

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

Carolina Pires Rosa

**NANOCÁPSULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO
VIMPOCETINA: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE**

**Santa Maria, RS
2017**

Carolina Pires Rosa

**NANOCÁPSULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO VIMPOCETINA:
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE**

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

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

**Santa Maria, RS
2017**

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

Pires Rosa, Carolina
NANOCÁPSULAS DE POLI(E-CAPROLACTONA) CONTENDO
VIMPOCETINA: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICONVULSIVANTE / Carolina Pires Rosa.- 2017.
112 f.; 30 cm

Orientador: Scheila Rezende Schaffazick
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. Neuroprotetor 2. Liberação cerebral 3. Atividade
anticonvulsivante 4. Microscopia de força atômica 5.
Viscosidade I. Rezende Schaffazick, Scheila II. Título.

Carolina Pires Rosa

**NANOCÁPSULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO VIMPOCETINA:
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE**

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

Aprovado em 13 de janeiro de 2017:

Scheila Rezende Schaffazick, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Aline Ferreira Ourique, Dra. (UNIFRA)

Cristiane de Bona da Silva, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais, pelo apoio e incentivo para que eu chegasse até aqui

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Scheila Schaffazick, pela oportunidade concedida, confiança em mim depositada, paciência e orientação durante todos esses anos, desde a iniciação científica.

Ao professor Dr^o. Carlos Mello do departamento de farmacologia da UFSM, pela importante colaboração com os estudos *in vivo*, e à suas alunas de Pós-graduação Micheli, Fernanda e Joseane pelo acolhimento e ensinamentos transmitidos.

Agradeço à professora Cristiane de Bona da Silva pela disponibilidade do equipamento Zetasizer.

Ao professor André Gündel, da UNIPAMPA de Bagé, pelas análises de microscopia de força atômica.

À professora Dr^a. Letícia Cruz pelo carinho e ensinamentos transmitidos durante esses anos. Aos colegas e amigos do Labtec, pela convivência diária e experiências divididas: Juliane, Luana, Mailine, Marila, Natháli, Alessandra, Sabrina, Taiane, Marcela, Allanna, Felipe, Cristina, Luan, Camila, Renata, Verônica, Fernanda, Laura, Gabriele, Gabriela Buzzatti, Gabriela Mimbacas, Luiz Eduardo, Daniela e Carina.

Ao colega e amigo Estevan e a técnica Charlene, pela sempre disponibilidade em ajudar e compartilhar ideias.

Às amigas e colegas Patrícia, Milena e Maria Gilda pela amizade construída durante este período, pelos momentos agradáveis que juntas passamos. Um agradecimento especial às alunas de iniciação científica Camila Rampelotto e Tainara pela agradável convivência, amizade e auxílio para que este trabalho fosse finalizado. Vocês foram muito importantes durante este período.

Agradeço à minha família, principalmente meus pais e irmão, pelo incentivo e apoio nas minhas escolhas. Aos meus avós por estarem sempre presentes em minha vida, preocupados e atenciosos.

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

Especialmente ao CNPq pelo suporte financeiro, bem como à FAPERGS.

RESUMO

NANOCÁPSULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO VIMPOCETINA: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE

AUTORA: Carolina Pires Rosa

ORIENTADORA: Scheila Rezende Schaffazick

A epilepsia é uma doença caracterizada por crises convulsivas, oriundas de uma descarga elétrica neuronal excessiva, que acomete 50 milhões de pessoas no mundo inteiro. A vimpocetina, derivada do alcaloide vincamina, é um neuroprotetor que possui atividade antioxidante, sendo utilizada no tratamento de doenças neurodegenerativas. Pesquisas têm demonstrado também um importante efeito antiepilético. No entanto, este fármaco apresenta baixa solubilidade e curta meia-vida, limitando sua aplicação no campo farmacêutico. Dessa forma, nanocápsulas, as quais também são muito pesquisadas para a liberação cerebral de fármacos, tornam-se alternativas para veicular esta substância ativa. Neste trabalho, foram desenvolvidas suspensões de nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) (PCL) pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, contendo triglicerídeos de cadeia média (NC-TCM-VP) ou óleo de abacate (NC-ABA-VP) como núcleo, para veicular vimpocetina (0,5 mg/mL), a fim de avaliar as características físico-químicas, o perfil de liberação, a atividade antioxidante *in vitro* e atividade anticonvulsivante *in vivo* do fármaco associado às nanoestruturas. As suspensões de nanocápsulas apresentaram tamanho de 200 a 211 nm (Zetasizer[®]), PDI de 0,12 a 0,13, potencial zeta negativo, pH entre 6,78 a 6,83, teor próximo a 95% e eficiência de encapsulamento de, aproximadamente, 98%. Nos parâmetros avaliados, o tipo de óleo utilizado influenciou a viscosidade das formulações (viscosímetro capilar) e a distribuição de tamanho de partículas (Mastersizer[®]). Microscopia de força atômica das formulações demonstrou a presença de partículas coloidais de formato próximo a esferas. Ambos os sistemas desenvolvidos foram capazes de controlar a liberação da vimpocetina, em comparação ao fármaco livre, pela técnica de difusão em sacos de diálise, utilizando tampão fosfato pH 7,4: etanol (70:30). As suspensões preparadas com TCM apresentaram melhor estabilidade, bem como distribuição de tamanho mais homogênea, em comparação às de óleo de abacate, sendo, então, selecionadas para dar seguimento aos estudos. As formulações NC-TCM-VP apresentaram atividade antioxidante *in vitro* superior ao fármaco livre, pelo método TBARS, assim como as suspensões sem o fármaco. No estudo *in vivo*, utilizando modelo animal de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ), doses de vimpocetina de 5 mg/Kg ou 10 mg/Kg foram avaliadas, e os tratamentos foram realizados 30 minutos ou 4 h antes da administração de PTZ. Os resultados demonstraram que as suspensões NC-TCM-VP foram capazes de melhorar o efeito anticonvulsivante do fármaco livre ou em relação ao veículo/nanocápsulas sem fármaco, em alguns parâmetros avaliados, principalmente no menor tempo (30 minutos). Diante dos resultados obtidos, as suspensões de nanocápsulas são sistemas aquosos promissores para a liberação cerebral da vimpocetina, fármaco altamente lipofílico, podendo constituir uma alternativa futura para o tratamento da epilepsia, o qual ainda não é usado clinicamente para este fim.

Palavras-chave: Neuroprotetor. Poli(ε-caprolactona). Nanoestruturas. Liberação cerebral. Atividade anticonvulsivante. Microscopia de força atômica. Viscosidade

ABSTRACT

NANOCAPSULES OF POLY (ϵ -CAPROLACTONE) CONTAINING VINPOCETINE: DEVELOPMENT AND EVALUATION OF ANTICONVULSANT ACTIVITY

AUTHOR: Carolina Pires Rosa
ADVISOR: Scheila Rezende Schaffazick

Epilepsy is a disease characterized by convulsive seizures, caused by an excessive neuronal electrical discharge, which affects 50 million people worldwide. Vinpocetine, derived from the alkaloid vincamine, is a neuroprotective that has antioxidant activity, being used in the treatment of neurodegenerative diseases. Researches have also shown an important antiepileptic activity for vinpocetine. However, this drug presents low solubility and short half-life, limiting its application in the pharmaceutical field. Thus, nanocapsules, which are also well researched for the cerebral delivery of drugs, become alternatives to deliver this active substance. In this work, vinpocetine-loaded poly(ϵ -caprolactone) (PCL) nanocapsule suspensions (0.5 mg/mL) were developed by the interfacial deposition of preformed polymer, containing medium chain triglycerides (NC-TCM-VP) or avocado oil (NC-ABA-VP) as core, in order to evaluate the physicochemical characteristics, drug release profile, both *in vitro* antioxidant and *in vivo* anticonvulsive activities of the drug associated with nanostructures. The nanocapsule suspensions had a size of 200 to 211 nm (Zetasizer[®]), PdI of 0.12 to 0.13, negative zeta potential, pH between 6.78 to 6.83, drug content close to 95% and encapsulation efficiency about 98 %. In the parameters evaluated, the type of oil influenced the viscosity of the formulations (capillary viscometer) and particle size distribution (Mastersizer[®]). Atomic force microscopy of the formulations demonstrated the presence of colloidal particles with shape close to spheres. Both developed systems were able to control the release of vinpocetine, compared to the free drug, by the dialysis bag diffusion technique using phosphate buffer pH 7.4: ethanol (70:30). The suspensions prepared with TCM presented better stability as well as a more homogeneous size distribution compared to avocado oil, and were then selected to follow the studies. The NC-TCM-VP formulations showed higher *in vitro* antioxidant activity than the free drug, by the TBARS method, as well as suspensions without drug. In the *in vivo* study, using animal model of seizure induced by pentylenetetrazole (PTZ), doses of 5 mg/kg or 10 mg/kg vinpocetine were evaluated, and treatments were performed 30 minutes or 4 h prior to administration of PTZ. The results demonstrated that NC-TCM-VP suspensions were able to improve the antiepileptic effect of the free drug or vehicle/nanocapsules without drug in some parameters evaluated, mainly in the shortest time (30 minutes). In view of the results obtained, nanocapsule suspensions are promising aqueous systems for the cerebral delivery of vinpocetine, a highly lipophilic drug, and may be a future alternative for the treatment of epilepsy. Vinpocetine is not yet used clinically for this purpose.

Keywords: Neuroprotector. Poly(ϵ -caprolactone). Nanostructures. Brain delivery. Anticonvulsive activity. Atomic force microscopy. Viscosity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo que envolve a formação de radicais livres, resultando em epilepsia.....	24
Figura 2 - Estrutura química da vimpocetina.....	25
Figura 3 - Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas: Fármaco dissolvido no núcleo geralmente oleoso e/ou adsovido à parede polimérica.....	29
Figura 4 - Representação esquemática do método de preparação de suspensões de nanocápsulas, empregado no presente estudo: deposição interfacial de polímero pré-formado.....	31
Figura 5 - Representação esquemática de dois dos possíveis mecanismos de liberação de fármacos mediado por nanopartículas através da BHE: (a) abertura das junções entre as células endoteliais devido à presença das nanopartículas; (b) Endocitose de nanopartículas mediada por receptores de macromoléculas, seguido de transcitose.....	35
Figura 6 - Estrutura química do polímero poli(ϵ -caprolactona).....	40
Figura 7 - Viscosímetro de Cannon-Fenske.....	52
Figura 8 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV. NC-TCM-VP: suspensões de nanocápsulas de TCM com fármaco; NC-TCM: suspensões de nanocápsulas de TCM sem fármaco; NC-ABA-VP: suspensões de nanocápsulas de óleo de abacate com fármaco, NC-ABA: suspensões de nanocápsulas de óleo de abacate sem fármaco.....	61
Figura 9 - Aspecto macroscópico das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimpocetina, empregando os diferentes óleos (NC-TCM-VP e NC-ABA-VP, respectivamente).....	64
Figura 10 - Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimpocetina (n=3), obtidos através de espalhamento de luz dinâmico.....	66
Figura 11 – Gráficos do potencial zeta das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimpocetina (n=3).....	66
Figura 12 – Distribuição de tamanho de partículas obtida a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, através de difração a laser (n=3).....	69

Figura 13 - Imagens obtidas através da microscopia de força atômica (MFA). NC-TCM-VP (Figura 13 A e 13 C), NC-ABA-VP (Figura 13 B e 13 D). Figuras 13 C e 13 D demonstram as imagens tridimensionais.....	74
Figura 14 - Perfis de liberação <i>in vitro</i> da vimpocetina a partir das diferentes nanocápsulas (NC-TCM-VP e NC-ABA-VP), em comparação à difusão do fármaco livre (VP). Resultados expressos em média e DP (n=3).....	76
Figura 15 - Gráficos indicando o ajuste gráfico ao modelo monoexponencial para os dados da liberação da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas contendo os diferentes óleos e em relação ao fármaco livre.....	77
Figura 16 - Teor de fármaco nas suspensões de nanocápsulas de PCL (NC-TCM-VP), armazenadas por 60 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata. (*) Diferença significativa em relação ao tempo inicial. ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$).....	80
Figura 17 - Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas de PCL (NC-TCM-VP), armazenadas por 60 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	81
Figura 18 - Índice de polidispersão das suspensões de nanocápsulas de PCL (NC-TCM-VP), armazenadas por 60 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	82
Figura 19 - Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas de PCL (NC-TCM-VP), armazenadas por 60 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	82
Figura 20 - Valores de pH das suspensões de nanocápsulas de PCL (NC-TCM-VP) durante 60 dias de armazenamento. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.....	83
Figura 21 - Representação gráfica da análise do tamanho de partículas obtido por difração a laser, do lipossoma de lecitina de soja empregado para os estudos de lipoperoxidação.....	84
Figura 22 - Avaliação da atividade antioxidante (AA) a partir das suspensões de nanocápsulas contendo fármaco ou não, e da vimpocetina livre. Os valores foram obtidos através da concentração de MDA obtida na peroxidação lipídica. Os resultados foram expressos como a atividade antioxidante observada em relação a uma amostra máxima	

oxidada (controle positivo). * Diferença significativa entre as nanocápsulas e o fármaco livre. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata. ANOVA seguida de teste Tukey ($p < 0,05$).....86

Figura 23 - Efeito da vimpocetina livre (VP) ou nanoencapsulada (NC-TCM-VP) (10 mg/Kg; i.p.) após indução das convulsões com PTZ (50 mg/Kg; i.p.). (A) latência para mioclonia; (B) latência para convulsões tônico-clônicas generalizadas; (C) número de episódios convulsivos; (D) tempo de duração das convulsões; (E) Escala de Racine. Efeitos obtidos após 4 horas de tratamento. Análise não paramétrica de duas vias, seguida de teste de Mann-Whitney; dados apresentados como mediana \pm intervalo interquartil, para $n = 6-9$ em cada grupo. * Diferença significativa para $p < 0,025$ em comparação ao veículo. @ Diferença significativa para $p < 0,025$ em comparação ao fármaco livre.....89

Figura 24 - Efeito da vimpocetina livre (VP) ou nanoencapsulada (NC-TCM-VP) (5 mg/Kg; i.p.) após indução das convulsões com PTZ (50 mg/Kg; i.p.). (A) latência para mioclonia; (B) latência para convulsões tônico-clônicas generalizadas; (C) número de episódios convulsivos; (D) tempo de duração das convulsões; (E) Escala de Racine. Efeitos obtidos após 30 minutos de tratamento. Análise não paramétrica de duas vias, seguida de teste de Mann-Whitney; dados apresentados como mediana e intervalo interquartil, além de média \pm DP para (C); $n = 4-7$ em cada grupo. @ Diferença significativa para $p < 0,025$ em comparação ao fármaco livre; # Diferença significativa para $p < 0,025$ em comparação ao seu controle (NC-TCM); ## Diferença significativa para $p < 0,005$ em comparação ao seu controle (NC-TCM).....92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, preparadas com triglicerídeos de cadeia media (NC-TCM-VP) ou com óleo de abacate (NC-ABA-VP).....	47
Tabela 2 - Análise de precisão.....	62
Tabela 3 - Análise de exatidão.....	63
Tabela 4 - Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas de PCL, com TCM ou óleo de abacate, contendo vimpocetina (0,5 mg/mL), após a preparação (n=3).....	65
Tabela 5 - Diâmetros das suspensões de nanocápsulas de PCL, obtidos por difração a laser (n=3).....	67
Tabela 6 - Parâmetros calculados através do modelo monoexponencial e Lei da Potência para as nanocápsulas (NC-TCM-VP e NC-ABA-VP) e a solução do fármaco (n=3).....	77
Tabela 7 - Concentrações de MDA resultante da lipoperoxidação lipídica induzida pelo radical livre ascorbil, empregando lipossomas como substrato (n=3).....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AVE	Acidente vascular encefálico
BHE	Barreira hematoencefálica
BSC	Barreira sangue-cérebro
CLAE-UV	Cromatografia a líquido de alta eficiência; detecção na região ultravioleta
CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
cP	CentiPoise
DAEs	Drogas antiepiléticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
D _{3,2}	Diâmetro médio ponderado em superfície
EEG	Eletroencefalografia
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Método de redução de ferro
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
GSH	Glutathiona reduzida
IL-1 β	Interleucina 1 beta
ILAE	Internacional League against Epilepsy
MDA	Malondialdeído
MFA	Microscopia de força atômica
mPa.s	Mili.Pascal.segundo
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MSC	Critério de seleção do modelo
NC-ABA	Suspensões de nanocápsulas de óleo de abacate sem fármaco
NC-ABA-VP	Suspensões de nanocápsulas de óleo de abacate com fármaco
NC-TCM	Suspensões de nanocápsulas de triglicerídeos de cadeia média sem fármaco

NC-TCM-VP	Suspensões de nanocápsulas de triglicérides de cadeia média com fármaco
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
PBCA	Poli(butil cianocrilato)
PCL	Poli(ϵ -caprolatona)
PdI	Índice de polidispersão
Pgp	Glicoproteína P
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(lactídeo-co-glicolídeo)
PTZ	Pentilenotetrazol
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCM	Triglicérides de cadeia média
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VP	Vimocetina livre

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1 EPILEPSIA.....	22
3.1.2 Epilepsia e o estresse oxidativo.....	23
3.2 VIMPOCETINA	24
3.2.1 Vimpocetina e seu efeito antioxidante.....	26
3.2.2 Vimpocetina e seu efeito anticonvulsivante.....	27
3.3 NANOESTRUTURAS POLIMÉRICAS.....	29
3.3.1 Barreira sangue-cérebro e liberação cerebral através de nanopartículas...30	
3.3.2 Nanoestruturas contendo vimpocetina.....	37
3.3.3 Polímeros usados para liberação cerebral e poli(ϵ-caprolactona).....	39
3.3.4 Óleos vegetais e seus benefícios.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 MATERIAIS.....	44
4.1.1 Matérias-primas e outros materiais.....	44
4.1.2 Equipamentos.....	45
4.1.3 Animais.....	46
4.2 MÉTODOS.....	46
4.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas.....	46
4.2.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas.....	47
<i>4.2.2.1 Determinação do diâmetro médio de partículas, distribuição de tamanho e potencial zeta.....</i>	<i>48</i>
<i>4.2.2.2 Determinação do pH.....</i>	<i>48</i>
<i>4.2.2.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulamento da</i>	

<i>vimpocetina</i>	48
4.2.2.3.1 Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas.....	49
4.2.2.4 Estudo da solubilidade da vimpocetina nos óleos.....	51
4.2.2.5 Avaliação da viscosidade das suspensões de nanocápsulas.....	51
4.2.2.6 Análise da morfologia das suspensões de nanocápsulas	53
4.2.3 Estudo da cinética de liberação da vimpocetina a partir das nanocápsulas em suspensão aquosa.....	53
4.2.4 Estudo de estabilidade das formulações contendo vimpocetina.....	55
4.2.5 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> contra a lipoperoxidação.....	55
4.2.5.1 Preparação dos lipossomas	55
4.2.5.2 Ensaio da lipoperoxidação.....	56
4.2.6 Avaliação da atividade anticonvulsivante da vimpocetina associada às nanocápsulas.....	57
4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS CONTENDO VIMPOCETINA.....	60
5.1.1 Desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados poliméricos.....	60
5.1.2 Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas.....	61
5.1.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina.....	63
5.1.4 Microscopia de força atômica.....	73
5.2 ESTUDO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA VIMPOCETINA A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS.....	74
5.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA.....	79
5.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> CONTRA LIPOPEROXIDAÇÃO.....	83

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE *IN VIVO*.....87

6 CONCLUSÃO.....**97**

REFERÊNCIAS.....**99**

1 INTRODUÇÃO

Segundo a ILAE (*Internacional League against Epilepsy*), epilepsia é a manifestação de sintomas ou sinais provenientes de uma atividade neuronal excessiva no cérebro. Essa desordem acomete aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo (TORRES, 2015). Considerando que os novos tratamentos visam diminuir a frequência e severidade das crises, além de diminuir os efeitos adversos causados por fármacos, torna-se interessante o estudo de novas terapias para o tratamento desta desordem cerebral (NEELIMA, 2015).

A vimpocetina, um alcaloide da vincamina, vem sendo utilizada por ser um fármaco sintético vasodilatador cerebral, classificado como nootrópico, que atua no sistema nervoso central, sendo, assim, responsável por aumentar a circulação cerebral, empregada no tratamento de doenças como Alzheimer, isquemia vascular cerebral crônica, AVC (acidente vascular cerebral) agudo e disfunção cerebral senil (MOLNÁR; ERDÓ, 1995; XU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010). Pesquisas também demonstram sua atividade antioxidante, devido à neutralização de radicais livres (PATYAR et al., 2011).

Relatos mais recentes demonstraram um potente efeito antiepilético, empregando diferentes modelos animais, capazes de inibir convulsões induzidas por distintos agentes convulsivantes. A vimpocetina demonstrou efeito biológico em concentrações até menores, comparadas a outros anticonvulsivantes clássicos, amplamente utilizados para o tratamento da epilepsia (GÓMEZ; BUIGS; SITGES, 2014; NEKRASSOV; SITGES, 2008; PEREIRA et al., 2003; SITGES; ALDANA; REED, 2016; SITGES; CHUI; NEKRASSOV, 2006), tornando-se interessante mais estudos visando explorar este potencial anticonvulsivante.

No entanto, este fármaco apresenta uma baixa solubilidade em água (XU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010), além de outras limitações, como lenta dissolução, curta meia-vida e significativo metabolismo de primeira passagem, proporcionando baixa biodisponibilidade, restringindo seu uso clínico (ZHUANG et al., 2010).

Nanopartículas poliméricas são estruturas com diâmetro inferior a 1000 nm, porém, na maioria dos estudos, são relatadas partículas com tamanho entre 100 a 500 nm (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Entre estes sistemas, estão as nanocápsulas, que possuem um núcleo geralmente oleoso, envolto por uma membrana polimérica. O fármaco nas nanocápsulas pode estar dissolvido no núcleo ou adsorvido à parede polimérica, como também pode encontrar-se nas duas localidades (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). As nanocápsulas têm sido amplamente estudadas

visando a diferentes aplicações terapêuticas, devido às vantagens que apresentam, como tamanho reduzido de partículas, capacidade de melhorar a estabilidade de diversas substâncias, além da possibilidade do núcleo solubilizar fármacos pouco solúveis (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010), promoção de liberação modificada dos princípios ativos veiculados (RIBEIRO et al., 2016; RIGO et al., 2014; SANTOS et al., 2014), aumento da eficácia terapêutica e redução de efeitos adversos (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

Uma das vias de administração muito explorada, para as aplicações das nanoestruturas, é a parenteral, com o objetivo de aumentar o índice terapêutico (SCHAFFAZICK et al., 2003), controlar a distribuição/liberação de fármacos, reduzir a toxicidade, promovendo a vetorização de fármacos a alvos específicos, além da proteção da substância ativa (SCHAFFAZICK et al., 2003; VENTURINI et al., 2011). Neste sentido, os sistemas nanoestruturados podem promover a liberação cerebral de fármacos, objetivando tratamentos em doenças neurológicas, aumentando a concentração dos mesmos e, conseqüentemente, o efeito terapêutico (KREUTER, 2001; RONEY et al., 2005; KREUTER, 2014; WILSON et al., 2014).

Na área da nanotecnologia, podem ser encontrados vários estudos com óleos vegetais utilizados para compor os sistemas nanoestruturados (FERREIRA et al., 2016; FLORES et al., 2011; SANTOS et al., 2014), devido as suas vantagens, podendo colaborar com diferentes efeitos esperados, como propriedades antioxidantes (MANEA; UNGUREANU; MEGHEA, 2014) e fotoprotetora (LACATUSU et al., 2014).

O óleo de abacate possui excelente qualidade nutricional, além de apresentar vitamina E em sua composição, conferindo propriedades antioxidantes (SALGADO et al., 2008), tornando-o interessante, também, para o desenvolvimento de nanocápsulas. Já os triglicerídeos de cadeia média (TCM) são amplamente utilizados na preparação de suspensões de nanocápsulas, sendo componentes adequados inclusive para formulações a serem administradas de forma parenteral (TAN et al., 2016).

