possible to quantify or the possible degradation products formed have been retained column, not detected within the scanning time. For this analysis the purity of the peak of risperidone was 0.99, at all times. Suthar et al. (2009)²⁹, when evaluated the RIS degradation tablet found similar results.

Photolytic degradation. The Fig.4 shows the results obtained from the analysis of raw material, RIS previously diluted in acetonitrile and nanocapsules in different oils, in times of initial, 1, 4, 6 and 24 hours. The raw material had a 50% content in the first hour of the test, but thereafter remained stable. The RIS diluted in acetonitrile, had a reduction of area around 16.8%, 24.5%, 37.1% and 53.0%, occurred at 1, 4, 6 and 24 hours, respectively. Kumar et al. (2003)³⁰ have observed instability of the drug in the UV light, when validated a method to quantify RIS by spectrophotometry UV. All nanocapsules, regardless of the oil used, managed to protect the drug from degradation in the light, and presented the best result was the formulation with sesame oil in which, after 24 hours, the content decreased only 12.5%.

With the aid of DAD detector, studies of forced degradation of the drug and possible interference of excipients were evaluated, demonstrating thus that the developed method using HPLC is selective for determination of RIS in nanocapsules in different oils.

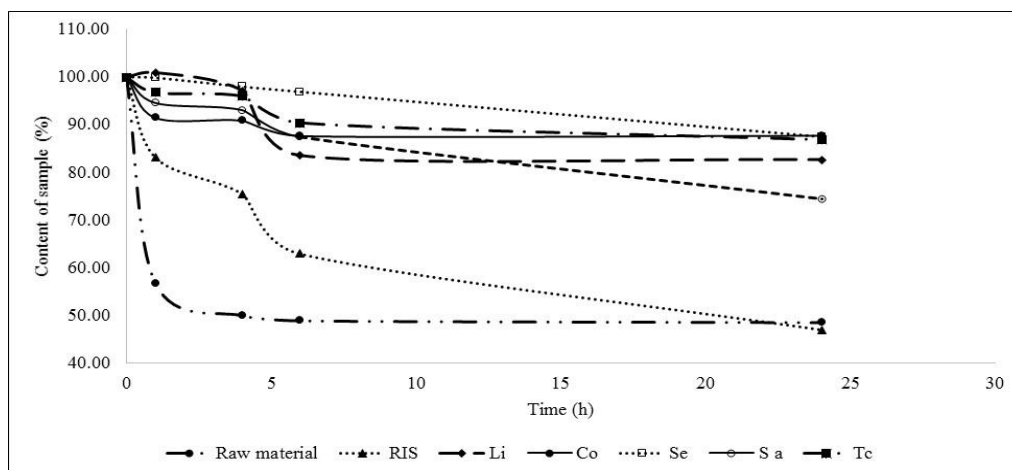


Fig. 4 Photolytic degradation of raw material, RIS and nanocapsules in different oils.

Linearity and range. Linearity corresponds to the ability of the methodology to demonstrate that values obtained are directly proportional to the drug concentration in the sample within a specified range. In fact, it is recommended that it be composed of at least five concentration levels within a range corresponding to at least from 80 to 120% of the working concentration^{18,19}.

Linearity was observed over the concentration range of 10.0 - 30.0 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 5), with a correlation coefficient of ($r = 0.9999$) according to the criteria established for $r = 0.99$ and the linear regression equation $y = 30119x - 10375$ (where, x is concentration and y is the peak absolute area). Assay validity was verified by means of the ANOVA. According to the statistical data, there is a linear relationship between the variables and there is no deviation from linearity ($p < 0.05$). It was shown that it could be used for interpolation of the experimental values, aiming at quantitative determination of this substance.

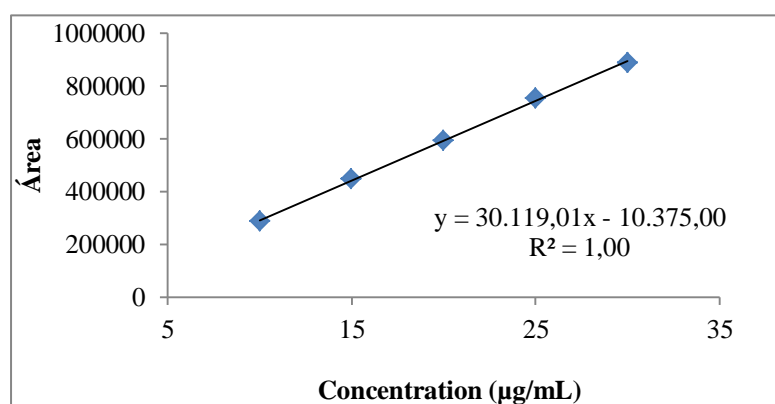


Fig.5 Graphic representation of the average standard curve reference chemical substance RIS.

Detection limit and quantification limit. The LQ is the least amount of analyte present in a sample that can be quantified with acceptable precision and accuracy. LD is the lowest amount of analyte present in a sample that can be detected but not necessarily quantified¹⁸. Quantification and detection limits were 0.66 µg/mL and 1.97 µg/mL respectively, showing sensibility of method.

Precision and Accuracy. Precision is the scattering of results between different studies, repeated from the same sample, or samples of similar patterns under defined conditions¹⁸. The precision of the method was evaluated as repeatability and intermediate precision and was expressed as RSD %. The mean results were 0.69% and 0.532% of RSD respectively, according to Tables 5 and 6. Limit is RSD maximum of 2.0%¹.

Experimental results for intermediate precision were evaluated statistically by analysis of variance (ANOVA) in order to determine whether there is a significant difference in the values obtained between different days. As shown in Tables 5 and 6, the value obtained for calculated F is lower than the tabulated value F, indicating no significant difference between the results for $p < 0.05$.

Table 5 Analytical parameters and variations to evaluate the repeatability of the chromatographic method for RIS quantification.

Sample concentration (µg/mL)	Content of sample (%)	Mean (%)	RSD (%)
10	99.67	99.37	0.48
	98.81		
	99.62		
20	99.68	99.46	0.97
	98.42		
	100.29		
30	100.22	99.29	0.82
	98.94		
	98.70		
Mean test (%) ± SD		99.44 ± 0.69	
RSD test (%)		0.69	
ANOVA		<i>F calculated</i>	<i>F tabulated*</i>
Between concentration		0.04	5.14

From RSD values obtained, it can be seen that the developed method provides an accurate determination of showing when it was performed on different days and by different analysts and adequate repeatability for analysis on the same day.

Accuracy was calculated as the percentage of recovery by the assay of the known added amount RIS reference substance in solution, using three concentration levels and three replicate of each concentration. The test was carried out accurately by retrieving the amounts of RIS reference substance added to the sample, obtaining a mean value of 100.28% (Table 7). The recommended value for different levels of concentration must be in the range of 98.0% to 102.0%^{18,19}. The method showed adequate strength when subjected to small variations in the parameters established.

Table 6 Analytical parameters and variations to evaluate the intermediate precision of the chromatographic method for RIS quantification.

Day	n	Content of sample (%)		Mean \pm DP	RSD (%)
		Analyst 1	Analyst 2		
1	1	100.14	99.94	99.83 \pm 0.44	0.44
	2	99.84	98.95		
	3	100.04	100.04		
2	1	99.56	100.10	99.78 \pm 0.30	0.30
	2	100.01	100.02		
	3	99.35	99.65		
3	1	99.94	100.12	99.92 \pm 0.21	0.21
	2	99.56	100.09		
	3	99.82	100.00		
Mean test (%) \pm SD			99.84		
RSD test (%)			0.32		
ANOVA		<i>F calculated</i>		<i>F tabulated*</i>	
Between days		0.28		3.68	

* $p < 0,05$; SD: standard deviation; RSD: relative standard derivation.

Table 7 Experimental values obtained for the accuracy test.

Samples	Final concentration ($\mu\text{g/mL}$)	RS quantity recovered*	
		($\mu\text{g/mL}$)	(% \pm SD)
R1	7.0	6.95	99.23 \pm 0.12
R2	10.0	10.07	100.70 \pm 0.29
R3	12.0	12.41	99.30 \pm 0.12
R4	15.0	15.27	101.79 \pm 0.47

*Mean of 3 determinations; SD: standard deviation.

Robustness. The method described by Youden and Steiner (1975)²⁰, makes it possible not only to evaluate method robustness, but also to sort the variation of each parameter in the final results³⁰.

Table 8 Combinations tested to evaluate the robustness of the analytical method, evaluating the conditions 1.

Combination assay								
Results	s	t	u	v	w	x	y	z
Content (%)*	99.9	99.3	97.4	98.9	99.3	99.6	100.3	99.7
Mean content (%): 99,32								
RSD (%): 0,88								
Acceptable range for content of RIS (%): $94.85 \leq 101.20 \leq 104.83$								

*mean for three determinations; SD: standard deviation; RSD: relative standard deviation.

Table 9 Combinations tested to evaluate the robustness of the analytical method, evaluating the conditions 2.

Content of RIS (%)		Difference (%)		Limits for difference (3% de 99.84%)	
A= 98.89	a= 99.76	A - a = - 0.88		2.99	Robust
B= 99.54	b= 99.11	B - b = 0.44		2,99	Robust
C= 99.25	c= 99.40	C - c = - 0.15		2.99	Robust
D= 99.81	d= 98.84	D - d = 0.98		2.99	Robust
Mean (%)* (A,a,B,b,C,c,D,d,E,e): 99.32					
SD: 0.37					
RSD (%): 0.37					

*mean for three determinations; SD: standard deviation; RSD: relative standard deviation.

Results presented in Tables 8 and 9, indicate satisfactory robustness of the method. After variation of some parameters of the method proposed, these variations were not able to significantly change the RIS content in the sample, mean levels of RIS ranging from 97.4% to 100.3%. The results satisfy conditions 1 and 2, and were therefore considered a robust method for the determination of RIS in nanocapsules.

The chromatograms related to this variation factors are shown in Fig. 6. With an increase in mobile phase flow rate reduced the retention time of the sample and SQR to 5 minutes, as expected, since it decreased the time to interact with the stationary phase (A). On the last changed parameter, the chromatographic column was heated, which caused a small decrease in 8.0 risperidone retention time to 7.4 minutes without interfering with the contents RIS (B). When the exchange chromatographic column was an increase in the RS and sample retention time, which does not interfere with the quantitative analysis of risperidone, since the content of the column in which the method was developed in was 99.64% and Phenomenex® column Luna in 99.41% (C). Thus, we conclude that the changes were not significant for the sample compared to the SQR, thus ensuring the robustness of the proposed analytical method.

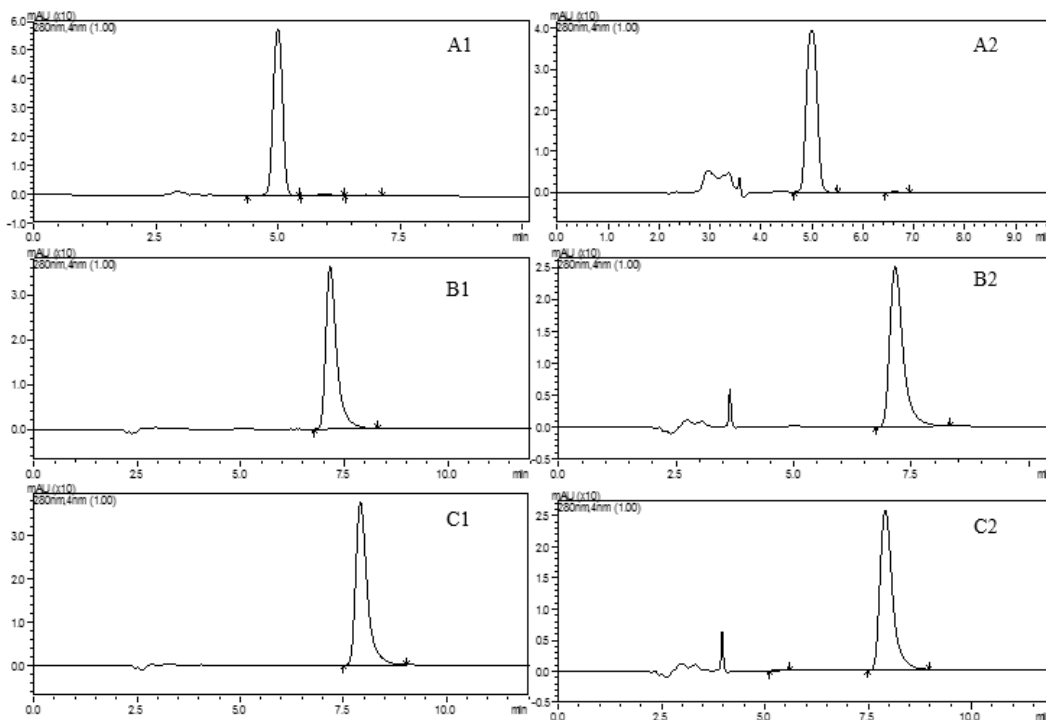


Fig. 6 Chromatograms of the RS (1) and sample (2) when some chromatographic conditions were altered: mobile phase flow rate (1.0 mL/min to 1.1 mL/min) (A). Column temperature (25 °C to 30 °C) (B) and column chromatographic (Waters® Bridge C8 (250 x 4.6 mm, 5 µm) to Phenomenex® Luna C8 (250 x 4.6 mm, 5 µm) (C).

CONCLUSION

The suspensions showed mean particle sizes according to the literature, monomodal size distributions and low polydispersity index indicating highly homogeneous formulations with narrow size distributions and appropriate pH and zeta potential. The extraction process proved to be efficient for the release of RIS nanostructured system. The proposed liquid chromatography method provides selective for different oils, linear, precise, accurate and robust results for the quantification of RIS-PEGNC.

NOTES AND REFERENCES

1 The United States Pharmacopoeia. *Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2013. 2879 p.*

2 Bhanji, N. H.; Chouinard, G. and Margolese, H. C. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 2004, **14**, 87-92.

3 Chue, P.; Welch, R. and Binder, C. *Can. J. Psychiatry.*, 2004, **49**, 701-703.

4 Chue, P.; Prinzo, R.S. and Binder, C.E. *Hum. Psychopharmacol.*, 2007, **22**, 307-314.

5 Kumar, M.; Misra, A.; Babbar, A.K.; Mishra, A.K.; Mishra, P. and Pathak, K. *Int. J. Pharm.*, 2008, **358**, 285- 291.

6 Muller, R. H.; Shegokar, R. and Keck, C. M. *Curr. Drug Discov. Technol.*, 2011, **8**, 207-27.

7 Das, S. and Chaudhury, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech.*, 2010, **12**, 62-76.

8 Ermer, J. and Ploss, H. J. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **37**, 859-870.

9 LoBrutto, R.; Patel, T. *John Wiley & Sons: New York*, 2007, 455-502.

10 Ermer, J. *Biomed. Anal.*, 2001, **24**, 755-767.

11 El-Sherif, Z. A.; El-Zeany, B. and El-Houssini, O. M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **36**, 975-981.

12 Batool, F.; Hasnat, A.; Haleem, M. A. and Haleem, D. J. *Acta Pharm.*, 2010, **60**, 129-140.

13 Zhang, G.; Terry, A.V. Jr. and Bartlett, M. G. *J. Chromatogr. B Analyt Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007, **856**, 20- 28.

14 Mandrioli, R.; Mercolini, L.; Lateana, D.; Boncompagni, G. and Raggi, M. A. *J. Chromatogr. B Analyt Technol. Biomed. Life Sci.*, 2011, **879**, 167-173.

- 15 Silva, A. C.; Lopes, C. M.; Fonseca, J.; Soares, M. E.; Santos, D.; Souto E. B. and Ferreira, D. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2012, **8**, 307-316.
- 16 Ould-Ouali, L.; Noppe, M.; Langlois, X.; Willems, B.; Te Riele, P.; Timmerman, P.; Brewster, M.E.; Arien, A. and Preat, V. *J. Control. Release*, 2005, **102**, 657-668.
- 17 Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P. and Amoury, N.; Benita, S. *Int. J. Pharm.*, 1989, **113**, 1-4.
- 18 Brasil. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. p.15.
- 19 ICH Expert Working Group, Int. Conf. Harmon. Tech. *Requir. Regist. Pharm. Hum. USE*, 2005, p.1-17.
- 20 Youden, W. and Stainer, E. *Washington: AOAC*, 1975. 88 p.
- 21 Nogueira, R.; Wollinger, W.; Silva, T.; Oliveira, L.; Moreira, G.; Barin, J.; Laporta, L.; Mesko, M.; Bittencourt, C.; Rodrigues, J. and Cunha, V. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2011, **47**, 351-362.
- 22 Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H. and Elaissari, A. *Int. J. Pharm.*, 2010, **385**, 113–142.
- 23 Bender, E. A.; Adorne, M. D.; Colomé, L. M.; Abdalla, D. S. P.; Guterres, S. S. and Pohlmann, A. R. *Int. J. Pharm.*, 2012, **426**, 271–279.
- 24 Kreuter, J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2014, **71**, 2–14.
- 25 Rao, J. P. and Geckeler, K. E. *Prog. Polym. Sci.*, 2011, **36**, p.887-913.
- 26 Jager, A.; Stefani, V.; Guterres, S. S and Pohlmann, A. R. *Int J Pharm*, 2007, **338**, p.130-140.
- 27 Win, K.Y. and Feng, S.S. *Biomaterials.*, 2005, **26**, 2713-2722.
- 28 Chan, J. M.; Valencia, P. M.; Zhang, L.; Langer, R. and Farokhzad, O. C. Grobmyer, S.R.; Moudgil, B. M. (eds.). *Cancer Nanotechnol.*, 2010, **624**, 163-175.
- 29 Suthar, A. P.; Dubey, S. A.; Patel, S. R. and Shah, A. M. *International Journal of PharmTech Research*, 2009, **1**, 568-574.
- 30 Kumar, V. V.; Singh, R. S. and Chaudhuri, A. *Current Medicinal Chemistry*, 2003, **10**, 1297-1306.
- 31 INMETRO (Brasil). 2007, DOQ-CGCRE-008.

Capítulo 12. Artigo 2

Nanoencapsulation risperidone with sesame oil: a study of formulation development and biological evaluation

Nanoencapsulation risperidone with sesame oil: a study of formulation development and biological evaluation

Luciane Varini Laporta^{1,2*}; Alexandre Machado Rubim^{1,2}; Bibiana Aldrigui²; Marta Palma Alves¹; Marilise E. Burger³; Katiane Rovesi³; Clarice Madalena Rolim¹.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

²Curso de Farmácia do Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS.

³Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

*Correspondence: L. V. Laporta. Centro Universitário Franciscano. Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos. Rua dos Andradas, 1614. CEP: 97015-040 – Santa Maria – RS. E-mail: luciane.laporta@gmail.com

ABSTRACT

The use of sesame oil (Se) to prepare nanocapsules (Nc) as controlled drug delivery systems was investigated. NC were prepared by interfacial deposition using the preformed polymer method. The formulations showed negative zeta potential and adequate nanotechnological characteristics (particle size, polydispersity index, pH, encapsulation efficiency) and remained stable for two months at temperatures of 25 °C and 4 °C. Biphasic drug release profiles were observed for the formulations. After 48 h, the concentration of drug released from the formulation containing sesame oil was lower (0.94 mg/mL) than the formulation containing triglycerides capric /caprylic acid (0.97 mg/mL). The results obtained with IR, DSC and X-ray diffraction, in addition to characterization studies, are a good indication that the RIS is nano-coated. *In vitro* studies demonstrate that the developed formulation was safe for the studied cells, showing no effect of cytotoxicity and genotoxicity. The *in vitro* drug-model release from NC formulations showed a biphasic controlled release profile, regardless of the type of oil. In addition, antipsychotic effect was increased with in relation to free drug and NcTc. Therefore, the type of the oil was shown as an important factor governing the control of drug release from nanocapsules.

Uniterms: Factorial design. Sesame oil. Nanotoxicity. Antipsychotic activity. Rats.

INTRODUCTION

Risperidone (RIS) is an atypical antipsychotic drug used for the treatment of mental disorders, like schizophrenia. According to these diseases conditions and the limited pharmaceutical forms available for RIS administration, poor patient compliance is a major issue. Moreover, concerning the RIS unpleasant extrapyramidal adverse effects, and the risk of occurring variations in drug plasma concentrations, due to sudden interruptions of the treatment, studies of alternative administration routes and development of prolonged release formulations are necessary (Bhanji; Chouinard; Margolese, 2004; Silva *et al.*, 2012).

One of the greatest challenges for the effective treatment of diseases of the central nervous system (CNS) is the inability of most drugs to penetrate the blood-brain barrier efficiently, thus preventing them from reaching an adequate concentration at their action site (Henrich-Noack *et al.*, 2014). To this end, nanostructured systems consisting of biodegradable polymers can be used as drug carriers, because they can interact even with the most complex biological systems with increased selectivity and faster than conventional pharmacological approaches, due to their size (10 a 1000 nm) (Choonara *et al.*, 2009; Galla, Hüwel, Lohmann, 2002).

Among the nanostructured systems we can highlight the nanocapsules which comprise a polymeric shell containing an oily or aqueous core. The drug may be dissolved or retained in the core and/or adsorbed to the polymeric shell (Guterres, Schaffazick, Pohlmann, 2007). Since RIS have major dose-dependent side effects, front instability to light, moisture and oxidations process, and are practically insoluble in water, we consider this drug a good candidate to be nanoencapsulated.

Sesame oil, derived from the seeds of plant species of *Sesamum indicum* L. belongs to family Pedaliaceae, consists of various fatty acids and non fat antioxidants, including tocopherol, sesamin, sesamol, and sesamol (Saleem; Madhusudhana Chetty; Kavimani, 2012). Although the use of the vegetable oils for the preparation of polymeric nanocapsules has been previously reported, not found in the literature searched, the association of sesame oil, with risperidone. Considering these information, the aims of this work are to development nanocapsules with RIS and sesame oil to evaluate *in vitro*, the influence of oil on the modulation of the drug release and the impact of the optimized formulation in the stereotyped behavior animal model induced by D,L-amphetamine and *in vivo*.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

The raw material Risperidone batch: 01192/2011 (purity 99.9%) was supplied by Cristália[®]. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL, $M_n = 70,000 - 90,000$), sorbitan monostearate 60 (Span[®]60), chloroform, potassium phosphate monobasic, sodium hydroxide, *n*-octanol (Sigma-Aldrich[®], USA); sesame oil (Pazze[®], Brazil); polysorbate 80 (Tween[®] 80) and acetone (Synth[®], Brazil); polyethylene glycol 4000 (Galena, Brazil). HPLC grade acetonitrile, methanol and tetrahydrofuran were acquired from Merck[®] (São Paulo, Brazil); Potassium bromide (J. T. Baker[®]). All other reagents and solvents used were of analytical grade.

Fatty acid composition in sesame oil

The sesame oil was produced by Paezze company that kindly provided the analytical report of the product. The main fatty acids found in these oils were determined by gas chromatography following the protocol established by the Adolfo Lutz institute (tec.055 / 053 and IV/IV).

Determination of RIS solubility in oil

The solubility of RIS in sesame oil was determined by adding by adding an excess amount of drug in the oil and keeping it under moderate magnetic stirring for 24 hours, at a temperature of 25 °C to reach equilibrium (Kelman *et al.*, 2007). A sample was centrifuged at 4000 rpm, for 25 minutes and an aliquot of the supernatant was diluted with acetonitrile and the RIS content was assayed by high-performance liquid chromatography.