A vimpocetina já foi associada a vários sistemas visando à sua liberação controlada, como ciclodextrinas (RIBEIRO et al, 2005), nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (LUO et al., 2006), prolipossomas (XU et al, 2009), carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (ZHUANG et al, 2010) e micelas poliméricas (EL-DAHMY et al, 2014). A maioria destes estudos possui a finalidade de aumentar a biodisponibilidade oral da vimpocetina quando administrada.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver suspensões de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis, de poli(ϵ -caprolatona) [PCL], contendo vimpocetina, visando à administração parenteral, tendo em vista o potencial destes sistemas coloidais poliméricos na liberação cerebral. O trabalho foi baseado no emprego do óleo vegetal de abacate, em comparação aos TCM, como núcleos oleosos, propondo avaliar a atividade antioxidante *in vitro* frente à indução da peroxidação lipídica em modelo de membrana de lipossomas, utilizando o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), além da avaliação da atividade anticonvulsivante *in vivo* deste fármaco neuroprotetor associado às nanoestruturas.

Cabe evidenciar que, embora existam alguns relatos de estudos que comprovem a atividade anticonvulsivante deste fármaco, não foram encontrados trabalhos direcionados à liberação cerebral e à avaliação do efeito antiepilético a partir da administração do neuroprotetor associado a sistemas nanoestruturados. Vale ressaltar que nosso grupo tem se dedicado ao desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas de etilcelulose (polímero não biodegradável) contendo vimpocetina, e de liofilizados/granulados/comprimidos contendo estes sistemas, visando à administração oral e controle da sua liberação (BOLSON, 2015; PINHEIRO, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver suspensões de nanocápsulas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) contendo vimpocetina, empregando TCM ou óleo de abacate, comparar esses sistemas quanto às características físico-químicas e capacidade de liberação do fármaco, bem como avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e a atividade anticonvulsivante *in vivo* das formulações selecionadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar suspensões de nanocápsulas biodegradáveis contendo vimpocetina, utilizando TCM ou óleo abacate, como núcleo oleoso, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado;
- Caracterizar as formulações quanto ao pH, diâmetro médio, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta, viscosidade relativa, teor e eficiência de encapsulamento;
- Verificar a morfologia das suspensões de nanocápsulas empregando microscopia de força atômica;
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanocápsulas desenvolvidas, através da técnica de difusão em sacos de diálise;
- Avaliar a estabilidade das formulações, em temperatura ambiente, durante 2 meses;
- Estudar a atividade antioxidante *in vitro* dos sistemas desenvolvidos, frente à peroxidação lipídica, empregando lipossomas como substrato;
- Avaliar a atividade anticonvulsivante *in vivo* da vimpocetina associada às nanocápsulas de TCM, em comparação ao fármaco livre, empregando camundongos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 EPILEPSIA

A epilepsia é caracterizada basicamente por crises convulsivas, oriundas de uma descarga elétrica excessiva (ACHARYA et al., 2013), entretanto, também pode assumir outras formas, como a perda de consciência (NEELIMA, 2015). A maioria da população que apresenta esta desordem sofre de convulsões tônico-clônicas generalizadas e a parcela restante acaba desenvolvendo as outras formas possíveis da doença (YUSUF et al., 2012). Estas crises estão associadas à despolarização com alta frequência de um grupo de neurônios do cérebro, onde a região atingida por esta despolarização vem a definir os sintomas que ocorrerão, por exemplo, o envolvimento do córtex motor causa convulsões, o do hipotálamo causa despolarização autônoma periférica, já o envolvimento da formação reticular na parte alta do tronco encefálico leva à perda da consciência (RANG; DALE, p. 540, 2012). Esta alteração neuronal pode ser decorrente de diferentes fatores, entre eles, acidente vascular encefálico, traumatismo ou causas genéticas (GOODMAN; GILMAN, p. 585, 2012).

Quanto à classificação clínica, esta é feita a partir das características das crises convulsivas. São divididas em crises parciais, onde a despolarização inicia-se de forma local e assim costuma permanecer, ou, então, generalizadas, onde acabam envolvendo os dois hemisférios (GOODMAN; GILMAN, p. 583, 2012; RANG; DALE, p. 540, 2012).

A Organização Mundial da Saúde estima que, aproximadamente, 50 milhões de pessoas apresentem ou já apresentaram episódios de epilepsia em algum período da vida (TORRES, 2015). São relatados cerca de 8,4 milhões de novos casos a cada ano (ACHARYA et al., 2013), sendo, assim, um dos transtornos neuropsicológicos mais frequentes relatados (TORRES, 2015). A incidência da epilepsia apresenta diferenças entre as faixas etárias, sendo mais prevalente em crianças e idosos (KANASHIRO, 2006; PATEL, 2004). No Brasil, a prevalência é mais proeminente no gênero masculino e em indivíduos mais idosos (GOMES, 2011). Estes pacientes epiléticos possuem maior probabilidade de morte prematura do que pessoas saudáveis, pois se estima que a mortalidade destes indivíduos seja de duas a três vezes maior quando comparados à população em geral (ACHARYA et al., 2013; FERREIRA; SILVA, 2009).

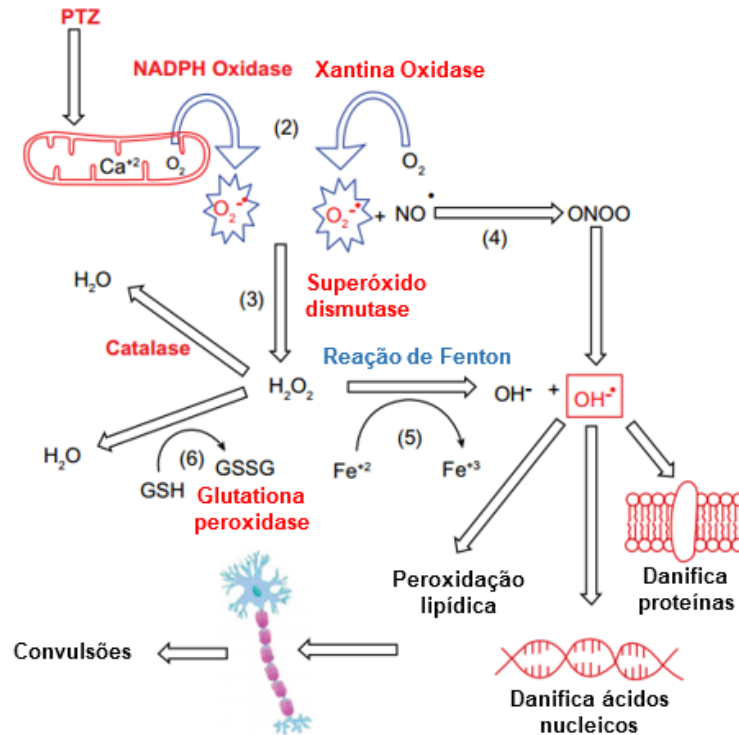
Quanto ao tratamento, este é baseado em fármacos antiepiléticos, também conhecidos por DAEs (“drogas” antiepiléticas), sendo que os mais utilizados são a carbamazepina, a fenitoína, o fenobarbital e o ácido valproico (KANASHIRO, 2006). A finalidade do tratamento da epilepsia com fármacos antiepiléticos é procurar amenizar a frequência e a gravidade das crises, bem como se busca diminuir a toxicidade dos fármacos empregados no cérebro e em outros tecidos (NEELIMA, 2015).

3.1.2 Epilepsia e o estresse oxidativo

A morte neuronal pode ser um fator a contribuir para o desenvolvimento da epilepsia. Processos como o estresse oxidativo podem favorecer a progressão da doença, além de resultarem em lesões neuronais. Crises epiléticas repetidas podem resultar no aumento da oxidação de macromoléculas (PATEL, 2004). Existem evidências de que o estresse oxidativo possa levar a episódios epiléticos (DEVI; PILLAI; VOHORA, 2006), bem como, o próprio episódio epilético poderia causar estresse oxidativo. Neste sentido, os radicais livres podem induzir a convulsões ou, por outro lado, o processo de estresse oxidativo pode ser capaz de tornar o cérebro mais suscetível a convulsões, sendo o estresse oxidativo, portanto, consequência ou causa da epilepsia (PATEL, 2004).

O aumento do Ca^{2+} no tecido neuronal leva a uma cascata de respostas bioquímicas desencadeando morte celular neuronal após o estado epilético. O mecanismo que envolve a formação de radicais livres (figura 1), resultando em epilepsia, resumidamente, pode ocorrer através da presença de um agente indutor de epilepsia (ex: pentilenotetrazol – PTZ), que aumenta o Ca^{2+} intracelular, induzindo a formação do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). A NADPH oxidase e xantina oxidase também geram $\text{O}_2^{\bullet-}$. Através da dismutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ catalisada pela superóxido dismutase, ocorre aumento da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção de ONOO^- , a partir de NO, acaba gerando mais radical OH^{\bullet} livre. A produção de radicais OH^{\bullet} , através da reação de Fenton, facilmente oxida proteínas estruturais de células neuronais, perturbando sua permeação e funcionamento biológico, ocasionando epilepsia (YUSUF et al., 2014).

Figura 1 – Mecanismo que envolve a formação de radicais livres, resultando em epilepsia



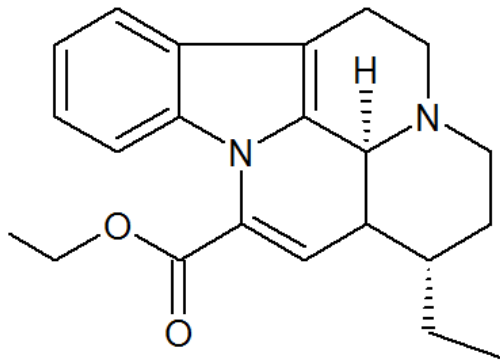
Fonte: adaptado de YUSUF et al., 2014.

3.2 VIMPOCETINA

A vimpocetina (figura 2) foi descrita, primeiramente, como um vasodilatador cerebral por Karparti e colaboradores em 1976. Em 1978, este fármaco, sintetizado do alcaloide vincamina, obtido das folhas da *Vinca minor*, foi introduzido no mercado pelo nome de Cavinton[®]. Atualmente, comprimidos de vimpocetina estão disponíveis no mercado (BÖNÖCZK, 2000; RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2003), como o Vicog[®] (RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015) e Vinporal[®] (EL-DAHMY et al., 2014), com dosagem terapêutica de 5 a 10 mg, três vezes ao dia (BÖNÖCZK, 2000). A vimpocetina é um sólido branco, com massa molar igual a 350,46 g/mol, apresenta pKa de 7,31, solúvel em solventes orgânicos

como ácido acético, dimetilsulfóxido, acetona e clorofórmio, sendo pouco solúvel em álcoois e praticamente insolúvel em água (INDEX, 2006).

Figura 2 - Estrutura química da vimpocetina



Embora este fármaco seja classificado como um agente nootrópico, utilizado na estimulação da capacidade cognitiva (RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015), possui significativos efeitos neuroprotetores, tanto *in vitro* como *in vivo* (MOLNÁR; ERDÓ, 1995; SZABÓ et al., 1893). A atividade neuroprotetora e os efeitos anticonvulsivantes da vimpocetina têm relação com o bloqueio dos canais de Na^+ dependentes de voltagem e inibição indireta de processos moleculares iniciados pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular. Outro mecanismo proposto para a neuroproteção resulta da prevenção da diminuição do gradiente eletroquímico de Na^+ e da liberação dos aminoácidos excitatórios aspartato e glutamato que ocorre em situação de estresse oxidativo (GÓMEZ; BUIGS; SITGES, 2014; MOLNÁR; ERDÓ, 1995; PEREIRA et al., 2003). Este efeito neuroprotetor relatado é capaz de reduzir a lesão neuronal que ocorre em condições de hipóxia e isquemia (PEREIRA et al., 2003).

Por possuir propriedades anti-inflamatórias, reduzindo a inflamação cerebral (GÓMEZ et al., 2014), a vimpocetina tem importante aplicação no tratamento da degeneração, a qual possui relação com doenças cuja a patogenia e progressão envolvem o estresse oxidativo, como a doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e doença de Parkinson. A vimpocetina, por ser utilizada como um vasodilatador cerebral, pois aumenta a

microcirculação e reduz a agregação plaquetária, por atuar também inibindo a enzima fosfodiesterase, aumentando os níveis de AMPc e GMPc, responsáveis pelos efeitos vasculares, sendo útil no tratamento da isquemia cerebral (BÖNÖCZK, 2000; JINCAI et al., 2014; PEREIRA et al., 2003).

3.2.1 Vimpocetina e seu efeito antioxidante

Embora o mecanismo de ação da vimpocetina ainda não tenha sido completamente elucidado, existem evidências de efeitos antioxidantes, especialmente relacionado à capacidade de neutralizar o radical OH^\bullet , formado pela reação de Fenton (HERRERA-MUNDO; SITGES, 2013). Este fármaco pode ser considerado um eficiente antioxidante, com capacidade de diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) induzidas por ascorbato/ Fe^{2+} , protegendo o organismo do ataque das EROS, além da peroxidação lipídica, sendo capaz de proteger as estruturas e a permeabilidade das membranas biológicas de alterações que possam resultar na morte da célula (PEREIRA et al., 2003). A vimpocetina também reduziu o estresse oxidativo induzido por um lipopolissacarídeo na pele da pata de ratos e o efeito foi observado empregando diferentes testes, como a capacidade sequestrante de radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$, além de ensaios de redução férrica (FRAP) e de glutathiona reduzida (GSH). A vimpocetina nesse estudo também apresentou efeito na redução dos níveis aumentados do ânion superóxido, nitrito e malondialdeído (MDA) (RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015). Em outro estudo, a fim de avaliar a atividade antioxidante da vimpocetina, metossulfato de fenazina foi empregado para gerar radicais livres em amostras de suspensões de células vermelhas sanguíneas de humanos, gerando células vermelhas rígidas. A técnica de vazamento de potássio foi empregada para detectar possíveis danos celulares. A vimpocetina apresentou efeito antioxidante pronunciado, capaz de proteger a rigidez causada nas células, induzida por metossulfato de fenazina, diminuindo também o vazamento do potássio das células (HORVATH et al., 2002).

3.2.2 Vimpocetina e seu efeito anticonvulsivante

Recentemente, existem evidências maiores de que este fármaco possui propriedades anticonvulsivantes importantes (GÓMEZ; BUIGS; SITGES, 2014; NEKRASSOV; SITGES, 2008; PATYAR et al., 2011; SITGES et al., 2006; SITGES et al., 2011; SITGES; ALDANA; REED, 2016), já que é capaz de inibir os canais de sódio, de uma forma semelhante como atua a carbamazepina e a fenitoína, antiepiléticos clássicos, muito utilizados no tratamento de convulsões (BÖNÖCZK, 2000; RANG; DALE, p. 546, 2012).

Nekrassov e Sitges (2004) já relatavam atividade anticonvulsivante da vimpocetina para tratar convulsões induzida por PTZ em porcos-da-índia. No estudo, doses a partir de 2 mg/kg (i.p.) de vimpocetina foram suficientes para impedir completamente as mudanças induzidas pelo PTZ na eletroencefalografica (EEG) dos animais, demonstrando um potente efeito antiepilético, além da capacidade do fármaco em evitar a perda auditiva observada durante crises epiléticas. Os mesmos pesquisadores avaliaram também a atividade anticonvulsivante da vimpocetina para tratar convulsões induzidas por 4-aminopiridina (4-AMP), em porcos-da-índia. Como resultado, a vimpocetina também foi capaz de impedir as mudanças na EEG dos animais a partir de doses de 2 mg/Kg, bem como, as alterações auditivas, confirmando, assim, o efeito anticonvulsivante potente deste fármaco (SITGES; NEKRASSOV, 2004).

Em um estudo de Nekrassov e Sitges (2008), a vimpocetina na dose de 3mg/Kg foi administrada via intraperitoneal, em porcos-da-índia, e os resultados demonstraram que a vimpocetina atuou como um potente antiepilético capaz de inibir convulsões em doses 10 vezes menores, quando comparadas à carbamazepina, além de inibir também a perda auditiva, efeito não relatado para esse antiepilético clássico. Assim, a vimpocetina poderia prevenir alterações auditivas, como alternativa no tratamento da epilepsia.

Em outro estudo, utilizando hipocampus isolados de ratos Wistar, vimpocetina inibiu a liberação do glutamato (importante neurotransmissor excitatório que provoca epilepsia) induzida por 4-AMP. Os resultados demonstraram que o fármaco em estudo reduziu a liberação do neurotransmissor em concentrações menores do que outros antiepiléticos utilizados no estudo, como carbamazepina, fenitoína, lamotrigina, oxcarbamazepina e topiramato (SITGES et al., 2011).

A vimpocetina (potente antiepilético não clássico) também foi comparada aos antiepiléticos clássicos carbamazepina e ácido valproico, onde as expressões de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α em hipocampos de ratos foram avaliadas, sendo que quando estão em níveis aumentados podem indicar epilepsia em modelos animais. Os resultados obtidos demonstraram que a vimpocetina e a carbamazepina foram capazes de diminuir a expressão de ambos os marcadores em condições basais, diferente do ácido valproico, que não obteve resultados satisfatórios. Com o estudo, os pesquisadores puderam concluir que a vimpocetina e a carbamazepina possuem mecanismos de ação que envolvem a diminuição da permeabilidade dos canais de sódio, exercendo efeitos anti-inflamatórios cerebrais, eficazes na prevenção de crises epiléticas (GÓMEZ; BUIJS; SITGES, 2014).

Mais recentemente, antiepiléticos usuais (levetiracetam, carbamazepina, fenitoína, valproato, lamotrigina, oxcarbamazepina, topiramato), a vimpocetina e o antidepressivo sertralina foram estudados quanto ao efeito no aumento do Ca²⁺ induzido por 4-AMP em hipocampos isolados de ratos. Sertralina e vimpocetina inibiram seletivamente o aumento do Ca²⁺, efeito também visto para os demais anticonvulsivantes; entretanto, não observados para o levetiracetam, ácido valproico e topiramato (SITGES; CHIU; REED, 2015).

Devido à efetiva capacidade antiepilética já relatada acima e pelas vantagens mencionadas anteriormente, a vimpocetina tem sido considerada um novo antiepilético potente alternativo. Contudo, esse fármaco ainda não é utilizado para este fim, mas se tem estudado sua possível utilização no tratamento da epilepsia (SITGES; CHUI; NEKRASSOV, 2006).

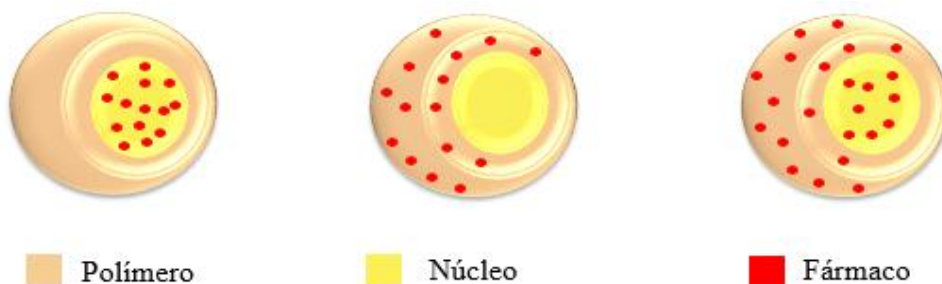
Embora a vimpocetina apresente as diversas vantagens já mencionadas e seja rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, este fármaco possui baixa solubilidade aquosa, de cerca de 5 $\mu\text{g/mL}$, curta meia-vida (1-2 horas), lenta dissolução, além de sofrer um pronunciado metabolismo de primeira passagem, resultando em uma biodisponibilidade oral de aproximadamente 7 % em humanos quando administrada em períodos de jejum, uma vez que a ingestão de alimentos pode aumentar sua biodisponibilidade (BÖNÖCZK et al., 2000; XU et al., 2009; ZHUANG et al., 2010). Estas limitações acabam refletindo na viabilidade das formulações farmacêuticas, pois, independente da via de administração, a biodisponibilidade do fármaco é um fator muito relevante e depende da dissolução deste nos fluidos biológicos e da sua permeabilidade através das membranas celulares (HASA et al., 2014). A fim de reverter estas limitações da molécula, uma possível estratégia é incorporar este fármaco lipofílico a sistemas nanoestruturados (LUO et al., 2006; ZHUANG et al., 2010).

3.3 NANOESTRUTURAS POLIMÉRICAS

Sistemas nanoestruturados têm atraído interesse na aplicação medicinal pela elevada estabilidade química e biológica, possível incorporação de substâncias tanto hidrofílicas como lipofílicas, além da capacidade de serem administrados por várias vias como oral, pulmonar, parenteral, oftálmica e tópica, proporcionando liberação controlada do fármaco (ALVES, et al., 2005; MASSERINI, 2013; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Nanopartículas poliméricas, em geral, são mais estáveis em fluidos biológicos quando comparadas com outros sistemas nanométricos (RONEY et al., 2005). Essas nanopartículas são carreadores de fármacos, caracterizados por apresentarem diâmetro na faixa submicrométrica, sendo que, na maioria dos estudos, são obtidas partículas na faixa de 100 a 500 nm. Entre estes sistemas poliméricos, encontram-se as nanocápsulas (figura 3), que foram descritas pela primeira vez em 1970 (FRANK et al., 2015). Esses nanossistemas são constituídos basicamente de fármaco, polímero, óleo, tensoativo e água e vem sendo descritos como nanovesículas, pois apresentam um invólucro composto por polímero disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso, podendo ser aquoso. O fármaco nesse tipo de nanocápsulas é encapsulado na fase interna, podendo estar dissolvido no núcleo ou adsorvido à parede polimérica, como também pode encontrar-se das duas maneiras (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; FRANK et al., 2015).

Figura 3 – Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas: Fármaco dissolvido no núcleo geralmente oleoso e/ou adsorvido à parede polimérica



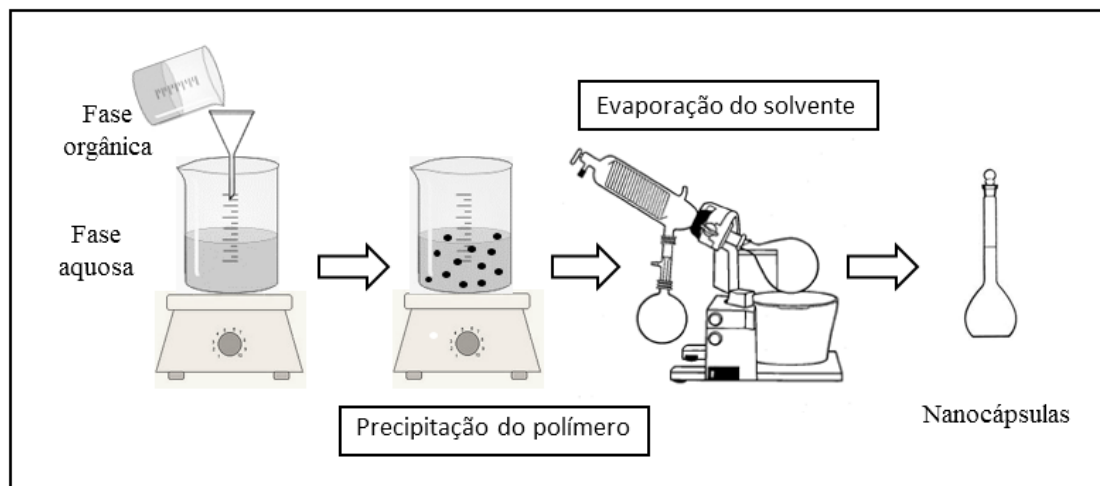
Fonte: próprio autor.

Dentre as principais vantagens estudadas, atribuídas às nanocápsulas, estão o aumento da estabilidade química de fármacos, diminuindo a produção de produtos de degradação, e o aumento da eficácia das formulações, como também a capacidade de proporcionar o aumento da interação entre fármacos e tecidos, levando ao aumento da penetração do fármaco, em função da alta área superficial das nanopartículas. Outra vantagem que é amplamente estudada é o aumento da biodisponibilidade e, conseqüentemente, da eficácia de fármacos, tanto *in vitro* (utilizando cultura de células), quanto *in vivo* (utilizando modelo animais). Estes sistemas também vêm sendo apontados como uma alternativa para reduzir os efeitos adversos de diversos fármacos, pois permitem evitar o contato direto da substância ativa com os tecidos (FRANK et al., 2015), ou mediante a vetorização de substâncias ativas a alvos terapêuticos, reduzindo a distribuição em órgãos saudáveis (GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, 2007).

Quanto à preparação destes sistemas, para a escolha do método, deve-se conhecer as características de solubilidade do fármaco (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Existem na literatura várias técnicas para preparar suspensões de nanocápsulas, podendo ser classificadas em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). Os métodos obtidos através de precipitação de polímeros pré-formados possuem um maior rendimento, e podem ser obtidos através de diferentes técnicas, como emulsificação-evaporação do solvente, *salting-out*, emulsificação-difusão do solvente ou nanoprecipitação (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). O método de deslocamento de solvente/nanoprecipitação (nanopartículas/nanoesferas; *self-assembly*), também conhecido por deposição interfacial de polímero pré-formado (para nanocápsulas), é o mais utilizado no preparo desses sistemas por ser considerado um método simples e de fácil reprodutibilidade de lotes (FESSI et al, 1989; FRANK et al., 2015; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010), sendo o escolhido para o desenvolvimento das nanocápsulas do presente estudo (figura 4). O método baseia-se em uma fase orgânica contendo um solvente ou uma mistura de solventes miscíveis em água, como etanol e acetona. Nesta fase, também contém um polímero de natureza sintética, semissintética ou natural, um óleo e um tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico), além do fármaco. Uma fase não-orgânica (fase aquosa) é preparada, contendo um tensoativo de alto EHL e água. A fase orgânica é vertida lentamente na fase aquosa e, sob agitação mantida durante o processo, ocorre uma emulsificação espontânea. Após este processo, o solvente orgânico é retirado através de

pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório. Geralmente, as partículas obtidas por esta técnica apresentam tamanho de 150-200 nm (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Independentemente do método utilizado, os produtos originados são suspensões coloidais aquosas (SCHAFFAZICK et al., 2003), que podem ser administradas como injeções intravenosas ou por via oral, ou ainda podem ser incorporadas em formas farmacêuticas semissólidas, como géis (RIGO et al., 2015) e cremes (PANDIT et al., 2015). Alternativamente, essas suspensões podem ser transformadas em formas farmacêuticas sólidas, como pós, através de processo de desidratação, como a liofilização (LORENZONI, 2015; RIBEIRO et al., 2016; SCHAFFAZICK et al., 2003), ou secagem por aspersão/*spray-drying* (RIBEIRO et al., 2016) ou até mesmo incorporadas em comprimidos (FRIEDRICH et al., 2010; PINHEIRO, 2016).

Figura 4 – Representação esquemática do método de preparação de suspensões de nanocápsulas, empregado no presente estudo: deposição interfacial de polímero pré-formado



Fonte: Próprio autor.

Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) ou triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico são encontrados em diversos trabalhos, com a finalidade de compor o núcleo oleoso

das nanocápsulas (ABBAS et al., 2015; ALVES et al., 2005; KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2015; OURIQUE et al., 2011; PREETZ et al., 2008; SANTOS et al., 2013; SAVIAN et al., 2015) e não apresentam tendência à oxidação, por isso são muitas vezes escolhidos para fazerem parte da composição das mesmas. Além destas vantagens mencionadas, este óleo é apropriado para a preparação de formulações de tamanho de partículas coloidais adequadas para administração intravenosa (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; TAN et al., 2016).

Os sistemas nanoestruturados são caracterizados quanto a vários parâmetros. O tamanho médio de partículas pode ser obtido por espectroscopia de correlação de fótons, determinando o raio hidrodinâmico das partículas na suspensão coloidal aquosa (COUVREUR et al., 2002). Para avaliações mais detalhadas de tamanho, também é possível fazer uma avaliação granulométrica das partículas por difração a laser (VENTURINI et al., 2011). O potencial zeta oriundo das nanopartículas reflete o potencial de superfície das partículas dispersas e sofre influência das mudanças na interface com o meio dispersante. Este parâmetro é analisado utilizando técnicas de eletroforese. Um dos principais componentes que influencia este parâmetro é o polímero empregado (SCHAFFAZICK et al., 2003), além da natureza química do estabilizante e do pH do meio (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Valor de potencial zeta alto (em módulo) tende a indicar uma boa estabilidade físico-química, que resulta de forças repulsivas que evitam a agregação das partículas, facilitando a redispersão e melhorando a estabilidade (WILSON et al., 2014), entretanto, um potencial zeta com valores mais baixos não necessariamente indicam baixa estabilidade, já que por muitas vezes, formulações que apresentaram o potencial zeta perto da neutralidade apresentaram boa estabilidade, podendo ser explicada pela estabilidade estérica (CORADINI et al., 2014; RIGO et al., 2015).

No que diz respeito à liberação de sistemas nanoestruturados, diferentes grupos de pesquisas já demonstraram que nanopartículas podem melhorar a absorção, tanto no intestino, ou através da barreira sangue-cérebro, liberando o fármaco a locais específicos (LEYVA-GÓMEZ, et al., 2014), além de proporcionar liberação lenta e gradual, ou seja, controlada da substância ativa associada (LORENZONI, 2015; RIBEIRO et al., 2016; RIGO et al., 2014; SANTOS et al., 2014).

3.3.1 Barreira hematoencefálica e liberação cerebral através de nanopartículas

A barreira hematoencefálica (BHE) ou barreira sangue-cérebro (BSC) está presente no sistema nervoso central e possui a finalidade de proteger o cérebro contra toxinas, bactérias e vírus. Esta barreira também é capaz de regular o transporte de substâncias endógenas. Mais de 95% dos fármacos utilizados para o tratamento de doenças cerebrais não conseguem atravessar a BHE em concentrações que garantam efeitos terapêuticos. Sendo, assim, muitas vezes necessário administrar doses elevadas para atingir efeitos terapêuticos adequados, o que pode gerar reações adversas graves, levando à alta toxicidade (REIMOLD et al., 2008). Este não é o caso do fármaco em estudo, já que ele demonstrou atravessar a barreira sangue-cérebro após administração intravenosa, atingindo o sistema nervoso central (BÖRNÖCZK et al., 2000).

É possível encontrar, na literatura, fármacos associados a diversos tipos de nanoestruturas, como lipossomas, micelas poliméricas, dendrímeros (YANG, 2010), nanopartículas lipídicas sólidas (LEYVA-GÓMEZ et al., 2014; NAIR et al., 2012), nanoemulsões (TAN et al., 2016) e nanopartículas poliméricas (KREUTER, 2014) capazes de penetrar a BHE, com finalidade de promover a liberação do fármaco em regiões específicas do cérebro, aumentando a concentração deste e seu efeito terapêutico (NANCE et al., 2014; WILSON et al., 2014).

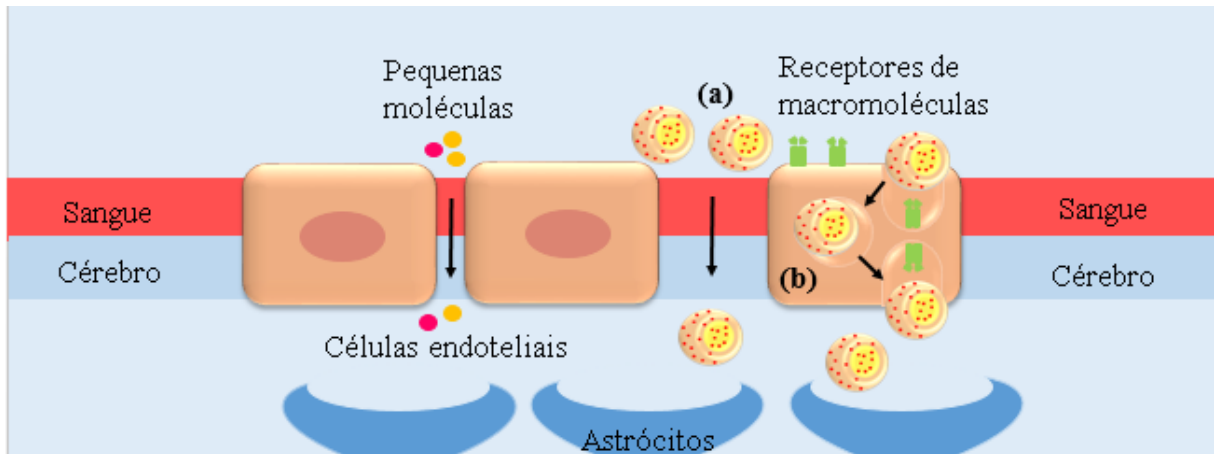
Existem cerca de oito possíveis mecanismos (figura 5) responsáveis pela liberação de fármacos mediada por nanopartículas no cérebro (KREUTER, 2014), que vêm sendo pesquisados nos últimos anos, que são:

- (a) O aumento da retenção de nanopartículas nos capilares presentes no cérebro, havendo adsorção às paredes dos capilares, elevando o gradiente de concentração, aumentando o transporte pelas células do endotélio;
- (b) O tensoativo utilizado (polissorbato 80) pode inibir o efluxo, especialmente mediado pela glicoproteína P (Pgp);
- (c) Um possível efeito tóxico sobre a vasculatura cerebral pode ocorrer;
- (d) Solubilização das células endoteliais lipídicas, oriunda da presença dos tensoativos nas formulações, aumentando assim a permeabilidade das substâncias na BHE;
- (e) Abertura das junções entre as células endoteliais, devido à presença das nanopartículas, e a transição dos sistemas através do endotélio;

- (f) Recentemente, a endocitose de nanopartículas, mediada por receptores de macromoléculas, pelas células endoteliais dos capilares do cérebro, seguida pela transcitose, tem sido o principal mecanismo e o mais aceito para explicar a liberação cerebral de fármacos promovida por nanoestruturas;
- (g) Combinação dos mecanismos, descritos acima, também pode ocorrer.

Algo que desempenha um importante papel, no que diz respeito à liberação cerebral, são as propriedades de superfície das nanopartículas (KREUTER, 2014). O polissorbato 80, presente nas interfaces partículas/água, nas nanoestruturas, pode auxiliar na vetorização de fármacos até o sítio de ação desejado, o que já foi demonstrado em vários estudos, onde nanopartículas revestidas com este tensoativo melhoraram a liberação cerebral e, conseqüentemente, o efeito desejado (KREUTER, 2014; WILSON et al., 2014; YUSUF et al., 2012). O polissorbato 80 atua como uma âncora para as apolipoproteínas (Apo), principalmente Apo A (A-I), B e E, sendo que estas interagem com os receptores endoteliais localizados nos capilares cerebrais. Mais especificamente, Apo A-I interage com o receptor classe B tipo I (SR-BI), já a Apo B e Apo E interagem com os receptores de LDL (RLP1). A interação com estes receptores promove endocitose e transcitose das nanopartículas através das células endoteliais (KREUTER, 2014), promovendo a passagem destas através da BHE e a difusão do fármaco para o cérebro.

Figura 5 – Representação esquemática de dois dos possíveis mecanismos de liberação de fármacos mediado por nanopartículas através da BHE: (a) abertura das junções entre as células endoteliais devido à presença das nanopartículas; (b) Endocitose de nanopartículas mediada por receptores de macromoléculas, seguido de transcitose



Fonte: próprio autor

Neste sentido, diversificadas nanopartículas vêm sendo utilizadas como estratégia para liberação cerebral de fármacos antiepiléticos, havendo evidências de que possam ser capazes de melhorar o tratamento da epilepsia (BENNEWITZ, 2009). Como as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo quitosana e carbamazepina, de Nair e colaboradores (2012), que foram desenvolvidas com objetivo de melhorar o efeito terapêutico de crises convulsivas, para administração oral, em modelo de ratos. As formulações apresentaram diâmetro inferior a 200 nm. A carbamazepina associada às NLS de quitosana demonstrou um aumento na latência para iniciar as crises convulsivas, demonstrando melhora na atividade antiepilética, quando comparada ao fármaco livre e controle, sugerindo que os sistemas seriam adequados para o tratamento de convulsões.

Leyva-Gómez e colaboradores (2014) desenvolveram diferentes sistemas coloidais contendo o benzodiazepínico clonazepam (NLS e micelas poliméricas), para auxiliar no tratamento da epilepsia. Foi avaliada a permeabilidade *in vitro* da BHE em linhagens de células humanas endoteliais cerebrais (hCMEC/D3) diante das diferentes nanopartículas, além

de avaliar *in vivo* o potencial anticonvulsivante do fármaco associado a estes sistemas. As formulações apresentaram diâmetro na faixa nanométrica, 332 nm (NLS) e 16,5 nm (micelas poliméricas), com potencial zeta negativo. A permeabilidade do clonazepan à BHE aumentou quando associado às NLS, porém, diminui na presença das micelas poliméricas. O potencial anticonvulsivante, avaliado através de estudo comportamental e EEG através de convulsões induzidas por PTZ, demonstrou que o efeito anticonvulsivante do fármaco foi aumentado quando este foi associado às NLS, efeito não demonstrado na associação às micelas poliméricas.

Nanopartículas de albumina, contendo gabapentina, outro antiepilético amplamente utilizado no tratamento de convulsões, foram desenvolvidas com o objetivo de avaliar sua eficácia no tratamento da epilepsia. As nanoestruturas apresentaram diâmetro de 141 nm e potencial zeta negativo. Os testes realizados em ratos, com administração intraperitoneal das nanopartículas, demonstraram um aumento na concentração de fármaco no cérebro em relação ao fármaco livre, resultados ainda melhores foram observados com as nanopartículas revestidas com Tween[®] 80 (polissorbato 80). As nanopartículas ainda demonstraram uma diminuição na duração das convulsões em comparação ao fármaco livre. Os sistemas foram considerados promissores para o tratamento da epilepsia (WILSON et al, 2014).

Nanopartículas de poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) contendo oxcarbamazepina, um antiepilético capaz de atravessar a barreira placentária, sem apresentar malformação congênita nos fetos, foram desenvolvidas, pelo método de deslocamento de solvente modificado, para avaliar a permeabilidade das formulações utilizando modelos *in vitro* de membranas: células hCMEC/D3 para barreira sangue-cérebro e trofoblastos da placenta humana (células BeWo) para barreira placentária. Foram preparadas partículas entre 140-170 nm, com índice de polidispersão abaixo de 0,3, potencial zeta de -34 a -51 mV e com eficiência de encapsulamento próxima a 70%. Estudos utilizando o marcador cumarina-6 demonstraram que a permeabilidade do fármaco livre e nanoencapsulado demonstrou valores muito próximos, entretanto a liberação do fármaco livre foi mais rápida. O desenvolvimento das nanopartículas foi considerado promissor para o tratamento da epilepsia durante a gravidez (LOPALCO et al., 2015).

Lipossomas também são explorados para liberação cerebral, como os com nimodipino de Gayosso, Moreno e colaboradores (2015), fármaco que manifesta efeito anticonvulsivante, mas que possui baixa solubilidade nos fluidos gastrointestinais e pronunciado efeito de primeira passagem no fígado. Diante destas desvantagens, os autores desenvolveram

nanossistemas simples (lipossomas) a fim de avaliar a atividade anticonvulsivante do fármaco associado aos mesmos, através de convulsões induzidas por pilocarpina em ratos. Os lipossomas com nimodipino apresentaram efeito antiepilético superior ao do fármaco livre, além de reduzir a toxicidade do fármaco nos animais.

Mais recentemente, Tan e colaboradores (2016) desenvolveram nanoemulsões para via parenteral, contendo ácido valproico, outro antiepilético muito empregado na terapêutica. Os pesquisadores utilizaram uma mistura de óleos (TCM e óleo de semente de cártamo) pelo método de sonicação. A intensidade do ultrassom, temperatura e tempo de sonicação foram avaliados para a escolha da melhor formulação. As formulações apresentaram tamanho de gotículas na faixa nanométrica (43 nm), com índice de polidispersão de 0,2. Quanto à estabilidade, esta foi avaliada durante 5 meses e, embora o tamanho das gotículas tenha aumentado, ainda se manteve em 250 nm, que é considerado adequado para administração parenteral. Com os resultados obtidos, as nanoemulsões desenvolvidas foram consideradas sistemas promissores, com potencial para penetrar a BHE, e, portanto, úteis no tratamento de epilepsia.

3.3.2 Nanoestruturas contendo vimpocetina

É possível encontrar na literatura diferentes sistemas de liberação com vimpocetina, como ciclodextrinas (RIBEIRO et al., 2005), nanopartículas lipídicas sólidas (LUO et al., 2006), prolipossomas (XU et al., 2009), carreadores lipídicos nanoestruturados (ZHUANG et al., 2010) e micelas poliméricas (EL-DAHMY et al., 2014). A maioria destes estudos possui a finalidade de aumentar a biodisponibilidade da vimpocetina quando administrada oralmente.

Luo e colaboradores (2006) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) com tamanho médio de partículas de 70 a 200 nm, potencial zeta negativo e uma elevada eficiência de encapsulamento para vimpocetina. Não foram observadas diferenças significativas no tamanho das nanopartículas no período de armazenamento de seis meses. Um estudo realizado, em ratos, mostrou que a biodisponibilidade da vimpocetina foi aumentada significativamente quando associada às NLS.

Sistemas baseados em prolipossomas foram desenvolvidos e apresentaram um tamanho médio de partículas de 300 nm e eficiência de encapsulamento de 86,3%. A

vimpocetina associada aos prolipossomas teve sua biodisponibilidade oral aumentada em coelhos (XU et al., 2009).

Em estudo conduzido por Zhuang e colaboradores (2010), carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram preparados pelo método de homogeneização à alta pressão, obtendo tamanho médio de partículas de 107 a 177 nm, potencial zeta negativo (-13,4 a -24,7 mV) e eficiência de encapsulamento de 83,2 a 95,3%. Quanto à morfologia analisada, por microscopia eletrônica de transmissão, as partículas mostraram-se esféricas, confirmando o tamanho na faixa de 100 – 150 nm. Foi observado um aumento da biodisponibilidade oral da vimpocetina em ratos, demonstrando que os sistemas nanoestruturados são viáveis para a veiculação desse neuroprotetor.

Recentemente, micelas poliméricas foram desenvolvidas empregando um copolímero de diferentes EHL, com objetivo de aumentar o tempo médio de permanência da vimpocetina na circulação sanguínea, após injeção intravenosa em coelhos. A formulação otimizada apresentou tamanho médio de partículas de 161,50 nm, índice de polidispersão de 0,21, potencial zeta negativo (-22,42 mV) e eficiência de encapsulamento de 50,74%. As formulações foram liofilizadas, sem a presença de crioprotetor e esterilizadas com radiação gama. As nanoestruturas proporcionaram um aumento significativo na meia-vida em relação a um produto comercial e não apresentaram diferenças significativas quanto à caracterização físico-química dos produtos após os processos de liofilização e esterilização (EL-DAHMY et al., 2014).

Nosso grupo de pesquisa tem investido no desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas para veiculação da vimpocetina, empregando etilcelulose como polímero, destinadas à administração por via oral. As suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina (1mg/mL), preparadas por Bolson (2015), apresentaram características físico-químicas adequadas, como tamanho de partículas inferiores a 200 nm, baixos índices de polidispersão, elevada eficiência de encapsulamento, além de estabilidade adequada, durante o período de 90 dias, sobretudo na forma liofilizada, e capacidade de promover liberação controlada. Pinheiro (2016) também desenvolveu suspensões de nanocápsulas de etilcelulose, contendo vimpocetina (3 mg/mL), que apresentaram tamanho de partículas adequado (138 a 157 nm), baixa polidispersão e elevada eficiência de encapsulamento. A partir desses sistemas, empregados como líquido de granulação, granulados foram desenvolvidos, com características físico-químicas e tecnológicas adequadas, os quais foram empregados para a

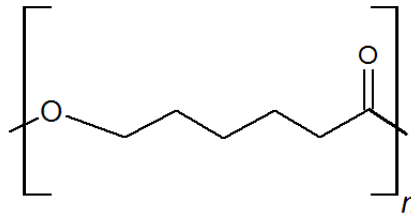
preparação de comprimidos de 2,5 mg de vimpocetina. Esses sistemas foram capazes de controlar a liberação do fármaco.

3.3.3 Polímeros usados para liberação cerebral e poli(ϵ -caprolactona)

Diferentes polímeros têm sido utilizados com o objetivo de aumentar o tempo de circulação das nanopartículas, com a finalidade de facilitar a entrada destes sistemas no cérebro. Polímeros que não são biodegradáveis, acabam sendo tóxicos (KREUTER et al., 2014), deste modo, é aconselhado utilizar polímeros biodegradáveis. O poli(butil cianoacrilato) [PBCA] foi o primeiro polímero biodegradável a ser explorado por demonstrar êxito na liberação cerebral, além de ser o material existente de biodegradabilidade mais rápida (KREUTER, 2001; KREUTER, 2014). A partir deste, outros polímeros, como os poliésteres são os mais empregados devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (ABDELWAHED et al., 2006). Os mais usuais, que objetivam a liberação cerebral, são o poli(ácido lático) [PLA] (XIA et al., 2012) e copolímeros dos ácidos lático e glicólico [PLGA] (MITTAL et al., 2011). Ainda, no que diz respeito à liberação cerebral de nanopartículas, algo que vêm a interferir na biodegradabilidade é o baixo peso molecular dos polímeros empregados. Desta forma, polímeros de menor peso têm demonstrado uma biodegradação mais rápida, tornando-se potencialmente menos tóxicos e, assim, mais adequados para este tipo de liberação (KREUTER, 2014).

Dentre os poliésteres, está incluído o PCL (figura 6), sendo caracterizado como alifático, semicristalino, biocompatível, biodegradável e não tóxico (SINHA et al., 2004; BEHERA et al., 2012), solúvel em diclorometano e clorofórmio, parcialmente solúvel em solventes polares, como a acetona e insolúvel em álcoois e água (POHLMANN et al., 2013). Seu peso molecular geralmente varia entre 3.000 a 80.000 g/mol (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Figura 6 – Estrutura química do polímero poli(ϵ -caprolactona)



Fonte: Próprio autor.

Por possuir uma degradação lenta (BEHERA et al., 2012), elevada permeabilidade para muitos fármacos e não possuir toxicidade (SINHA et al., 2004), este polímero sintético é aconselhado para utilização na preparação de diferentes sistemas de liberação de substâncias, inclusive muito usado para a preparação de suspensões de nanopartículas/nanocápsulas (ALVES et al., 2005; ABDELWAHED et al., 2006; CORADINI et al., 2014; OURIQUE et al., 2011; RIGO et al., 2014; RIGO et al., 2015; SAVIAN et al., 2015), para diversos fins.

Embora as nanopartículas de PCL não sejam as mais utilizadas visando à vetorização em sítios específicos no cérebro, é possível encontrar alguns estudos de nanossistemas compostos por este polímero objetivando a liberação cerebral (BENVEGNÚ et al., 2012, KANAZAWA et al., 2011; LIU et al., 2013; XIN et al., 2011).

Dentre os métodos descritos na literatura, empregados no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados baseados em PCL, os mais relatados são deposição interfacial de polímeros pré-formado e emulsificação-difusão (POHLMANN et al., 2013).

3.3.4 Óleos vegetais e seus benefícios

O uso de óleos vegetais, com amplo benefício para a saúde, satisfaz tanto as necessidades industriais como as de consumo, justamente por causa de sua segurança e

sustentabilidade (LACATUSU et al., 2014). Podemos encontrar vários estudos utilizando óleos vegetais para a formação do núcleo de sistemas nanoestruturados, devido a sua composição, levando a diferentes atividades, como antioxidante. Como exemplo, o óleo de melaleuca (FLORES et al., 2011), óleo de coco (SANTOS et al., 2014), óleo de semente de uva (ALMEIDA et al., 2010; CORADINI et al., 2014; MANEA; UNGUREANU; MEGHEA, 2014), óleo de framboesa (NICULAE et al., 2014), óleo de abóbora, óleo de amaranto (LACATUSU et al., 2014) e óleo de rícino (GOTO et al., 2013; WANG et al., 2014).

O abacate (*Persea americana* Mill) é um fruto tropical e subtropical nativo da América Central - México (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 1999), sendo atualmente produzido em todo território brasileiro (JORGE et al., 2015). O óleo oriundo deste fruto pode ser obtido através de um processo de extração a partir da polpa, que é considerada a parte principal do fruto, por possuir a maior quantidade do óleo (SALGADO et al., 2008).