Polymer swelling experiments

Films were obtained by complete dissolution of 125 mg poly(ϵ -caprolactone) (PCL) in 10 mL chloroform and subsequent total organic solvent evaporation. For each experiment, the films were precision weighed and placed on a glass plate. A sufficient amount of sesame oil to cover the film was added using a previously described methodology. The Petri plates were closed and stored at room temperature. After 2, 4, 6, 14, 21, 28, 35 and 60 days, the films were removed from contact with the solution, gently dried with absorbent paper and weighed on an analytical balance. The test was performed in triplicate (Rigo *et al.*, 2014).

Experimental design

Nanocapsules containing RIS were prepared based on 2^3 factorial design, with the polymer, the drug and the oil dependent variables, as shown in table I. The concentrations of the three variables were previously tested, following the ranges suggested by Mora-Huertas, Fessi, Elaissari (2010). The results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test, considering significant p values <0.05 , using the Design Expert® software (9.0).

TABLE I- Variables and levels of 2^3 factorial design for preparation of RIS nanocapsules.

Factor	Levels	
	Low (formulation)	High (formulation)
X_1 = Polymer concentration (%)	0.8 (F3, F4, F7, F8)	1.0 (F1, F2, F5, F6)
X_2 = Drug concentration (%)	0.08 (F5, F6, F7, F8)	0.1 (F1, F2, F3, F4)
X_3 = Oil concentration (%)	3.1 (F1, F3, F5, F7)	3.5 (F2, F4, F6, F8)

The nanocapsules (NC) were prepared by interfacial deposition of preformed polymer according to Fessi *et al.*, 1989. RIS was dissolved in acetone (62.5 mL) with the polymer (PCL), the sesame oil and sorbitan monostearate (0.2 g) at 40 °C. This organic phase was poured into an aqueous phase composed of polysorbate 80 (0.2 g), PEG (0.175 g) and aqueous solvent (125 mL), under stirring, leading to the immediate formation of a milky dispersion. After 60 minutes, acetone was removed and the suspension concentrated by evaporation (bath at 40 °C) under reduced pressure. The RIS nanocapsule was concentrated to 0.8 mg/mL or 1 mg/mL and a fixed volume of 25 mL. The drug-unloaded (placebo suspensions) were prepared as described above, without adding RIS. All formulations were prepared in triplicate, stored in a refrigerator ($4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) and protected from light (amber glass flasks) and their physicochemical characteristics evaluated and were identified as following: NCSe-F1, NCSe-F2, NCSe-F3, NCSe-F4, NCSe-F5, NCSe-F6, NCSe-F7 and NCSe-F8.

Particle size, polydispersity index and zeta potential

The particle size, polydispersity index were measured by photon correlation spectroscopy (3 measurements/batch; 3 runs of 30 s/measurement 25 °C) after adequate dilution of an aliquot of the suspensions in purified water (Zetasizer Nanoseries, Malvern

Instruments). Zeta potential were determined using the same instrument at 25 °C, after the dilution of the samples in purified water (3 measurements/batch; 12 runs/measurement, 25 °C).

pH

The pH values of the formulations were measured directly in the dispersions using a calibrated potentiometer (Denver Instrument, Model Ultrabasic, USA).

Extraction of RIS from the nanocapsules

After preparation, 400 µL of RIS loaded nanocapsule suspension were transferred to a 10 mL volumetric flask and subjected to ultrasound for 30 minutes. Next, this solution was mechanically stirred for two hours. The volume was completed with THF and homogenized. The obtained solution was diluted to the concentration of 20 µg/mL with acetonitrile.

Drug content and encapsulation efficiency

The amount of RIS loaded nanocapsule suspension was assayed by the HPLC method as previously validated. The assay was developed on a Shimadzu LC system (Kyoto Japan), with an LC-20AT pump, SIL- 20A ht automatic injector, CTO-20AC column oven, SPDM20A photodiode array detector (PDA) and CBM-20A controller with LC solution software. Chromatographic separations were achieved using a Waters® Bridge C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) column. The mobile phase contained a mixture of acetonitrile:methanol:buffer phosphate pH 7.0 (45:15:40 v/v), 1.0 mL/min flow, PDA detection at 275 nm. The injection volume was 20 µL and the column temperature was set at 25°C.

The free amount of RIS in the nanocapsules was determined by measuring the non-incorporated drug present in the aqueous phase after ultrafiltration/centrifugation using Microcon® centrifugal filter devices (100,000 NMWL; Millipore, USA). The drug associated with emulsions was calculated from the difference between the total and the free drug concentrations.

Refinement of the selected formulation

The formulation showing the best encapsulation efficiency, with a suitable diameter and zeta potential, low PDI and predicative value, consistent with the practical, will be chosen to continue *in vitro* studies.

Infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction and differential scanning calorimetry

The selected formulation (NcSe) and drug-unloaded (NcSe-DU), previously selected, were lyophilized at -55°C for 40 hours using 10% (w/v) lactose as a cryoprotectant agent.

For Ft-IR about 150 mg of the samples were compressed with 150 mg spectral grade potassium bromide and subjected to reading in a spectrophotometer (IR Spectrophotometer Fourier transform, Perkin Elmer spectrum one model-Japan) Infrared absorption.

For X-ray diffraction, the samples were scanned from 5° to 30° at a scan rate of $0.09^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Hu *et al.*, 2011). The X-ray powder diffraction diagrams were measured using a Bruker (D2 Phaser).

The differential scanning calorimetry curve (DSC) was obtained in the DSC-60 cell (Shimadzu, Japan) with the use of aluminum capsules sealed with approximately 2 mg of sample under a dynamic atmosphere of nitrogen ($100\text{ mL}/\text{min}$), with a heating ratio of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in the temperature range from 30°C to 300°C . The DSC equipment was calibrated with standard reference indium (melting point: 156.6°C ΔH melting = $-28.54\text{ J}/\text{g}$) and zinc (melting point 419.5°C).

Stability studies

The formulations NcSe and NcSe-DU were monitored for up to 60 days of storage for drug content, encapsulation efficiency, particle size, polydispersity index, zeta potential and pH. Formulations were stored at the following temperature 4°C , 25°C and 40°C , protected from light (amber glass flasks).

In vitro drug release assay

The *in vitro* NC release profiles for NcSe and NcTc (RIS nanocapsules with triglycerides capric/caprylic acid) (for comparison) were obtained ($n=3$) by the dialysis bag method using buffer HCl pH 1.2 as the medium, at 37°C . The dialysis bag containing 3 mL of the sample ($3.0\text{ mg}/\text{mL}$) was placed into a 500 mL of release medium under constant stirring (50 rpm). The amount of 3 mL of the external medium was withdrawn from the system at pre-determined time intervals, replaced by an equal volume of fresh medium and filtered through a 0.45 mm membrane. As the control, an ethanolic solution of RIS (RIS-Et) at $1.0\text{ mg}/\text{mL}$ was prepared in order to evaluate the diffusion of nonencapsulated drug across the dialysis bag. RIS was assayed by liquid chromatography. In order to understand the influence of the type of oil on the drug release behavior of nanocapsules, a mathematical model (MicroMath® Scientist® for WindowsTM) was used to analyze the drug release profiles (Cruz *et al.*, 2006). Monoexponential ($C=C_0 e^{-kt}$) and

biexponential ($C = ae^{-k_1t} + be^{-k_2t}$) models were used to evaluate the drug release profiles. The release rate constants are k , k_1 and k_2 and the initial concentration of drug are C_0 , a and b . The choice of the model that best fitted the drug release profiles was based on the best correlation coefficient, the best model selection criteria (MSC), both provided by the software, and the best fit observed on the graphs.

Antioxidant determination

The DPPH assay was done according to the method of Choi *et al.* (2002). The oil solution is prepared 10% (v/v) in chloroform and diluted to concentrations of 0.3%, 0.6%, 1.2%, 1.6%, 2.5% and 3.0% (v/v) in ethanol. The assay was performed in triplicate. The standard solution of butylhydroxytoluene (BHT) was prepared in the same way, using the same concentrations. It was transferred to 2.5 mL test tubes for each concentration of standard and samples and 1.5 mL of DPPH were added. Samples and standard were stored protected from light for 30 minutes and their absorbance determined spectrophotometrically in the visible region (518 nm). Simultaneously a blank was prepared for each concentration by adding 2.5 mL sample and 1.5 mL of ethanol. For the negative control 2.5 mL of ethanol and 1 mL of DPPH were transferred. The control reading should be in the range from 0.8 to 0.9.

The results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test, considering significant p values <0.05 , using the Graphpad Prism® software (5.0).

Cell viability, lipid peroxidation and chromosomal instability

The peripheral blood samples were obtained from samples without identification data Analysis Laboratory School Clinics of Franciscan University. The samples were obtained by venipuncture using heparin-like Vacutainer® tubes, which were used to separate the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and for subsequent treatments and cell cultures. This project was submitted to the Research Ethics Committee of the Franciscan University, and was registered under number CAAE 31211214.4.0000.5306. The samples of sesame oil, NcSe and NcSe-DU were diluted to concentrations of 1.2, 1.6, 2.5 and 3.1%. The experiments were performed in triplicate.

Cell viability was evaluated before and after exposure to treatment using the MTT assay, according to the method described by Choi *et al.* (2002). The absorbance at 560 nm was read into a TP-Reader (Thermoplate, China), and the results are expressed as percentage of control.

Lipid peroxidation was assessed by determining the thiobarbituric acid reactive species (TBARS) according to the method described by Ohkawa *et al.* (1979). After treatment of cells, an aliquot of this was mixed with a reaction medium containing 2- thiobarbituric acid (TBA) (0.8%) and incubated at 95 °C for 1 hour. The absorbance was measured at a wavelength of 532 nm in a spectrophotometer and the results expressed as moles of MDA (Malondialdehyde). The results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test, considering significant p values < 0.05, using the Graphpad Prism® software (5.0).

Evaluation of chromosomal instability was performed according to Moorhead *et al.* (1960). PBMC were resuspended in culture medium to an atmosphere of 37 °C and 5 % CO₂ for 72 hours. The metaphases were analyzed in objective 1000x, evaluating the mitotic index, the core size, the presence of chromosomal instability and metanucleares changes. Chromosomal instability is a quantitative test used for diagnostic purposes. All the evaluation of this study was performed by a biologist with samples without direct identification.

Antipsychotic Tests: pseudo-psychosis induced by D,L-amphetamine (AMPH)

Adult male Wistar rats (250 ± 50 g) (n=7) were kept in Plexiglas cages with free access to food and water in a room with controlled temperature (22 – 23 °C), and a 12 h light/dark cycle with lights on at 7:00 am. The experimental protocol of this study was approved by the Animal Ethics Committee of Universidade Federal de Santa Maria (CIETEA-22/2010), affiliated to CONCEA, and adhered to the “Principles of Laboratory Animal Care” and international rules of ethics in research.

The protocol of pseudo-psychosis induced by D,L-amphetamine was performed according to Benvegnú *et al.* (2011) with some modifications. One hour before the beginning of the experiment animals were habituated in mirrored individual cages. All groups received their first amphetamine (AMPH) administration (8 mg/kg i.p.) at time 0 (hour 0). After 30 min of AMPH, a 3 mg/kg body weight single dose via i.p. route were administrated of each formulation: Control (vehicle), Free-RIS, NcSe-DU, NcSe, NcTc-DU and NcTc.

Two, 4, 6, 8 and 10 h after the first AMPH administration, rats received the second, third, fourth and fifth dose of AMPH, in order to maintain its activity. Trained observers quantified stereotyped head behavior according to the method developed by Ujike *et al.* (1990) scale scores: 0, no head movement; 1, normal head movement and normal exploration; 2, increased rate of head movement with hyperactivity; 3, discontinuous repetitive and stereotyped up-down head movement; 4, continuous stereotyped head movement with an occasional break; 5,

continuous and intense stereotyped head movement at one location. A score was assigned to every 15 minutes in the hours 2, 4, 6, 8, 10 and 12h after the first AMPH administration. The average of scores in each hour was expressed as % head movements in relation to group that received alone AMPH stereotyped behavior scores.

Significant statistical differences on antipsychotic tests the groups were analyzed by Two-way ANOVA with repeated measures followed by Duncan's multiple range tests, when appropriate. Data were analyzed using Statistica® software (11.0) and expressed as mean \pm S.E.M. Significance was considered when $p < 0.05$.

RESULT AND DISCUSSION

Fatty acid composition in sesame oil

Sesame oil has long been categorized as traditional health food in India and other East Asian countries. Sesame oil has been found to contain considerable amounts of the sesame lignans: sesamin, episesamin, and sesamol. Sesame oil also contains vitamin E (40 mg/100 g oil), 43 percent of polyunsaturated fatty acids, and 40 percent monounsaturated fatty acids. The lignans are thought to be responsible for many of its unique chemical and physiological properties, including its antioxidant and antihypertensive properties (Sankar *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 1995). Sesame oil contains linoleic acid (43.8%), linolenic acid (1.0%), both polyunsaturated and responsible for providing omega 6 and 3 and octadecenoic acid (39.6%) (monounsaturated). The presence of oil in the nanocapsule formulations may increase the drug concentration in these systems. The general criteria for choice of oil are no toxicity, high stability, inability to solubilize the polymer and high affinity to the drug (Guterres, Schaffazick, Pohlmann, 2007). Besides the above features, some authors use the oils to assist or enhance drug activity (Rigo *et al.*, 2014; Benvegnù *et al.*, 2012).

Determination of RIS solubility in oil

The study results revealed that the solubility of RIS is 3.8 mg/mL \pm 0.26 in sesame oil and 2.1 \pm 0.66 mg/mL in triglycerides of capric/caprylic acid, which allows its use in the production of nanocapsules with a required dosage of 1 mg/mL. One of the basic principles for the development of nanocapsules and the drug studied is affinity and solubility of the oils, to prevent it from precipitating and compromising the formulation stability (Kelmann *et al.*, 2007).

Polymer swelling experiments

The compatibility of the oils and the polymeric material was evaluated by a polymer swelling experiment, in a pre-formulation test. Compared to the initial weight, the weight of the polymeric films after this test did not show any significant difference weight (ANOVA, $p > 0.05$), after 60 days in contact with vegetable oil. This means that sesame oil neither solubilize nor swell the polymer with in the period of analysis, demonstrating the potential for the use of these vegetable oil as new adjuvant prepare NC intended for the development of nanomedicines and nanocosmetics.

Experimental design

In this work, we evaluated the influence of these parameters on drug loading using a 2^3 factorial experimental design (eight experiments in triplicate). Eight batches of different combinations were prepared by taking values of selected variables: X1 – X3 at two levels as shown in table I. The variation of the nanoparticle size, polydispersion index, zeta potential, pH, drug content and encapsulation efficiency obtained for the factorial design is shown in table II.

TABLE II – Physicochemical characteristics of RIS nanocapsule suspension.

Formulation	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (Mz)	pH	Drug content (%)	EE (%)
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
NcSeF1	299.4 \pm 8.7	0.313 \pm 0.02	-38.0 \pm 1.86	6.8 \pm 0.05	98.94 \pm 0.77	86.58
NcSeF2	349.6 \pm 14.1	0.192 \pm 0.01	-39.9 \pm 0.25	6.9 \pm 0.01	99.05 \pm 1.23	86.78
NcSeF3	247.7 \pm 16.1	0.222 \pm 0.01	-36.4 \pm 0.74	6.8 \pm 0.07	99.28 \pm 0.67	89.04
NcSeF4	291.2 \pm 11.4	0.150 \pm 0.00	-37.8 \pm 0.91	6.7 \pm 0.08	98.76 \pm 0.23	89.54
NcSeF5	281.3 \pm 16.3	0.355 \pm 0.01	-43.7 \pm 1.76	6.8 \pm 0.06	98.33 \pm 0.26	85.30
NcSeF6	305.9 \pm 8.5	0.256 \pm 0.01	-36.3 \pm 0.69	6.7 \pm 0.06	98.66 \pm 0.52	91.16
NcSeF7	302.7 \pm 5.9	0.159 \pm 0.01	-40.6 \pm 0.76	6.8 \pm 0.05	99.98 \pm 0.04	84.96
NcSeF8	340.2 \pm 3.5	0.207 \pm 0.00	-36.9 \pm 1.66	6.7 \pm 0.08	99.49 \pm 0.87	90.30

PDI = Polydispersity index; SD; EE = efficiency encapsulation; = Standard deviation.

Nanocapsule preparation was a homogeneous system and its appearance is of an opalescent liquid (Tyndall effect) (Dimer *et al.*, 2014). Particle size distribution being an important aspect during the formulations of nanosystems, efforts are made to achieve a system with lowest polydispersity index (Mali; Bathe, 2015). The particle size values found in the formulations studied are between 0.150 nm to 0.355 nm and the polydispersity index from

0.150 to 0.355. pH values were 6.7 to 6.9 ± 0.14 and the zeta potential value were -36,6 to -3,7 mV.

The particle size results showed that all samples were in the nanometric range. Literature describes nanocapsules obtained from preformed polymers which are in the range of 250-500 nm, indicating the homogeneity of the particle size distribution (Mora-Huertas, Fessi, Elaissari, 2010). This polydispersity index was calculated by cumulant analysis and estimates the range of distribution, and values up to 0.250 are acceptable, indicating an adequate homogeneity of the systems (Alves *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2004). Formulations NcSeF1 and NcSeF5 have high polydispersity index, both of which have sesame oil at its lowest concentration. The negative zeta potential were observed for all formulations and are a consequence of the particle coating with polysorbate 80 acting as a physical stabilizer at the particle/water interface. There are two approaches to stabilizing colloidal systems such as nanocapsules: electrostatic and steric. In these formulations, the nanocapsules were sterically stabilized by a polysorbate layer around the particles (Jager *et al.*, 2007). The values obtained for the drug content were in the range of 98.33% to 99.99%, demonstrating that the drug does not suffer degradation in the nanocapsule preparation process and that the active extraction method was efficient.

Many factors affect drug encapsulation efficacy in the nanoprecipitation method for nanocapsules for instance, the amount of polymer or surfactant, the volume of the oily phase, amount of drug and others (Mohanraj, Chen, 2006; Fessi *et al.*, 1989). The results obtained in the factorial analysis for encapsulation efficiency are shown in figure 1 and figure 2 (polymer 1.0% and 0.8%), the factors that significantly alter the association rate for NcSe. Changes in the concentrations of drug and oil were statistically significant ($p < 0.05$) when compared by ANOVA, at 2 levels of variation and three variables. The best encapsulation efficiency was obtained when the concentration increased oil and low drug, independent of polymer.

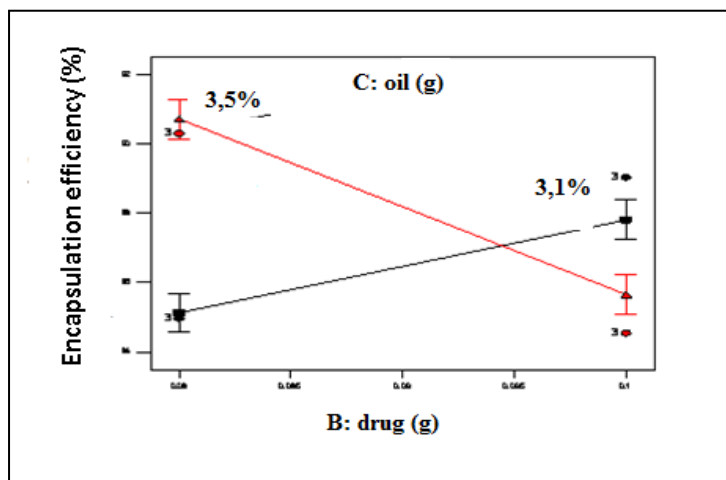


Figure 1 - Factors that significantly alter the association rate for NcSe.

The goal of the experimental design was the factorial method, with the minimum number of experimental variables have the biggest impact on the final product and finding the process variables. As described by Montgomery (2001), the response value of the effects could be calculated. Through the analysis of variance (ANOVA-3-way) the equation for the prediction of values was established, based on the responses obtained for each factor, and the following code was used for dependent variables: (A) polymer, (B) drug and (C) oil. The combination of letters is the interaction between two or more factors. The equation obtained for the encapsulation efficiency was (Equation 1):

$$\text{Encapsulation efficiency} = 87,33 - 0,60B + 0,86C - 1,94BC \quad (\text{Equation 1})$$

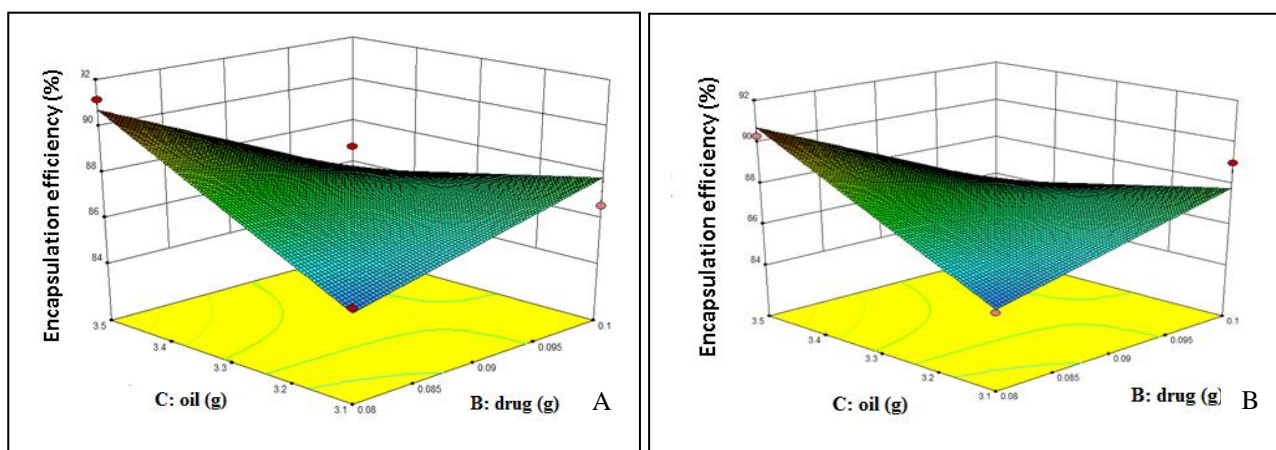


Figure 2 - Response surface plots for X2 and X3 on encapsulation efficiency, where X2 = drug concentration, X3 = oil concentration, when X1 = polymer concentration was 1.0% (A). Representation of planar interaction between X2 and X3 when X1=0.8% (B).

The result in table III illustrates the comparison between the observed and predicted values for all formulations studied, indicating a good correlation between them. It can be seen that in all cases there was a reasonable agreement between the predicted and the experimental values. For this reason it can be concluded that the equations adequately describe the influence of the selected independent variables on the responses under study. This indicates that the technique was appropriate for optimizing the RIS nanocapsule suspension with sesame oil. Thus, the low magnitudes of error in the present investigation prove the high prognostic ability of the optimization technique by factorial design.