O óleo de abacate é rico em β -sitosterol e ácido oleico, além de apresentar ácidos linoleico e linolênico em sua composição, gordura insaturada que tem sido utilizada como um coadjuvante no tratamento de hiperlipidemias, além de possuir uma excelente qualidade nutricional. Também apresenta vitamina E, sob a forma de α -tocoferol, apresentando, assim, conhecida propriedade antioxidante (JORGE et al., 2015; PEREIRA et al., 2003; SALGADO et al., 2008) e combate à oxidação lipídica (JORGE et al., 2015).

Embora o óleo de abacate apresente significativas propriedades, ainda são poucos os trabalhos publicados que exploram este óleo como componente de formulações de tamanho submicrométrico, como as nanoemulsões de Eid e colaboradores (2013), desenvolvidas para posterior incorporação em hidrogéis de carbopol, utilizando óleo de abacate e estearato de sacarose como tensoativo. As formulações apresentaram tamanho médio de gotículas de 105 a 128 nm, baixo índice de polidispersão e potencial zeta negativo (aproximadamente -30 mV). Após a preparação dos hidrogéis, utilizando carbopol e água, as características físico-químicas foram mantidas. Também foi possível observar que a concentração do óleo influenciou na elasticidade do gel.

Nanocápsulas contendo PCL ou um copolímero (PEG-PBA-PEG) como componentes poliméricos, e óleo de abacate como núcleo oleoso, foram desenvolvidas, variando as concentrações dos componentes até a obtenção de tamanhos ótimos de partículas, indicando que as diferentes porcentagens de óleo e polímeros empregados influenciaram no tamanho médio de partículas das formulações, obtendo valores entre 72 a 91 nm (ESMAEILI; GHOLAMI, 2015).

Mais recentemente, Eid e colaboradores (2015), avaliaram a influência do estearato de sacarose na estabilidade de nanoemulsões preparadas com óleo de abacate, pelas técnicas de inversão de fase e emulsificação espontânea. As formulações escolhidas apresentaram tamanho médio de gotículas de 106 nm, índice de polidispersão de 0,156 e potencial zeta de -30,4 mV. A influência da temperatura no tempo de armazenamento também foi avaliada, onde foi observado melhor estabilidade para as nanoemulsões armazenadas a 4°C, estabilidade moderada para as armazenadas a 25°C e maior instabilidade quando armazenadas a 40°C.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas e outros materiais

- Ácido tiobarbitúrico – Merck (Alemanha);
- Ácido tricloroacético - Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Acetato de etila - Dinâmica (Diadema, SP, Brasil);
- Acetona – Química Moderna (Barueri, SP, Brasil);
- Água destilada;
- Água ultrapura – Mega Purity Water Purification;
- Dimetilsufóxido (DMSO) – Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Dispositivo de ultrafiltração-centrifugação (Amicon[®] Ultra, 0,5 mL; Ultracel 10 K – membrana de celulose regenerada; 10,000 MWCO; Millipore);
- Etanol – (Neon, São Paulo, SP, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico – Êxodo Científica (Hortolândia, SP, Brasil);
- Funil de Büchner;
- Hidróxido de Sódio (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil);
- Lecitina de soja – Ativos Magisttrais (Barueri, SP, Brasil);
- L-ascorbato (+) sódio – Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Membranas hidrofílicas (nylon; 0,45 µm; Sartorius – EUA; diâmetro de 13 mm ou 47 mm);
- Membrana de celulose para sacos de diálise, 10 mm (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich, MO, USA);
- Metanol grau HPLC – Merck (Alemanha);
- Metanol UV/HPLC - (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil);
- Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) – Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Papel filtro qualitativo, gramatura: 80 g/m²; espessura: 205 µm – J Prolab (São José dos Pinhais, Brasil);

- Pentilenotetrazol – Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil);
- Poli(ϵ -caprolactona M_n 10.000) - Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) – Delaware (Porto Alegre, RS, Brasil);
- Tris - Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Triglicerídeos de cadeia média (TCM) – Alpha Química (Porto Alegre, RS, Brasil);
- Óleo de abacate – Flores e Ervas (Piracicaba, SP, Brasil);
- Sulfato de Ferro II heptahidratado – Neon (São Paulo, SP, Brasil);
- Vimpocetina (valor declarado 101,16%) – Pharmanostra (Anápolis, GO, Brasil).

4.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético – Tecnal TE-0851;
- Balança analítica – Shimadzu AUY220;
- Centrífuga MTD III-Plus – Servilab;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência – Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japão), equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A (arranjo de diodos – PDA) e sistema controlador com injeção automática;
- Espectrofotômetro UV-1800 – Shimadzu (Japão)
- Evaporador rotatório – Buchi Rotavapor R-3
- MasterSizer[®] 3000 E – Malvern Instruments
- Microcentrífuga – Sigma 1-14;
- Potenciômetro – pH 21 pH/mV meter – Hanna Instruments;
- Ultrassom – ALT Sonic Clean 3PA
- Ultra-Turrax – IKA[®] T25 (Alemanha)
- ZetaSizer[®] Nano series Nano-Zs – Malvern Instrument

4.1.3 Animais

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

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado descrito por Fessi e colaboradores (1989). A fase orgânica foi constituída de 0,125 g de PCL [M_n 10.000], 0,375 g de óleo (TCM ou abacate) e 0,1925 g de tensoativo (monoestearato de sorbitano – Span[®] 60). Para a solubilização do Span[®] 60, utilizou-se 5 mL de etanol e o restante da fase orgânica foi dissolvido em 63 ml de acetona, sendo a mistura mantida sob agitação constante a 40 °C. A vimpocetina (0,0125 g) foi incorporada à fase orgânica somente após a completa solubilização de todos os componentes. Após 10 minutos, a fase orgânica foi vertida, lentamente, na fase aquosa, composta por 0,1925 g de tensoativo [polissorbato 80 (Tween[®] 80)] e 133 mL de água destilada, com auxílio de um funil (Ponteira PD-TIPS/25 mL, Brand). A dispersão foi mantida por mais 10 minutos de agitação moderada à temperatura ambiente e, em seguida, levada ao evaporador rotatório para ajuste final do volume para 25 mL, obtendo-se, assim, suspensões de nanocápsulas de 0,5 mg/mL de vimpocetina (Tabela 1). Após a preparação, as suspensões foram filtradas empregando papel filtro quantitativo, para remoção de possíveis agregados maiores, com auxílio de um funil de Büchner e vácuo.

Nanocápsulas sem fármaco, contendo TCM (NC-TCM) ou óleo de abacate (NC-ABA) também foram preparadas nas mesmas condições, para fins comparativos.

Tabela 1 – Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas contendo vimopocetina, preparadas com triglicerídeos de cadeia media (NC-TCM-VP) ou com óleo de abacate (NC-ABA-VP)

Formulação	Polímero (%)* p/v	Óleo (%)* p/v	Span 60® (%)* p/v	Tween 80® (%)* p/v	Fármaco (%)* p/v	Água/ Solvente Orgânico (mL)	Volume final (mL)
NC-TCM-VP	0,5	1,5	0,77	0,77	0,05	133 mL/ 68 mL	25 mL
NC-ABA-VP	0,5	1,5	0,77	0,77	0,05	133 mL/ 68 mL	25 mL

*Percentuais considerando o volume final da formulação, após a evaporação do solvente orgânico e parte da água.

É importante ressaltar que outras formulações foram testadas nos estudos de pré-formulação, até que fosse definida a composição final (Tabela 1). Para isso, foram testadas diferentes concentrações dos constituintes, como, por exemplo, o dobro da quantidade de óleo e de polímero, e incluindo testes com o mesmo polímero, mas com diferentes pesos moleculares (PCL M_n 45.000 e 70.000-90.000), além de outras concentrações do fármaco.

4.2.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

Cada lote (triplicata de formulação) foi analisado logo após a preparação, através da avaliação dos seguintes parâmetros: diâmetro médio de partículas, polidispersidade [índice de polidispersão (PDI), span], potencial zeta, pH, teor de fármaco, eficiência de encapsulamento (EE%), viscosidade e análise morfológica.

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

Os diâmetros médios e índices de polidispersão (PdI) foram obtidos por espectroscopia de correlação de fótons (espalhamento de luz dinâmico), empregando equipamento Zetasizer[®] Nano Series (Malvern Instruments), após diluições das amostras em água ultrapura previamente filtrada (500 vezes; a 25°C). O potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética das partículas em suspensão (25°C), empregando também o Zetasizer[®], após diluições (500 vezes) das amostras em solução de NaCl (10 mM).

Para avaliação complementar, a análise granulométrica foi realizada por difração a laser, empregando o equipamento Mastersizer[®] 3000E (Malvern Instruments). As amostras foram diluídas em água destilada até atingirem obscuração padrão do equipamento e lidas utilizando o índice de refração do polímero PCL (1,59) (LOBATO et al., 2013).

4.2.2.2 Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões foram determinados logo após a preparação, empregando potenciômetro (modelo pH 21; HANNA), previamente calibrado com solução tampão pH 4,00 e 7,00, diretamente nas formulações.

4.2.2.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulamento da vimpocetina

A quantificação da vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas foi realizada com base no método desenvolvido por Elbary e colaboradores (2002), com algumas adaptações realizadas por nosso grupo de pesquisa (BOLSON, 2015; PINHEIRO, 2016), após a extração das amostras em metanol, utilizando cromatografia a líquido em fase reversa (CLAE-UV), empregando detecção a 274 nm, fase móvel metanol:água (85:15, v/v), contendo 0,1% de trietilamina e ácido acético glacial para ajuste do pH (7,0); coluna C₁₈ (Phenomenex –

Kinetex; C₁₈; 250 mm x 4,6 mm; 5 µm) e vazão de 1,0 mL/min (cromatógrafo Shimadzu LC-20AT, Kyoto, Japão, equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A – arranjo de diodos – PDA e sistema controlador CBM-20A; com injeção automática, volume de injeção de 20 µL). Uma curva analítica foi feita empregando metanol (concentrações de 2 a 10 µg/mL).

Para determinar o teor de fármaco (concentração total), o experimento constituiu em pipetar 120 µL da suspensão de nanocápsulas em um balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se metanol e deixou-se em ultrassom por 30 minutos, o balão foi então completado com metanol para ajuste do volume final, resultando na concentração teórica de 6,0 µg/mL. Após, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, durante 10 minutos, e o sobrenadante foi filtrado em membrana (0,45 µm) e injetado no cromatógrafo.

Quanto à eficiência de encapsulamento (EE; concentração de fármaco associado às nanoestruturas), as formulações foram submetidas à técnica de ultrafiltração-centrifugação, utilizando Amicon[®] Ultra 10,000 MW/Millipore, onde uma alíquota da suspensão de nanocápsulas (200 µL) foi adicionada ao dispositivo e centrifugada a 3.615 xg por 10 minutos (Microcentrífuga Sigma[®] 1-14). O fármaco livre, presente na fase aquosa, separado das nanoestruturas (ultrafiltrado), foi analisado por CLAE-UV. A EE foi calculada a partir da diferença entre as concentrações total e livre de vimpocetina, determinadas nas suspensões das nanoestruturas e no ultrafiltrado obtido, respectivamente, de acordo com a seguinte equação:

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

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

A validação foi realizada segundo os parâmetros preconizados pela International Conference on Harmonisation (ICH, 2005) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA, 2003): especificidade, linearidade, precisão e exatidão. As condições cromatográficas validadas estão descritas no item anterior (4.2.2.3).

Para a especificidade, foram feitas injeções de amostras das suspensões de nanocápsulas sem fármaco, comparando-as com os cromatogramas das suspensões com vimpocetina, a fim de avaliar se os excipientes empregados nas formulações interferem no pico de retenção do fármaco. A pureza do pico foi confirmada pelo detector de arranjo de diodos (PDA).

Para a linearidade, foram preparadas três soluções de referência contendo 0,5 mg/mL de vimpocetina em metanol, em três dias diferentes. A partir destas soluções, foram preparadas três curvas analíticas constituídas pelas concentrações de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 µg/mL, nos três dias diferentes, onde os dados foram avaliados através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (n=3).

Quanto à precisão do método, avaliou-se a repetibilidade (intra-dia; n=6) e a precisão intermediária (entre-dias). Assim, foram preparadas seis diluições em metanol a partir de uma mesma suspensão de nanocápsulas contendo vimpocetina, na concentração teórica de 6,0 µg/mL, sob as mesmas condições, no mesmo dia (intra-dia) e em dois dias consecutivos (entre-dias), por dois analistas diferentes. Os resultados foram expressos através do desvio padrão relativo (DPR%).

A exatidão do método foi avaliada através da recuperação de fármaco. Foram avaliados três níveis de concentração teóricos: baixo (4,8 µg/mL), médio (6 µg/mL) e alto (7,2 µg/mL). O teste de exatidão consistiu em adicionar, em balões volumétricos de 10 mL, 60 µL das suspensões de nanocápsulas com vimpocetina e os volumes de 36,0, 60,0, e 84,0 µL da solução padrão de vimpocetina de 500 µg/mL (nível baixo, médio e alto de concentração, respectivamente). Logo após, metanol foi adicionado, o balão levado ao ultrassom (30 minutos) e completado o seu volume (n=3).

4.2.2.4 Estudo da solubilidade da vimpocetina nos óleos

O fármaco, em excesso, foi adicionado a 1,5 mL dos diferentes óleos (TCM e abacate), as amostras foram mantidas sob agitação moderada, a 25°C, pelo período de 24 horas e, posteriormente, centrifugadas a 3.000 rpm, durante 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas, diluídas em metanol, filtradas e injetadas no cromatógrafo. As condições cromatográficas do ensaio também estão descritas no item 4.2.2.3.

4.2.2.5 Avaliação da viscosidade das suspensões de nanocápsulas

Para o estudo de viscosidade das formulações foi utilizado viscosímetro de vidro Cannon-Fenske (nº 25 reto; Vidrolabor) para líquidos opacos, o qual é um capilar simples, em U, que também pode ser chamado de viscosímetro tipo capilar de Ostwald modificado.

Para a avaliação da viscosidade das formulações, foi determinada, primeiramente, a densidade relativa à água, a 20°C, das suspensões contendo vimpocetina, utilizando picnômetro com capacidade de 5 mL, pesando aproximadamente 7,9 g. O picnômetro vazio foi pesado em balança analítica, em seguida, pesado novamente, contendo a amostra ou água. O peso da massa da amostra foi obtido através da diferença entre o picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa (mg/mL; d_{20}^{20}) foi obtida através da razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água (ANVISA, 2010), pela seguinte equação:

$$d_{20}^{20} = \frac{\text{massa amostra}}{\text{massa água}} \quad (\text{Equação 2})$$

A análise da viscosidade relativa foi realizada a 20°C, com prévia ambientação do aparato, utilizando 12 mL de amostra, que foi adicionada cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro na extremidade A (Figura 7). Para obter equilíbrio de temperatura no sistema, a amostra ficou em contato com o viscosímetro capilar por aproximadamente 10 minutos. O tempo que a amostra percorreu entre os meniscos que delimitam o bulbo B e C foi medido. O experimento foi conduzido em triplicata.

Figura 7 – Viscosímetro Cannon-Fenske



A viscosidade relativa foi obtida através da equação:

$$n_1 = \frac{n_2}{t_2 \cdot d_2} \cdot t_1 \cdot d_1 \quad (\text{Equação 3})$$

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

Os testes de densidade e viscosidade foram realizados como preconizado pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (ANVISA, 2010), para viscosímetros do tipo capilar de Ostwald modificado.

4.2.2.6 Análise da morfologia das suspensões de nanocápsulas

A morfologia das amostras foi avaliada por microscopia de força atômica (MFA), empregando equipamento Agilent Technologies 5500, em colaboração com o professor Dr. André Gündel, da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, Bagé, RS). As imagens foram obtidas à temperatura ambiente, no modo não-contato, empregando sondas de alta resolução SSS-NCL (Nanosensors; força constante = 48 N/m, frequência da ressonância = 154 kHz). As imagens foram capturadas e analisadas utilizando software PicoView 1.14.4 (Molecular Imaging Corporation) e Picolmage 5.1. Para a preparação das amostras, as suspensões foram diluídas em água ultra-pura (1:50) e gotejadas sobre a superfície de um substrato (mica recém clivada).

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

Os perfis de liberação da vimpocetina, a partir das suspensões de nanopartículas, foram obtidos através da técnica de difusão em sacos de diálise (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich). A técnica é bastante usual para a avaliação do perfil de liberação de fármacos associados a nanoestruturas (ALMEIDA et al., 2010; CORADINI et al., 2014; FERREIRA et al., 2016; LUO et al., 2006). O ensaio foi realizado respeitando a condição *sink*, utilizando como meio de liberação tampão fosfato pH 7,4: etanol (70:30). Para a comparação, avaliou-se o fármaco livre, empregando uma solução metanólica de vimpocetina (0,5 mg/mL). Testes de solubilidade do fármaco em diferentes meios foram realizados para a escolha do meio de liberação mais adequado.

A técnica consistiu em preencher os sacos de diálise (8 cm cada) com 1,0 mL das suspensões de nanocápsulas (aproximadamente 500 µg de vimpocetina), os sacos foram presos com presilhas e, logo após, cada saco foi colocado em contato com 200 mL de meio de liberação em béquers de 250 mL, mantidos sob agitação moderada e constante em uma cuba à temperatura de 37°C. Em tempos pré-determinados, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas do meio de liberação, repondo-se o mesmo volume com meio fresco, à mesma temperatura. As coletas do experimento foram realizadas até completar 72 horas para as suspensões de

nanocápsulas e 14 horas para a solução metanólica. A porcentagem de fármaco liberada no meio foi analisada diretamente nas alíquotas coletadas, por CLAE-UV, utilizando metodologia já descrita no item 4.2.2.3, entretanto com volume de injeção de 50 µL. Uma solução mãe do fármaco em metanol foi preparada e, a partir desta, realizada uma curva analítica nas concentrações de 0,125 a 3 µg/mL, empregando o mesmo meio de liberação do experimento. O experimento foi realizado em triplicata de lote (n=3).

Os perfis de liberação *in vitro* da vimpocetina obtidos foram analisados através de modelagem matemática (Scientist 2.0 software - MicroMath[®], USA), empregando a abordagem modelo-dependente [ordem zero ou primeira ordem (monoexponencial ou biexponencial)] e Lei da Potência/Korsmeyer-Peppas – equação 7). O modelo (monoexponencial – equação 6) foi escolhido, observando os seguintes parâmetros: coeficiente de correlação (r), critério de seleção do modelo (MSC), melhor ajuste gráfico e avaliação dos critérios estatísticos de estimativa dos parâmetros. A equação 8 descreve a fórmula empregada para o cálculo da meia-vida de liberação.

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (\text{monoexponencial}) \quad (\text{Equação 6})$$

$$f_t = a \cdot t^n \quad (\text{modelo de Korsmeyer-Peppas}) \quad (\text{Equação 7})$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (\text{Equação 8})$$

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

4.2.4 Estudo de estabilidade das formulações contendo vimpocetina

Para avaliar a estabilidade, as suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina foram armazenadas por 60 dias, à temperatura ambiente e protegidas da luz, em frascos de vidro âmbar.

No período de 0, 30, e 60 dias, amostras das formulações foram coletadas e submetidas às análises de diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, pH e teor de fármaco, conforme descrito anteriormente. O estudo foi realizado em triplicata de lote (n=3).

4.2.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* contra a lipoperoxidação

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; Bird e Draper, 1984). Para o experimento, o protocolo utilizado foi adaptado da literatura (POHLMANN et al., 2010; SCHAFFAZICK et al., 2005).

4.2.5.1 Preparação dos lipossomas

Primeiramente, lipossomas foram preparados pelo método de hidratação de um filme lipídico (SHARMA; SHARMA, 1997) e utilizados como substrato para a lipoperoxidação. Lecitina de soja (1,25 g) foi solubilizada em 100 mL de acetato de etila e aquecida a 40°C, obtendo-se uma dispersão homogênea. A dispersão foi evaporada a 35°C, até a obtenção de um filme fino no balão, o qual foi ressuspensão em 100 mL de água (12,5 mg/mL). A suspensão foi agitada em Ultra-Turrax (IKA® T25) a 16.000 rpm, por 10 minutos. O tamanho médio das vesículas foi avaliado por difração a laser (Mastersizer 3000E, Malvern Instruments).

4.2.5.2 Ensaio da lipoperoxidação

Para avaliar a atividade antioxidante, um meio de reação, composto de substrato (lipossomas; 107 μL), suspensão de nanocápsulas contendo vimpocetina (NC-TCM-VP) [ou vimpocetina livre (VP) em DMSO], ascorbato (500 μM) e solução aquosa de FeSO_4 (250 μM) em tampão Tris-HCl pH 7,4 (0,1 M), foi incubado a 37°C, durante 60 minutos. Os controles do experimento foram compostos pelo meio de reação sem adição de formulação (controle positivo), meio de reação sem o par oxidante (controle negativo) e suspensões de nanocápsulas sem fármaco (NC-TCM). Foram testadas diferentes concentrações de fármaco (0,4 mM e 0,6 mM) no meio de reação. Após o período de incubação a 37°C, ácido tricloroacético a 12% e ácido tiobarbitúrico a 0,73% foram adicionados no meio de reação e mantidos a 100°C durante 30 minutos. A mistura foi resfriada e centrifugada e o sobrenadante avaliado a 535 nm, empregando espectrofotômetro previamente zerado com água/tampão Tris. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Uma curva analítica de malondialdeído (MDA) (0,75 - 6,00 nmol/mL) foi empregada para calcular a concentração de MDA (nmol/mL) nas amostras analisadas ($y = 0,2394x + 0,0036$; $r > 0,99$).

A proteção contra a peroxidação lipídica foi expressa como atividade antioxidante (AA%) e calculada a partir da equação 9 (KÜLKAMP et al., 2011).

$$AA = 1 - \left(\frac{C_{amostra}}{C_{controle}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

Onde, $C_{amostra}$ é a concentração de MDA, em nmol/mL, presente na amostra estudada (formulações), $C_{controle}$ é a concentração de MDA, em nmol/mL, na ausência de antioxidante (controle positivo).

4.2.6 Avaliação da atividade anticonvulsivante da vimpocetina associada às nanocápsulas

Para os experimentos *in vivo*, os animais foram mantidos em condições ambientais controladas (12:12 h de ciclo claro/escuro, $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 55% de umidade relativa), com livre acesso à comida (Supra[®]) e à água. Todos os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo (entre 9 e 16 h) e os protocolos foram realizados objetivando o uso de um número mínimo de animais, assim como minimização do sofrimento, os quais foram conduzidos de acordo com normas nacionais (CONCEA) e internacionais, com aprovação do Comitê de Ética para pesquisa com animais da Universidade Federal de Santa Maria (número 9040100815), em colaboração com o professor Dr. Carlos Fernando de Mello (Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM), no Laboratório de Neuropsicofarmacologia – LabNeuro.

A atividade anticonvulsivante da vimpocetina associada às nanocápsulas foi avaliada em comparação a uma solução do fármaco livre, bem como aos respectivos controles (sem fármaco), empregando um modelo de convulsão induzida em camundongos adultos Swiss machos (25-35 g), por pentilenotetrazol (PTZ).

Os animais foram divididos em 4 grupos ($n = 6-9$ animais por grupo) para receberem o tratamento via i.p. (10 mg/Kg de vimpocetina livre ou encapsulada, além dos controles). O grupo 1 recebeu veículo (10% de Tween[®] 80 em água destilada), grupo 2 nanocápsulas sem vimpocetina (NC-TCM), grupo 3 nanocápsulas com vimpocetina (NC-TCM-VP) e o grupo 4 vimpocetina solubilizada no veículo (VP). Após 4 horas, as crises convulsivas foram induzidas por PTZ (50 mg/Kg, i.p.).

O mesmo experimento foi realizado com algumas modificações, em que a dose do tratamento foi de 5 mg/Kg de vimpocetina livre ou encapsulada e seus respectivos controles, já descritos acima ($n = 4-7$ animais por grupo). A indução com PTZ, das crises convulsivas, foi realizada após 30 minutos do início do tratamento.

Posteriormente à injeção de PTZ, nos dois protocolos, os animais foram observados por 20 minutos e monitorados por vídeo. O comportamento foi avaliado considerando diferentes parâmetros: latência para o primeiro episódio mioclônico; latência para a primeira crise generalizada tônico-clônica, número de episódios convulsivos, tempo de duração das crises convulsivas e escala de Racine [(1) parada súbita; (2) espasmos leves no fucinho e/ou

olho; (3) espasmos no pescoço; (4) convulsões clônicas em posição sentada; (5) convulsões incluindo convulsão clônica e/ou tônico-clônica, enquanto se deita; (6) convulsões incluindo convulsão clônica e/ou tônico-clônica, enquanto se deita de lado, ou dá saltos bruscos] (LUTTJOHANN; FABENE; VAN LUIJTELAAR, 2009). Após os experimentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste *t* ou Tukey, considerando $p < 0,05$ como significativo, utilizando software GraphPad Prism[®]. Para os experimentos *in vivo*, foi utilizado software SPSS[®], onde, as análises da atividade anticonvulsivante foram realizadas utilizando teste de duas vias não-paramétrico, seguido de teste Mann-Whitney, com significância para $p < 0,025$. Teste do qui-quadrado foi realizado para o estudo da interação entre fármaco e nanoencapsulamento, considerando valores acima de 3,84 significativos (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS CONTENDO VIMPOCETINA

5.1.1 Desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados poliméricos

As formulações foram desenvolvidas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, descrito por Fessi e colaboradores, 1989. Primeiramente, foram preparadas formulações com base em estudos anteriores, desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa por Bolson (2015), as quais foram preparadas empregando o polímero não-biodegradável etilcelulose, objetivando a liberação oral da vimpocetina.

No presente estudo, inicialmente, foram preparadas suspensões de nanocápsulas, utilizando poli(ϵ -caprolactona; PCL) em substituição à etilcelulose, por ser um polímero biodegradável, visando à liberação cerebral da vimpocetina. A partir disso, foram preparadas nanocápsulas de PCL (M_n 70-90.000) (1,0 %, p/v), empregando diferentes óleos (TCM ou óleos vegetais, como de coco, semente de uva e gérmen de trigo; 3,0 %, p/v), Span[®] 60 (0,77 %, p/v), vimpocetina (0,1 %, p/v) e acetona (27 mL), na fase orgânica, e Tween[®] 80 (0,77 %, p/v) e água (53 mL), na fase aquosa. Logo depois da preparação destas formulações, foi notada a presença de muitos precipitados. A fim de resolver estes problemas, testou-se PCL de diferentes pesos moleculares (M_n 45.000 e 10.000), em que foi possível observar diminuição visível dos precipitados utilizando o polímero de menor peso molecular, o qual foi selecionado. Com objetivo de otimizar a formulação, foi proposto reduzir pela metade as concentrações normalmente utilizadas de polímero, de fármaco e dos diferentes óleos já mencionados. Entretanto, quanto à utilização do óleo, somente com TCM e o óleo de abacate foi possível a obtenção de formulações viáveis (livres de precipitados), gerando, então, as suspensões de nanocápsulas de PCL efetivamente empregadas neste trabalho: PCL de M_n 10.000 (0,5 %, p/v), óleo sintético TCM ou óleo de abacate (1,5 %, p/v), Span[®] 60 (0,77, % p/v), vimpocetina (0,05 %, p/v) e Tween[®] 80 (0,77 % p/v), gerando formulações que, pela análise macroscópica, demonstraram-se sistemas homogêneos e livres de precipitados.

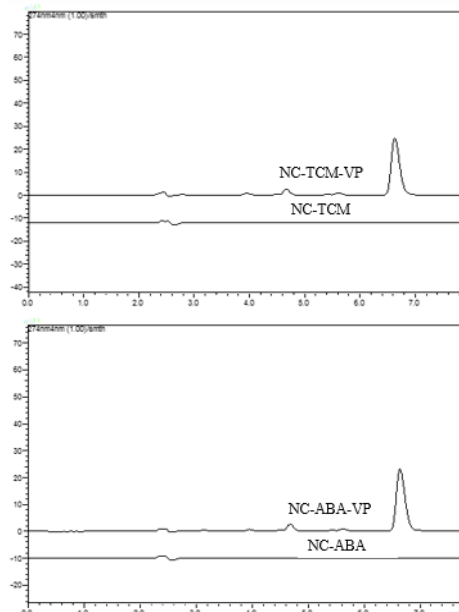
5.1.2 Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas

A vimpocetina foi quantificada empregando um método desenvolvido por Elbary e colaboradores (2002), adaptado por nosso grupo (BOLSON, 2015; PINHEIRO, 2016). Este método foi reproduzido com algumas modificações e validado para a quantificação da vimpocetina presente nas suspensões de nanocápsulas de PCL estudadas, segundo os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão e exatidão (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Ao analisar os cromatogramas sobrepostos (Figura 8), referentes às suspensões contendo ou não vimpocetina, observou-se que não houve interferência dos constituintes da formulação no pico do fármaco. Além disto, evidenciou-se a pureza do pico correspondente à vimpocetina, através de um detector tipo PDA, onde o índice de pureza foi de 1,0000, indicando, assim, que o método adotado é específico para a determinação da substância ativa nas formulações desenvolvidas.

Figura 8 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV.

NC-TCM-VP: suspensões de nanocápsulas de TCM com fármaco (6,0 µg/mL); NC-TCM: suspensões de nanocápsulas de TCM sem fármaco; NC-ABA-VP: suspensões de nanocápsulas de óleo de abacate com fármaco (6,0 µg/mL); NC-ABA: suspensões de nanocápsulas de óleo de abacate sem fármaco



Uma relação linear entre a área do pico e a concentração de vimpocetina foi obtida para a faixa de concentração de 2 µg/mL a 10 µg/mL, já que as curvas analíticas (n=3) descritas pela equação $y = 45.988 x - 5.645$ apresentaram coeficiente de correlação (r) de 0,9961 e regressão linear significativa (ANOVA, $p < 0,05$).

As análises da repetibilidade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (precisão inter-dias) estão descritas na Tabela 2, observando que os ensaios apresentaram DPR aceitáveis (ANVISA, 2003), demonstrando que o método é preciso. Vale ressaltar que para as análises de precisão e exatidão foi escolhida a formulação contendo TCM.

Tabela 2 – Análise de precisão das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

Amostra	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Teor (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	6,00	5,84 ± 0,14	97,39 ± 2,30	2,36
Dia 2 (n=6)	6,00	5,61 ± 0,14	93,57 ± 2,34	2,50
Inter-dias (n=12)	6,00	5,73 ± 0,18	95,48 ± 2,98	3,12

Quanto à análise de exatidão, as amostras foram analisadas em três níveis diferentes de concentração do fármaco (baixo, médio e alto), onde os valores de recuperação estão descritos na Tabela 3, indicando que o método apresentado é exato na faixa de concentração estudada (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Tabela 3 – Análise de exatidão das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

Nível de concentração	Amostra conhecida (µg/mL)	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	Recuperação (%)
Baixo	3,00	1,80	4,78 ± 0,09	102,45 ± 1,97
Médio	3,00	3,00	5,94 ± 0,12	101,33 ± 2,04
Alto	3,00	4,20	6,87 ± 0,18	97,41 ± 2,49

Os resultados demonstraram que foi possível quantificar a vimpocetina presente nas suspensões coloidais preparadas com PCL, levando em questão todos os parâmetros avaliados, confirmando que o método empregado mostrou-se adequado.

5.1.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) são comumente utilizados em trabalhos envolvendo o desenvolvimento de sistemas nanotecnológicos, a exemplo da composição do núcleo de nanocápsulas poliméricas (CHARÃO et al., 2015; LORENZONI, 2015; OURIQUE et al., 2011; SANTOS et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016; SAVIAN et al., 2015). Nosso grupo de pesquisa também vem trabalhando com o mesmo óleo na produção de nanocápsulas com vimpocetina, empregando etilcelulose como polímero, para liberação oral do fármaco, com características físico-químicas adequadas (BOLSON, 2015; PINHEIRO, 2016).

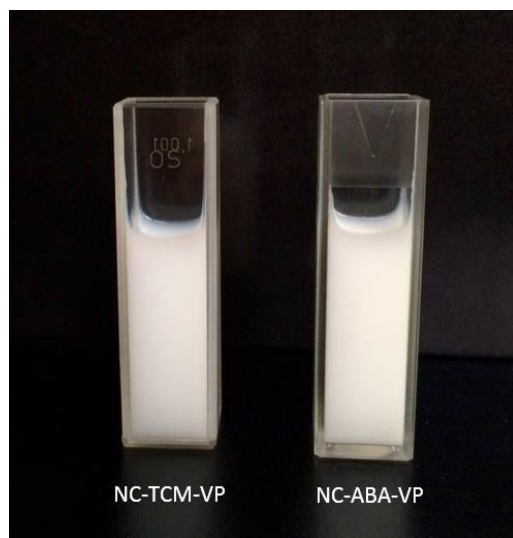
Já o óleo de abacate apresenta excelente qualidade nutricional e ação antioxidante por apresentar tocoferóis (JORGE et al., 2015; SALGADO et al., 2008), entretanto, existem poucos trabalhos envolvendo o mesmo na preparação de sistemas nanotecnológicos (EID et al., 2013; EID et al., 2015; ESMAEILI; GHOLMI, 2015).

Um estudo preliminar de solubilidade do fármaco nos óleos, empregados para compor o núcleo das nanocápsulas, foi realizado. A partir das análises por CLAE, verificou-se que a solubilidade da vimpocetina foi de 8,97 mg/mL e 8,94 mg/mL, em TCM e em óleo de abacate, respectivamente, indicando semelhança neste parâmetro. Ferreira e colaboradores (2016) avaliaram a solubilidade do cetoprofeno no óleo de semente de romã, para o desenvolvimento de nanoemulsões. Neste estudo, o fármaco apresentou solubilidade de 3,08 mg/mL, inferior aos valores obtidos no presente trabalho, mas também resultou em alta eficiência de encapsulamento para o fármaco em estudo (>90 % para o cetoprofeno).

Após a validação do método analítico, três lotes de cada suspensão, contendo os diferentes óleos, foram preparados e caracterizados quanto ao aspecto macroscópico e às características físico-químicas.

Quanto o aspecto macroscópico (figura 9), ambas as formulações apresentaram aspecto homogêneo, com coloração branca leitosa, opalescente azulada, caracterizando o efeito *Tyndall* (GUTERRES et al., 2007).

Figura 9 - Aspecto macroscópico das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimpocetina, empregando os diferentes óleos (NC-TCM-VP e NC-ABA-VP, respectivamente)



Os resultados obtidos na caracterização das formulações (n=3) estão descritos na Tabela 4, cuja composição quali-quantitativa está descrita na Tabela 1. Os gráficos referentes à distribuição de tamanho de partículas e potencial zeta (n=3) podem ser visualizados nas figuras 10 e 11.

Tabela 4 - Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas de PCL, com TCM ou óleo de abacate, contendo vimpocetina (0,5 mg/mL), após a preparação (n=3)

Suspensão	Diâmetro médio (nm)	PdI*	Potencial Zeta (mV)	pH	Teor total (%)	EE** (%)
NC TCM-VP	200 ± 09	0,12 ± 0,02	-11,92 ± 1,68	6,75 ± 0,05	94,89 ± 3,37	97,67
NC ABA-VP	211 ± 04	0,13 ± 0,01	-11,42 ± 3,42	6,83 ± 0,10	92,51 ± 1,48	97,53

*PdI: Índice de polidispersão; **Eficiência de encapsulamento

Figura 10 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimopcetina (n=3), obtidos através de espalhamento de luz dinâmico

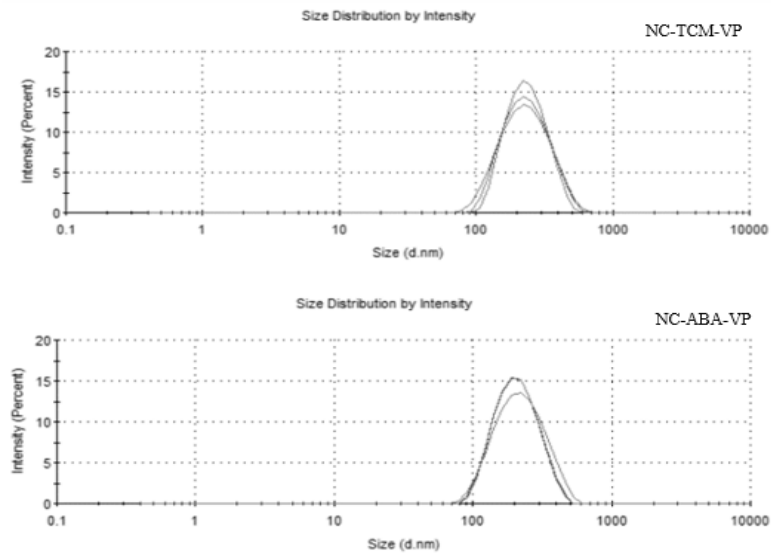
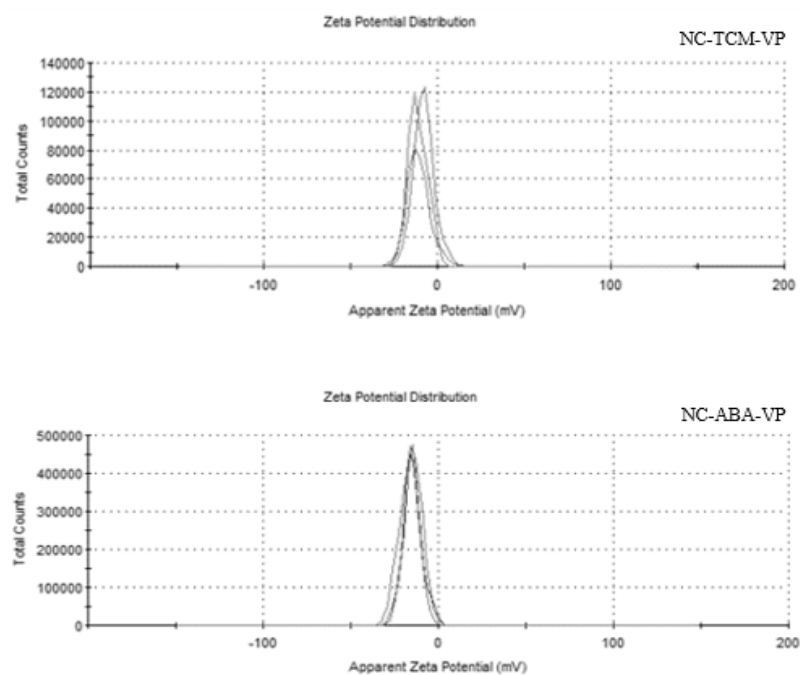


Figura 11 – Gráficos do potencial zeta das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimopcetina (n=3)



Como pode ser observado na Tabela 4, os diâmetros médios das nanocápsulas foram próximos a 200 nm, estando de acordo com os tamanhos de nanocápsulas obtidos em outros estudos, através do mesmo método de preparação (BENVEGNÚ et al., 2012; CORADINI et al., 2014; FLORES et al., 2011; FROZZA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016; SAVIAN et al., 2015). Diante destes valores, o tipo de óleo não interferiu no tamanho das partículas originadas ($p > 0,05$). Outros estudos, com nanoestruturas contendo diferentes fármacos/óleos, também evidenciaram que o óleo não influenciou neste parâmetro (CORADINI et al., 2014; RIGO et al., 2015). Quanto à análise de PdI, em ambas as formulações, os valores ficaram abaixo de 0,2, indicando homogeneidade adequada dos sistemas, resultando em valores satisfatórios. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações neste parâmetro. Diâmetros de partículas de até 200 nm e PdI baixos são adequados para administração de nanopartículas via parenteral, como intravenosa (ZHANG; MUROWCHICK; YOUAN, 2011).

Para uma melhor avaliação do tamanho dos sistemas, o perfil granulométrico foi observado por difração a laser, utilizando o equipamento Masterziser[®] 3000E (tabela 5, figura 12). Esta técnica é uma ferramenta útil e importante para a verificação de sistemas unimodais, pois apresenta ampla faixa de medição (0,1 μm a 1000 μm), podendo detectar partículas maiores em sistemas coloidais (KECK; MÜLLER, 2008), complementando a análise por espalhamento de luz dinâmica.

Tabela 5 – Diâmetros das suspensões de nanocápsulas de PCL, obtidos por difração a laser (n=3).

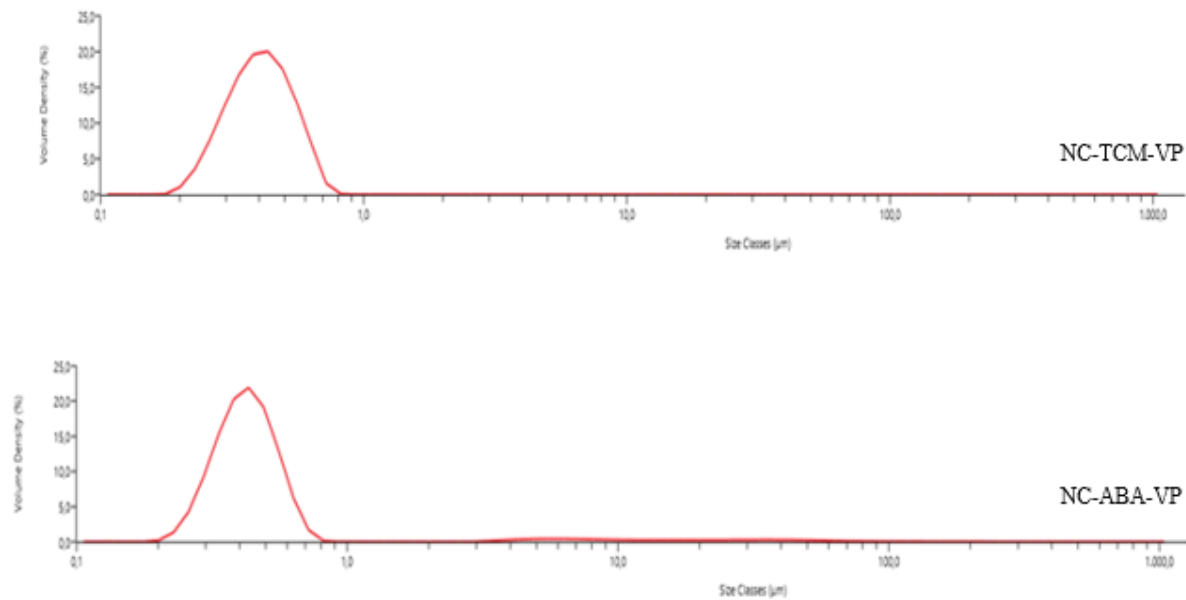
Formulação	d(0,1) (nm)	d(0,5) (nm)	d(0,9) (nm)	Span*
NC TCM-VP	280 \pm 3	402 \pm 6	554 \pm 46	0,755 \pm 0,028
NC ABA-VP	288 \pm 13	418 \pm 2	1217 \pm 1006	2,217 \pm 2,424

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

Conforme a tabela 5, 90% das partículas que compõe as suspensões de nanocápsulas, preparadas com TCM, apresentaram diâmetros menores do que 554 nm, possuindo valor de span abaixo de 2,0, demonstrando distribuição de tamanho estreita, confirmando a homogeneidade dos sistemas (BENDER et al., 2012), corroborando com os baixos valores de PDI (0,12). Já as formulações preparadas com óleo de abacate tenderam a uma menor homogeneidade de distribuição de tamanho, com grande variação no valor do span entre a triplicata.

Lobato e colaboradores (2013), desenvolveram nanocápsulas contendo o antioxidante bixina, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, contendo PCL e TCM. Esses sistemas apresentaram 90% das partículas com diâmetros inferiores a 124 nm (D_{90}) e span de 1,4. Estreita distribuição de tamanho para suspensões de nanocápsulas de PCL, contendo melatonina, também foi confirmada através dos baixos valores de PDI (0,09) e de span (1,75), obtidos por espalhamento de luz dinâmica e por difração a laser, respectivamente (CHARÃO et al., 2015).

Figura 12 – Distribuição de tamanho de partículas obtida a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimopocetina, através de difração a laser (n=1)



As suspensões com PCL/TCM desenvolvidas neste estudo têm sido consideradas um tipo particular de nanocápsulas, constituídas, na fase interna, de uma dispersão de monoestearato de sorbitano (Span[®]60) e TCM no núcleo, envoltas por PCL e estabilizadas por polissorbatato 80, constituinte da fase externa. Estes sistemas, por apresentarem uma substância lipídica sólida no núcleo (Span[®]60), apresentam núcleo de maior viscosidade que as demais nanocápsulas, sendo assim, denominadas de núcleo lipídico pelos autores (CHARÃO et al., 2015; JORNADA et al., 2012; VENTURINI et al., 2011).

Vale salientar que, no método de nanoprecipitação, a natureza e a concentração do polímero, a polaridade do solvente, relação entre as fases, bem como a natureza e concentração dos tensoativos, são elementos primordiais, que acabam determinando o tamanho das partículas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Neste método, as nanocápsulas são formadas, mediante agitação moderada, quando o solvente difunde para a fase aquosa, e o polímero precipita ao redor das gotículas de óleo (LETCHFORD; BURT, 2007). O diâmetro de partículas submicrométrico é de extrema importância, pois fornece grande área superficial, sendo essa, uma característica que possui relação direta com as

respostas biológicas no organismo, pela capacidade que os sistemas nanométricos possuem de atravessarem as barreiras biológicas (JORNADA et al., 2012; FRANK et al., 2015).

A carga de superfície das partículas, refletida pelo potencial zeta, influencia a interação dos nanossistemas com o meio aquoso (CHO et al., 2013). Este parâmetro pode ser avaliado por técnicas de eletroforese (SCHAFFAZICK et al., 2003). Pode-se observar que o potencial zeta (tabela 4), independentemente do tipo de óleo empregado, apresentou valores negativos, muito próximos, sem diferença significativa entre as formulações ($p < 0,05$). O potencial zeta alto em módulo é indicativo de estabilidade, entretanto, neste trabalho, os valores apresentaram-se próximos a -11 mV. Porém, outros fatores podem explicar a estabilidade destes sistemas, como a estabilização estérica, consequência da utilização de um tensoativo não-iônico (polissorbato 80) na interface partículas/água (CORADINI et al., 2014; RIGO et al., 2015). Os mesmos tipos de sistemas (nanocápsulas de PCL e TCM), preparados por Schultze e colaboradores (2014), também apresentaram resultados negativos (-12,7 e -11,0 mV), muito próximos aos valores obtidos neste trabalho, devido à natureza química do polímero/tensoativo dispostos na interface.

A medição do pH é um parâmetro importante, pois alterações nos valores de pH podem indicar alterações nos componentes presentes nas formulações coloidais, ou até mesmo difusão do fármaco das nanopartículas para o meio aquoso (GUTERRES et al., 1995). Os valores de pH das formulações deste estudo apresentaram-se entre 6,75 e 6,83, sem diferença significativa entre as mesmas ($p > 0,05$). Esses valores, ligeiramente ácidos, podem ser explicados pela presença dos grupos carboxílicos terminais das cadeias poliméricas presentes no polímero estudado (RIGO et al., 2015).

O teor de vimpocetina também não diferiu significativamente entre as formulações estudadas ($p > 0,05$), apresentando valores de, aproximadamente, 93 a 95%, considerando a concentração teórica de 0,5 mg/mL (Tabela 4).

A EE obtida para as diferentes nanocápsulas foi próxima a 100%, isso se deve à natureza lipofílica da vimpocetina, que por apresentar baixa solubilidade em água, apresenta maior afinidade pelas nanocápsulas do que pela fase externa da formulação constituída de água. A EE da vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas foi próxima para ambas as formulações, provavelmente, devido à solubilidade semelhante do fármaco nos dois tipos de óleos testados. Altas EE da vimpocetina associada a diferentes nanopartículas foram relatadas em outros estudos, como as NLS de Luo e colaboradores (2006), com EE, de aproximadamente, 98%; os prolipossomas de Xu e colaboradores (2009), com EE de 86,3%;

os CLN de Zhuang e colaboradores (2010), com EE de 94,9% e as nanocápsulas de etilcelulose desenvolvidas anteriormente pelo nosso grupo, com EE próxima a 100% (BOLSON, 2015; PINHEIRO, 2016).