Refinement of the selected formulation

Based on the results obtained, we chose the formulation that showed best encapsulation efficiency, but with a suitable diameter and zeta potential, low PDI and a predicative value consistent with a practical value, it was formulation NcSeF4, that from the selection will be called NcSe. The drug-unloaded formulation was prepared without the addition of RIS. The formulation with triglycerides of capric/caprylic acid were prepared in the same concentration, for comparison to the *in vivo* study.

TABLE III - The predicted and observed response variables of the RIS loaded nanocapsule with sesame oil.

Formulation	Predicted value	Observed value	Prediction error (%)*
NcSeF1	86.47	86.58	0.13
NcSeF2	89.44	86.78	-2.97
NcSeF3	86.47	89.04	2.97
NcSeF4	89.44	89.54	0.11
NcSeF5	86.47	85.33	-1.32
NcSeF6	89.44	91.16	1.92
NcSeF7	86.47	84.96	-1.75
NcSeF8	89.44	90.3	0.96

*Prediction error (%)=(observed value–predicted value) /predicted value×100%.

Infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction and differential scanning calorimetry (DSC)

In the FT-IR spectrum (figure 3) a significant reduction of some major bands of RIS (A), occurred, like the one in 1643, corresponding to axial strain C=O with stretching of the β -lactam ring, band 1535 corresponding to CN and CO, with angular deformation of the oxazole ring and band 1130 corresponding to fluorine, compared to nanocapsule formulation NcSe (B), as shown in figure 3 (Elzubair *et al.*, 2006). The RIS bands changed, which leads one to conclude that there was a chemical interaction between the components of the formulation. The spectra of NcSe-DU (C) and NcSe (B) were compared using the product software and had a 0.999 correlation factor, indicating the similarity between them and that there was an interaction between RIS, oil and polymer.

The X-ray diffraction of RIS shows the characteristic of the crystalline drug, having its main peaks at 10.6° and 21.0° (figure 4A). When the drug was nanoencapsulated NcSe, we can see that there was no peak at 10.6° and the peak at 21.0° is less intense, with the reduction or disappearance of the characteristic of RIS diffractions peaks. The similarity between the diffractogram patterns of NcSe and NcSe-DU indicates that there is chemical interaction between the drug, oil and polymer.

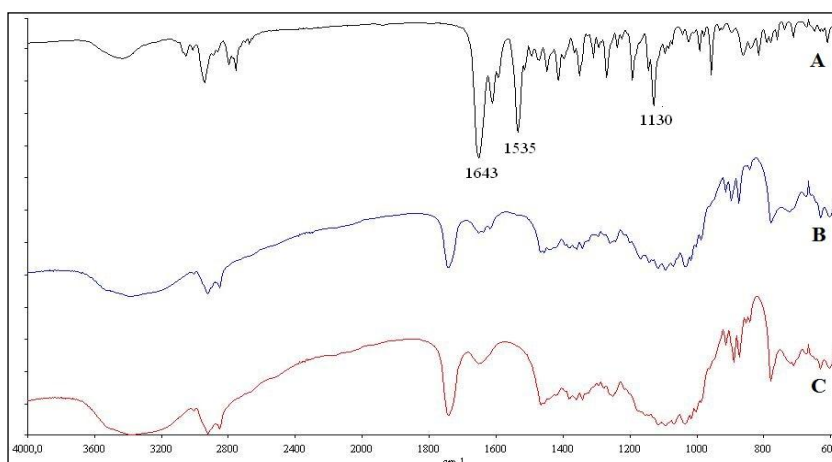


Figure 3 – FT-IR of RIS (A), NcSe (B) and NcSe-DU (C).

The thermal behavior of RIS, NcSe and NcSe-DU was evaluated using DSC test and the results are shown in figure 4B. DSC curves of RIS and PCL revealed a single sharp endothermic peak around 167.70°C , corresponding to the melting point of the drug ($\Delta H = -$

117.02 J/g), and endothermic peak around 55.26 °C, corresponding to the melting point of the PCL ($\Delta H = -87.13$ J/g) as described in the literature (Danel *et al.*, 2013; Rosa, Pentead, Calil, 2000). It was clear that the melting point of RIS in NcSe and NcSe-DU had disappeared, and the melting point of the endothermic peak PCL had decreased ($\Delta H = -11.08$ J/g). These values are an indication that there was interaction between the components of the formulation and the drug was nanocoated.

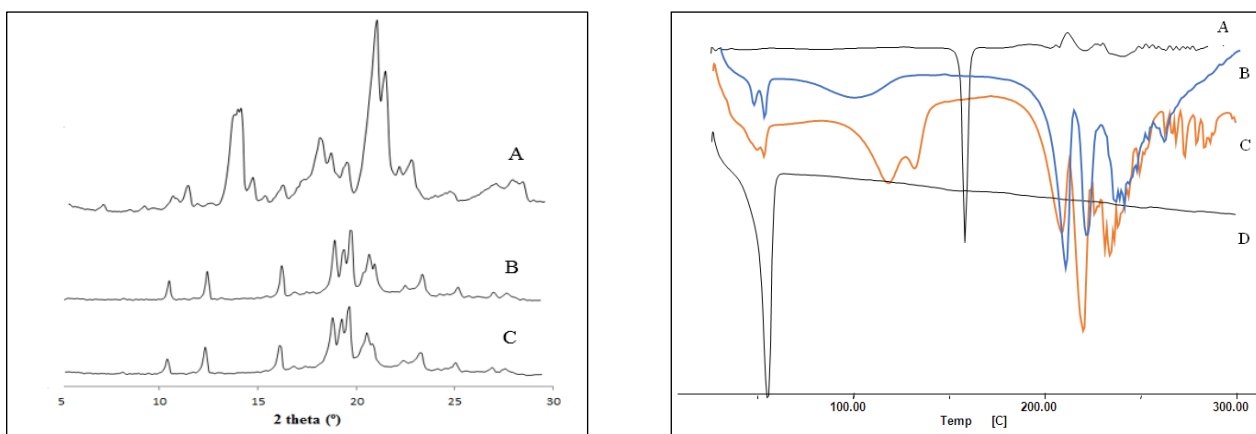


Figure 4 –X-ray diffraction and DSC of RIS and samples. A= RIS; B=NcSe; C=NcSe-DU and D=PCL.

Stability studies

The formulations were stored at temperature 4 °C, 25 °C and 40 °C, protected from light in order to evaluate their stability under storage. The results for the mean size, polydispersity index, zeta potential, pH, drug content and encapsulation efficiency were monitored for 2 months. As can be observed in table IV, for all formulations, after 2 months of storage the values for pH, mean particle size, polydispersity index, drug content and encapsulation efficiency were similar to the initial values, except that it was stored at 40 °C. At 40 °C the particle size and zeta potential increased and decreased efficiency of encapsulation.

TABLE IV -Physicochemical characteristics of NcGe and NcGe-DU after preparation and 2 months of storage (n = 3).

	25 °C		40 °C		4°C	
After the preparation						
	NcGe	NcGe-DU	NcGe	NcGe-DU	NcGe	NcGe-DU
pH	6.6±0.01	5.8 ± 0.04	6.6±0.01	5.8 ± 0.04	6.6±0.01	5.8 ± 0.04
Particle size (nm)	231.6±7	276.4±3	231.6±7	276.4±3	231.6±7	276.4±3
PDI	0.15±0.02	0.17±0.02	0.15±0.02	0.17±0.02	0.15±0.02	0.17±0.02
Zeta potential (mV)	-35.4±0.1	-31,4±0.4	-35.4±0.1	-31,4±0.4	-35.4±0.1	-31,4±0.4
Drug content (%)	99.65±0.8	-	99.65±0.8	-	99.65±0.8	-
EE (%)	90.41	-	90.41	-	90.41	-
After 2months						
	NcGe	NcGe-DU	NcGe	NcGe-DU	NcGe	NcGe-DU
pH	5.3±0.04	4.6± 0.03	3.5±0.07	3.7± 0.04	6.4±0.02	5.4± 0.05
Particle size (nm)	232.1±9	213.6±6	333.0±6	278.9±8	222.2±3	255.4±7
PDI	0.16±0.01	0.13±0.03	0.25±0.01	0.23±0.01	0.17±0.02	0.18±0.04
Zeta potential (mV)	-33.4±0.5	-22.6±0.8	-25.9±1.0	-30.1±1.4	-32.5±0.7	-36.7±0.9
Drug content (%)	99.49±1.2	-	98.78±0.6	-	99.17±0.8	-
EE (%)	90.15	-	80.26	-	90.31	-

***In vitro* drug release assay**

In the second part of this study, the aim was to investigate the influence of the oil on the modulation of drug release from nanocapsules, as an important property in the development of pharmaceutical formulations. Figure 5 shows the RIS release profiles for NcSe and NcTc as well as the diffusion profile for the RIS ethanolic solution (RIS-Et). RIS showed fast diffusion through the dialysis bag for the ethanolic solution (RIS-Et). On the other hand, NC formulations showed the ability to control the drug release rate. Furthermore, the type of oil influenced this drug release control.

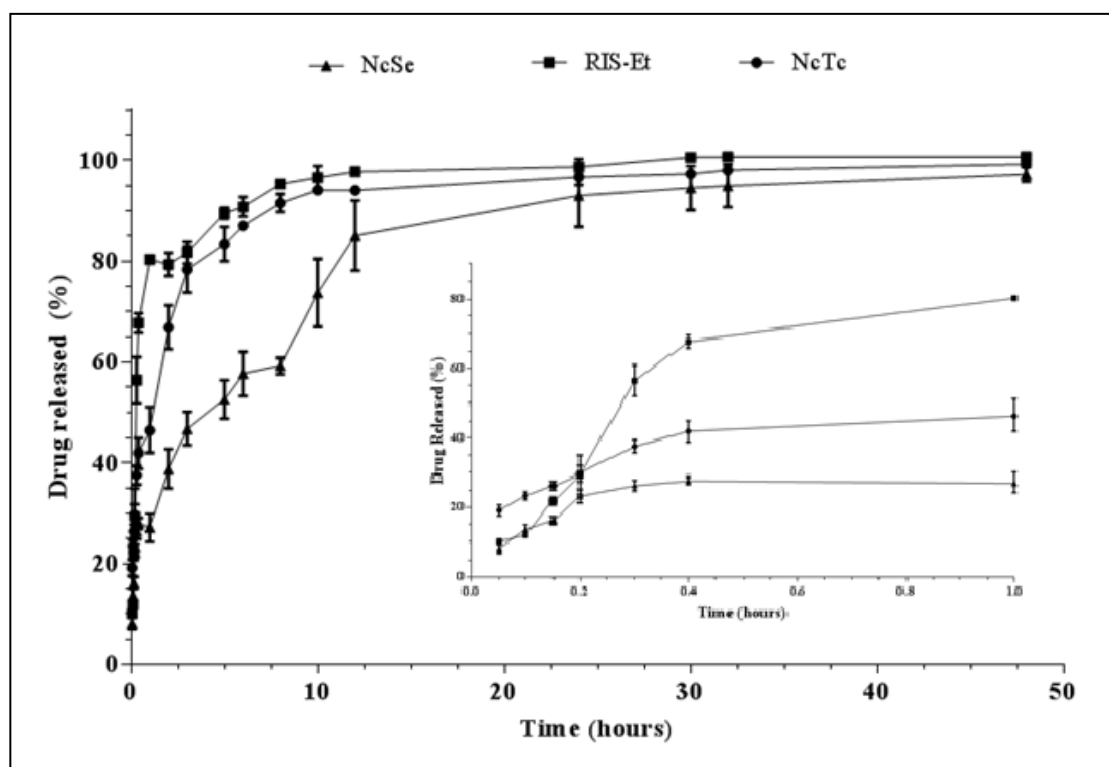


Figure 5 -Profiles of in vitro RIS release from ethanolic solution (RIS-Et) and NcSe and NcTc.

After 48 h, the concentration of RIS released from the NC formulation containing NcSe and NcTc 0.94 mg/mL and 0.97 mg/mL, respectively. The characteristics underlying the drug release profile for drug-loaded NC were investigated through the mathematical modeling of the data (Cruz *et al.*, 2006). The model that best described the release profile for formulations was the biexponential model (table V). This profile characterizes a biphasic release – an initial burst release followed by a rather slow drug release process. The concentrations of RIS associated with the burst (a) and the sustained (b) release phases ranged from 0.25 mg/mL and 0.75 mg/mL (NcSe) and 0.67 mg/mL and 0.31 mg/mL (NcTc). The encapsulation efficiency for these formulations were 0.89 mg/mL (NcSe) and 0.74 mg/mL (NcTc). Comparing the results of sustained release phase with the encapsulation efficiency can conclude that of 14% (NcSe) and 43% (NcTc) were adsorbed onto the polymeric wall and the remaining entrapped within the NC.

On the other hand, the rate constants for the burst (k_1) and the sustained (k_2) phases showed statistical differences among the formulations ($p < 0.05$). The drug delivery systems of the nanocapsules are directly related to the solubility of the drug, solubility in oil and this is

linked to the particle size. Depending on the type of oil incorporated into the polymer to profile release will be different, allowing more controlled systems than others (Pires, 2011). RIS showed different solubility in oils, which is very clear in the release values of NcTc, in which very little amount of active was in the oil core of the nanocapsule. Similar data were reported by Rigo *et al.*, (2014) when studying the influence of different vegetable oils in the drug release profile from lipid-core nanocapsules.

TABLE V - Rate constants, correlation coefficients, and MSC obtained by fitting the release profiles of NcSe and NcTc according to the biexponential equation.

Monoexponential model	NcSe	NcTc
k (min^{-1})	0.16 \pm 0.02	0.81 \pm 0.14
r	0.9806	0.9798
MSC	0.19	0.20
Biexponential model		
k1	0.81 \pm 0.24	0.29 \pm 0.30
k2	0.10 \pm 0.01	0.97 \pm 0.04
a	0.25 \pm 0.03	0.67 \pm 0.03
b	0.75 \pm 0.02	0.31 \pm 0.31
r	0.9960	0.9968
MSC	4.40	4.44

Antioxidant determination

The antioxidant capacity has been used as an indicator of the bioactivity of vegetable oils in the human body. Through *in vitro* antioxidant capacity values it is possible to rank the oils regarding their potential beneficial effect in the human body. However, it is reasonable to assume that the action of the main dietary antioxidants of biological significance *in vivo* depends on factors such as the level of oxidative stress to which the organism is exposed, the composition and amounts of antioxidants and pro-oxidants usually consumed, as well as the bioavailability and metabolism of the antioxidant compounds in the human body (Castelo-Branco, Torres, 2009).

The scavenging capacity of DPPH was concentration dependent and is in accordance with that described in the literature by Choi *et al.* (2002). The antioxidant activity of sesame oil can be attributed to its main compounds, linoleic acid. There was no formation of a plateau

at the concentrations studied (figure 6). When the average values of oil and BHT were compared by ANOVA followed by Tukey ($p < 0.05$), there was statistically significant difference in antioxidant capacity, for all concentration.

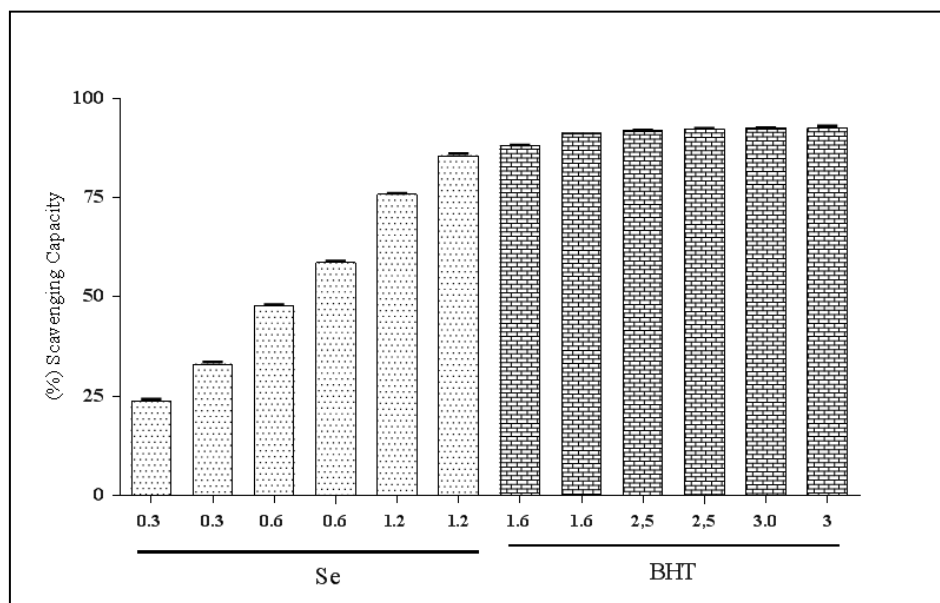


Figure 6 - DPPH radical scavenging capacity of sesame oil and BHT. Se: sesame oil; BHT: antioxidant standard. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

Cell viability, lipid peroxidation and chromosomal instability

Oxidative stress has been proposed as a major mechanism by which the polymeric nanocapsules can induce toxicity. However, in redox equilibrium conditions, reactive oxygen species (ROS) have beneficial activity because they participate in the defense against infectious agents and in cell signaling (Valko *et al.*, 2006). This stress is characterized by an imbalance between the production of ROS and nitrogen (RNS) and the endogenous antioxidant defense system, and may lead to a number of physiological changes, generated by significant damage to biomolecules with potential impact on the body (Ahamed, 2006). The ROS can be considered dangerous to membrane lipids (lipid peroxidation), DNA, proteins because they promote apoptosis and necrosis even in healthy cells. It is always important that the data obtained in the study of oxidative stress are confirmed by cytotoxicity and genotoxicity studies.

The study of cell viability is based on the reduction of 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) into a dark purple colored product, MTT - formazan, by the succinate dehydrogenase tetrazolium mitochondrial enzyme. As conversion occurs only in

viable cells, the decrease in absorbance of the tests compared to the negative control indicates cell death (Sagrillo *et al.*, 2015; Mosman, 1983). Therefore values lower than the positive control show cell death and values greater than the negative control show cell proliferation.

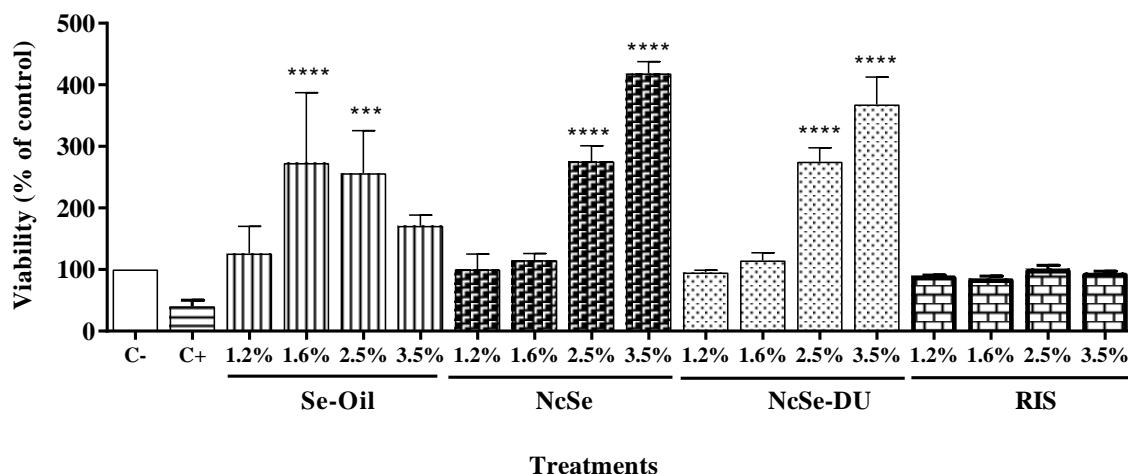


Figure 7 – MTT assay after 72 h of incubation. Results expressed as a percentage of the negative control (100%). Negative control (C-): cell in culture medium; (C+): cell with H₂O₂; Se: sesame oil. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

The samples tested did not alter cell viability, but sesame oil and as well as the highest concentrations tested NcSe and NcSe-DU, caused cell proliferation, suggesting pro-inflammatory activity (figure 7). This effect was expected since the oil exhibits concentration-dependent antioxidant action, as shown above.

Lipid peroxidation can be described generally as a process in which oxidants such as free radicals attack lipids containing carbon-carbon double bond(s), especially polyunsaturated fatty acids. The importance of the membrane lipid physical (phase) state is evidenced by the fact that lipids may control the physiological state of a membrane organelle by modifying its biophysical aspects, such as polarity and permeability. Lipids also have a key role in biology as signaling molecules (Ayala, Muñoz, Argüelles, 2014). Sesame oil at its all concentrations caused damage in the cell membrane as compared to the negative control. The nanocapsules exerted a protective effect on cells preventing lipid peroxidation caused by the free oil (figure 8).

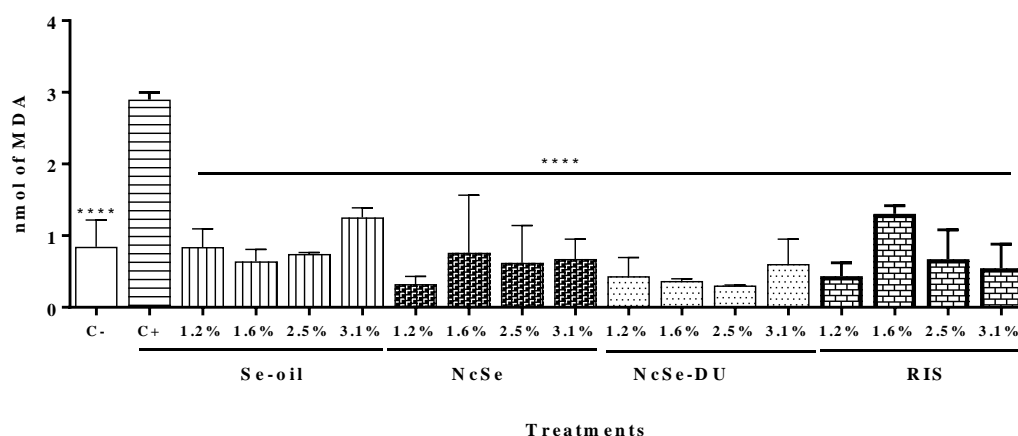


Figure 8 – Test TBARS after 72 h of incubation. Results expressed as mol of MDA. Negative control (C-): cell in culture medium; (C+): cell with H₂O₂; Se: sesame oil. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

No changes were viewed in the chromosomes of cells studied, when they received treatment with NcSe, NcSe-DU and RIS. Only sesame oil at the concentration of 2.5%, karyopyknosis caused in 10% of cells. The nanocapsules protected the cells when the oil was in the same concentration.

Antipsychotic Tests: pseudo-psychosis induced by D,L-amphetamine (AMPH)

The influence of free and nanoencapsulated risperidone on the percentage of AMPH-induced stereotyped behavior are shown in figure 9. The control and blank nanocapsules groups (NcTc-DU and NcSe-DU) showed a strong stereotyped behavior in all evaluations. Both RIS and NcTc groups showed decreased head movements in relation to their control (Control and NcTc-DU) group, which was maintained until six hours after drug administration. From of this time and until the last evaluation, animals treated with free RIS and NcTc showed stereotyped behavior similar to control group.

In the hour four after drugs administration was observed lower head movements in NcTc group in relation to Free-RIS group, while in the hour six NcTc and NcSe groups demonstrated a significative decrease in head movements in relation to free RIS. NcSe group showed decreased percentage of head movements in comparison to your control NcSe-DU in all time evaluated and showed more prolonged time effect of this formulation in relation to others formulations containing risperidone (RIS and NcTc).

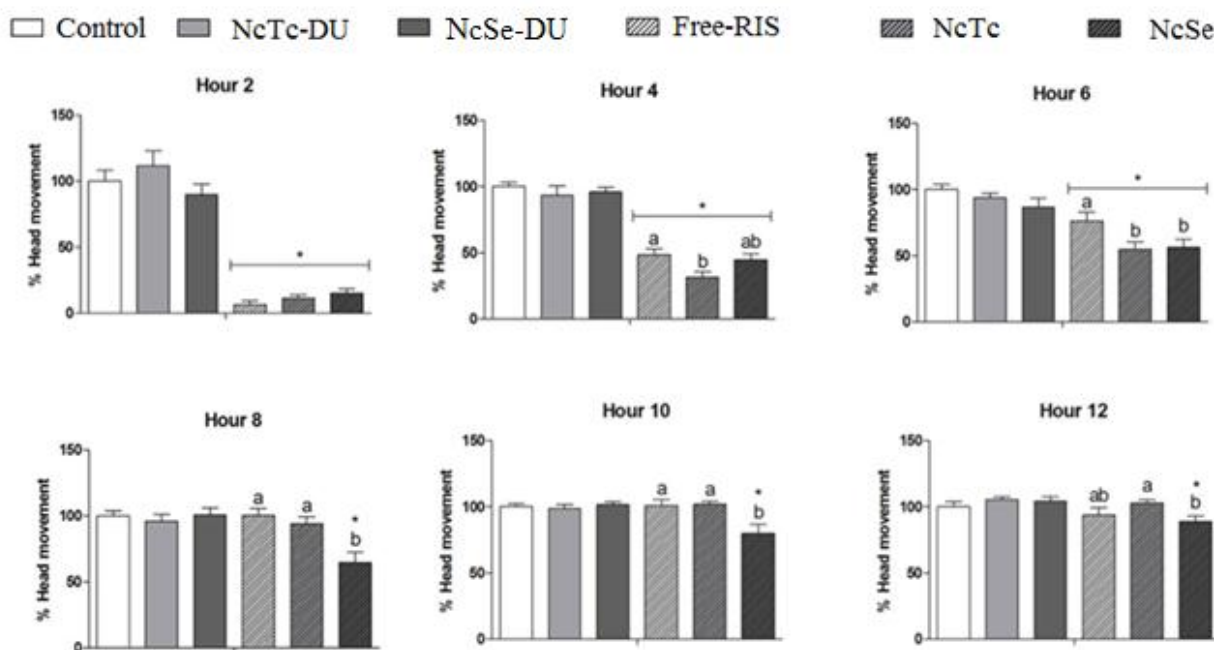


Figure 9 - Antipsychotic activity of different formulations of Risperidone ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) on amphetamine (AMPH)-induced stereotyped behavior ($8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p. each 2 h) in rats ($n=7$). Data are expressed as mean \pm S.E.M. of % head movements. Different lowercase letters indicate significant difference between experimental groups that contain RIS; *indicates significant difference to the same formulation without RIS.

Using an animal model of pseudo-psychosis AMPH-induced, it was observed that the animals develop stereotypic behavior as expected for the model and that a single dose of different formulations of antipsychotic RIS was able to decrease these pseudo-psychosis behaviors. Interestingly, our study demonstrated that NcSe in the formulation showed a more prolonged antipsychotic action in relation to free drug and classical NcTc. Other studies already demonstrated a more prolonged antipsychotic action of nanoencapsulated drugs like haloperidol (Benvegnú *et al.*, 2011), olanzapine (Dimer *et al.*, 2014, 2015) and risperidone (Muthu *et al.*, 2009). However, this is the first study demonstrating the beneficial effect of nanoencapsulated risperidone nanocoated containing sesame oil in the formulation. The more prolonged effect of this formulation can be explained by the *in vitro* release study, as NcSe released only 0.25 mg/mL at the initial stage and 0.75 mg/mL in the sustained phase, which did not occur with the NcTc or with Free-RiS. One explanation may be related to the increased solubility of the drug in sesame oil.

CONCLUSION

In conclusion, the factorial method was suitable for the development of RIS nanocapsule suspension with sesame oil, proving the high prognostic ability of the technique used in the optimization of laboratory studies. This study demonstrated the feasibility of preparing polymeric NC containing RIS at 1.0 mg/mL using sesame oil as an oily core with surface modifications. The formulation exhibited adequate physicochemical properties, for 2 months and prolonged the drug release. The nanocapsules with sesame oil and as adjuvants do not present cytotoxicity and genotoxicity potential. The *in vitro* drug-model release from NC formulations showed a biphasic controlled release profile, regardless of the type of oil. In addition, antipsychotic effect was increased with in relation to free drug and NcTc. These results indicate that NcSe is candidate a promising delivery system for RIS schizophrenia treatment.

REFERENCES

AHAMED, M. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in Vitro*, v.25, n.4, p.930-936, 2011.

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

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p.1-32, 2014.

BENVEGUNÚ, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; PASE, CAMILA S.; OURIQUE, A. F.; BECK, R. C.; BURGER, M. E. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.77, p.332-336, 2011.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Potential application of antioxidant capacity assays to assess the quality of edible vegetable oils. *Lipid Technology*, v.21, n.7, p.152-155, 2009.

CHOI, C. W.; KIMA, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. *Plant Science*, v.163, p.1161-1168, 2002.

CHOONARA, Y.; MODI, G.; NAIDOO, D.; NDESENDO, V. M. K.; PILLAY, V.; TOIT, L. C. Nanotechnological application for the treatment of neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, v.50, p.272-285, 2009.

CRUZ, L. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.313, p.198-205, 2006.

DIMER, F. A.; ORTIZ, M.; PASE, C. S.; ROVERSI, K.; FRIEDRICH, R. B.; POHLMANN, A. R.; BURGER, M. E.; GUTERRES, S. S. Nanoencapsulation of Olanzapine Increases Its Efficacy in Antipsychotic Treatment and Reduces Adverse Effects, *J. Biomed. Nanotechnol.*, v.10, n.6, p.1137-1145, 2014.

DIMER, F. A.; PIGATTO, M. C.; BOQUE, C. A.; PASE, C. S.; ROVERSI, K.; POHLMANN, A. R.; BURGER, M. E.; RATES, S. M. K.; COSTA, T. D.; GUTERRES, S. S. Nanoencapsulation Improves Relative Bioavailability and Antipsychotic Effect of Olanzapine in Rats, *J. Biomed. Nanotechnol.* V.11, n.8, p.1482-1493, 2015.

DANEL, C.; AZAROUAL, N.; BRUNEL, A.; LANNOY, D.; VERMEERSCH, G.; ODOU, P.; VACCHER, C. Study of the complexation of risperidone and 9-hydroxyrisperidone with cyclodextrin hosts using affinity capillary electrophoresis and ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, v.1215, p.185-193, 2008.

ELZUBAIR, A.; ELIAS, C. N.; SUAREZ, C. M.; LOPES, H. P.; VIEIRA, M. V. The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation. *Journal of dentistry*, v.34, p.784-789, 2006.

FESSI, H.; PUISIUEX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formulation by interfacial deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v.55, R1-R4, 1989.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. *Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos*. In: Marcelo Morales. (Org.). *Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007, v. único, p. 247-263.

HENRICH-NOACK, P.; HINTZ, W.; KOCKENTIEDT, S.; SABEL, B. A.; TOMAS, J.; VOIGT, N. Surfactants, not site or zeta-potential influence blood-brain barrier passage of polymeric nanoparticles. *European Journal and Pharmaceutical Biopharmaceutics*, v.87, n.1, p.19-29, 2014.

HU, Z; LIU, Y; YUAN, W.; WU, F; SU, J; JIN, T. Effect of bases with different solubility on the release behavior of risperidone loaded PLGA microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.86, p.206-211, 2011.

JAGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.338, p.67-305, 2007.

KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L.S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v.324, p.231-239, 2007.

MALI, A. D.; BATHE, R. S. Updated review on nanoparticles as drug delivery systems. *International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v.4, p.18-34, 2015.

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

MONTGOMERY, D. C. *Design and analysis of experiments*, 5rd. New York:John-Wiley & sons, INC., p.218-276, 2001.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosomes preparations leucocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, v.20, p.613-616, 1960.

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

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*, v.65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, R. H.; SCHMIDT, S.; BUTTLE, I.; AKKAR, A.; SCHMITT, J.; BRÖMER, S. SolEmuls-novel technology for the formulation of I.V. emulsions with poorly soluble drugs. *International journal of pharmaceutics*, v.28, n.269 (2), p.293-302, 2004.

MUTHU, M. S.; M. KRAWAT, M. K.; MISHRA, A.; SINGH, S PLGA nanoparticle formulations of risperidone: preparation and neuropharmacological evaluation. *Nanomedicine*, v.5, n.3, p.323-333, 2009.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v.95, p.351-358, 1979.

PIRES, R. O. Modelagem matemática de perfis de Liberação de fármacos a partir de Nanocarreadores. *Tese (Mestrado)*. Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2011.

RIGO, L. A.; FRESCURA, V.; FIEL, L.; CORADINI, K.; OURIQUE, A. F.; EMANUELLI, T.; QUATRIN, A.; TEDESCO, S.; SILVA, C. B.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Influence of the type of vegetable oil on the drug release profile from lipid-core nanocapsules and in vivo genotoxicity study. *Pharmaceutical Development and Technology*, v.19, n.7, p.789-798, 2014.

ROSA, D. S.; PENTEADO, D. F.; CALIL, M. R. Propriedades térmicas e biodegradabilidade de PCL e PHB em um pool de fungos. *Revista de ciência & Tecnologia*, v.15, p.75-80, 2000.

SAGRILLO, M. R.; GARCIA, L. F. M.; DE SOUZA FILHO, O. C.; DUARTE, M. M. M. F.; RIBEIRO, E. E.; CADONÁ, F. C.; DA CRUZ, I. B. M. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food Chemistry*, v.173, p.741-748, 2015.

SALEEM, M.; MADHUSUDHANA CHETTY, C.; KAVIMANI, S. Sesame oil enhances endogenous antioxidants in ischemic myocardium of rat. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.22, n.3, p.669-675, 2012.

SANKAR, D.; RAMAKRISHNA RAO, M.; SAMBANDAM, G.; PUGALENDI K. V. Effect of Sesame Oil on Diuretics or β -blockers in the Modulation of Blood Pressure, Anthropometry, Lipid Profile, and Redox Status. *Yale Journal of Biology & Medicine*, v.79, n.1, p.19-26, 2006.

SILVA, A. C.; AMARAL, M. H.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; SANTOS, D.; FERREIRA, D. Solid lipid nanoparticles (SLN) – based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of risperidone: preparation and characterization studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.93, p.241-248, 2012.

UJIKE, H.; AKIYAMA, K.; OTSUKI, S. D-2 but not D-1 dopamine agonists produce augmented behavioral response in rats after subchronic treatment with methamphetamine or cocaine. *Psychopharmacology* v.102, p.459-464, 1990.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, v.160, n.1, p.1-40, 2006.

YAMASHITA, K.; IIZUKA, Y.; IMAI, T.; NAMIKI, M. Sesame seed and its lignans produce marked enhancement of vitamin E activity in rats fed a low alpha-tocopherol diet. *Lipids*, v.30, p.1019-1028,1995.

Capítulo 13. Artigo 3

Influence of variation of pH of the aqueous phase in the encapsulation efficiency of nanocapsules PEGylated risperidone with linseed oil and in vitro evaluation of the toxicity

(Revista Pretendida: Brazilian Journal Pharmaceutical Science)

Influence of the variation of aqueous phase pH on the encapsulation efficiency of PEGylated risperidone nanocapsules with linseed oil and in vitro evaluation of toxicity

Luciane Varini Laporta^{1,2*}; Alexandre Machado Rubim^{1,2}; Conrado Beltrão Schopf²; Bibiana Aldrigui²; Marta Palma Alves¹; Clarice Madalena Rolim¹.

¹Graduate program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria

²Laboratory of Control of Drug Quality, Franciscan University Center

*Correspondence: L. V. Laporta. Centro Universitário Franciscano. Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos. Rua dos Andradas, 1614. CEP: 97015-040 – Santa Maria – RS. E-mail: luciane.laporta@gmail.com

ABSTRACT

The present study aimed to develop risperidone nanocapsules with linseed oil, to evaluate the influence of the pH of the aqueous phase for encapsulation efficiency and to determine the safety of these formulations *in vitro* when in contact with healthy human cells. Nanocapsules containing RIS were prepared by interfacial deposition method of the preformed polymer, based on 2^3 factorial design, the polymer, drug and oil being the dependent variables. The LiF4-PEG formulation was selected because it showed the best encapsulation efficiency, but with a suitable diameter and zeta potential, low polydispersity index and predicative values consistent with practical values. Increased encapsulation efficiency, of 10.15%, was obtained when the pH of the aqueous phase was altered to 7.0. The results obtained with IR, DSC and X-ray diffraction, in addition to characterization studies, are a good indication that the RIS is nanocoated. *In vitro* studies demonstrate that the developed formulation was safe for the studied cells, showing no effect of cytotoxicity and genotoxicity.

Uniterms: Nanocapsules. Encapsulation efficiency. Factorial design. Partition coefficient. Linseed oil. Nanotoxicity.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de nanocápsulas de rispedisona (RIS) com óleo de linhaça, a avaliação do pH da fase aquosa na eficiência de encapsulação e a determinação, *in vitro*, da segurança destas formulações, quando em contato com as células humanas saudáveis. Nanocápsulas contendo RIS foram elaboradas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, com base no planejamento fatorial 2^3 , sendo o polímero, o fármaco e o óleo as variáveis dependentes. A formulação LIF4-PEG foi selecionada, pois apresentou a melhor eficiência de encapsulação, mas também distribuição do diâmetro médio de partículas e potencial zeta adequados, baixo índice de polidispersão e valores predicativos coerentes com os valores práticos. Quando o pH da fase foi alterado para pH 7,0, conseguiu-se um aumento de 10,15% na eficiência de encapsulação. Os resultados obtidos com o IR, DSC e Difração de Raio-X, somado aos estudos de caracterização, indicam de que a RIS foi adequadamente nanoencapsulada. Os estudos *in vitro* demonstraram que a formulação desenvolvida foi segura para as células avaliadas, não apresentando efeito citotóxico ou genotóxico.

Unitermos: Nanocápsulas. Eficiência de encapsulação. Desenho fatorial. Coeficiente de partição. Óleo de linhaça. Nanotoxicidade.

INTRODUCTION

Risperidone (RIS) is a second generation antipsychotic drug used in the treatment of schizophrenia, refractory schizophrenia, infantile autism and depressed phase of bipolar disorder. It was the first dopamine/serotonergic antagonist induction of catalepsy and with low extra pyramidal effects compared to other drugs, but also has complex adverse effects, such as agitation, headache, difficulty in concentrating, rash and considerable weight gain (Cordioli, 2005; Baptista *et al.*, 2004).

The nanostructured systems, consisting of biodegradable polymers, can be used as drug carriers, since they can interact even with the most complex biological systems, such as the blood-brain barrier, more selectively and faster than the conventional pharmacological approaches, due to their size (10 to 1000 nm) (Choonara *et al.*, 2009; Galla, Hüwel, Lohmann, 2002). Among the nanostructured we can highlight the nanocapsules which comprise a polymeric shell containing an oily or aqueous core. The drug may be dissolved or retained in the core and/or adsorbed to the polymeric shell (Guterres, Schaffazick, Pohlmann, 2007). Since RIS have major dose-dependent side effects, front instability to light, moisture and oxidations process, and are practically insoluble in water, we consider this drug a good candidate to be nanoencapsulated.

Vegetable oils and animals have natural antioxidants, can potentially prevent chronic diseases as they can protect biological systems against the action of reactive oxygen species and nitrogen, responsible for oxidative damage to lipids, proteins and nucleic acids, in addition to presenting bioactivity) in the human organism. Among the recognized health benefits is the ability to reduce glucose, triglycerides and cholesterol levels, among others. Linseed oil is notable for being rich in linoleic acid (Omega 6), linolenic acid (Omega 3) and octadecenoic acid, and is widely consumed by the population (Barroso *et al.*, 2014; Galvão *et al.*, 2008).

The presence of oil in nanocapsules aims to increase the affinity of lipophilic drugs to the organic phase, and consequently increase their encapsulation but often this strategy is not enough to ensure the success of the formulation (Alanazi *et al.*, 2014), since the aqueous phase occurs at a higher concentration in the system and may influence the drug partition coefficient, causing it to migrate from the organic phase into the aqueous generating system instability.

RIS has two pKa, the first at 3.11 and the other at 8.24 is considered a strong base, thus having a better solubility in more acidic pH values, as it deprotonated form RH_2^{2+} which can

hinder their affinity for the oil core of the nanocapsule (Jung, Kos, Becirevic-Lacan, 2009). The pH of the aqueous phase of nanocapsules, generally composed of water and detergents, is in the range of 5.0 to 6.0, and may solubilize the drug.

The growing interest in the use of nanomaterials in pharmaceutical and food products, and the presence and safety of such nanoparticles in the environment need to be considered. Interest in the impact of this emerging technology has recently increased and therefore a key issue in this field is to evaluate its potential toxicity (Magdolenova *et al.*, 2012; Barrena *et al.*, 2009). Some researchers have reported that limited studies have been conducted on the toxicity of nanoparticles since the subject of nanotoxicology is relatively new (Curtis *et al.*, 2006).

The functionalization and adequate safety of nanostructured systems is one of the new challenges in the study of these formulations, thus the present study aimed to develop nanocapsules with risperidone and linseed oil, to evaluate the influence of aqueous phase pH on encapsulation efficiency and determine *in vitro*, the safety of these formulations when in contact with healthy human cells.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

The raw material Risperidone batch: 01192/2011 (purity 99.9%) was supplied by Cristália[®]. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL, $M_n = 70,000 - 90,000$), sorbitan monostearate 60 (Span[®]60), chloroform, potassium phosphate monobasic, sodium hydroxide, *n*-octanol (Sigma-Aldrich[®], USA); linseed oil (Pazze[®], Brazil); polysorbate 80 (Tween[®] 80) and acetone (Synth[®], Brazil); polyethylene glycol 4000 (Galena, Brazil). HPLC grade acetonitrile, methanol and tetrahydrofuran were acquired from Merck[®] (São Paulo, Brazil); Potassium bromide (J. T. Baker[®]). All other reagents and solvents used were of analytical grade.

Fatty acid composition in linseed oil

The linseed oil was produced by Paezze company that kindly provided the analytical report of the product. The main fatty acids found in these oils were determined by gas chromatography following the protocol established by the Adolfo Lutz institute (tec.055 / 053 and IV/IV).

Determination of RIS solubility in oil

The solubility of RIS in linseed oil was determined by adding an excess amount of drug in the oil and keeping it under moderate magnetic stirring for 24 hours, at a temperature of 25 °C to reach equilibrium (Kelman *et al.*, 2007). A sample was centrifuged at 4000 rpm, for 25 minutes and an aliquot of the supernatant was diluted with acetonitrile and the RIS content was assayed by high-performance liquid chromatography.

Polymer swelling experiments

Films were obtained by complete dissolution of 125 mg poly(ϵ -caprolactone) (PCL) in 10 mL chloroform and subsequent total organic solvent evaporation. For each experiment, the films were precision weighed and placed on a glass plate. A sufficient amount of linseed oil to cover the film was added using a previously described methodology. The Petri plates were closed and stored at room temperature. After 2, 4, 6, 14, 21, 28, 35 and 60 days, the films were removed from contact with the solution, gently dried with absorbent paper and weighed on an analytical balance. The test was performed in triplicate (Rigo *et al.*, 2014).

Experimental design

Nanocapsules containing RIS were prepared based on 2^3 factorial design, with the polymer, the drug and the oil dependent variables, as shown in table I. The concentrations of the three variables were previously tested, following the ranges suggested by Mora-Huertas, Fessi, Elaissari (2010).

TABLE I- Variables and levels of 2^3 factorial design for preparation of RIS nanocapsules.

Factor	Levels	
	Low (formulation)	High (formulation)
X ₁ = Polymer concentration (%)	0.8 (F3, F4, F7, F8)	1.0 (F1, F2, F5, F6)
X ₂ = Drug concentration (%)	0.08 (F5, F6, F7, F8)	0.1 (F1, F2, F3, F4)
X ₃ = Oil concentration (%)	3.1 (F1, F3, F5, F7)	3.5 (F2, F4, F6, F8)

The nanocapsules were prepared by interfacial deposition of preformed polymer according to Fessi *et al.*, 1989. RIS was dissolved in acetone (62.5 mL) with the polymer (PCL), the linseed oil and sorbitan monostearate (0.2 g) at 40 °C. This organic phase was poured into an aqueous phase composed of polysorbate 80 (0.2 g), PEG (0.175 g) and aqueous solvent (125 mL), under stirring, leading to the immediate formation of a milky

dispersion. After 60 minutes, acetone was removed and the suspension concentrated by evaporation (bath at 40 °C) under reduced pressure. The RIS loaded PEGylated nanocapsule was concentrated to 0.8 mg/mL or 1 mg/mL and a fixed volume of 25 mL. The drug-unloaded (placebo suspensions) were prepared as described above, without adding RIS. All formulations were prepared in triplicate, stored in a refrigerator (4 °C ± 2 °C) and protected from light (amber glass flasks) and their physicochemical characteristics evaluated and were identified as following: LiF1-PEG, LiF2-PEG, LiF3-PEG, LiF4-PEG, LiF5-PEG, LiF6-PEG, LiF7-PEG and LiF8-PEG.

Statistical analysis

The results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test, considering significant p values <0.05, using the Design Expert[®] software (version 9.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN).

Particle size, polydispersity index and zeta potential

The particle size, polydispersity index were measured by photon correlation spectroscopy (3 measurements/batch; 3 runs of 30 s/measurement 25 °C) after adequate dilution of an aliquot of the suspensions in purified water (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments). Zeta potentials were determined using the same instrument at 25 °C, after the dilution of the samples in purified water (3 measurements/batch; 12 runs/measurement, 25 °C).

pH

The pH values of the formulations were measured directly in the dispersions using a calibrated potentiometer (Denver Instrument, Model Ultrabasic, USA).

Extraction of RIS from the nanocapsules

After preparation, 400 µL of RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension were transferred to a 10 mL volumetric flask and subjected to ultrasound for 30 minutes. Next, this solution was mechanically stirred for two hours. The volume was completed with THF and homogenized. The obtained solution was diluted to the concentration of 20 µg/mL with acetonitrile.