A viscosidade das formulações desenvolvidas neste estudo foi determinada através de viscosímetro capilar, sendo necessária a determinação prévia da densidade das suspensões, utilizando picnômetro. A unidade dinâmica (Sistema CGS) de viscosidade é o *poise* (P; frequentemente cP, *centipoise*). Já no sistema internacional, a unidade que corresponde ao cP é o mili.Pascal.segundo (mPa.s). A viscosidade da água (1,004 cP a 20° C) é empregada como referência para a determinação de líquidos de baixa viscosidade, adotando-se os valores de sua viscosidade conforme a temperatura do experimento (ANVISA, 2010; LACHMAN, 2001, p.213).

De acordo com os resultados, valores significativamente diferentes de viscosidade ($p < 0,05$) foram obtidos para as suspensões de nanocápsulas conforme o óleo empregado, de maneira que as formulações com TCM ($1,40 \pm 0,01$ cP) apresentaram menor viscosidade em relação àquelas preparadas com o óleo vegetal e ($1,60 \pm 0,02$ cP). Em hipótese, diferentes números de partículas ou a mais ampla distribuição de tamanho observada (Mastersizer[®]) para as formulações com óleo de abacate poderiam influenciar a reologia dos sistemas, apesar de não ter sido detectada influência significativa nos diâmetros médios de partículas medidos por espalhamento de luz dinâmica. Por definição, a viscosidade expressa a resistência de líquidos ao deslocamento de parte de suas moléculas sobre outras vizinhas. Neste sentido, a viscosidade representa a resistência ao escoamento, sendo que esta provém do atrito interno (forças de coesão entre moléculas relativamente juntas) (ANVISA, 2010).

Eltayebe e colaboradores (2016) empregaram viscosímetro de rotina Cannon-Fenske (75 mL) para correlacionar a viscosidade de soluções (ácido esteárico/etilvanilina; 0,82 a 1,18 mPa.s) com o tamanho de nanopartículas lipídicas (52 a 65 nm), para aplicação na área alimentícia. Yang e colaboradores (2015), empregando viscosímetro Cannon-Fenske (n° 25; 0,5-2,0 cP), verificaram que, com o aumento da concentração de dodecilsulfato de sódio, houve um aumento na viscosidade da solução/dispersão, em estudos voltados à estabilidade de dispersões aquosas de nanopartículas de dióxido de titânio, em oposição à aglomeração e sedimentação.

Outras técnicas têm sido empregadas para avaliar a viscosidade de formulações nanotecnológicas, como viscosímetro rotacional, usado, por exemplo, para avaliar a viscosidade das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo bixina ($11,4 \pm 0,24$

mPa.s). O comportamento destas formulações coloidais (PCL/TCM/Span[®]60/polissorbato 80), contendo o carotenoide, foi típico de fluidos Newtonianos (LOBATO, et al, 2013). Suspensões de nanocápsulas de PCL (núcleo lipídico), contendo licopeno, apresentaram viscosidade de $1,09 \pm 0,03$ mPa.s, determinada em viscosímetro rotacional, esperando-se comportamento Newtoniano, devido à baixa viscosidade, similar à da água, bem como o sistema ser constituído de pequenas partículas e apresentar-se homogêneo (dos Santos et al., 2015). Rigo e colaboradores (2014) também verificaram comportamento Newtoniano para suspensões de nanocápsulas de PCL preparadas com diferentes óleos, empregando viscosímetro rotacional, sendo que as formadas com óleo de soja ($1,36 \pm 0,01$ mPa.s) apresentaram menor viscosidade em relação àquelas contendo óleo de farelo de arroz ($1,58 \pm 0,02$ mPa.s) ou de girassol ($1,56 \pm 0,06$ mPa.s).

Viscosímetro vibracional também tem sido utilizado para avaliar a viscosidade de formulações nanométricas. Assim, Teoesferas de manteiga de cacau/TCM (140 nm), preparadas por homogeneização à alta pressão, e suspensões de nanocápsulas de PCL/TCM (inferiores a 200 nm), preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado, desenvolvidas para encapsular α -bisabolol, não apresentaram diferenças significativas nos valores de viscosidade, mesmo sendo sistemas preparados por métodos e materiais diferentes (1,03-1,16 mPa.s), estando muito próximas à viscosidade da água (TERROSO et al., 2016).

O viscosímetro de rotina Cannon-Fenske (n° 25) é um aparato apropriado para fluidos que apresentem uma faixa de viscosidade entre 0,5 e 2,0 cP, com comportamento newtoniano presumido. Para esta técnica, é necessário pouco volume de amostra (12 mL), além de ser bastante simples e de baixo custo (YANG et al., 2015).

A viscosidade é importante para o desenvolvimento de nanoestruturas, pois, a partir dela, é possível obter comparação entre diferentes formulações, além de ser outro parâmetro de controle de qualidade/avaliação de reprodutibilidade entre lotes (YANG et al., 2015), principalmente quando se trata de formulações destinadas à administração parenteral (RIGO et al., 2015).

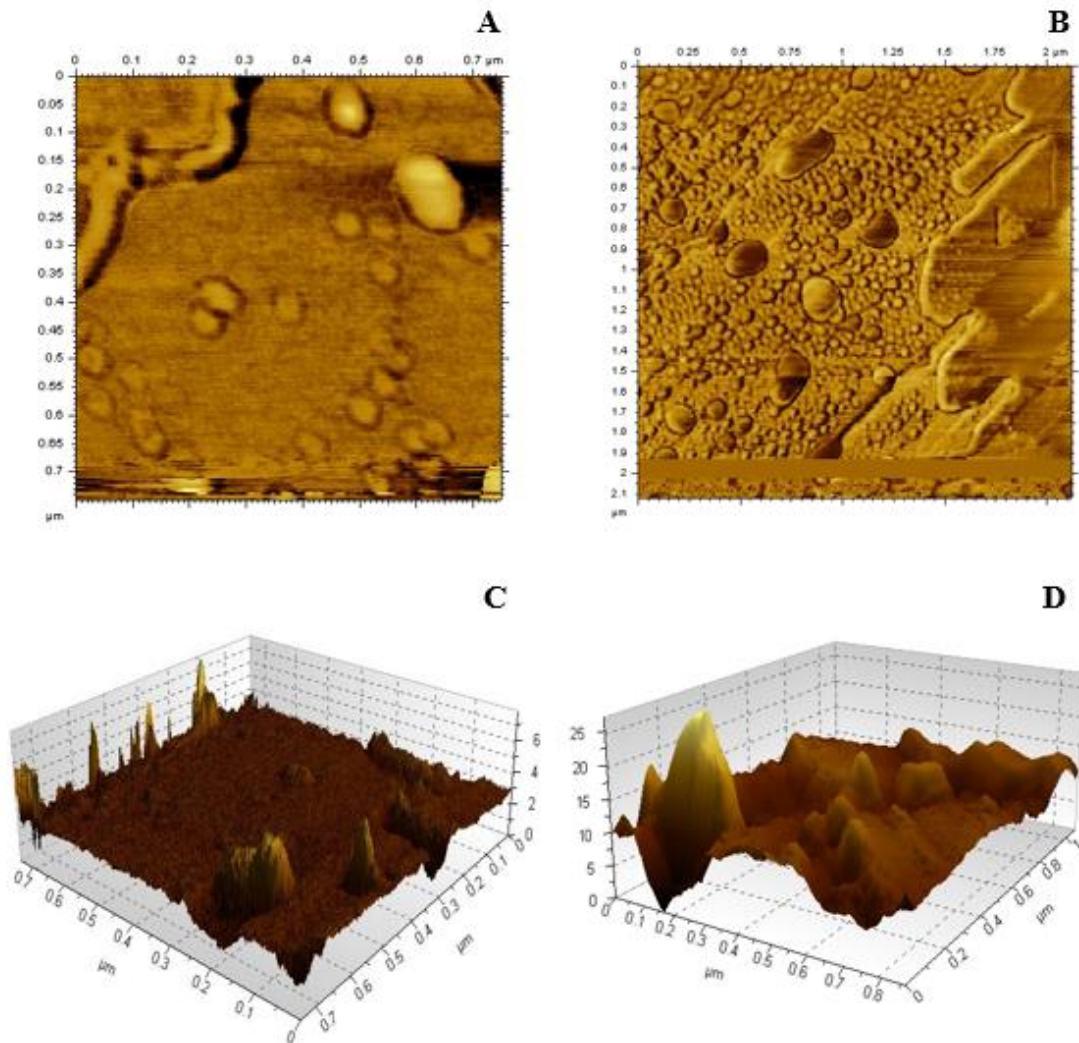
5.1.4 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica é uma das técnicas de microscopia de varredura por sonda mais populares (KLAPETEK et al., 2011), utilizada para avaliar a morfologia da superfície das nanoestruturas (LEITE et al., 2005). Esse tipo de metodologia é capaz de fornecer imagens em alta resolução, tridimensionais, detalhando a superfície em nível atômico (SCHAFFAZICK et al., 2003). Na literatura, é possível encontrar trabalhos que avaliam a morfologia de sistemas nanométricos pela técnica de microscopia de força atômica (CHOW et al., 2015; DORDEVIC et al., 2015; LEITE et al., 2015; RONEY et al., 2005).

No presente trabalho, na figura 13, em ambas as imagens das suspensões de nanocápsulas, é possível observar partículas esféricas, com superfície lisa.

As nanocápsulas contendo TCM (NC-TCM-VP) apresentaram distribuição de tamanho de partículas mais homogênea em comparação àquelas preparadas com óleo de abacate (NC-OABA). Estes resultados, obtidos por microscopia, corroboraram com o índice de span obtido por difratometria a laser, onde este se demonstrou menor para as nanocápsulas contendo TCM, confirmando que essas apresentam distribuição mais homogênea de tamanho de partículas. Foram observadas, na figura 13, partículas com dimensões estimadas de 42,4 nm x 32,8 nm a 126,0 nm x 60,3 nm para nanocápsulas com TCM. Para as nanocápsulas com óleo de abacate, foram estimadas partículas maiores, com dimensões de 30,9 nm x 36,0 nm a 306,0 nm x 134 nm.

Figura 13 – Imagens obtidas por microscopia de força atômica (MFA). NC-TCM-VP (Figura 13 A e 13 C), NC-ABA-VP (Figura 13 B e 13 D). Figuras 13 C e 13 D demonstram as imagens tridimensionais



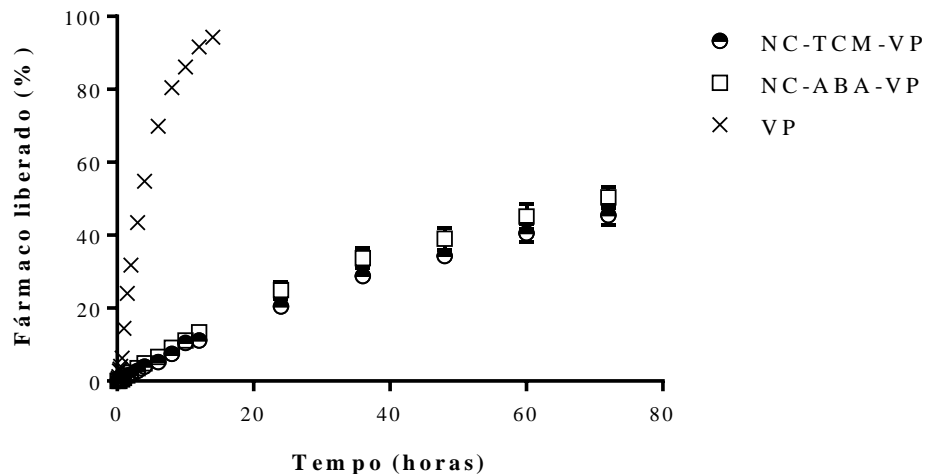
5.2 ESTUDO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA VIMPOCETINA A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

O estudo de liberação da vimpocetina foi realizado pelo método de difusão em sacos de diálise, conduzido por 72 horas, a uma temperatura de 37°C, sob agitação constante, em meio tampão fostato, pH 7,4 e etanol. Os perfis foram obtidos a partir das suspensões de

nanocápsulas de PCL (figura 13) em comparação a uma solução metanólica de vimpocetina livre (0,5 mg/mL), de maneira que o processo de difusão do fármaco, no meio de liberação, foi garantido pela manutenção da condição *sink*. O método analítico empregado no estudo mostrou-se específico, uma vez que o meio de liberação (tampão fosfato pH 7,4: etanol) não interferiu na quantificação da vimpocetina, linear na faixa de concentração de 0,125 a 3,0 µg/mL (ANOVA, $p < 0,05$), com coeficiente de correlação $> 0,99$ e equação $y = 101.425x + 794$, obtida a partir de 3 curvas analíticas.

Conforme a figura 14, ambas as suspensões de nanocápsulas apresentaram liberação lenta da vimpocetina. Segundo Pohlmann e colaboradores (2013), o polímero PCL é relatado por apresentar uma velocidade de liberação mais lenta que outros polímeros empregados para a preparação de nanocápsulas, pois possui maior cristalinidade e, por consequência, maior tortuosidade para a liberação da substância ativa quando comparado com polímeros amorfos. Além disso, nas nanocápsulas de núcleo lipídico, como as obtidas neste estudo (NC-TCM-VP), não somente o polímero presente na formulação que é capaz de controlar a difusão do fármaco, mas um componente que também pode atuar no controle da liberação é o monoestearato de sorbitano (Span[®] 60), que forma núcleos mais viscosos nestes tipos de sistemas, capazes de auxiliar no controle da liberação do fármaco, diferente das nanocápsulas convencionais, de núcleo oleoso, que apresentam somente uma única barreira (polímero). As formulações compostas de TCM apresentaram liberação média da vimpocetina de $45,48 \pm 2,80\%$, enquanto que as formulações empregando óleo de abacate liberaram $50,56 \pm 2,85\%$ de fármaco ($p < 0,05$), em 72 horas. Já a solução de vimpocetina livre praticamente completou sua difusão em 14 horas.

Figura 14 - Perfis de liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das diferentes nanocápsulas (NC-TCM-VP e NC-ABA-VP), em comparação à difusão do fármaco livre (VP). Resultados expressos em média e DP (n=3)

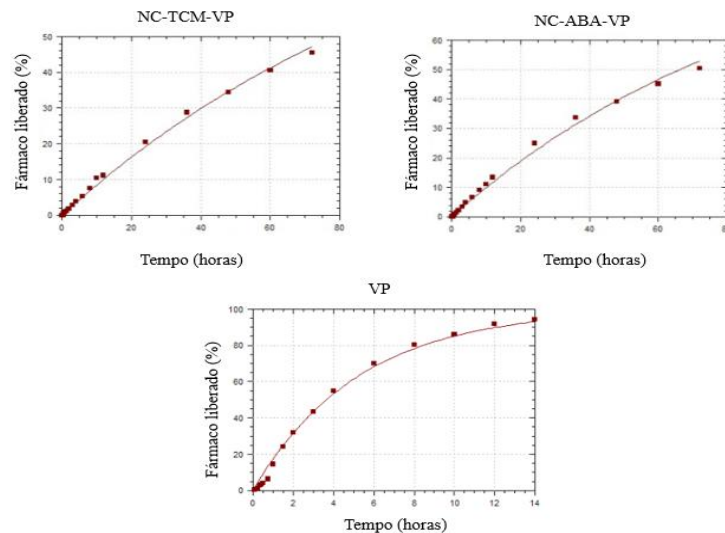


Quanto à modelagem matemática dos dados (Scientist[®] 2.0 software, Micromath), o modelo que melhor descreveu o comportamento da liberação do fármaco foi o monoexponencial (equação 6, pag. 48), apresentando coeficiente de correlação (r) adequado, alto critério de seleção de modelo (MSC) e coerente ajuste gráfico (figura 15), independente da formulação. A partir dos valores de k , foi possível obter a meia-vida de liberação, que se demonstrou sem diferença ($p > 0,05$) para as suspensões de nanocápsulas, estando entre 66 e 78 horas (tabela 6). Já a meia-vida para a difusão do fármaco livre foi de 3,6 horas. Apesar das diferentes formulações apresentarem distintos valores de viscosidade e distribuição de tamanho, estes parâmetros não foram capazes de influenciar significativamente a velocidade de liberação (valores de k , $p > 0,05$). O modelo monoexponencial indica que a liberação ocorreu em uma etapa, sem efeito *burst*, isso se deve, provavelmente, à alta hidrofobicidade desta molécula, que, possivelmente, encontra-se aprisionada no núcleo das nanocápsulas, corroborando com a alta eficiência de encapsulamento obtida neste trabalho.

Tabela 6 – Parâmetros calculados através do modelo monoexponencial e Lei da Potência para as nanocápsulas (NC-TCM-VP e NC-ABA-VP) e a solução do fármaco. Resultados expressos em média e DP (n=3)

	Nanocápsulas (NC-TCM-VP)	Nanocápsulas (NC-ABA-VP)	Solução (VP)
Monoexponencial			
r	0,9984 ± 0,0006	0,9974 ± 0,0006	0,9990 ± 0,0001
MSC	5,4704 ± 0,1392	5,0304 ± 0,2636	4,8088 ± 0,1158
k (h ⁻¹)	0,0089 ± 0,0006	0,0105 ± 0,0011	0,1908 ± 0,0023
t _{1/2} (h)	78,36 ± 5,37	66,52 ± 6,59	3,63 ± 0,04
Lei da Potência			
r	0,9984 ± 0,0008	0,9974 ± 0,0008	-
a	0,0335 ± 0,0021	0,0392 ± 0,0062	-
n	0,8020 ± 0,0165	0,7697 ± 0,0355	-

Figura 15 – Gráficos indicando o ajuste gráfico ao modelo monoexponencial para os dados da liberação da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas contendo os diferentes óleos e em relação ao fármaco livre



O mecanismo de liberação da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas poliméricas desenvolvidas foi avaliado empregando a Lei da Potência (Korsmeyer-Peppas), um modelo simples, que relaciona a liberação do fármaco com o tempo. Esse modelo é bastante utilizado para estudar a liberação de formas farmacêuticas que empregam polímeros, onde o mecanismo de liberação destas não é bem conhecido ou, então, quando é possível se ter mais de um tipo de mecanismo de liberação (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Para sistemas de liberação esféricos, o expoente de liberação que caracteriza o mecanismo (n) pode ser: (a) difusão Fickiana para $n = 0,43$; (b) transporte anômalo para $0,43 < n < 0,85$, ou (c) transporte de caso II para $n \geq 0,85$ (RITGER; PEPPAS, 1987). Assim, este modelo apresentou bom ajuste ($r > 0,99$, tabela 5) aos dados experimentais e os valores de n obtidos neste estudo foram 0,80 para nanocápsulas contendo TCM e 0,78 para nanocápsulas contendo óleo de abacate (tabela 5), indicando mecanismo do tipo transporte anômalo para ambas as suspensões. Deste modo, a liberação da vimpocetina apresentou um comportamento não Fickiano, liberando o fármaco devido ao relaxamento das cadeias poliméricas e difusão do princípio ativo para o meio.

Deve-se ressaltar que o estudo de liberação das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimpocetina corroborou com a literatura, uma vez que já é amplamente conhecido que as nanopartículas possuem propriedade de controlar a liberação de diversos ativos (CORADINI et al., 2014; LINDNER et al., 2015; SANTOS et al., 2014; SAVIAN et al. 2015).

Nanocápsulas desenvolvidas em nosso grupo de pesquisa (Lorenzoni, 2015), empregando o polímero etilcelulose e os óleos TCM, amendoim e coco, para veicular o flavonoide crisina, também apresentaram liberação do tipo transporte anômalo. As primeiras nanocápsulas desenvolvidas, em nosso grupo, contendo vimpocetina (1 mg/mL), preparadas com etilcelulose de diferentes pesos moleculares e óleos (TCM ou óleo de coco), também apresentaram liberação controlada, comparadas à vimpocetina livre. Os sistemas contendo etilcelulose de menor peso molecular liberaram, aproximadamente, 50% do fármaco; já os que continham etilcelulose de maior peso molecular liberaram, aproximadamente, 45% do fármaco no período de 72 horas. O modelo que melhor descreveu os perfis de liberação também foi o monoexponencial, sem efeito *burst*, e o mecanismo de liberação da vimpocetina a partir das nanocápsulas contendo óleo de coco foi por transporte anômalo, já a formulação contendo TCM apresentou mecanismo do tipo transporte de caso II (BOLSON, 2015). Mais recentemente, Pinheiro (2016) desenvolveu suspensões de nanocápsulas, também com

etilcelulose (TCM ou óleo de coco), porém, mais concentradas (3 mg/mL de vimpocetina), as quais também foram capazes de controlar a liberação da vimpocetina, em relação ao fármaco livre. O experimento foi conduzido por 120 horas, em que foram liberados 38% do fármaco presente nas nanocápsulas, apresentando mecanismo de liberação por transporte anômalo, corroborando, assim, com os resultados encontrado no presente estudo, com as suspensões de PCL.

5.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA

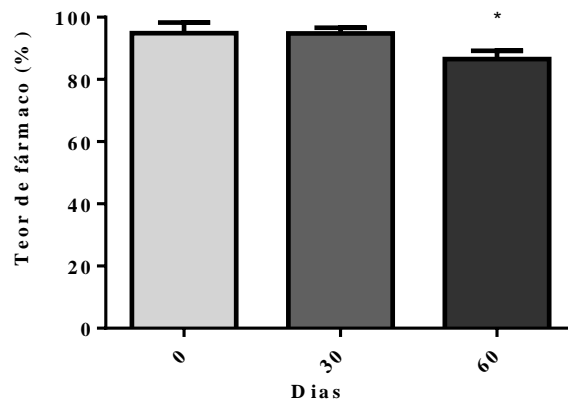
Após o desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas de PCL, um estudo capaz de analisar a estabilidade físico-química dos sistemas contendo vimpocetina foi realizado, durante 60 dias. O tamanho médio de partículas, o potencial zeta, o pH e o teor de fármaco são parâmetros normalmente utilizados para avaliar a estabilidade de formulações coloidais baseadas em polímeros (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Analisando o aspecto macroscópico, as suspensões de nanocápsulas de TCM mantiveram-se homogêneas, com coloração branca/aspecto opalescente, sem presença de precipitados visíveis, durante os 60 dias de armazenamento, diferentemente das formulações contendo o óleo de abacate.

O teor de fármaco foi um fator de escolha da melhor formulação, sendo que as suspensões de nanocápsulas de óleo de abacate não apresentaram teor adequado nos primeiros 30 dias de armazenamento (abaixo de 80 %), havendo a presença de precipitados e queda significativa no teor de vimpocetina ($p < 0,05$). Embora a solubilidade da vimpocetina nos diferentes óleos tenha sido semelhante, os sistemas são complexos e apresentaram comportamento diferente. Diante disso, as formulações de óleo de abacate apresentaram visivelmente menor estabilidade em relação àquelas contendo TCM, a qual foi escolhida para dar seguimento aos próximos estudos e os resultados podem ser vistos nas figuras a seguir.

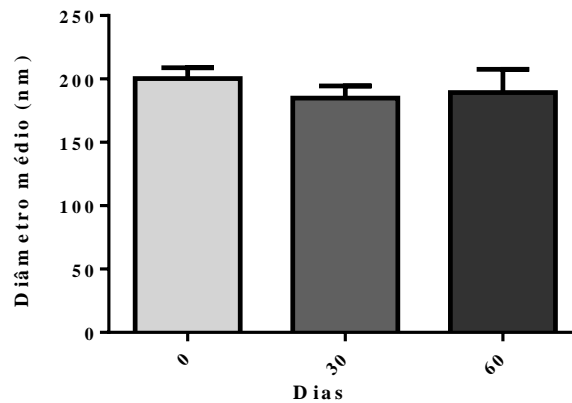
O teor de vimpocetina na formulação NC-TCM-VP (figura 16) demonstrou-se adequado no período de 30 dias, próximo ao valor teórico (0,5 mg/mL), com redução significativa ($p < 0,05$) apenas após 60 dias da preparação.