Drug content and encapsulation efficiency

The amount of RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension was assayed by the HPLC method as previously validated, according to ICH guidelines (ICH, 2005), with respect to specificity, linearity (R^2 0,9999), precision (intra-day RSD <0.70 and inter-day RSD < 0.40) and accuracy (recoveries between 99.90% and 100.74%). The assay was developed on a Shimadzu LC system (Kyoto Japan), with an LC-20AT pump, SIL- 20A ht automatic injector, CTO-20AC column oven, SPDM20A photodiode array detector (PDA) and CBM-20A controller with LC solution software. Chromatographic separations were achieved using a Waters® Bridge C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m) column. The mobile phase contained a mixture of acetonitrile:methanol:buffer phosphate pH 7.0 (45:15:40 v/v), 1.0 mL/min flow, PDA detection at 275 nm. The injection volume was 20 μ L and the column temperature was set at 25 °C.

The free amount of RIS in the nanocapsules was determined by measuring the non-incorporated drug present in the aqueous phase after ultrafiltration/centrifugation using Microcon® centrifugal filter devices (100,000 NMWL; Millipore, USA). The drug associated with emulsions was calculated from the difference between the total and the free drug concentrations.

Determination of the partition coefficient

The partition coefficient was obtained using as aqueous phase water (pH 5.6) and water with pH adjusted at 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0, and the organic phase, *n*-octanol (Aulton, 2005). The initial concentration of RIS in the organic phase was determined by UV spectrophotometer at 280 nm. The phases were mixed by magnetic stirring for 1 hour at a temperature of 25 °C and then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The final concentration of RIS in the organic phase was determined by a UV absorption spectrophotometer at 280 nm. The drug concentration in the aqueous phase was calculated as the difference between the initial and the final concentration in the organic phase. The analysis was performed in triplicate and the average \pm standard deviation was calculated. The value of P was determined by the following expression $P = [Co]/[Ca]$, where Co is the concentration of the substance in the organic phase and the Ca concentration of the substance in the aqueous phase (Rama *et al.*, 2006)

Refinement of the selected formulation

The formulation showing the best encapsulation efficiency, with a suitable diameter and zeta potential, low PDI and predicative value, consistent with the practical, will be chosen to

continue variation studies of the aqueous phase. The following aqueous solvents were tested: buffers at pH 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0 (The United States Pharmacopeia, 2013) and Milli-Q® water with pH adjusted to 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0 with the aid of sodium hydroxide 0.01 N.

Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction

The differential scanning calorimetry curve (DSC) was obtained in the DSC-60 cell (Shimadzu, Japan) with the use of aluminum capsules sealed with approximately 2 mg of sample under a dynamic atmosphere of nitrogen (100 mL/min), with a heating ratio of 10 °C/min in the temperature range from 30 °C to 300 °C. The DSC equipment was calibrated with standard reference indium (melting point: 156.6 °C ΔH melting = -28.54 J/g) and zinc (melting point 419.5 °C). The sample (LiF4-PEG/7.0) and drug-unloaded (LiF4DU-PEG/7.0), previously selected, were lyophilized at -55 °C for 40 hours using 10% (w/w) lactose as a cryoprotectant agent.

For X-ray diffraction, the samples were scanned from 5° to 30° at a scan rate of 0.09 °C/min (Hu *et al.*, 2011). The X-ray powder diffraction diagrams were measured using a Bruker (D2 Phaser).

Infrared spectroscopy(FT-IR)

About 150 mg of the samples were compressed with 150 mg spectral grade potassium bromide and subjected to reading in a spectrophotometer (IR Spectrophotometer Fourier transform, PerkinElmer spectrum one model-Japan) Infrared absorption. The sample and drug-unloaded, previously selected, were lyophilized at -55 °C for 40 hours using 10% (w/v) lactose as a cryoprotectant agent.

Antioxidant determination

The DPPH assay was done according to the method of Choi *et al.*(2002). The oil solution is prepared 10% (v/v) in chloroform and diluted to concentrations of 0.3%, 0.6%, 1.2%, 1.6%, 2.5% and 3% (v/v) in ethanol. The assay was performed in triplicate. The standard solution of butylhydroxytoluene (BHT) was prepared in the same way, using the same concentrations. It was transferred to 2.5 mL test tubes for each concentration of standard and samples and 1.5 mL of DPPH were added. Samples and standard were stored protected from light for 30 minutes and their absorbance determined spectrophotometrically in the visible region (518 nm). Simultaneously a blank was prepared for each concentration by

adding 2.5 mL sample and 1.5 mL of ethanol. For the negative control 2.5 mL of ethanol and 1 mL of DPPH were transferred. The control reading should be in the range from 0.8 to 0.9.

The results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test, considering significant p values <0.05 , using the Graphpad Prism 5.0 software.

Cell viability, lipid peroxidation and comet assay

The peripheral blood samples were obtained from samples without identification data Analysis Laboratory School Clinics of Franciscan University. The samples were obtained by venipuncture using heparin-like Vacutainer[®] tubes, which were used to separate the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and for subsequent treatments and cell cultures. This project was submitted to the Research Ethics Committee of the Franciscan University, and was registered under number CAAE 31211214.4.0000.5306. The samples of linseed oil, LiF4-PEG and LiF4UD-PEG were diluted to concentrations of 1.2, 1.6, 2.5 and 3.1%. The experiments were performed in triplicate.

Cell viability was evaluated before and after exposure to treatment using the MTT assay, according to the method described by Choi *et al.* (2002). The absorbance at 560 nm was read into a TP-Reader (Thermoplate, China), and the results are expressed as percentage of control.

Lipid peroxidation was assessed by determining the thiobarbituric acid reactive species (TBARS) according to the method described by Ohkawa *et al.* (1979). After treatment of cells, an aliquot of this was mixed with a reaction medium containing 2- thiobarbituric acid (TBA) (0.8%) and incubated at 95 °C for 1 hour. The absorbance was measured at a wavelength of 532 nm in a spectrophotometer and the results expressed as moles of MDA (Malondialdehyde). The comet assay was performed according to Singh *et al.* (1988). Overall, 100 cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration) (De Souza Filho *et al.*, 2013).

The results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test, considering significant p values <0.05 , using the Graphpad Prism 5.0 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Fatty acid composition in linseed oil

Vegetable oils are natural products that have in their composition certain bioactive compounds with acknowledged health benefits. According to the literature, linseed oil is rich in omega 3 and omega 6, which are present in some fatty acids, and give them the ability to reduce the levels of glucose, cholesterol, triglycerides and cellular oxidative processes (Lewinska *et al.*, 2015; Farooqui *et al.*, 2007). Linseed oil contains linoleic acid (16.2%), linolenic acid (19.1%), both unsaturated and responsible for providing omega 6 and 3 and octadecenoic acid (22.9%) (Saturated).

The presence of oil in the nanocapsule formulations may increase the drug concentration in these systems. The general criteria for choice of oil are no toxicity, high stability, inability to solubilize the polymer and high affinity to the drug (Guterres, Schaffazick, Pohlmann, 2007). Besides the above features, some authors use the oils to assist or enhance drug activity (Rigo *et al.*, 2014; Benvegnù *et al.*, 2012; Barros, 2010).

Determination of RIS solubility in oil

One of the basic principles for the development of nanocapsules and the drug studied is affinity and solubility of the oil, to prevent it from precipitating and compromising the formulation stability (Kelman *et al.*, 2007). The study results revealed that the solubility of RIS is 3.3 mg/mL \pm 0.45 in linseed oil, which allows its use in the production of nanocapsules with a required dosage of 1 mg/mL.

Polymer swelling experiments

A polymer swelling experiment, in a pre-formulation test, evaluated the compatibility of the oil and the polymeric material. Compared to the initial weights of the polymeric films there was no weight loss after this test. The polymeric films did not show any significant difference in weight (ANOVA, $p > 0.05$) after 60 days in contact with the vegetable oil, theoretically allowing a polymer wall to form around the oil core.

Experimental design

In this work, we evaluated the influence of these parameters on drug loading using a 2³ factorial experimental design (eight experiments in triplicate). Eight batches of different combinations were prepared by taking values of selected variables: X1 – X3 at two levels as

shown in table I. The variation of the nanoparticle size, polydispersion index, zeta potential, pH, drug content and encapsulation efficiency obtained for the factorial design is shown in table II. Nanocapsule preparation was a homogeneous system and its appearance is of an opalescent liquid (Ourique *et al.*, 2008).

TABLE II – Physicochemical characteristics of RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension.

Formulation	Particle size	PDI	Zeta potential	pH	Drug content	EE
	(nm)		(Mz)		(%)	(%)
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
LiF1-PEG	334 \pm 15.3	0.198 \pm 0.07	-34.6 \pm 1.17	7.4 \pm 0.10	99.93 \pm 0.74	78.50
LiF2-PEG	349 \pm 14.7	0.171 \pm 0.03	-34.0 \pm 0.78	7.5 \pm 0.06	97.48 \pm 1.16	78.65
LiF3-PEG	283 \pm 14.4	0.177 \pm 0.02	-33.1 \pm 0.50	7.3 \pm 0.12	99.69 \pm 1.19	80.06
LiF4-PEG	289 \pm 14.4	0.168 \pm 0.00	-34.2 \pm 2.29	7.5 \pm 0.06	99.80 \pm 0.44	83.38
LiF5-PEG	339 \pm 03.2	0.167 \pm 0.00	-32.8 \pm 0.59	7.2 \pm 0.12	99.79 \pm 0.30	70.16
LiF6-PEG	376 \pm 04.6	0.141 \pm 0.05	-34.1 \pm 1.05	7.4 \pm 0.06	100.73 \pm 0.54	81.52
LiF7-PEG	257 \pm 05.5	0.207 \pm 0.06	-35.1 \pm 1.66	7.3 \pm 0.06	100.00 \pm 0.10	74.90
LiF8-PEG	324 \pm 13.9	0.174 \pm 0.06	-30.8 \pm 1.31	7.2 \pm 0.12	98.95 \pm 0.15	76.17

PDI = Polydispersity index; SD; EE = efficiency encapsulation; = Standard deviation.

Many factors affect drug encapsulation efficacy in the nanoprecipitation method for nanocapsules for instance, the amount of polymer or surfactant, the volume of the oily phase, amount of drug and others (Mohanraj, Chen, 2006; Fessi *et al.*, 1989). The particle size results showed that all samples were in the nanometric range, from 283.2 to 376.1 nm and the literature describes nanocapsules obtained from preformed polymers which are in the range of 250-500 nm, indicating the homogeneity of the particle size distribution (Mora-Huertas, Fessi, Elaissari, 2010). This polydispersity index was calculated by cumulant analysis and estimates the range of distribution, and values up to 0.250 are acceptable, indicating an adequate homogeneity of the systems (Alves *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2004). The pH values found in the formulations studied, between 7.2 and 7.5, are in agreement with literature reports for the nanoprecipitation methods, which in general, are in a range from 3.0 to 7.5 (Mora-Huertas, Fessi, Elaissari, 2010). Klkamp *et al.* (2009) have reported slightly acidic pH values found in the nanocapsule suspension, attributing it to two factors: the presence of the drug with an acid character and PCL). As RIS is a strong base, the pH somewhat closer to neutrality can be attributed to the presence of the drug in the aqueous phase or adhering to the polymer surface. The negative zeta potentials were observed between -30.8 and -35.1 mV for all formulations

and are a consequence of the particle coating with polysorbate 80 acting as a physical stabilizer at the particle/water interface. There are two approaches to stabilizing colloidal systems such as nanocapsules: electrostatic and steric. In these formulations, the nanocapsules were sterically stabilized by a polysorbate layer around the particles (Jager *et al.*, 2007). The values obtained for the drug content were in the range of 98.98% to 100.73%, demonstrating that the drug does not suffer degradation in the nanocapsule preparation process and that the active extraction method was efficient.

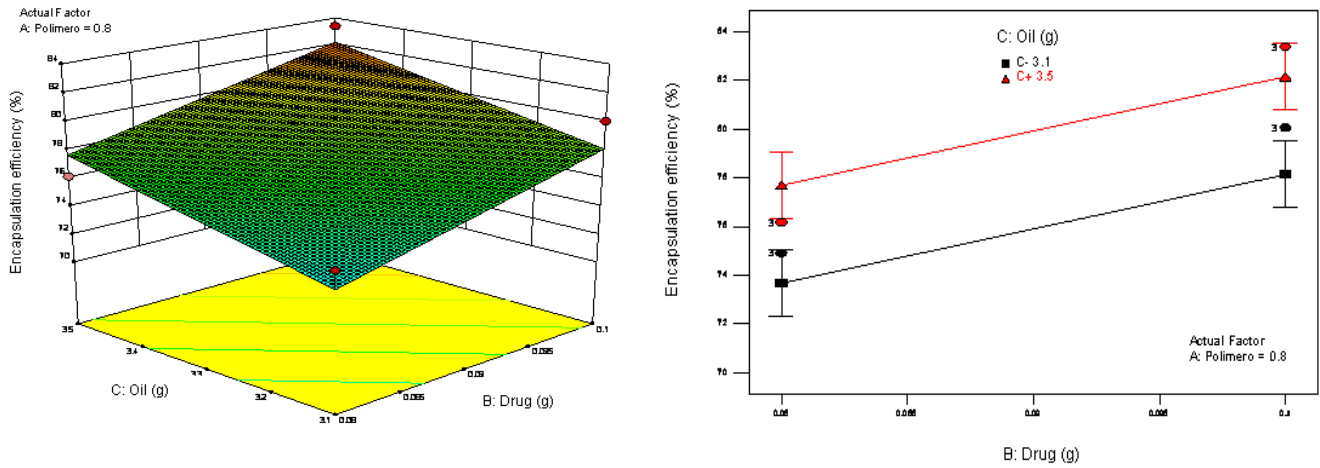


Figure 1 - Response surface plots for X2 and X3 on encapsulation efficiency, where X2 = drug concentration, X3 = oil concentration, when X1 = polymer concentration was 0.8% (A). Representation of planar interaction between X2 and X3 when X1=0.8% (B).

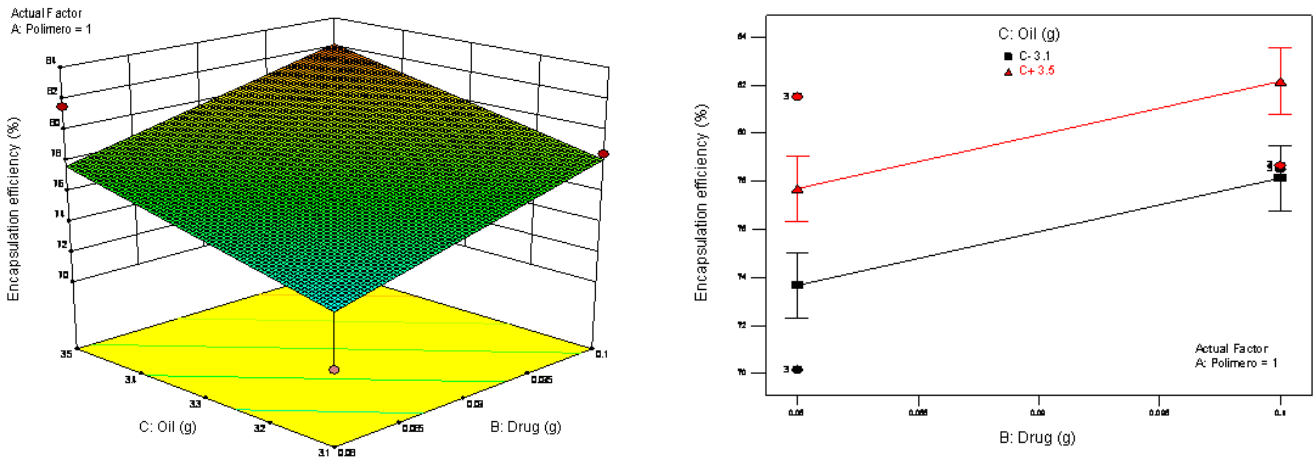


Figure 2 - Response surface plots for X2 and X3 on encapsulation efficiency, where X2 = drug concentration, X3 = oil concentration, when X1 = polymer concentration was 1.0% (A). Representation of planar interaction between X2 and X3 when X1=1.0% (B).

The results obtained in the factorial analysis for encapsulation efficiency are shown in figure 1 (polymer 0.8%) and figure 2 (polymer 1.0%). Changes in the concentrations of drug and oil were statistically significant ($p < 0.05$) when compared by ANOVA, at 2 levels of variation and three variables. The best encapsulation efficiency was obtained when the concentration increased oil and drug independent of polymer concentration.

Mora-Huertas, Fessi, Elaissari (2010) report that when using the precipitation method lipophilic compounds have higher hydrophilic encapsulation efficiency, obtaining values greater than 70%, the solubility of the active principle in the oil used, one of the most important criteria. RIS showed a solubility of 3.3 mg/mL in linseed oil, and despite working at concentrations below oil saturation, we can see that this combination of factors was decisive for encapsulation efficiency. The largest association rate was achieved with the LiF4-PEG formulation, which stood at 83.38%, and thus 15.62% of the drug remained free in the medium, which could justify the neutral pH of the formulations.

RIS is a strong base and in the presence of water, the main constituent of the aqueous phase may have been in its deprotonated form RH_2^{2+} , which is more soluble in the medium, thereby reducing its affinity to the oily core of the nanocapsule (Santana, Severino, Souto, 2012; Jung, Kos, Becirevic-Lacan, 2009).

When more than one factor is changed simultaneously in a formulation the interaction between them can produce a different response than expected (Mahajan, Tatiya, Nerkar, 2012). As described by Montgomery (2001), the response value of the effects could be calculated. The main effects alone do not have much meaning when they are involved in significant interactions. Those interactions are the key to achieving the optimal conditions. The goal of the experimental design was the factorial method, with the minimum number of experimental variables have the biggest impact on the final product and finding the process variables. Through the analysis of variance (ANOVA-3-way) the equation for the prediction of values was established, based on the responses obtained for each factor, and the following code was used for dependent variables: (A) polymer, (B) drug and (C) oil. The combination of letters is the interaction between two or more factors. The equation obtained for the encapsulation efficiency was (Equation 1):

$$\text{Encapsulation efficiency} = 77.92 + 2.23B + 2.01C \text{ (Equation 1)}$$

The result in table III illustrates the comparison between the observed and predicted values for all formulations studied, indicating a good correlation between them. It can be seen

that in all cases there was a reasonable agreement between the predicted and the experimental values. For this reason it can be concluded that the equations adequately describe the influence of the selected independent variables on the responses under study. This indicates that the optimization technique was appropriate for optimizing the RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension with linseed oil. Thus, the low magnitudes of error in the present investigation prove the high prognostic ability of the optimization technique by factorial design.

TABLE III - The predicted and observed response variables of the RIS loaded PEGylated nanocapsule with linseed oil.

Formulation	Predicted value	Observed value	Prediction error (%)*
LiF1-PEG	78.13	78.50	0.47
LiF2-PEG	82.16	78.65	-4.27
LiF3-PEG	78.13	80.06	2.47
LiF4-PEG	82.16	83.38	1.48
LiF5-PEG	73.67	70.16	-4.76
LiF6-PEG	77.70	81.52	4.92
LiF7-PEG	73.67	74.90	1.67
LiF8-PEG	77.70	76.17	-1.97

*Prediction error (%)=(observed value–predicted value) /predicted value×100%.

Determination of the partition coefficient (P)

A pure substance can be distributed between two partially miscible solvents when they are in close contact. The balance ratio of solute concentrations in both phases is known as partition coefficient (Sangster, 1989). Thus the partition coefficient is a physical characteristic which determines the balance between the lipophilic and hydrophilic properties, representing the ratio between the non-ionized part of the molecule dissolved in the oil phase, saturated *n*-octanol, and the ionized one, soluble in the aqueous phase, which may be water or buffer (Rama *et al.*, 2006).

The measure of the lipophilicity of a molecule can be used to predict its feasibility to cross a biological membrane, and is directly correlated to properties such as solubility, toxicity and bioavailability (Aulton, 2005). This magnitude is considered an informative parameter, since in the human body it is distributed between the apolar structures (eg cell

membranes) and aqueous solutions (eg, blood plasma and intracellular fluids). If $\text{Log } P=0$ then $P=1$ and hence the substance has the same affinity for both phases. If $\text{Log } P<0$ then $P<1$, the substance tends to preferentially dissolve in the aqueous phase, and if $\text{Log } P>0$ then $P>1$ will tend to dissolve preferentially in the organic phase.

TABLE IV –Partition and Log P obtained for RIS in *n*-octanol and water at different pHs.

pH of the aqueous phase	Partition coefficient (Mean \pm SD)	Log P
6.5	124.00 \pm 1.17	2.09
7.0	199.00 \pm 0.78	2.30
7.5	1.40 \pm 0.98	0.15
8.0	1.24 \pm 1.87	0.09
Water (5.6)	3.03 \pm 1.13	0.48

As shown in Table IV, the values obtained in the study of RIS partition coefficient demonstrate that the drug has greater affinity for the organic phase, since all the Log P values were always greater than zero. At pH 6.5 the value of Log P was 2.09 and pH 7.0 of 2.30, indicating that this pH range RIS has a more hydrophobic character, increasing the concentration of neutral molecules and their decreasing the concentration of the cationic form, making the aqueous environment not favorable for the drug (Allen, Popovich, Ansel, 2007). When you change the water pH to 7.5 and 8.0, we note that the values of Log P approached zero and P values were around 1, indicating that we have obtained a homogeneous distribution of the drug from the aqueous phase and organic. This can be explained because the pKa of the compound and the pH of the medium are similar (Tozer, Rowland, 2009). The pH of water (5.6), was the most acid to be tested, making RIS stay in shape diprotonated RH_2^{2+} more soluble in the medium, which can hinder their affinity for the oil core of the nanocapsule (Santana, Severino, Souto, 2012; Jung, Kos, Becirevic-Lacan, 2009). When the pH of the aqueous phase increased to 6.5 and 7.5, increased the concentration of neutral molecules and decreased the concentration of the cationic form, making the environment less favorable for the hydrophilic RIS (Allen, Popovich, Ansel, 2007).

As shown in Table IV, the values obtained in the study of the RIS partition coefficient demonstrate that the drug has greater affinity for the organic phase, since all the Log P values obtained were always greater than zero. At pH 6.5 the value of Log P was 2.09 and pH 7.0 of 2.30, indicating that in this pH range RIS has a more hydrophobic character, increasing the

concentration of neutral molecules and their decreasing the concentration of the cationic form, so that the aqueous environment is unfavorable for the drug (Allen, Popovich, Ansel, 2007). When the water pH was changed to 7.5 and 8.0, we note that the values of Log P approached zero and P values were around 1, indicating that we have obtained a homogeneous distribution of the drug between the aqueous and organic phase. This can be explained because the pKa of the compound and the pH of the medium are very similar (Tozer, Rowland, 2009). The pH of water (5.6), was the most acid to be tested, was the most acid tested, and since RIS is a base, it remained in the deprotonated form RH_2^{2+} more soluble in the medium, which can hinder its affinity for the oil core of the nanocapsule (Santana, Severino, Souto, 2012; Jung, Kos, Becirevic-Lacan, 2009). When the pH of the aqueous phase increased to 6.5 and 7.5, it increased the concentration of neutral molecules and decreased the concentration of the cationic form, making the hydrophilic environment less favorable for RIS (Allen, Popovich, Ansel, 2007).

Refinement of the selected formulation

Based on the results obtained, we chose the formulation that showed best encapsulation efficiency, but with a suitable diameter and zeta potential, low PDI and a predicative value consistent with a practical value. Therefore we selected the formulation LiF4-PEG, which has the following composition for 25 mL: RIS (0.25 g), acetone (62.5 mL), PCL (0.2 g), linseed oil (0.875 g), sorbitan monostearate (0.2 g), polysorbate 80 (0.2 g), PEG (0.175 g) and water (125 mL). Later the suspensions were prepared with water, with a pH previously adjusted to 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0.

The drug-unloaded (non-encapsulated blank) was prepared as described above, without adding RIS. The study was performed in triplicate and the resulting samples were properly evaluated for pH, particle size, polydispersity index, zeta potential, content, encapsulation efficiency, differential scanning calorimetry, Infrared spectroscopy and X-ray diffraction.

Buffers with pH 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0, were tested as the aqueous phase in the preparation of nanocapsules. However, at the time the oily phase was poured over the aqueous one, precipitation of the polymer occurred, and therefore they could not be used in the study.

The results obtained in physicochemical characteristics of RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension and drug-unloaded (DU) PEGylated nanocapsule suspension prepared with aqueous phase, at different pHs are shown in the Tables V and VI, respectively.

TABLE V – Physicochemical characteristics of RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension prepared with aqueous phase, at different pHs.

LiF4- PEG/pH	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (Mv)	pH	Drug content (%)	EE (%)
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
6.5	286 \pm 7.0	0.108 \pm 0.01	-34.31 \pm 1.5	7.5 \pm 0.07	99.46 \pm 0.62	90.48 \pm 0.78
7.0	293 \pm 7.2	0.187 \pm 0.01	-33.86 \pm 1.1	7.5 \pm 0.10	100.58 \pm 0.06	93.53 \pm 0.81
7.5	324 \pm 2.0	0.136 \pm 0.05	-32.88 \pm 1.1	7.5 \pm 0.10	100.00 \pm 0.11	80.97 \pm 0.45
8.0	315 \pm 6.3	0.111 \pm 0.06	-33.14 \pm 4.0	7.2 \pm 0.27	99.54 \pm 0.78	78.06 \pm 0.62
Water (5.6)	304 \pm 2.9	0.171 \pm 0.01	-32.63 \pm 0.2	7.4 \pm 0.03	99.92 \pm 0.16	83.38 \pm 0.15

PDI = Polydispersity index; SD = Standard deviation EE = Encapsulation efficiency

TABLE VI – Physicochemical characteristics of drug-unloaded (DU) PEGylated nanocapsule suspension prepared with aqueous phase, at different pHs.

LiF4DU- PEG/pH	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (Mv)	pH
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
6.5	314 \pm 4.98	0.128 \pm 0.00	-33.54 \pm 0.53	6.2 \pm 0.06
7.0	311 \pm 4.13	0.154 \pm 0.05	-31.20 \pm 0.42	6.2 \pm 0.00
7.5	330 \pm 2.75	0.082 \pm 0.01	-32.37 \pm 0.51	6.5 \pm 0.01
8.0	293 \pm 2.26	0.111 \pm 0.01	-32.43 \pm 0.55	6.1 \pm 0.00
Water (5.6)	265 \pm 1.71	0.136 \pm 0.00	-30.83 \pm 0.35	5.5 \pm 0.06

PDI = Polydispersity index; SD = Standard deviation

The RIS loaded PEGylated nanocapsule suspensions prepared using the aqueous phase, at different pHs presented the particle size values (286.56 to 324.31 nm), polydispersity index (0.108 to 0.187), zeta potential (-32.63 to -34.31) and drug content (99.46% to 100.58%) within the limits recommended in the literature for these systems (table V).

The pH values were in the range of 7.2 to 7.5 and showed no statistically significant difference ($p > 0.05$) between them when evaluated by ANOVA (one-way), but when compared to drug-unloaded (DU) PEGylated nanocapsule (table VI), all showed significant differences ($p < 0.05$), probably due to the presence of RIS in the aqueous phase or adhered to polymer surface. The lipophilicity of RIS was measured or calculated to identify a

relationship between lipophilicity and encapsulation efficiency in nanocapsules. The stability of the encapsulated drug within the inner core of the nanoparticles depends also on the transfer rate by diffusion in the aqueous medium, which is critically dependent on the partition coefficient of the drug between the particle core and the aqueous medium. Stella *et al.* (2007) demonstrated in their study that the higher the partition coefficient the lower was the transfer of the drug into the system. In our study an improvement of 10.15% in the encapsulation efficiency was obtained when the pH of the aqueous phase was 7.0, which reduced the ionization of the molecule, increasing its affinity for the oil phase.

Differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction and Infrared

The DSC curves are very useful tools for the verification of incompatibility between pharmaceutical excipients and several drugs and for the characterization and evaluation of the interaction between the components of the formulation, since the disappearance of endo or exothermic peaks of drugs is mostly an indication of the interaction (Yoshida *et al.*, 2011). The thermal behavior of RIS, LIF4-PEG/7.0 and LIF4DU-PEG/7.0 was evaluated using DSC test and the results are shown in figure 3.

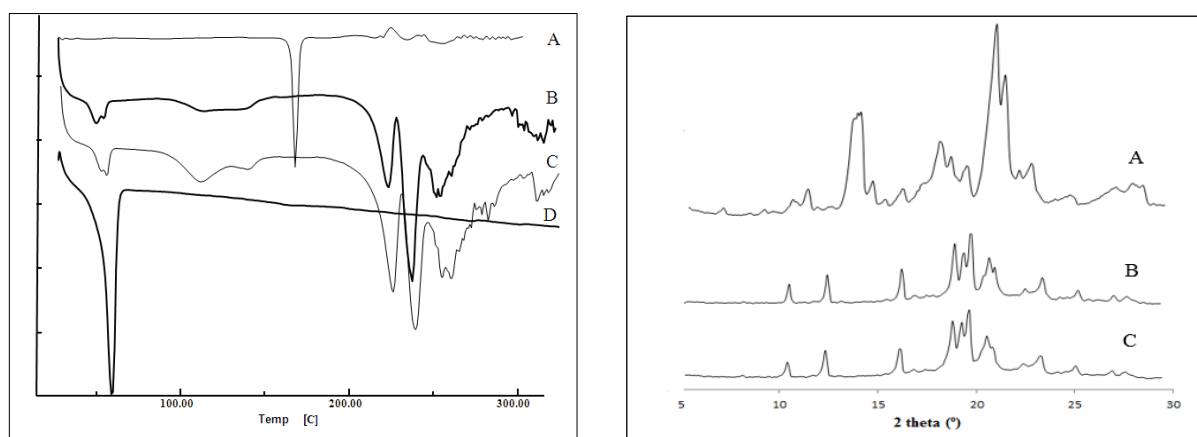


Figure 3 – DSC and X-ray diffraction of RIS and samples. A= RIS; B=LIF4-PEG/7.0; C=LIF4DU-PEG/7.0 and D=PCL.

DSC curves of RIS and PCL revealed a single sharp endothermic peak around 167.70 °C, corresponding to the melting point of the drug ($\Delta H = -117.02$ J/g), and endothermic peak around 55.26 °C, corresponding to the melting point of the PCL ($\Delta H = -87.13$ J/g) as described in the literature (Danel *et al.*, 2013; Rosa, Pentead, Calil, 2000).

It was clear that the melting point of RIS in LiF4-PEG/7.0 and LiF4DU-PEG/7.0 had disappeared, and the melting point of the endothermic peak PCL had decreased ($\Delta H = -11.08$ J/g). These values are an indication that there was interaction between the components of the formulation and the drug was nano-coated.

The X-ray diffraction of RIS shows the characteristic of the crystalline drug, having its main peaks at 10.6° and 21.0° (figure 3). When the drug was nano-encapsulated LiF4-PEG/7.0, we can see that there was no peak at 10.6° and the peak at 21 is less intense, with the reduction or disappearance of the characteristic of RIS diffractions peaks. The similarity between the diffractogram patterns of LiF4-PEG/7.0 and LiF4DU-PEG/7.0 indicates that there is chemical interaction between the drug, oil and polymer.

Infrared spectroscopy (FT-IR)

In the FT-IR spectrum (figure 4) a significant reduction of some major bands of RIS (A), occurred, like the one in 1643, corresponding to axial strain C=O with stretching of the β -lactam ring, band 1535 corresponding to CN and CO, with angular deformation of the oxazole ring and band 1130 corresponding to fluorine, compared to nanocapsule formulation LiF4-PEG/7.0 (B), as shown in figure 4 (Elzubair *et al.*, 2006). The RIS bands changed, which leads one to conclude that there was a chemical interaction between the components of the formulation. The spectra of LiF4DU-PEG/7.0 (C) and LiF4-PEG (B) were compared using the product software and had a 0.999 correlation factor, indicating the similarity between them and that there was an interaction between RIS, oil and polymer.

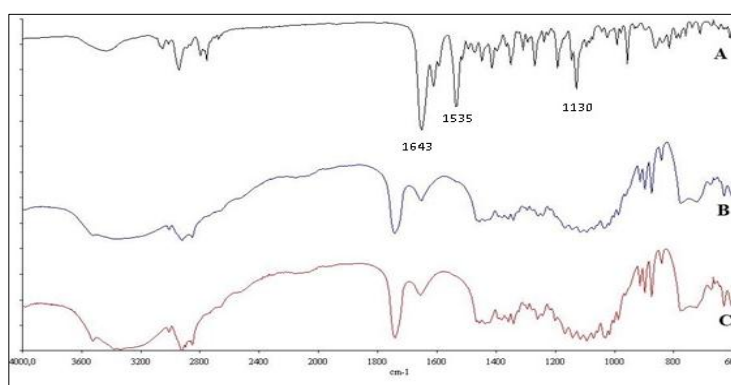


Figure 4 – FT-IR of RIS (A), LiF4-PEG/7.0 (B) and LiF4DU-PEG/7.0 (C).

Antioxidant determination

According to Roginsky, Lissi (2005) one of the best known methods to determine the antioxidant activity of extracts and isolated substances is the DPPH method. Due to the action of an antioxidant, the DPPH is reduced forming diphenyl-picryl-hydrazine, changing the color presented to yellow, a reaction monitored by the decrease in absorbance at 518 nm.

The scavenging capacity of DPPH was concentration dependent and is in accordance with that described in the literature by Choi *et al.* (2002). The antioxidant activity of linseed oil can be attributed to its main compounds, linoleic acid. There was no formation of a plateau at the concentrations studied (figure 5). When the average values of oil and BHT were compared by ANOVA followed by Tukey ($p < 0.05$), there was only no statistically significant difference in antioxidant capacity, for the highest concentration of oil (3.0%).

The antioxidant capacity has been used as an indicator of the bioactivity of vegetable oils in the human body. Through *in vitro* antioxidant capacity values it is possible to rank the oils regarding their potential beneficial effect in the human body. However, it is reasonable to assume that the action of the main dietary antioxidants of biological significance *in vivo* depends on factors such as the level of oxidative stress to which the organism is exposed, the composition and amounts of antioxidants and pro-oxidants usually consumed, as well as the bioavailability and metabolism of the antioxidant compounds in the human body (Castelo-Branco, Torres, 2009).

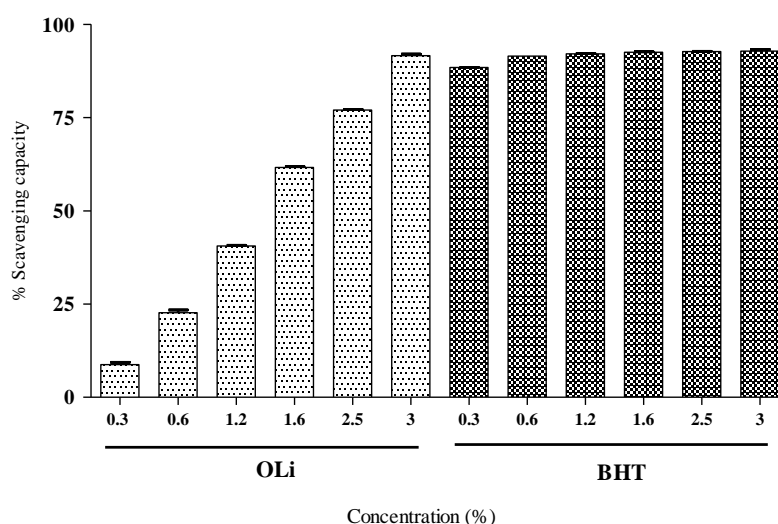


Figure 5 - DPPH radical scavenging capacity of linseed oil and BHT. OLi: linseed oil; BHT: antioxidant standard. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

Cell viability, lipid peroxidation and comet

Oxidative stress has been proposed as a major mechanism by which the polymeric nanocapsules can induce toxicity. However, in redox equilibrium conditions, reactive oxygen species (ROS) have beneficial activity because they participate in the defense against infectious agents and in cell signaling (Valko *et al.*, 2006). This stress is characterized by an imbalance between the production of ROSs and nitrogen (RNSs) and the endogenous antioxidant defense system, and may lead to a number of physiological changes, generated by significant damage to biomolecules with potential impact on the body (Ahamed, 2006). The ROS can be considered dangerous to membrane lipids (lipid peroxidation), DNA, proteins because they promote apoptosis and necrosis even in healthy cells. It is always important that the data obtained in the study of oxidative stress are confirmed by cytotoxicity and genotoxicity studies.

The study of cell viability is based on the reduction of 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) into a dark purple colored product, MTT - formazan, by the succinate dehydrogenase tetrazolium mitochondrial enzyme. As conversion occurs only in viable cells, the decrease in absorbance of the tests compared to the negative control indicates cell death (Sagrillo *et al.*, 2015; Mosman, 1983). Therefore values lower than the positive control show cell death and values greater than the negative control show cell proliferation.

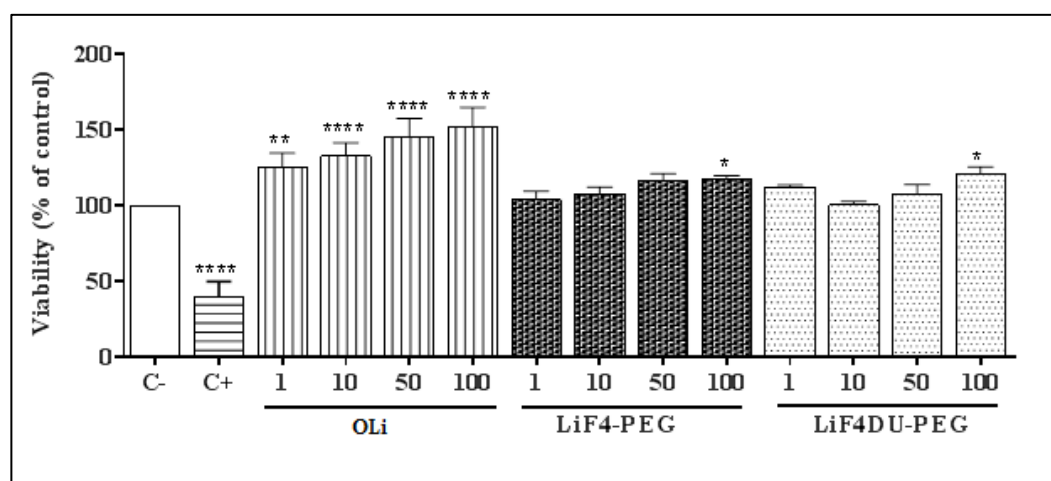


Figure 6 – MTT assay after 72 h of incubation. Results expressed as a percentage of the negative control (100%). Negative control (C-): cell in culture medium; (C+): cell with H₂O₂; Li: linseed oil. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

The samples tested did not alter cell viability, but linseed oil and as well as the highest concentrations tested LiF4-PEG and LiF4DU-PEG, caused cell proliferation, suggesting pro-

inflammatory activity (figure 6). This effect was expected since the oil exhibits concentration-dependent antioxidant action, as shown above.

Lipid peroxidation can be described generally as a process in which oxidants such as free radicals attack lipids containing carbon-carbon double bond(s), especially polyunsaturated fatty acids. The importance of the membrane lipid physical (phase) state is evidenced by the fact that lipids may control the physiological state of a membrane organelle by modifying its biophysical aspects, such as polarity and permeability. Lipids also have a key role in biology as signaling molecules (Ayala, Muñoz, Argüelles, 2014). Linseed oil at its highest concentrations (2.5% and 3.15%) caused damage in the cell membrane as compared to the negative control, and its effect was concentration-dependent. The nanocapsules exerted a protective effect on cells preventing lipid peroxidation caused by the free oil at the two highest concentrations (figure 7).

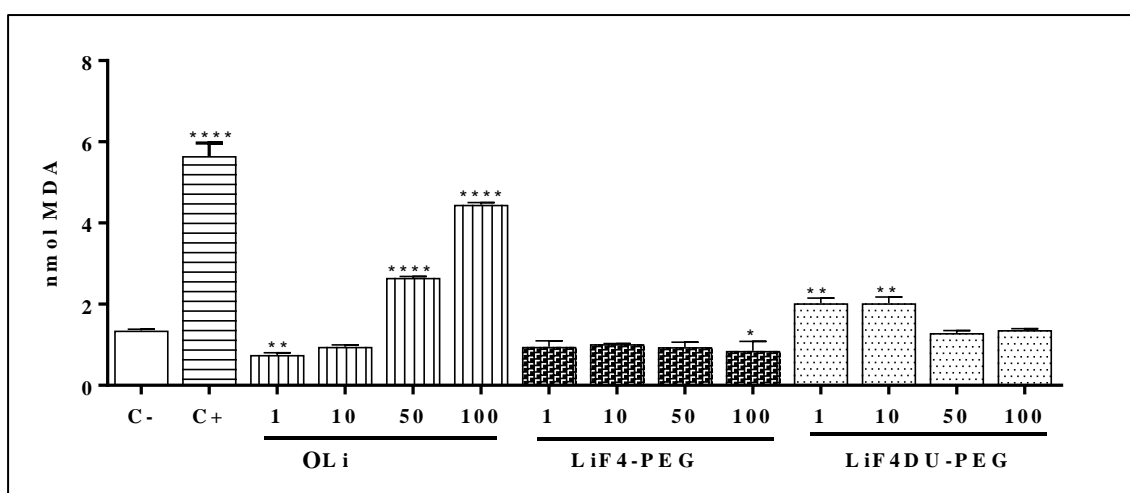


Figure 7 – Test TBARS after 72 h of incubation. Results expressed as mol of MDA. Negative control (C-): cell in culture medium; (C+): cell with H₂O₂; Li: linseed oil. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

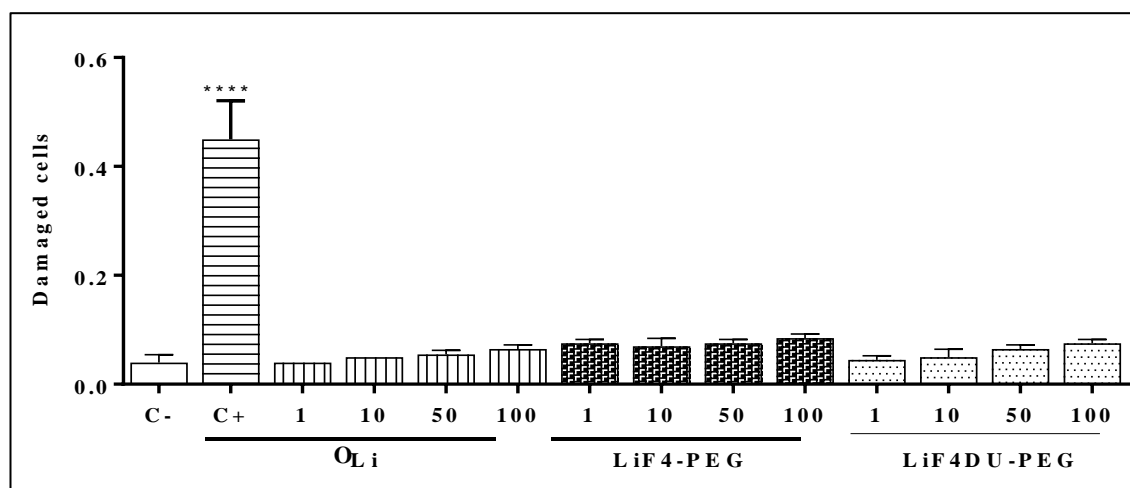


Figure 8 - Test comet after 72 h of incubation. Results expressed as index damage. Negative control (C-): cell in culture medium; (C+): cell with H₂O₂; Li: linseed oil. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

The basic principle of the Comet assay is the movement of negatively charged damaged low molecular weight DNA fragments towards anode during electrophoresis leaving a trail resembling a comet tail. When the damaged DNA in the leftover nucleoid mass is subjected to electrophoresis it migrates towards the anode producing a comet-like structure. The measurement of this tail reflects the extent of DNA damage (Gunasekarana, Raj, Chand, 2015). According to Azqueta, Dusinka (2015), the comet assay is a sensitive and relatively simple method to study specific DNA lesions such as single and double strand breaks, oxidation and alkylation lesions or cross-links. It is so far the most used method in nanogenotoxicology and has great potential to be included in a test battery due to its robustness, versatility and reliability. The results are statistically different for the positive control, demonstrating that none of the sample caused breakage or damage to the DNA of cells (figure 8).

CONCLUSION

The factorial method was suitable for the development of RIS loaded PEGylated nanocapsule suspension with linseed oil, proving the high prognostic ability of the technique used in the optimization of laboratory studies. The formulation LiF4-PEG was selected based on the results obtained, because they present a good rate of association, adequate diameter and zeta potential, low PDI and a predicative value consistent with practicality. The increased encapsulation efficiency, of 10.15%, was obtained with the pH 7.0 of the aqueous phase,

which reduced the ionization of the molecule, improving its affinity to the oil phase, confirming the data obtained in the study of the partition coefficient.

The results obtained with the IR, DSC and X-ray diffraction, in addition to characterization studies, are a good indication of RIS nanocoating. *In vitro* studies demonstrate that the developed formulation was safe for the studied cells, showing no effect of cytotoxicity and genotoxicity.

Further studies are needed, especially regarding the stability of the formulation, but the data obtained are extremely important and highlight another parameter that should be part of the pre-formulation studies of nanostructured systems.

REFERENCES

- AHAMED, M. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in Vitro*, v.25, n.4, p.930-936, 2011.
- ALANAZI, F. K.; ALSARRA, I. A.; HAQ, N.; SHAKEEL, F. Solubility of antipsychotic drug risperidone in transcitol + water co-solvent mixtures at 298.15 to 333.15 K. *Journal of Molecular Liquids*, v.90, p.68-72, 2014.
- ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8ª ed. São Paulo: Artmed, 2007. p.300- 375.
- ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International journal of pharmaceutics*, v.341, p.215-220, 2007.
- AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2ª ed. Porto alegre: Artmed, 2005. 677 p.
- AZQUETA, A.; DUSINSKA, M. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. *Frontiers in Genetics*, v.6, p.1-4, 2015.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p.1-32, 2014.
- BAPTISTA, T.; BAPTISTA, E. A.; LALONDE, J.; PLAMONDON, J.; KIN, N. Y.; BEAULIEU, S.; JOOBER, R.; RICHARD, D. Comparative effects of the antipsychotics sulpiride and risperidone in female rats on energy balance, body composition, fat morphology and macronutrient selection. *Progress on Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v.28, p.1305-1311, 2004.
- BARRENA, R.; CASALS, E.; COLON, J.; FONT, X.; SANCHEZ, A.; PUNTES, V. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, v.75, p.850-857, 2009.
- BARRIOS, J. Desenvolvimento e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno em diferentes núcleos oleosos. *Tese (Mestrado)*. Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2010.
- BARROSO, A. K. M; TORRES, A. G; CASTELO-BRANCO, V. N; FERREIRA, A; FINOTELLI, P. V; FREITAS, S. P; DA ROCHA-LEÃO, M. H. M. Linhaça marrom e dourada: propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. *Ciência Rural*, v.44, n.1, p.181-187, 2014.
- BENVEGUNÚ, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; PASE, CAMILA S.; OURIQUE, A. F.; BECK, R. C.; BURGER, M. E. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.77, p.332-336, 2011.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Potential application of antioxidant capacity assays to assess the quality of edible vegetable oils. *Lipid Technology*, v.21, n.7, p.152-155, 2009.