Figura 16 – Teor de fármaco nas suspensões de nanocápsulas de PCL (NC-TCM-VP), armazenadas por 60 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata. (*) Diferença significativa em relação ao tempo inicial. ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$)



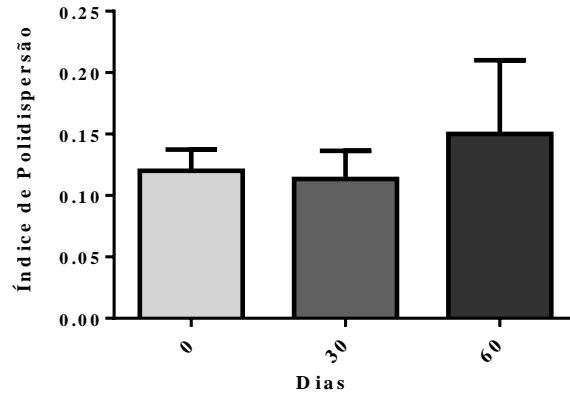
Como pode ser observado na figura 17, não foram observadas mudanças no diâmetro médio das partículas, demonstrando-se estáveis durante o período de armazenamento, próximo a 200 nm, sem diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado ao tamanho inicial das partículas nas suspensões aquosas. O diâmetro médio de partículas é um parâmetro essencial quando se refere a suspensões coloidais, já que quando ocorre agregação destas ocasiona alterações nestes parâmetros (GUTERRES et al., 1995), que podem impactar na performance dos sistemas.

Figura 17 – Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas de PCL (NC-TCM-VP), armazenadas por 60 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.



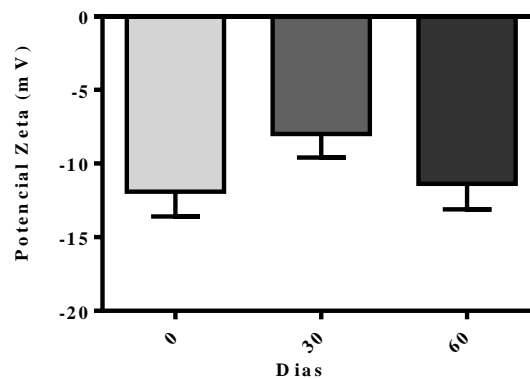
Quanto ao PDI, índices abaixo de 0,2 sugerem homogeneidade adequada dos sistemas coloidais, já demonstrado em outros trabalhos (FROZZA et al., 2013; SANTOS et al., 2013; NICULAE et al., 2014; SANTOS et al., 2016; PINTO et al., 2016). Neste trabalho, não houve diferença significativa ($p>0,05$) durante os 60 dias (figura 18). Os resultados de tamanho e índice de polidispersão indicam que as propriedades nanotecnológicas das partículas foram mantidas nos sistemas ao longo do período de armazenamento, corroborando com outras nanocápsulas de núcleo lipídico desenvolvidas com os mesmos constituintes (CORADINI et al., 2014). Adicionalmente, a análise granulométrica obtida através de difração a laser não demonstrou diferença significativa no valor do span ($p>0,05$) após os 60 dias de armazenamento (span= $0,866 \pm 0,055$).

Figura 18- Índice de polidispersão das suspensões de nanocápsulas de PCL (NC-TCM-VP), armazenadas por 60 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.



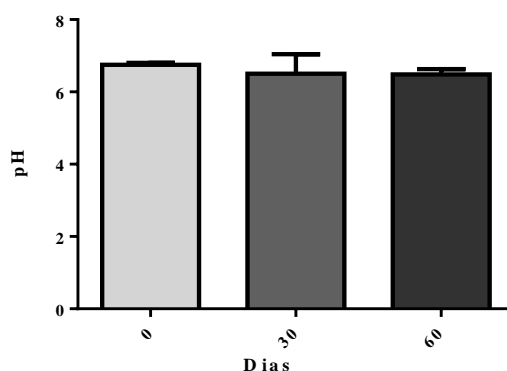
O potencial zeta também é um parâmetro importante que deve ser avaliado e pode apresentar relação direta com a estabilidade das formulações (SCHAFFAZICK et al., 2003). Na figura 19, pode-se observar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para a formulação NC-TCM-VP durante os 60 dias de armazenamento.

Figura 19 - Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas de PCL (NC-TCM-VP), armazenadas por 60 dias. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.



O pH (figura 20) também é um fator que pode impactar diretamente na estabilidade das formulações, e alterações no valor do mesmo podem indicar, inclusive, degradação do polímero ou de outros componentes. Suspensões de nanocápsulas geralmente abrangem valores de pH entre 3,0 a 7,5, quando obtidas pelo método de nanoprecipitação (MORA-HUERTAS et al., 2010). Neste estudo, a formulação apresentou valores similares de pH, sem diferença significativa ($p > 0,05$), estando em torno de 6,5 nos 60 dias de armazenamento.

Figura 20 – Valores de pH das suspensões de nanocápsulas de PCL (NC-TCM-VP) durante 60 dias de armazenamento. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata.



Através do estudo de estabilidade, foi possível concluir que as suspensões contendo TCM foram estáveis físico-quimicamente durante 30 dias. As propriedades nanométricas, como o tamanho e potencial zeta apresentaram estabilidade durante os 60 dias do estudo, mas com leve queda no teor do fármaco.

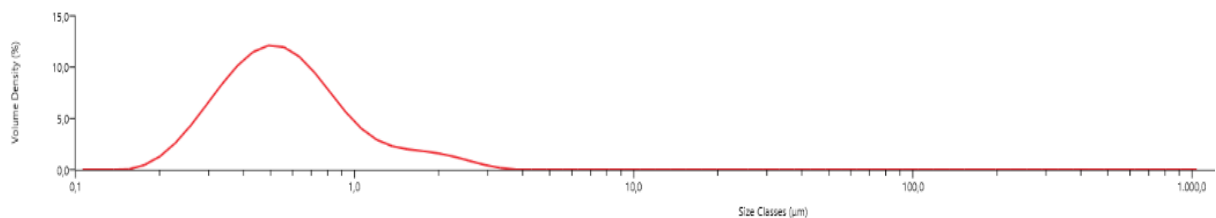
5.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* CONTRA LIPOPEROXIDAÇÃO

Para o estudo de peroxidação lipídica, lipossomas foram preparados pelo método de hidratação de um filme lipídico para serem utilizados como substrato (modelo de membrana

lipídica). O método utilizado neste trabalho explora a capacidade que um composto possui em reduzir a peroxidação de um substrato de lipossomas (SCHAFFAZICK et al., 2005; KÜLKAMP et al., 2011). Este teste *in vitro* mede a quantidade de malondialdeído formado, que é o principal produto obtido da peroxidação lipídica, onde o método mais amplamente empregado para determinar este produto é baseado na reação com o ácido tiobarbitúrico. Esta reação forma uma solução de coloração rosada, que apresenta absorvância ideal em 532-535 nm. Existem várias modificações que são introduzidas no protocolo do método do TBARS, entretanto, o aquecimento da amostra com TBA a um pH ácido é comum em todos os procedimentos existentes (BIRD; DRAPER, 1984).

As vesículas dos lipossomas apresentaram tamanho submicrométrico, com $D_{4,3}$ de, aproximadamente, 0,600 μm e span adequado (1,579), podendo ser observado na figura 21.

Figura 21 – Representação gráfica da análise do tamanho de partículas obtido por difração a laser, do lipossoma de lecitina de soja empregado para os estudos de lipoperoxidação



A tabela 7 mostra a peroxidação lipídica expressa por nmol de MDA/mL de reação, nas diferentes formulações testadas. A concentração de MDA foi de $4,38 \pm 0,13$ nmol/mL no controle positivo e $2,40 \pm 0,25$ a $2,44 \pm 0,17$ nas suspensões de nanocápsulas contendo vimopocetina.

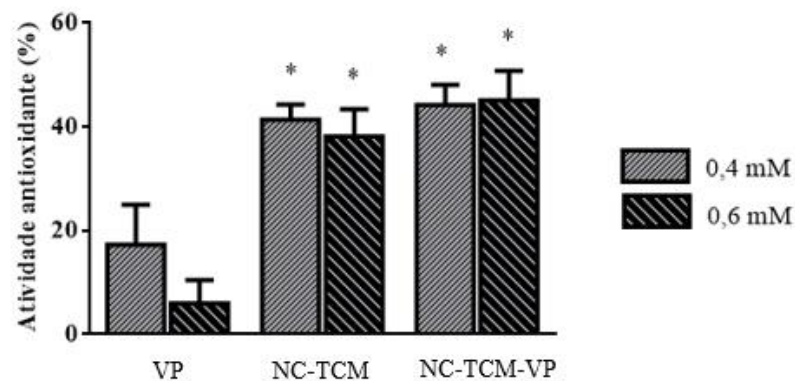
Tabela 7 – Concentrações de MDA resultante da lipoperoxidação lipídica induzida pelo radical livre ascorbil, empregando lipossomas como substrato. Resultados expressos em média e DP (n=3)

Amostra/dose de VP (mM)	Peroxidação lipídica (nmol MDA/mL)
Veículo (mesmo volume da dose 0,4)	4,44 ± 0,46
Veículo (mesmo volume da dose 0,6)	5,25 ± 0,80
VP 0,4	3,62 ± 0,34*
VP 0,6	4,12 ± 0,20
NC-TCM (mesmo volume da dose 0,4)	2,57 ± 0,13*
NC-TCM (mesmo volume da dose 0,6)	2,71 ± 0,23*
NC-TCM-VP 0,4	2,44 ± 0,17*
NC-TCM-VP 0,6	2,40 ± 0,25*

* p<0,05 em relação ao controle positivo. ANOVA seguida de teste Tukey

A figura 22 mostra os valores para a atividade antioxidante, obtida a partir da peroxidação lipídica do modelo de membrana empregando lipossomas. No estudo, foi empregado diferentes concentrações das amostras. A atividade antioxidante obtida a partir da vimpocetina livre foi de $17,28 \pm 7,76$ e $5,99 \pm 4,51$ % para as concentrações de 0,4 mM e 0,6 mM, respectivamente, sem diferença observada nas duas concentrações testadas ($p > 0,05$). Já para a vimpocetina associada às nanocápsulas foi possível observar um aumento significativo na atividade antioxidante ($p < 0,05$) de $44,20 \pm 3,85$ e $45,09 \pm 5,70$ % comparada ao fármaco livre, sem diferença significativa nos valores entre as duas concentrações utilizadas para o fármaco nanoencapsulado ($p > 0,05$). Portanto, não foi observada diferença significativa entre doses de vimpocetina nanoencapsulada e vimpocetina livre.

Figura 22 – Avaliação da atividade antioxidante (AA) a partir das suspensões de nanocápsulas contendo fármaco ou não (NC-TCM-VP e NC-TCM), e da vimpocetina livre (VP). Os valores foram obtidos através da concentração de MDA obtida na peroxidação lipídica. Os resultados foram expressos como a atividade antioxidante observada em relação a uma amostra máxima oxidada (controle positivo). * Diferença significativa entre as nanocápsulas e o fármaco livre. Resultados expressos em média \pm DP, em triplicata. ANOVA seguida de teste Tukey ($p < 0,05$).



Neste mesmo estudo, não foram observadas diferenças significativas na atividade antioxidante das nanocápsulas contendo fármaco ou não ($p > 0,05$), resultado também encontrado no estudo de Lindner e colaboradores (2015), que desenvolveram nanopartículas de PLA e Tween[®]80, contendo resveratrol. Ao avaliar a proteção antioxidante das nanopartículas de resveratrol na formação de malondialdeído no tecido cerebral, induzido por MPTP, um indutor de Parkinson, foi observado que as nanopartículas aumentaram o efeito protetor do resveratrol livre, entretanto, não foi possível observar diferença significativa entre as nanopartículas com fármaco e seu respectivo controle (nanopartículas sem fármaco), efeito também observado neste trabalho *in vitro*. Deste modo, os autores sugeriram que a atividade antioxidante não depende somente do fármaco, mas também das características físicas dos sistemas coloidais. Em outro estudo, envolvendo distinto método de avaliação (método do DPPH) *in vitro*, Kumar e colaboradores (2015) reportaram que nanopartículas de quitosana apresentaram certo efeito inibidor do radical (10-28%).

Outros estudos já demonstraram que a vimpocetina na forma livre apresenta atividade antioxidante avaliada pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (HERRERA-MUNDO; SITGES, 2013; RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015). O efeito da vimpocetina em neutralizar a formação de danos oxidativos nas membranas lipídicas em terminações nervosas isoladas (sinaptossomas) de ratos foi avaliada pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para o estudo foi avaliada a produção de TBARS a partir de amostras tratadas com 5 mM de 3-NPA, uma toxina mitocondrial inibidora da succinato desidrogenase (enzima atuante no ciclo de Krebs) e que apresenta capacidade de induzir formação de EROS. Neste trabalho, amostras contendo 3-NPA aumentaram cerca de 37% a produção de TBARS e já 25 μ M de vimpocetina foi capaz de reduzir em 24% a peroxidação lipídica, em comparação ao controle. O fármaco demonstrou um efeito até melhor do que o antioxidante α -tocoferol que foi testado em uma dose 2 vezes maior (HERRERA-MUNDO; SITGES, 2013).

O efeito antioxidante da vimpocetina em tecido inflamado também foi avaliado em amostras de homogeneizados de pele de patas de camundongos, também utilizando o método de TBARS. Os camundongos foram tratados 1 hora antes (30 mg/kg de vimpocetina via p.o.) da indução da inflamação com lipopolissacarídeo, e as amostras de pele foram coletadas 3 horas após a indução da inflamação. A vimpocetina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo induzido pela injeção do lipopolissacarídeo.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE *IN VIVO*

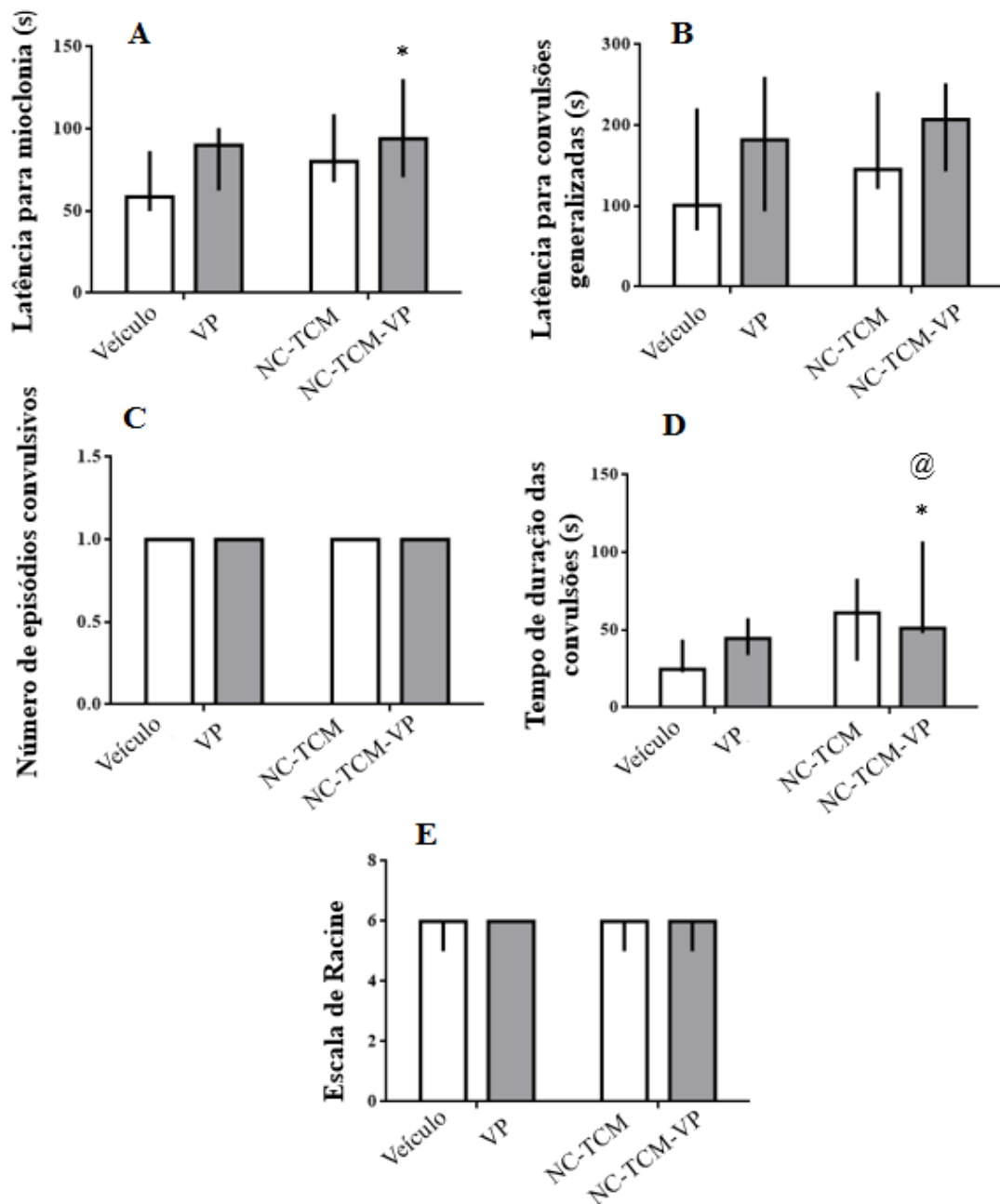
A atividade anticonvulsivante foi avaliada a fim de verificar a capacidade das suspensões de nanocápsulas na liberação cerebral da vimpocetina e, por consequência, sua eficácia no futuro tratamento de distúrbios epiléticos. A BHE protege o sistema nervoso central, além de regular o transporte de substâncias endógenas, sendo um problema na liberação de fármacos, pois exerce controle na absorção, efluxo e metabolismo destas moléculas (GARCIA-GARCIA, et al.; 2005; REIMOLD et al., 2008). Não é o caso do fármaco deste estudo, que já comprovou atravessar a BHE e apresentar efeito anticonvulsivante potente, em diferentes doses (a partir de 2 mg/Kg), quando administrado na forma livre, via i.p. em diferentes modelos animais (GÓMEZ; BUIJS; SITGES, 2014;

NEKRASSOV; SITGES, 2004; SITGES et al., 2016). Entretanto, diversificados sistemas nanoparticulados têm encapsulado distintas moléculas com potencial anticonvulsivante, a fim de vetorizá-las ao cérebro, promovendo um aumento da atividade terapêutica, sendo considerados eficazes no tratamento da epilepsia (LEYVA-GÓMEZ, et al., 2014; NAIR et al., 2012; WILSON et al., 2014; YUSUF et al., 2012). É importante salientar que, embora a vimpocetina já tenha sido associada a diferentes sistemas nanométricos, ainda não foi publicado nenhum estudo dedicado à avaliação de seu efeito anticonvulsivante associado a estes carreadores.

A primeira parte do estudo foi realizada empregando a dose de 10 mg/Kg de vimpocetina livre e encapsulada e seus respectivos controles (veículo e nanocápsulas sem fármaco). Após o tratamento, a indução das convulsões com PTZ (50 mg/Kg) foi realizada após um intervalo de 4 horas. Este período de tempo foi, inicialmente, avaliado considerando que a vimpocetina poderia ser liberada de forma lenta, devido aos testes de liberação *in vitro*, realizados anteriormente, de acordo com a metodologia empregada. Outro fator levado em consideração foi a meia-vida da vimpocetina, relatada na literatura em 1- 2 horas (BONOCZK et al., 2000). Assim, em hipótese, a vimpocetina encapsulada teria potencial para prolongar o efeito em relação à forma livre, após este período.

Conforme os resultados, a figura 23 mostra o efeito da vimpocetina (10 mg/Kg i.p.) na latência para mioclonia induzida por PTZ/primeiros espasmos visualizados nos animais (A), convulsões generalizadas (B), número de episódios convulsivos (C), tempo de duração das convulsões (D) e escala de Racine (E). Considerando a formulação, vimpocetina nanoencapsulada (NC-TCM-VP) ou vimpocetina livre (VP), e a presença de anticonvulsivante (veículo ou vimpocetina), as análises não paramétricas de duas vias revelaram aumento na latência das convulsões mioclônicas para a vimpocetina associada às nanocápsulas (NC-TMC-VP) comparada ao veículo do fármaco livre (A) ($p < 0,025$; $\chi^2 = 4,05$). Já na latência para convulsões tônico-clônicas generalizadas (B), foi observada uma tendência ao aumento da latência na presença de vimpocetina, embora, sem diferir significativamente ($p > 0,025$). Entretanto, as NC-TCM-VP ($p < 0,025$; $\chi^2 = 5,76$) apresentaram maior tempo de duração das crises convulsivas (figura 23 D) em relação ao fármaco livre e ao veículo, mas não diferiu das NC-TCM. Não foi possível observar diferença significativa (figura 23 C e E) nos outros parâmetros avaliados ($p > 0,025$).

Figura 23 – Efeito da vimpocetina livre (VP) ou nanoencapsulada (NC-TCM-VP) (10 mg/Kg; i.p.) após indução das convulsões com PTZ (50 mg/Kg; i.p.). (A) latência para mioclonia; (B) latência para convulsões tônico-clônicas generalizadas; (C) número de episódios convulsivos; (D) tempo de duração das convulsões; (E) Escala de Racine. Efeitos obtidos após 4 horas de tratamento. Análise não paramétrica de duas vias, seguida de teste de Mann-Whitney; dados apresentados como mediana \pm intervalo interquartil, para $n = 6-9$ em cada grupo. * Diferença significativa para $p < 0.025$ em comparação ao veículo. @ Diferença significativa para $p < 0.025$ em comparação ao fármaco livre.



Com base na literatura, onde foi demonstrado que o fármaco em estudo apresenta atividade anticonvulsivante em modelos animais a partir da dose de 2,0 mg/Kg (GÓMEZ; BUIJS, SITGES, 2014; NEKRASSOV; SITGES, 2008; NEKRASSOV; SITGES, 2008; SITGES, ALDANA, REED, 2016) e que diferentes sistemas nanotecnológicos, contendo distintas moléculas com potencial anticonvulsivante, apresentaram atividade após curtos períodos de tratamento (30 minutos), um novo experimento foi delineado. Assim, o mesmo protocolo anterior foi empregado, com algumas modificações, sendo que a dose escolhida de vimpocetina a ser administrada foi de 5 mg/Kg (livre ou encapsulada) e o período de tratamento, que precedeu a indução das convulsões, foi de 30 minutos.