CHOI, C. W.; KIMA, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. *Plant Science*, v.163, p.1161-1168, 2002.

CHOONARA, Y.; MODI, G.; NAIDOO, D.; NDESENDO, V. M. K.; PILLAY, V.; TOIT, L. C. Nanotechnological application for the treatment of neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, v.50, p.272-285, 2009.

CORDIOLI, A. V. *Psicofármacos: consulta rápida*. 3ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 695p.

CURTIS, J.; GREENBERG, M.; KESTER, J.; PHILLIPS, S.; KRIEGER, G. Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. *Toxicology Review*, v.25, p.245-260, 2006.

DANEL, C.; AZAROUAL, N.; BRUNEL, A.; LANNOY, D.; VERMEERSCH, G.; ODOU, P.; VACCHER, C. Study of the complexation of risperidone and 9-hydroxyrisperidone with cyclodextrin hosts using affinity capillary electrophoresis and ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, v.1215, p.185-193, 2008.

DE SOUZA FILHO OC.; SAGRILLO M. R.; GARCIA, L. F.; MACHADO, A. K.; CADONÁ, F.; RIBEIRO, E. E.; DUARTE, M. M.; MOREL, A. F.; DA CRUZ, I. B. The *in vitro* genotoxic effect of Tucuma (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian fruit rich in carotenoids. *Journal of Medicinal Food*, v.16, n.11, p.1013-1021, 2013.

ELZUBAIR, A.; ELIAS, C. N.; SUAREZ, C. M.; LOPES, H. P.; VIEIRA, M. V. The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation. *Journal of dentistry*, v.34, p.784-789, 2006.

FAROOQUI, A. A.; ONGB, W. Y.; HORROCKSA, L. A.; CHENC, P.; FAROOQUIA, T. Comparison of biochemical effects of statins and fish oil in brain: The battle of the titans. *Brainrese Archreviews*, v.56, p.443-471, 2007.

FESSI, H.; PUISIUEX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formulation by interfacial deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v.55, R1-R4, 1989.

GALLA, H. J.; HÜWEL, S.; LOHMANN, C. Predicting blood-brain barrier permeability of drugs: Evaluation of different *in vitro* assays. *Journal of Drug Targeting*, v.10, n.4, p.263-276, 2002.

GALVÃO, E. L.; da SILVA, D. C. F.; da SILVA, J. O.; MOREIRA, A. V. B.; SOUSA, E. M. B. D.; Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, n.3, p.551-557, 2008.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. *Journal of clinical and diagnostic research*, v.9, n.3, p.1-4, 2015.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. *Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos*. In: Marcelo Morales. (Org.). *Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007, v. único, p. 247-263.

HENRICH-NOACK, P.; HINTZ, W.; KOCKENTIEDT, S.; SABEL, B. A.; TOMAS, J.; VOIGT, N. Surfactants, not site or zeta-potential influence blood-brain barrier passage of polymeric nanoparticles. *European Journal and Pharmaceutical Biopharmaceutics*, v.87, n.1, p.19-29, 2014.

HU, Z; LIU, Y; YUAN, W.; WU, F; SU, J; JIN, T. Effect of bases with different solubility on the release behavior of risperidone loaded PLGA microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.86, p.206-211, 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE HARMONIZATION. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. ICH, 2005. Available at: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Accessed on: 17 Apr. 2010.

JAGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.338, p.67-305, 2007.

JUNG, M.; KOS, I.; BECIREVIC-LACAN, M. The pH-dependent complexation between risperidone and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.64, p.163-171, 2009.

KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L.S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v.324, p.231-239, 2007.

KÜLKAMP, 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, n.8, p.2078-2084, 2009.

LEWINSKA, A.; ZEBROWSKI, J; DUDA, M.; GORKA, A.; WNUK, M. Fatty Acid Profile and Biological Activities of Linseed and Rapeseed Oils. *Molecules*, v.20, p. 22872–22880, 2015.

MAGDOLENOVA, Z.; BILANICOVA, D.; POJANA, G. et al. Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related in vitro cytotoxicity and genotoxicity. *Journal of Environmental Monitoring*, v.14, p.455-464, 2012.

MAHAJAN, H. S.; TATIYA, B. V.; NERKAR, P. P. Ondansetron loaded pectin based microspheres for nasal administration: In vitro and in vivo studies. *Powder Technology*, v.221, p.168-176, 2012.

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

MONTGOMERY, D. C. *Design and analysis of experiments*, 5th. New York:John-Wiley & sons, INC., p.218-276, 2001.

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

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*, v.65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, R. H.; SCHMIDT, S.; BUTTLE, I.; AKKAR, A.; SCHMITT, J.; BRÖMER, S. SolEmuls-novel technology for the formulation of I.V. emulsions with poorly soluble drugs. *International journal of pharmaceutics*, v.28, n.269 (2), p.293-302, 2004.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International journal of pharmaceutics*, p.1-4, 2008.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v.95, p.351-358, 1979.

RAMA, A. C. R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I. V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil-ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.42, n.1, p.59-68, 2006.

RIGO, L. A.; FRESCURA, V.; FIEL, L.; CORADINI, K.; OURIQUE, A. F.; EMANUELLI, T.; QUATRIN, A.; TEDESCO, S.; SILVA, C. B.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Influence of the type of vegetable oil on the drug release profile from lipid-core nanocapsules and in vivo genotoxicity study. *Pharmaceutical Development and Technology*, v.19, n.7, p.789-798, 2014.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, London, v.92, n.2, p.235-254, 2005.

ROSA, D. S.; PENTEADO, D. F.; CALIL, M. R. Propriedades térmicas e biodegradabilidade de PCL e PHB em um pool de fungos. *Revista de ciência & Tecnologia*, v.15, p.75-80, 2000.

SAGRILLO, M. R.; GARCIA, L. F. M.; DE SOUZA FILHO, O. C.; DUARTE, M. M. M. F.; RIBEIRO, E. E.; CADONÁ, F. C.; DA CRUZ, I. B. M. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food Chemistry*, v.173, p.741-748, 2015.

SANGSTER, J. Octanol-water partition coefficients of dimple organic compound. *Journal of Physical and Chemical Reference*, v.18, n.3, p.1111-1120, 1989.

SANTANA, M. H. A.; SEVERINO, P.; SOUTO, E. B. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – Parte II. *Polímeros*, v.22, n.1, p.101-106, 2012.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v.175, n.1, p.184-19, 1988.

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.344, p.71-77, 2007.

UNITED States Pharmacopoeia. 35.ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2012. 2879 p.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, v.160, n.1, p.1-40, 2006.

YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; SOARES, C. D. V.; OLIVEIRA, M. A. Thermal behavior study and decomposition kinetics of Amiodarone Hydrochloride under isothermal conditions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.37, n.6, p.638-647, 2011.

Capítulo 14. Discussão

14 DISCUSSÃO

Nanopartículas são definidas como dispersões de partículas ou partículas sólidas com um tamanho na ordem de 10-1000 nm. O fármaco pode estar dissolvido, disperso, encapsulado ou quimicamente ligado a uma matriz polimérica. Dependendo do método de preparação das nanopartículas, podemos obter as nanoesferas ou nanocápsulas. As nanoesferas consistem de uma matriz polimérica, onde a substância ativa pode ficar retida, molecularmente dispersa ou adsorvida. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico, contendo um sistema reservatório oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido ou retido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Nos últimos anos, as nanopartículas poliméricas biodegradáveis, em especial as revestidas com polímero hidrófilo, tais como polietilenoglicol (PEG), têm sido utilizadas como potenciais dispositivos de fornecimento de fármacos devido à sua capacidade em circular durante um período de tempo prolongado pelo organismo humano (SIVASANKAR; KUMAR, 2010; SOPPIMATH et al., 2001).

A vantagem da utilização de nanopartículas na administração de fármacos resulta de duas propriedades básicas. A primeira vantagem é que, devido ao seu tamanho pequeno, pode penetrar através de capilares de menor calibre e serem facilmente absorvidas pelas células, permitindo a entrega de fármaco eficiente nos tecidos alvos. A segunda vantagem está relacionada a utilização de materiais biodegradáveis para a preparação das mesmas, permitindo a liberação controlada do fármaco, por um maior período de tempo (MALI; BAHTE, 2015).

Os sistemas poliméricos que tem a finalidade de serem utilizados na administração de medicamentos devem ter seus parâmetros farmacêuticos bem avaliados, tais como conteúdo total de fármaco presente no sistema, taxa de encapsulação, perfil de liberação e estabilidade da formulação desenvolvida (SILVA et al., 2012).

O controle de qualidade é a área das Ciências Farmacêuticas responsável pela avaliação de inúmeras propriedades que conferem a qualidade total das preparações farmacêuticas. Neste sentido atua no desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para fármacos, no estudo de estabilidade de formulações, na análise de produtos de degradação e na padronização dos procedimentos de produção.

O desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos e quantitativos para o controle de qualidade de produtos deve ser realizado a partir de um bom planejamento. Os métodos devem permitir uma análise completa do produto, contemplando aspectos como a identificação e quantificação de teor da substância ativa, identificação e determinação dos níveis

de impureza e produtos de degradação, além da verificação da estabilidade da substância ativa na formulação (WATSON, 1999). Um bom método analítico consegue abranger todos esses aspectos, sem necessitar sofrer modificações na determinação de cada parâmetro.

A fim de assegurar a credibilidade do método deve-se validá-lo. A validação de um procedimento analítico tem como objetivos demonstrar que este é adequado para a aplicação pretendida (ICH, 2005). É um processo pelo qual se estabelece, por estudos laboratoriais, que as características de desempenho do método satisfazem às exigências para a sua aplicação (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013). Os parâmetros analíticos que devem ser determinados durante a validação dos métodos incluem a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Na literatura existem várias descrições de métodos cromatográficos para a determinação da risperidona no plasma, a partir de formas farmacêuticas convencionais, tais como comprimidos (EL-SHERIF et al., 2005), injetáveis (BATOOL, et al., 2010), soluções ou suspensões orais (MANDRIOLI et al., 2011; ZHANG et al., 2007), nanopartículas lipídicas sólidas (SILVA et al., 2012) e também a partir de transportadores coloidais, tais como as micelas, porém não para quantificar a risperidona em nanocápsulas. Partindo-se dos artigos citados, foram realizados inúmeros estudos que envolveram variações na proporção da fase móvel, diluentes, fases estacionárias, entre outros. A extração da risperidona da nanocápsulas também necessitou de vários estudos, tendo em vista que os diluentes mais descritos na literatura para romper o PCL, não foram eficientes na liberação do ativo, possivelmente devido ao revestimento da nanocápsula com PEG. A combinação dos diluentes acetonitrila e tetrahydrofurano, com ultrassom e agitação foram imprescindíveis para a extração da risperidona.

Conforme apresentado no primeiro artigo, o método desenvolvido para a quantificação da risperidona nas nanocápsulas foi seletivo para os cinco oleos propostos, além de não sofrer interferência, de acordo com o diluente utilizado. Os resultados demonstraram que o método foi linear na faixa de 10 a 30 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9999$), apresentando limite de detecção de 0,66 $\mu\text{g/mL}$ e de quantificação de 1,97 $\mu\text{g/mL}$, adequados a faixa de trabalho. O método se mostrou preciso, com valores de DPR inferiores a 0,7%, exato, com uma quantidade média de SQR recuperada de 99,90 a 100,74% e robusto.

As mesmas condições cromatográficas estabelecidas para a quantificação do ativo puderam ser utilizadas nos estudos de liberação das formulações, sem necessitar de adaptações, demonstrando a versatilidade do método proposto, alterando-se somente o

diluyente final da amostra. A curva da liberação, construída com risperidona e ácido clorídrico, apresentou linearidade na faixa de 1 µg/mL a 9 µg/mL, e $R^2 = 0,9999$.

Kumar e colaboradores (2003) observaram a instabilidade da risperidona frente à luz UV, quando validavam um método para quantificá-la por espectrofotometria de UV. Barros e Barros (2010) relatam que os comprimidos e soluções orais contendo risperidona devem ser armazenados ao abrigo da luz. Essa instabilidade também foi percebida em nosso trabalho, o que motivou a estudar a eficiência das nanocápsulas em proteger o ativo contra essa degradação. As suspensões foram introduzidas na câmara de luz UV e avaliadas em tempos pré-determinados. Os resultados demonstraram que todas as nanocápsulas foram capazes de proteger o fármaco, mas os melhores resultados foram obtidos com as nanocápsulas com óleo de gergelim.

A principal função da análise fatorial é reduzir uma grande quantidade de variáveis observadas a um número reduzido de fatores. Os fatores representam as dimensões latentes que resumem ou explicam o conjunto de variáveis observadas. A análise fatorial não se refere a uma única técnica estatística, mas a uma variedade de técnicas relacionadas desenhadas para tornar os dados observados mais facilmente interpretáveis (FIGUEIREDO FILHO; DA SILVA JUNIOR, 2010). Quando mais de um fator é alterado simultaneamente em uma formulação a interação entre eles pode produzir uma resposta diferente da esperada (MAHAJAN, TATIYA e NERKAR, 2012). Segundo descrito por Montgomery (2001), esses valores podem ser calculados e o estudo dessas interações é a chave para obter as condições ideais do estudo. O delineamento experimental utilizado foi o método fatorial, a fim de investigar as variáveis do processo que têm o maior impacto no produto final, com o número mínimo de ensaios experimentais.

A fim de escolher a melhor formulação de nanocápsula para o estudo *in vivo*, o presente trabalho foi desenvolvido por análise fatorial 2^3 , utilizando como variáveis dependentes diferentes concentrações de polímero, fármaco e óleo. Essas variáveis foram escolhidas, pois são os constituintes que mais afetam a taxa de encapsulação das nanocápsulas, segundo a literatura pesquisada (MORA-HUERTAS; FESSI, ELAISSARI, 2010; MOHANRAJ; CHEN, 2012; WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

A comparação entre os valores observados e os valores previstos para todas as formulações estudadas, indicam uma boa correlação entre eles, podendo-se concluir que a técnica de otimização se mostrou adequada para o desenvolvimento de nanocápsulas de risperidona com diferentes óleos, comprovando a alta capacidade prognóstica da mesma.

A escolha da formulação para os estudos *in vitro* foi baseada na melhor taxa de encapsulação, diâmetro médio, potencial zeta, pH e PDI adequados e que o valor predicativo estivesse coerente com o prático. A formulação escolhida foi a com óleo de gergelim, por cumprir com os requisitos acima descritos e, adicionalmente, apresentar um perfil anti-oxidante mais robusto, ser a formulação que mais protegeu a risperidona frente a degradação fotolítica e apresentou um perfil de liberação adequado *in vitro*. O óleo de gergelim tem quantidades consideráveis de sesamina, episesamina e sesamolina, além da vitamina E, ácidos graxos poli-insaturados e ácidos graxos monoinsaturados (SANKAR *et al.*; 2006; YAMASHITA *et al.*, 1995).

Os estudos de estabilidade são parte integrante da garantia da qualidade, tendo por finalidade avaliar o comportamento dos fármacos ou medicamentos que se alteram com o tempo, por influência de fatores extrínsecos, como temperatura, umidade, luz, assim como os fatores relacionados ao próprio produto, denominados fatores intrínsecos, como propriedades físico-químicas dos ativos e excipientes, processo de fabricação, embalagem e forma farmacêutica (BRASIL, 2005; GIL, 2007; PALUDETTI, 2004).

A suspensão de risperidona foi avaliada por dois meses, nas temperaturas de 20 °C e 4 °C, não apresentou alterações significativas nas suas características físico-químicas. No final do segundo mês, a formulação que estava armazenada na estufa apresentou um acréscimo no seu diâmetro médio e PDI e sua eficiência de encapsulação diminuiu, começando a dar sinais de instabilidade.

No segundo artigo além da avaliação da estabilidade da formulação, realizou-se o teste de pseudo-psicose induzida por D, L-anfetamina a fim de avaliarmos a atividade, *in vivo*, das nanocápsulas desenvolvidas. As nanocápsulas com óleo de gergelim promoveram um aumento do tempo de ação do fármaco, quando comparadas com a risperidona livre e com as NcTc. O mesmo efeito foi observado no estudo de liberação *in vitro*, onde as nanocápsulas de gergelim liberaram apenas 0.25 mg/mL de risperidona no estágio e as outras 0.75 mg/mL, foram liberadas na fase de sustentação.

O óleo de linhaça é amplamente consumido pela população e possui conhecidos benefícios para a saúde, devido a sua capacidade para reduzir os níveis de glicose, triglicérides, colesterol, entre outros. Sua ação se deve a presença do ácido linoléico (ômega 6), ácido linolênico (ômega 3) e ácido octadecenoico (BARROSO *et al.*, 2014; GALVÃO *et al.*, 2008). Nos estudos iniciais, que envolveram a seleção das formulações, apesar do óleo ter apresentando um excelente perfil anti-oxidante, que na sua maior dose foi equivalente ao padrão, não obtivemos bons resultados com a taxa de encapsulação.

A risperidona possui dois pKa's, o primeiro em 3,11 e o outro em 8,24, sendo considerada uma base forte, tendo assim uma baixa solubilidade em valores de pH mais altos. Em pH ácido ela fica na forma diprotonada RH_2^{2+} , mais solúvel no meio, o que pode dificultar a sua afinidade pelo núcleo oleoso da nanocápsula; na faixa de pH entre 5 e 7 passa para a forma protonada menos solúvel (SANTANA; SEVERINO; SOUTO, 2012). Na faixa de pH da água, a risperidona tem uma boa afinidade tanto pela fase aquosa como pela fase oleosa, o que pode ter comprometido a porcentagem de fármaco retido no sistema, já que a afinidade da risperidona pelo óleo de linhaça foi um pouco inferior as dos óleos de gergelim e cártamo (JUG; KOS; BECIREVIC'-LACAN, 2009). Essas diferenças em relação a óleos vegetais também foram encontradas por Kelmann e colaboradores (2007), Almeida e colaboradores (2009) e Rigo e colaboradores (2014).

A maioria dos fármacos são ácidos e bases fracas e, dependendo do pH do meio estarão na forma ionizada ou não-ionizada. Os principais fatores que influenciam na absorção de ácidos e bases fracas são o pH do local de absorção e a solubilidade em meio lipofílico da forma não-ionizada. Esses fatores constituem a teoria da absorção de fármacos em função do coeficiente de partição e do pH (AULTON, 2005).

O pH é um dos fatores mais importantes no processo de formulação, pois afeta a solubilidade e a estabilidade dos fármacos. A quantidade total de um ácido fraco em solução com um pH específico é a soma da concentração de formas de ácido livre e sal, se um excesso de fármaco estiver presente, a concentração de ácido livre em solução é maximizada e constante devido a sua baixa solubilidade, atingindo a saturação. Quando o pH da solução aumenta, a quantidade de fármaco solúvel aumenta, pois a forma de sal hidrossolúvel é obtida. O processo inverso ocorre quando estamos trabalhando com bases. Na formulação, o veículo é frequentemente ajustado a um valor de pH para que um certo nível de ionização do fármaco seja obtido, favorecendo sua solubilidade e estabilidade (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Os principais estudos de risperidona associada com sistemas nanoparticulados encontrados na literatura pesquisada foram os de Silva e colaboradores (2012), Muthu e colaboradores (2009) e Kumar e colaboradores (2008), que trabalharam com nanopartículas lipídicas sólidas, utilizando PLGA como polímero e a água, como o principal componente da fase aquosa.

O coeficiente de partição entre uma fase oleosa e uma fase aquosa fornece uma medida da lipofilia de uma molécula, que poderá ser utilizada para prever a viabilidade da mesma em atravessar uma membrana biológica. Para isso, considera-se a ionização da molécula naquele

pH. A forma mais comum de determinar o coeficiente de partição é utilizando o método de agitação em frasco, onde conta com a distribuição de um fármaco no equilíbrio, entre uma fase oleosa e aquosa (AULTON, 2005). Os melhores coeficientes de partição obtidos para a risperidona ficaram na faixa de pH entre 6,5 (Log P= 2.09) a 7,0 (log P =2.3), seguido do da água (Log P = 0.48).

No terceiro artigo procuramos alternativas para aumentar a taxa de encapsulação da risperidona com óleo de linhaça e conseguimos um incremento de 10,15% nesse parâmetro, quando o pH da fase aquosa foi alterado para pH 7,0. A nanocápsula escolhida, posteriormente passou por identificações adicionais como o IR, DSC e difração de Raio-X e somado aos estudos de caracterização. Todos esses resultados forneceram bons indicativos de que a risperidona estava adequadamente nanoencapsulada.

Assim com para as nanocápsulas de gergelim, os estudos *in vitro* demonstraram que a formulação desenvolvida foi segura para as células avaliadas, não apresentando efeito citotóxico ou genotóxico.

Estudos adicionais de estabilidade e perfil de liberação se fazem necessários, porém esses resultados indicam que a fase aquosa e mais um parâmetro importante a ser investigado nos estudos de pré-formulação.

Podemos concluir após a realização desse estudo que os objetivos gerais do trabalho foram alcançados, pois foi possível nanoencapsular a risperidona de forma eficiente e esse processo melhorou a estabilidade do fármaco frente à luz. Além disso, os estudos *in vivo* demonstraram que a escolha de outros núcleos oleosos para a produção de nanocápsulas alterou, de forma significativa a liberação do ativo, contribuindo na prolongação da atividade do fármaco, em doses inferiores as usuais.

REFERÊNCIAS

AI, et al. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p.1117-1127, 2011.

ALANAZI, F. K. et al. F. Solubility of antipsychotic drug risperidone in transcitol + water co-solvent mixtures at 298.15 to 333.15 K. **Journal of Molecular Liquids**, v.90, p.68-72, 2014.

ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8ª ed. São Paulo: Artmed, 2007. p.300- 375

ALMEIDA, J. S. et al. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.2, p.165-172, 2009.

ALVAREZ-ROMÁN, R. et al. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v.99, p.53-62, 2004.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.341, p.215-220, 2007.

AMELLER, T. et al. Polyester–Poly(Ethylene Glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonization properties. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.7, p.1063-1070, 2003.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, p.413-420, 1995.

ANDREASEN, N. C. et al. Diagnosis, methodology and subtypes of schizophrenia. **Neuropsychobiology**, v.35, p.61 -63, 1997.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto alegre: Artmed, 2005. 677 p.