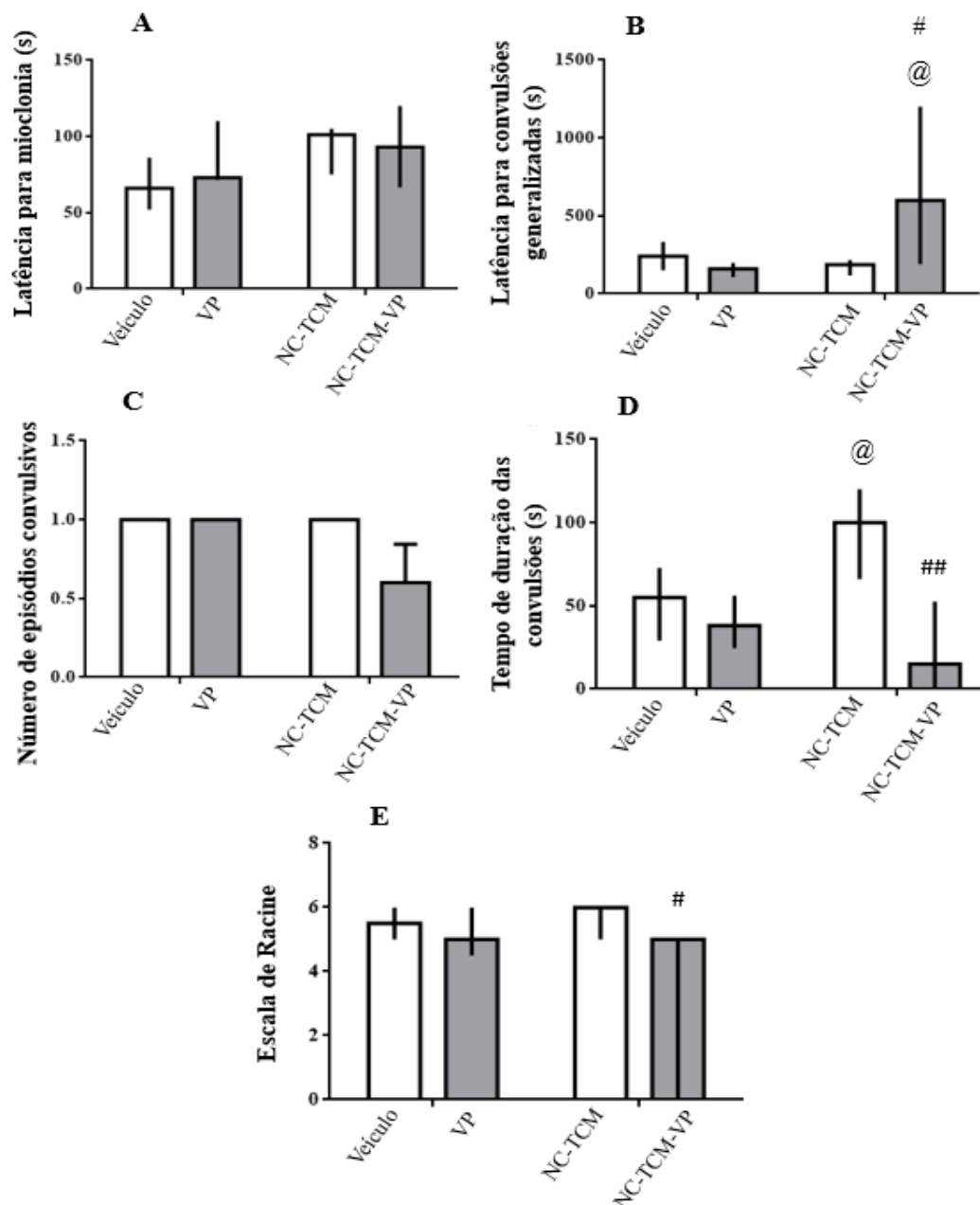
Neste sentido, a figura 24 mostra o efeito da vimpocetina (5 mg/Kg) nas convulsões induzidas por PTZ (50 mg/Kg), nos mesmos parâmetros avaliados na figura 23, porém, após tratamento de 30 minutos. Considerando a formulação [vimpocetina nanoencapsulada (NC-TCM-VP) ou livre (VP)] e a presença de anticonvulsivante (veículo ou vimpocetina) como dois fatores, as análises não paramétricas de duas vias evidenciaram aumento na latência das crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas (B) nos animais que receberam NC-TCM-VP, em comparação ao seu controle (NC-TCM) e ao fármaco livre (VP) ($p < 0,025$; $\chi^2 = 4,13$). Com este resultado, observou-se que somente houve efeito da vimpocetina quando foi administrada na forma nanoencapsulada, segundo o protocolo estudado.

Já na latência para a mioclonia (figura 24 A), não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,025$). A figura 24 D mostra o tempo de duração dos episódios convulsivos, onde diferenças significativas ($p < 0,025$) foram observadas entre as suspensões de nanocápsulas sem o fármaco (NC-TCM) e aquelas com o fármaco NC-TCM-VP ($p < 0,005$) ($\chi^2 = 6,72$), havendo redução deste parâmetro devido à presença da vimpocetina. Em relação à vimpocetina livre, houve também diferença significativa entre essa e NC-TCM.

A partir da escala de Racine (24 E), que avalia a gravidade das convulsões, foi possível observar que o tratamento com a formulação (NC-TCM-VP) reduziu a gravidade dos episódios convulsivos em comparação com seu controle (NC-TCM) ($p < 0,025$; $\chi^2 = 3,87$). Este resultado corrobora com a literatura, onde já foi observada redução na escala de Racine nos animais tratados com clonazepam (benzodiazepínico potente) associado às NLS, empregado como tratamento de segunda linha para epilepsias (LEYVA-GÓMEZ et al., 2014). Embora tenha sido observada uma tendência à redução do número de episódios convulsivos nos animais tratados com NC-TCM-VP, esta redução não foi significativa (figura 24 C) ($p > 0,025$).

Cabe evidenciar que 3 animais não convulsionaram ao receberem o tratamento com as suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina (NC-TCM-VP), fato que não ocorreu com os outros tratamentos, em que todos convulsionaram.

Figura 24 - Efeito da vimpocetina livre (VP) ou nanoencapsulada (NC-TCM-VP) (5 mg/Kg; i.p.) após indução das convulsões com PTZ (50 mg/Kg; i.p.). (A) latência para mioclonia; (B) latência para convulsões tônico-clônicas generalizadas; (C) número de episódios convulsivos; (D) tempo de duração das convulsões; (E) Escala de Racine. Efeitos obtidos após 30 minutos de tratamento. Análise não paramétrica de duas vias, seguida de teste de Mann-Whitney; dados apresentados como mediana e intervalo interquartil, além de média \pm DP para (C); $n = 4-7$ em cada grupo. @ Diferença significativa para $p < 0,025$ em comparação ao fármaco livre; # Diferença significativa para $p < 0,025$ em comparação ao seu controle (NC-TCM); ## Diferença significativa para $p < 0,005$ em comparação ao seu controle (NC-TCM)



No presente estudo, os resultados foram mais pronunciados quando o tratamento foi feito 30 minutos antes da administração do convulsivante, em relação ao período de 4 h. Este resultado corrobora com a literatura, em que o tempo usual para testar a efetividade de diferentes fármacos associados a sistemas nano-organizados (poliméricos ou lipídicos) é correspondente a 30 minutos antes da indução das crises convulsivas, independentemente do fármaco estudado. Tempos maiores não têm sido relatados. Lipossomas (fosfatidilcolina de soja/colesterol) contendo nimodipino, preparados pelo método de hidratação de um filme lipídico (107 nm, PDI de 0,303, potencial zeta negativo, EE de 99%), foram avaliados em relação aos parâmetros sinal colinérgico, movimentos estereotipados e tremores, bem como a taxa de mortalidade. Os lipossomas contendo nimodipino não foram capazes de reduzir a ocorrência dos sinais colinérgicos periféricos, entretanto, diminuíram os movimentos estereotipados e tremores nos animais, além de reduzir 100% das crises e das crises seguidas de morte, induzidas por pilocarpina (após 30 minutos), em todas as doses testadas em camundongos (0,1; 1,0; 10,0 mg/Kg i.p.). Esses resultados não foram observados com o fármaco livre, em que na dose mais alta, além de não haver redução nos sinais colinérgicos e tremores, não houve efetividade em diminuir as convulsões e as taxas de mortalidade (GAYOSO e MORENO et al 2014; GAYOSO e MORENO et al., 2015). Em outro protocolo, nanopartículas de albumina contendo gabapentina (142 nm; potencial zeta negativo), preparadas pelo método de coacervação, foram administradas em camundongos, que receberam os tratamentos (50 mg/Kg ip.) e, após 30 minutos, as convulsões foram induzidas por PTZ (70 mg/Kg) e eletrochoque, técnica também muito utilizada (50 mV, 0,2 s). As formulações contendo Tween[®] 80 foram capazes de reduzir todas as fases das convulsões, além da duração destas, em comparação às outras formulações (fármaco livre e nanopartículas sem Tween[®] 80), quando utilizado o eletrochoque. Nas convulsões induzidas por PTZ, as nanopartículas contendo gabapentina e Tween[®] 80 reduziram significativamente as convulsões tônico-clônicas generalizadas, comparadas as nanopartículas sem fármaco e ao fármaco livre. Assim, as nanopartículas com polissorbato 80 auxiliaram na melhoria da atividade antiepilética (WILSON et al., 2014).

Uma vez que estudos detalhados se tornam difíceis de serem realizados em humanos, modelos animais de epilepsia acabam sendo muito estudados. Existem três principais mecanismos de ação responsáveis pelo efeito antiepilético de diferentes fármacos: potencialização da ação do GABA; inibição da função dos canais de sódio e inibição da função dos canais de cálcio (RANG; DALE, p. 542-544, 2012). O PTZ é um antagonista do

receptor GABA_A, capaz de induzir crises convulsivas, promovendo um dos modelos mais estudados para avaliar fármacos antiepiléticos (LÜTTJOHANN; FABENE; LUIJTELAAR, 2009).

O efeito antiepilético da vimpocetina em modelos animais empregando PTZ também já foi relatado (NEKRASSOV, SITGES, 2004). Entretanto, 4-aminopiridina (4-AMP) tem sido o principal indutor de epilepsia estudado em animais tratados com vimpocetina, provavelmente, devido à atividade anticonvulsivante da vimpocetina *in vivo* estar relacionada com a inibição dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem (PATYAR et al., 2011; SITGES; CHIU, NEKRASSOV, 2006; SITGES, REED, CHIU, 2015). A vimpocetina ao inibir esses canais, consequentemente, inibe a liberação do neurotransmissor glutamato, efeito observado em terminações nervosas isoladas. A atividade antiepilética da vimpocetina já foi observada em concentrações menores que outros antiepiléticos amplamente utilizados, como a carbamazepina (SITGES; CHIU, NEKRASSOV, 2006; SITGES; ALDANA; REED, 2016), fenitoína, oxcarbamazepina, lamotrigina, topiramato e ácido valproico (SITGES; ALDANA; REED, 2016).

As altas doses de fármacos antiepiléticos para cessar as crises convulsivas acabam levando a efeitos adversos, por isso o pronunciado efeito anticonvulsivante da vimpocetina livre, além da sua capacidade em melhorar as funções cognitivas, pode fazer com que este fármaco se torne uma alternativa promissora no tratamento desta desordem cerebral (NEKRASSOV; SITGES, 2004; SITGES; CHIU, NEKRASSOV, 2006). O presente estudo, com o propósito de veicular este fármaco altamente lipofílico em suspensões aquosas de nanocápsulas, como carreadores coloidais para liberação cerebral, vem a contribuir neste sentido, ao demonstrar atividade anticonvulsivante *in vivo*, por vezes mais efetiva do que os veículos ou fármaco livre.

Pesquisas têm demonstrado que as nanopartículas possuem capacidade de vetorizar fármacos a sítios específicos no cérebro, aumentando sua eficácia. Embora o mecanismo de liberação de fármacos mediado por nanopartículas ainda não tenha sido completamente esclarecido (GARCIA-GARCIA et al., 2005), existem evidências de que o polissorbato 80, presente na superfície destas estruturas submicrométricas, facilite a interação das mesmas com os receptores presentes nas células endoteliais do cérebro, como o de LDL, por exemplo, além de apresentar propriedades de reverter o efluxo gerado pela glicoproteína P (P-gP). Essa interação pode promover endocitose e transcitose das nanopartículas através das células endoteliais (KREUTER, 2014).

Yusuf e colaboradores (2012) desenvolveram nanopartículas de PLGA contendo β -caroteno, revestidas ou não por polissorbato 80, eficazes para o tratamento da epilepsia, uma vez que foram capazes de aumentar a latência e diminuir a duração das crises convulsivas, em uma dose menor em comparação ao composto na sua forma livre. As formulações contendo polissorbato 80 foram mais eficazes nos parâmetros avaliados. Resultados também observados no estudo de Wilson e colaboradores (2014), em que nanopartículas de albumina com gabapentina, contendo ou não polissorbato 80, aumentaram a concentração do fármaco no cérebro, além da melhora na resposta ao tratamento ao empregar nanopartículas revestidas com o polissorbato 80. Estes estudos com nanopartículas poliméricas, veiculando substâncias anticonvulsivantes, corroboram com os resultados obtidos com as nanocápsulas contendo vimpocetina, desenvolvidas neste trabalho, revestidas com polissorbato 80.

Interessante ressaltar também que apesar das nanocápsulas de TCM preparadas sem fármaco indicarem atividade antioxidante *in vitro*, nas condições testadas neste trabalho, estes sistemas não apresentaram efeito anticonvulsivante *in vivo*, diferindo em alguns parâmetros das formulações coloidais contendo vimpocetina.

Como perspectivas desta pesquisa, estudos adicionais podem ser realizados no sentido de explorar mais os potenciais benefícios do nanoencapsulamento da vimpocetina, como quantificá-la no tecido cerebral e avaliar o seu efeito em outros modelos de indução de convulsão, em comparação ao fármaco livre, bem como avaliar o registro eletroencefalográfico e permeação à BHE.

6 CONCLUSÃO

Foi viável o desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas de PCL, empregando diferentes óleos (triglicerídeos de cadeia média ou abacate), para a veiculação de vimpocetina, em uma concentração de 0,5 mg/mL, através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado. As suspensões coloidais desenvolvidas, neste estudo, apresentaram características físico-químicas adequadas, além de alta eficiência de encapsulamento do fármaco. Os óleos empregados no estudo não influenciaram significativamente as características das partículas, somente na viscosidade relativa das formulações, bem como na distribuição de tamanho de partículas. Foi possível verificar também morfologia relativamente esférica para ambos os sistemas por microscopia de força atômica, confirmando a presença de partículas coloidais, as quais foram aparentemente mais homogêneas nas formulações preparadas com TCM, em comparação ao óleo vegetal, corroborando com os resultados obtidos através de difração a laser.

No estudo de liberação *in vitro*, foi possível observar que as nanocápsulas possuem propriedade de controlar a liberação do fármaco em comparação à vimpocetina livre, sem apresentar efeito *burst*, seguindo cinética de primeira ordem, com apenas uma fase de liberação. Segundo o ajuste ao modelo da Lei da Potência, o tipo de mecanismo de liberação encontrado para a vimpocetina, a partir das nanocápsulas, foi transporte anômalo, independentemente do óleo empregado.

Através do estudo de estabilidade das formulações, definiu-se que a suspensão mais adequada para continuar o trabalho foi aquela preparada com TCM, a qual também apresentou maior homogeneidade de distribuição de tamanho de partículas. Esses sistemas apresentaram atividade antioxidante *in vitro* superior ao fármaco livre, pelo método TBARS, assim como as suspensões sem fármaco, empregando lipossomas como substrato para a peroxidação lipídica, induzida por ferro/ascorbato. Este fato poderá, em hipótese, futuramente, beneficiar os efeitos terapêuticos da vimpocetina.

No experimento biológico, em camundongos, foi possível verificar que as suspensões de nanocápsulas de PCL, preparadas com TCM, foram capazes de melhorar o efeito anticonvulsivante da vimpocetina livre ou em relação ao veículo/nanoestruturas sem fármaco, em alguns parâmetros avaliados, principalmente após o tratamento da dose de 5 mg/kg de

fármaco, administrada 30 minutos (via i.p.) antes da indução das convulsões por PTZ. A administração de dose maior (10 mg/kg), em 4 horas antes da indução das convulsões, não resultou em melhores efeitos.

Até o momento, o conjunto de resultados obtidos demonstra que as suspensões de nanocápsulas de PCL contendo vimpocetina são sistemas com características físico-químicas adequadas e promissores para a veiculação desse neuroprotetor lipofílico, delineados para a liberação cerebral controlada, podendo ser uma plataforma tecnológica útil para o tratamento futuro de distúrbios neurológicos, como a epilepsia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, U. R. et al. Automated EEG of epilepsy: A review. **Knowledge-Based Systems**, v. 45, p. 147-165, 2013.

ABBAS, S. et al. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 81-92, 2015.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by polyvinyl alcohol): Formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 178-188, 2006.

ALMEIDA, J.S. et al. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1603-1610, 2010.

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

ANVISA. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 2003.

ANVISA. **Farmacopéia Brasileira 5ª edição**, Brasília, DF Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BEHERA, A.K.; BARIK, B.B.; JOSHI, S. Poly -ε-caprolactone based microspheres and nanospheres: a review. **FS Journal of Pharmacy Research**, v. 1, p. 38-45, 2012.

BENDER, E.A. et al. Hemocompatibility of poly(ε-caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecitin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, p. 271-279, 2012.

BENNEWITZ, M.F; SALTZMAN, W.M. Nanotechnology for delivery of drugs to the brain for epilepsy. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 6, p. 323-336, 2009.

BENVEGNÚ, D. M. et al. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules decrease its adverse motor side effects and oxidative stress markers in rats. **Neurochemistry International**, v. 61, p. 623-631, 2012.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative Studies on Different Methods of Malonaldehyde Determination. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 299-305, 1984.

BOLSON, S. N. **DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE NANOCÁPSULAS PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DO NEUROPROTETOR VIMPOCETINA**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

BÖNÖCZK, P. et al. Role of sodium channel inhibition in neuroprotection: Effect of vinpocetine. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 245-254, 2000.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: Princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artamed, 2003.

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

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

CHOW, S. F. et al. Development of highly stabilized curcumin nanoparticles by flash nanoprecipitation and lyophilization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 436-449, 2015.

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

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

DEVI, P. U.; PILLAI, K. K.; VOHORA, D. Modulation of pentylenetetrazole-induced seizures and oxidative stress parameters by sodium valproate in the absence and presence of N-acetylcysteine. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 20, p. 247-253, 2006.

DORDEVIC, S. M. et al. Parenteral nanoemulsions as promising carriers for brain delivery of risperidone: Design, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, p. 40-54, 2015.

DOS SANTOS, P.P. et al. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, p.07, 2015.

EID, A. M.; ELMARZUGI, N. A.; EL-ENSHASY. Development of avocado oil nanoemulsion hydrogel using sucrose ester stearate. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 145-147, 2013.

EID, A. M. et al. Usage of sugar ester in the preparation of avocado oil nanoemulsion. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, p. 66-69, 2015.

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

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

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

ESMAELI, A.; GHOLAMI, M. Optimization and preparation of nanocapsules for food applications using two methodologies. **Food Chemistry**, v. 179, p. 26-34, 2015.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por epilepsia no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 14, n.1, p. 89-94, 2009.

FERREIRA, L.M. et al. Pomegranate seed oil nanoemulsions improve the photostability and in vivo antinociceptive effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 144, p. 214-221, 2016.

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

FLORES, F.C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: Protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FRANK, L. A.; CONTRI, R. V.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **WIREs: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, p. 623-639, 2015.

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

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

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

GAYOSO, C. L e MORENO, I, A. et al. 2014. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 116, p. 64-68, 2014.

GAYOSO, C. L e MORENO, I, A. et al. Acute toxicity and anticonvulsivante activity of liposomes containing nimodipine on pilocarpine-induced seizures in mice. **Neurociense Lettrers**, v. 585, p. 38-42, 2015.

GOMES, M. M. Mortality from epilepsy. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 69, p. 166-169, 2011.

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

GOODMAN; GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a. ed. Porto Alegre: Amgh, 2012.

GOTO, P.L. et al. Preparation and Characterization of Polymeric Nanocapsules Produced by in Situ Polymerization From Nanoemulsions Produced by Direct Emulsification. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, p. 228-233, 2013.

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

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

HASA, D. et al. Drug nanocrystals: Theoretical background of Solubility increase and dissolution rate enhancement. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 28, p. 247-258, 2014.

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

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

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

JORGE, T. S. et al. Physicochemical and rheological characterization of avocado oils. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 4, p. 390-400, 2015.

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

KANASHIRO, A. L. A. N. **Epilepsia: prevalência, características epidemiológicas e lacuna de tratamento farmacológico**. 2006. 134 p. Tese (Doutorado em Ciências Médicas)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

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

KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry-90% of the published measurements are false. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 150–63, 2008.

KLAPETEK, P. et al. Atomic force microscopy analysis of nanoparticles in non-ideal conditions. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, p. 1-9, 2011.

KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 122-128, 2015.

KÜLKAMP, I. C. et al. Nanoencapsulation improves the in vivo antioxidant activity of lipoic acid. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, p. 1-10, 2011.

KUMAR, S. P. et al. Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing narigenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 87-95, 2015.

KUO, Y-C.; YU, H-W. Polyethyleneimine/poly-(γ -glutamic)/ poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for loading and releasing antiretroviral drug. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, p. 158-164, 2011.

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

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

MITTAL, G. et al. Development and evaluation of polymer nanoparticles for oral delivery of estradiol to rat brain in a model of Alzheimer's pathology. **Journal of Controlled Release**, v. 150, p. 220-228, 2011.

LACATUSU, I. et al. Design of soft lipid nanocarriers based on bioactive vegetable oils with multiple health benefits. **Chemical Engineering Journal**, v. 246, p. 311-321, 2014.

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

LEITE, E. A. Poly-caprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 11, p. 48-51, 2005.

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

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

LINDNER, G. R. et al. Improved neuroprotective effects of resveratrol-loaded polysorbate 80-coated poly(lactide) nanoparticles in MPTP-induced Parkinson. **Nanomedicine**, v. 10, p. 1127-1138, 2015.

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

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

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

LÓPEZ-GÓMEZ, V.M. Characterization of Avocado (*Persea Americana* Mill.) Varieties of Low Oil Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, P. 2707-2710, 1999.

LORENZONI, A. S. **DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE CRISINA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO***. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

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

LÜTTJOHANN, A.; FABENE, P. F.; LUIJTELAAR, G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. **Physiology & Behavior**, v. 98, p. 579-586, 2009.

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

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

MANEA, A-M.; UNGUREANU, C.; MEGHEA, A. Effect of vegetable oils on obtaining lipid nanocarriers for sea buckthorn extract encapsulation. **Comptes Rendus Chimie**, v. 17, p. 934-943, 2014.

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

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

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

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

NANCE, E. et al. Non-invasive delivery of stealth, brain-penetrating nanoparticles across the blood- brain barrier using MRI-guided focused ultrasound. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p.123-132, 2014.

NEELIMA, T. Nanomedicine drug delivery system for brain diseases. **International Journal of Pharma and Bio Science**, v. 6, p. 431-436, 2015.

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

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

NICULAE, G. et al. Rice bran and raspberry seed oil-based nanocarriers with self-antioxidative properties as safe photoprotective formulations. **Photochemical e Photobiological Science**, v. 13, p. 703-716, 2014.

OURIQUE, A. F. et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 95-101, 2011.

PANDIT, R.S. et al. Curcumin nanoparticles: physico-chemical fabrication and its in vitro efficacy against human pathogens. **3 Biotech**, v. 5, p. 991-997, 2015.

PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: Cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 12, p. 1951-1962, 2004.

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

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

PIESZKA, M. et al. Effect of bioactive substances found in rapessed raspberry and strawberry seed oils on blood lipid profile and selected parameters of oxidative status in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 1055-1062, 2013.

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

PINTO, N. O. F. et al. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia siodes* Cham. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 279-288, 2016.

POHLMANN, A.R. et al. Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles and Evaluation of the Antioxidant Activity Against Lipid Peroxidation. In: Rao M. Uppi; William A Pryor; S. N. Murthy. (Org.). *Free Radicals and Antioxidant Protocols*. 2 ed. Totowa: The Humana Press Inc., 2010.

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

PREETZ, C. et al. Preparation and characterization of biocompatible oil-loaded polyelectrolyte nanocapsules. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 4, p. 106-114, 2008.

RANG; DALE. **Farmacologia**. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

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

RIBEIRO, L. S. S. et al. In vitro controlled release of vinpocetine-cyclodextrin-tartaric acid multicomponent complexes from HPMC swellable tablets. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 325-339, 2005.

RIBEIRO, R. F. et al. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 875-884, 2016.

RIGO, L. A. et al. Influence of the type of vegetable oil on the drug release profile from lipid-core nanocapsules and in vivo genotoxicity study. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 7450, n. 7, p. 789-798, 2014.

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

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

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

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

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

SALGADO, J.M. et al. O óleo de abacate (*Persea americana Mill*) como matéria-prima para a indústria alimentícia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 20-26, 2008.

SANTOS, S.S. et al. Clotrimazole-loaded Eudragit[®] RS100 nanocapsules: preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 1389, 2013.

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

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

SCHAFFAZICK, S.R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n.5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1-2, p. 209–213, 2005.

SCHULTZE, E. et al. Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, p. 55-63, 2014.

SHARMA, A; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 123-140, 1997.

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

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

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

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

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

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

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – Parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-1-6, 2012.

SZABÓ, L. et al. New route to the stereo selective synthesis of (+)- vincamine, (-)- vincamone and (+)-apovincaminic acid esters. **Tetrahedrom**, v. 39, p. 3337-3747, 1893.

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

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

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

TORRES, C. V. Epilepsia. **Medicine**, v. 11, n. 73, p. 4364-4373, 2015.

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

WANG, A. et al. *In situ* synthesis of copper nanoparticles within ionic liquid-in-vegetable oil microemulsions and their direct use as high efficient nanolubricants. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 45251-45257, 2014.

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

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1217-1256, 2010.

XIA, H. et al. Penetratin-functionalized PEG-PLA nanoparticles for brain delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 840-850, 2012.

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

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

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

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

YANG, H. Nanoparticle-Mediated Brain-Specific Drug Delivery, Imaging, and Diagnosis. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 1759-1771, 2010.

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

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