- AVENOSO, A. et al. Determination of risperidone and its major metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v.746, p.173-181, 2000.
- BADO, P. et al. Effects of low-dose d-serine on recognition and working memory in mice. **Pharmacology**, v.218, p.461-470, 2011.
- BALZEAU, J. et al. The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells. **Biomaterials**, v.34, p.3381-3389, 2013.
- BAPTISTA, T. et al. Comparative effects of the antipsychotics sulpiride and risperidone in female rats on energy balance, body composition, fat morphology and macronutrient selection. **Progress on Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.28, p.1305-1311, 2004.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.630-643, 2010.
- BARRIOS, J. Desenvolvimento e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno em diferentes núcleos oleosos. **Tese (Mestrado)**. Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2010.
- BARROS, E.; BARROS, H. M. T. **Medicamentos na prática clínica**, Porto Alegre : Artmed, 2010.
- BARROSO, A. K. M. et al. Linhaça marrom e dourada: propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. **Ciência Rural**, v.44, n.1, p.181-187, 2014.
- BATOOL, F. et al. Dose-related effects of clozapine and risperidone on the pattern of brain regional serotonin and dopamine metabolism and on tests related to extrapyramidal functions in rats. **Acta Pharmaceutica**, v.60, p.129-140, 2010.
- BEHELLI, L. P. C. Antipsicóticos de ação prolongada no tratamento de manutenção da esquizofrenia. Parte i. Fundamentos do seu desenvolvimento, benefícios e nível de aceitação em diferentes países e culturas. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v.11, n.3, p.341-349, 2003.
- BENVEGUNÚ, D. M. et al. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.77, p.332-336, 2011.

BERNARDI, A. et al. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A β 1-42 in Alzheimer's disease models. **International Journal of Nanomedicine**, n.7, p.4927- 4942, 2012.

BHANJI, N. H.; CHOUINARD, G.; MARGOLESE, H. C. A review of compliance, depot intramuscular antipsychotics and the new long-acting injectable atypical antipsychotic risperidone in schizophrenia. **European Neuropsychopharmacology**, v.14, p.87-92, 2004.

BHARATHI, C. H. et al. Identification, isolation and characterization of potential degradation product in risperidone tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.46, p.165-169, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Publicada no D.O.U. de 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE. nº. 01, de 29 de julho de 2005. Guia para Realização do Estudo de Estabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRITISH PHARMACOPEIA. London: Her Majesty Stationery Office, London, 2012.

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, n.5, p.530-536, 1996.

CALVO, P. et al. Long-circulating PEGylated polycyanocrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery, **Pharma Research.**, v.18, n.8, p.1157-1166, 2001.

CARRARO, T. C. M. M. Desenvolvimento, caracterização físico-química e biológica de nanopartículas poliméricas contendo anfotericina B. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

CARTER, C. S. Applying new approaches from cognitive neuroscience to enhance drug development for the treatment of impaired cognition in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v.31, n.4, p.810-815, 2005.

CASTAÑO, A.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. **Toxicology in Vitro**, v.19, p.695–705, 2005.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Potential application of antioxidant capacity assays to assess the quality of edible vegetable oils. **Lipid Technology**, v.21, n.7, p. 152-155, 2009.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, v.24, n.1, p.173-187, 2011.

CAUCHETIER, E. et al. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v.250, p.273-281, 2003.

CHAIYASIT, W. et al. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, p.299-317, 2007.

CHEN, D. et al. Tamoxifen and toremifene impair retrieval, but not acquisition, of spatial information processing in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.72, p.417-428, 2002.

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

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. 2^a ed., New York: Marcel Dekker Inc., 2005. p.300- 375

CHO, S. H. et al. Effects of a safflower tea supplement on antioxidative status and bone markers in postmenopausal women. **Nutrition Research and Practice**, v.5, n.1, p.20-27, 2011.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.5, p.169-186, 2006.

CHOI, C.W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. **Plant Science**. v.163, p. 1161-1168, 2002.

CHUE, P.; WELCH, R.; BINDER, C. Acceptability and disintegration rates of orally disintegrating risperidone tablets in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. **Canadian Journal of Psychiatry**, v.49, p.701-703, 2004.

CHUN, Y. et al. ^1H and ^{13}C NMR assignments for amlodipine and risperidone. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v.13, n.1, 2004.

CORDIOLI, A. V. **Psicofármacos: consulta rápida**. 3^a ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 695p.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparacion of dissolution profiles. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, n.13, p.123-133, 2001.

CRUZ, L. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.313, p.198–205, 2006.

DALENÇON, F. et al. Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules: formulation studies. **Int. J. Pharm.**, n.153, p.127–130, 1997.

DANEL, C. et al. Study of the complexation of risperidone and 9-hydroxyrisperidone with cyclodextrin hosts using affinity capillary electrophoresis and ^1H NMR spectroscopy. **Journal of Chromatography A**, v.1215, p.185-193, 2008.

DANIEL, J. S. P. et al. Risperidone – Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility using thermal and non-thermal techniques. **Thermochimica Acta**, v.568, p.148-155, 2013.

DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas. 40. ed. São Paulo, SP: JBM, 2011. 921 p.

DONG, Y. et al. Solid lipid nanoparticles: continuous and potential large-scale nanoprecipitation production in static mixers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.94, p.68-72, 2012.

EL-SHERIF, Z.A.; EL-ZEANY, B.; EL-HOUSSINI, O.M. High performance liquid chromatographic and thin layer densitometric methods for the determination of risperidone in the presence of its degradation products in bulk powder and in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, p. 975-981, 2005.

ERMER, J. Validation in Pharmaceutical Analysis. Part I: An Integrated Approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

FAROOQUI, A. A. et al. T. Comparison of biochemical effects of statins and fish oil in brain: The battle of the titans. **Brainrese Archreviews**, v.56, p.443-471, 2007.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.

FDA Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994.

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for Industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 2000a.

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for Industry: analytical procedures and methods validation. Chemistry, manufacturing, and controls documentation. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 2000b.

FDA – Food and Drug Administration. Risperdal consta. Washington, 2003. Disponível em <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/21346_Risperdal%20Consta%20Long-Acting%20Injection_chemr.PDF> Acesso em 17 nov. 2012.
FERNANDES DE SÁ, G. et al. Desenvolvimento da nanociência e da nanotecnologia. **Portaria MCT n° 252**, Programa de Desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia do PPA, 2004.

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

FIGUEIREDO FILHO, D. B; DA SILVA JÚNIOR, J. A. Visão além do alcance: uma introdução à análise fatorial. **Opinião Pública**, v.16, n.1, p.160-185, 2010.

FISCHER, R. S., HO, J. Potential new methods for antiepileptic drug delivery. **CNS Drugs**, v.16, n.9, p.579-593, 2002.

FOLLEY, B. S. et al. Anomalous neural circuit function in schizophrenia during a virtual Morris water task. **Neuroimage**, v.49, p.3373–3384, 2010.

FOX, B. G.; LYLE, K. S.; ROGGE, C. E. Reactions of the diiron enzyme stearylacyl carrier protein desaturase. **Accounts of Chemical Researches**, v.37, n.7 p.421-429, 2004.

FREDDO, R. J. Estudo para a obtenção e caracterização de sistemas nanoparticulados contendo ácido valpróico e avaliação da penetração destes através da barreira hematoencefálica. **Tese de doutorado**. UFRGS, Curso de Pós Graduação, 2009.

FRONZA, T. et al. **Nanocosméticos: Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.13-14, Porto Alegre, 2007.

FROTA, L. H. et al. Padronização de medicamentos psicoativos no Rio de Janeiro. Análise crítica da lista provisória da Secretaria Municipal de Saúde. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.47, n.1, p.29-38, 1998.

FROTA, L. H. et al. Olanzapina: comentários e sugestões ao protocolo preliminar do Ministério da Saúde. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.50, n.1-2, p.23-24, 2001.

FROTA L. H. Cinquenta anos de medicamentos antipsicóticos em psiquiatria, 2000. Disponível em: <http://www.medicina.ufrj.br/cursos/LH%20FROTA%20-%201%20Ed%20-%2050%20ANOS%20DE%20MEDICAMENTOS%20ANTIPsicOTICOS.pdf>, acesso em dezembro de 2015.

GALVÃO, E. L.; da SILVA, D. C. F; da SILVA, J. O; MOREIRA, A. V. B.; SOUSA, E. M. B. D; Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.551-557, 2008.

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

GARCIA-SAGREDO, J. M. Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. **Biochemical Biophys Acta**, v.1779, n.6-7, p.363-375, 2008.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n.69, p.1- 9, 2008.

GIL, E. S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3ª ed. Pharmabooks:São Paulo, 2010. 511 p.

GOLAN, D. E. et al. **Princípios de farmacologia. A Base fisiopatológica da farmacologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 952 p.

GÖPPERT, T. M.; MÜLLER, R. H. Plasma protein adsorption of tween 80 and poloxamer 188-stabilized solid lipid nanoparticles. **Journal of Drug Targeting**, v.11, n.4, p.225-231, 2003.

GREEN, M. F.; KERN, R. S.; HEATON, R. K. Longitudinal studies of cognition and functional outcome in schizophrenia: implications for MATRICS. **Schizophrenia Research**, v.72, p.41-51, 2004.

GRAF, R. et al. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced drug delivery reviews**, v.16, p.215-233, 1995.

GULYAEV, A. E. et al. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v.16, n.10, 1999.

GUTERRES, S. S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and Stability Study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.113, n.1, p.57-63, 1995.

GUTERRES, S. S. et al. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v.7, p.195-199, 2000.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. **Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: Marcelo Morales. (Org.). Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007, v. único, p. 247-263.**

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, monospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Insights**, v.2, p.147-157, 2007.

GUTFINGER, T. Polyphenols in olive oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n.11, p.966-968, 1981.

HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. 888 p.

HARRIS, J. M.; MARTIN, N.E.; MODI, M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetic**, v.40, n.7, p.539-551, 2001.

HE, W. et al. Nanoemulsion-templated shell-crosslinked nanocapsules as drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.445, p.69-78, 2013.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Science**, v.66, p.2873-2896, 2009.

HOU, Y. et al. Differential effects of haloperidol, clozapine and olanzapine on learning and memory functions in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology**, v.30, p.1486-1495, 2006.

IAEA - Manual in Biodosimetry, TRS-405. **International Atomic Energy Agency**, Vienna, Austria, 2001.

IANISKI, F. R. et al. Protective effect of meloxicam-loaded nanocapsules against amyloid-peptide-induced damage in mice. **Behavioural Brain Research**, n.230, p.100-107, 2012.

JOO, H. H. et al. Colloidal stability and in vitro permeation study of poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules containing hinokitiol. **J. Industrial and Engineering Chemistry Research**, n.14, p.608-613, 2008.

KAN, P. et al. Study on the formulation of o/w emulsion as carriers for lipophilic drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.15, n.2, p.117-125, 1999.

KEEFE, R. S. et al. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. **Archives of General Psychiatry**, v.64, p.633-647, 2007.

KELMANN, R. G. et al. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v.324, p.231-239, 2007.

KERN, R. S. et al. Psychosocial treatments to promote functional recovery in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v.35, p.347-361, 2009.

KHAN, L. et al. Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. **IET Nanobiotechnology**, v.9, n.6, p.396-400, 2014.

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

KÜLKAMP, I. C. et al. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2078-2084, 2009.

KUMAR, V. V.; SINGH, R. S., CHAUDHURI, A. Cationic transfection lipids in gene therapy: successes, set-backs, challenges and promises. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.1297-1306, 2003.

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

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.; Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25; p.726-732; 2005.

LEE, J.; LEE, Y.; CHOE, E. Effects of seamol, sesamin and sesamol extracted from roasted sesame oil on the thermal oxidation of methyl linolate. **Food Science and Technology**, v.41, p.1871-1875, 2008.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p.47-60, 2000.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, n.3, 2001.

LIMAYEM, I. et al. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v.325, p.124-131, 2006.

LINKOV, I.; SATTERSTROM, F. K.; COREY, L. M. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.4, p.167-171, 2008.

LOHMANN, C.; HÜWEL, S.; GALLA, H. J. Predicting blood-brain barrier permeability of drugs: Evaluation of different *in vitro* assays. **Journal of Drug Targeting**, v.10, n.4, p.263-276, 2002.

LOPES, E. et al. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, n.55, v.7, p.527-530, 2000.

LOSA, C. et al. Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metipranolol. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n.1, p. 80-86, 1993.

LU, Y. et al. In vivo evaluation of risperidone-SAIB in situ system as a sustained release delivery system in rats **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.68, p.422-429, 2008.

LV, H. et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **Journal Controlled Release**, v.114, p.100-109, 2006.

MAHAJAN, H. S.; TATIYA, B. V.; NERKAR, P. P. Ondansetron loaded pectin based microspheres for nasal administration: In vitro and in vivo studies. **Powder Technology**, v.221, p.168-176, 2012.

MALI, A. D.; BATHE, R. S. Updated review on nanoparticles as drug delivery systems. **International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v.4, p.18-34, 2015.

MALUF, S. W. et al. *Citogenética Humana*. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MANDRIOLI, R. et al. Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies Biomedical and Life Science**, v.879, p.167-173, 2011.

MEGENS, A. A.; AWOUTERS, F. H.; NIEMEGEREERS, C. J. Differential effects of the new antipsychotic risperidone on large and small motor movements in rats: a comparison with haloperidol. **Psychopharmacology**, v.95, n.4, p.493-496, 1988.

MEHTA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v.12, p.83, R-88 R, 1997.

MELTZER, H. Y.; MCGURK, S. R. The effects of clozapine, risperidone and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v.25, n.2, p.233-255, 1999.

MEZZALIRA, B.; FUNCHAL, C.; DANI, C. Comet assay: activity evaluation of chalcogens. **Ciência em Movimento**, v.2, n.33, 2014.

MODI, G. et al. Nanotechnological application for the treatment of neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, v.88, p.272-285, 2009.

MODI, G.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanotechnology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p.154-172, 2010.

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

MONACO, J. P. Desenvolvimento de sistemas bio e mucoadesivos de uso intra-bucal: Avaliação *in vitro* da liberação de nimesulida. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MOORHEAD, P. S. et al. Chromosomes preparations leucocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v.20, p.613-616, 1960.

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

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

MOURI, A. et al. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. **Neurochemistry International**, v.51, p.173-184, 2007.

MÜHLFELD, C. et al. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. **Physiology Published**, v.294, n.5, p.817-829, 2008.

MUTHU, M. S.; SINGH, S. Studies on biodegradable polymeric nanoparticles of risperidone: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Nanomedicine**, v.3, n.3, p. 305-319, 2008.

MUTHU, M. S. et al. PLGA nanoparticle formulations of risperidone: preparation and neuropharmacological evaluation. **Nanomedicine**, v.5, p.323-333, 2009.

NASCIMENTO, K. Citotoxicidade e estresse oxidativo causado por nanocápsulas contendo meloxicam em cultura de esplenócitos de camundongos *BALB/C*. **Tese (Mestrado)**. Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2010.

NEILL, J. C. et al. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. **Pharmacology & Therapeutics**, v.128, p.419-432, 2010.

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

PAESE, K. Desenvolvimento tecnológico, estudo de fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos. **Dissertação de mestrado**. UFRGS, Curso de Pós Graduação, 2008.

PALUDETTI, Luis Antonio. Critérios para preparação de líquidos para administração por via Oral. **International journal of pharmaceutical compounding**. v.6, n.4, p.192-197, 2004.

PATTERSON, T. L.; LEEUWENKAMP, O. R. Adjunctive psychosocial therapies for the treatment of schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v.100, p.108-119, 2008.

PEARLSON, G. D. Neurobiology of schizophrenia. **Annals of Neurology**, v.48, n.4, p.556-566, 2000.

PERACCHIA, M. et al. PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: investigation of their drug encapsulation and release characteristics. **Journal Control Release**, v.46, p.223-231, 1997.

PINA, K. V. et al. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: Estado da arte, perspectivas de inovação e investimentos. **XXV Encontro Nacional de Engenharia de Produção**. Porto Alegre, 2005. Disponível em: www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP2005_Enegep08021178.pdf. Acesso em: 17 nov. 2012.

PIRES, R. O. Modelagem matemática de perfis de Liberação de fármacos a partir de Nanocarreadores. **Tese (Mestrado)**. Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2011.

POMPL, P. N. et al. Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APP^{sw} transgenic mouse model for Alzheimer's disease. **Journal Neuroscience**, v.87, p.87-95, 1999.

PRIETO, M. J. et al. Optimization and in vitro toxicity evaluation of G4 PAMAM Dendrimer-risperidone complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p.845-850, 2011.

PUJALTÉ, I. et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. **Particle and Fibre Toxicology**, v.8, n.10, p. 1-16, 2011.

QUINTANAR, D. et al. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification–diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, n.15, p.1056–1062, 1998.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipidic nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.76, p.127- 137, 2010.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Risperidone solid dispersion for orally disintegration tablets: Its formulation design and non-destructive methods of evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**. v.400, p.49- 58, 2010.

RIGO, L. A. et al. Influence of the type of vegetable oil on the drug release profile from lipid-core nanocapsules and in vivo genotoxicity study. **Pharmaceutical Development and Technology**, v.19, n.7, p.789-798, 2014.

ROGERO, S.O. et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.6, p.3 - 31, 2003.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, London, v.92, n.2, p.235-254, 2005.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. 888 p.

RZIGALINSKI, B. A.; STROBL, J. S. Cadmium – Containing Nanoparticles: Perspectives on Pharmacology & Toxicology of Quantum Dots. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.238, n.3, p.280 - 288, 2009.

SAKAGUCHI, M. et al. E. Effects of systemic administration of beta-casomorphin-5 on learning and memory in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.530, p.81-87, 2006.

SALDEEN, K.; SALDEEN, T. Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. **Nutrition Research**, v.25, p.877-889, 2005.

SANTANA, M. H. A.; SEVERINO, P.; SOUTO, E. B. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – Parte II. **Polímeros**, v.22, n.1, p.101-106, 2012.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and b-carboline. **Psychopharmacology**, v.94, p.491-495, 1988.

SATO, M. E. O. et al. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n. 2, p.195-203, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SENA, E. P. et al. Diabetes mellitus e antipsicóticos atípicos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.25, n.4, p.253-257, 2003.

SHUKLA, D. et al. Preparation and in-vitro characterization of risperidone-cyclodextrin inclusion complexes as a potential injectable product, **DARU**, v.17, n.4, p.226-235, 2009.

SILVA, A. C. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) – based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of risperidone: preparation and characterization studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.93, p.241-248, 2012.

SILVA, A. C. et al. Risperidone release from solid lipid nanoparticles (SLN): validated HPLC method and modelling kinetic profile. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.8, p.307-316, 2012.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422p.

SILVA, J. **O uso do ensaio cometa para o ensino de Genética Toxicológica**. 2007. <http://geneticanaescola.com.br/wp-home/wp-content/uploads/2012/10/Genetica-na-Escola-22-Artigo-06.pdf>. Acesso em 02/06/2014.

SILVESRTAIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos editora S.A, 2007. 490 p.

SIVASANKAR, M.; KUMAR, B. P. Role of Nanoparticles in Drug Delivery System. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v.1; n.2, p41-66, 2010.

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

SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science and Engineering**, v.33, p.1744-1752, 2013.

SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011. v.2.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v.70, n.1, p.1-20, 2001.

SOUTO, C. R. O; DUARTE, H. C. **Química da vida. Ácidos carboxílicos**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte: Rio Grande do Norte, 2006. 32p.

STELLA, B. et al. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 344, p.71-77, 2007.

SUJA, K. P. et al. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. **Food Chemistry**, v.84, p.393-400, 2004.

SUTHAR, A. P. et al. Determination of risperidone and forced degradation behavior by HPLC in tablet dosage form. **International Journal of PharmTech Research**, v.1, n.3, p.568-574, 2009.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n.3, p.12-20, 1998.

SZYDTOWSKA-CZERNIAK, A. et al. Comparison of two analytical methods for assessing antioxidant capacity of rapeseed and olive oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p.141-149, 2008.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, "Just the Factor" 5. Treatment and prevention past, present, and future. **Schizophrenia Research**, v.122, p.1-23, 2010.

TEXEIRA, M. et al. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.9, p.491-500, 2005.

THE INDEX MERCK 30th.ed. Whitehouse Station: Merck Research Laboratories, Merck&CO., INC. 2001. CD-ROM.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 36 ed., Rockville: United States **Pharmacopeia Convention**, NF 29, 2013.

TITIER, K. et al. Simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma after overdose. **Journal of Chromatography B**, v.772, p.373-378, 2002.

THOMPSON, L.U.; CUNNANE, S.C. **Flaxseed in human nutrition**. 2.ed. Champaign, Illinois: AOCS, 2003. 458p

TOSI, G. et al. Polymeric nanoparticles for the drug delivery to the central nervous system. *Expert Opinion*. **Drug Delivery**, v.5, n.2, p.155-174, 2008.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v.365, n.1-3, p.147-159, 1996.

VIANNI, R.; BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, v.19, n.4, p.400-408, 1996.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.384-387, 2007.

- VOIGT, N. et al. Surfactants, not size or zeta-potential influence blood–brain barrier passage of polymeric nanoparticles. **European Journal and Pharmaceutical Biopharmaceutics**, n.x, p.xx-xx, 2014,
- VONARBOURG, A. et al. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. **Wiley InterScience**, p.620-628, 2006.
- WALSH, R. N., CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v.83, p.482-504, 1976.
- WEISS, V. Avaliação tecnológica de suspensões e nebulizador de nanocápsulas e nanoesferas contendo indometacina. **Tese (Mestrado)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- WELLS, B. G.; DiPIRO, J.; SCHWINGHAMMER, T. L.; HAMILTON, C. W. 6^a ed. **Manual de Farmacoterapia**. Rio de Janeiro:Mc Graw Hill, 2006. p.731-750.
- WONG, H. L.; WU, X. Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.686-700, 2012.
- WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drugs nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.53, p.456-469, 2011.
- WU, W. H. The contents of ligandans in commercial sesame oils of Taiwan and their changes during heating. **Food Chemistry**, v.104, p.341-344, 2007.
- YAN CHEN, A.; LIHONG L. B. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.640-665, 2012.
- YACOBI, N. R. et al. Nanoparticle effects on rat alveolar epithelial cell monolayer barrier properties. **Toxicology in vitro**, v.21, p.1373-1381, 2007.
- YOUNG, J. W. et al. A. Using the matrices to guide development of a preclinical cognitive test battery for research in schizophrenia. **Pharmacology & Therapeutics**, v.122, p.150-202, 2009.
- YOUNG, J. W.; POWELL, S. B.; GEYER, M. A. Mouse pharmacological models of cognitive disruption relevant to schizophrenia. **Neuropharmacology**, v.62, p.1381-1390, 2012.

ZHANG, G.; TERRY JR., A.V.; BARTLETT, M. G. Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat brain tissue. **Journal of Chromatography B**, v.858, p.276-281, 2007.

ZEINAB, A.; BADR, Z.; OLA, M. High performance liquid chromatographic and thin layer densitometric methods for the determination of risperidone in the presence of its degradation products in bulk powder and in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, p.975-981, 2005.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.294, p.261-267, 2005.