

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

Patrícia Garcia Pinheiro

**DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE VIMPOCETINA
ASSOCIADA A NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**

Santa Maria, RS
2016

Patrícia Garcia Pinheiro

**DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE VIMPOCETINA ASSOCIADA A
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**

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

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

Santa Maria, RS
2016

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

Pinheiro, Patrícia Garcia
DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE VIMPOCETINA
ASSOCIADA A NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS / Patrícia Garcia
Pinheiro.-2016.
114 f.; 30cm

Orientador: Scheila Rezende Schaffazick
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Vimpopcetina 2. Nanocápsulas 3. Granulação via
úmida 4. Comprimidos 5. Liberação Controlada I.
Schaffazick, Scheila Rezende II. Título.

Patrícia Garcia Pinheiro

**DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE VIMPOCETINA ASSOCIADA A
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**

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

Aprovado em 20 de maio de 2016:

Scheila Rezende Schaffazick, Dra. (UFSM)

(Presidente/Orientadora)

Aline Ferreira Ourique, Dra. (UNIFRA)

Andréa Inês Horn Adams, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS

2016

À minha família, por acreditar e investir em mim. À minha mãe que com seu cuidado e carinho me deu a esperança para seguir. Ao meu pai, pois sua presença e apoio me deram segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. Ao meu irmão e avós por todo amor e compreensão. Ao meu namorado pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, por guiar meus caminhos e me conceder saúde e força para seguir meus objetivos.

Aos meus pais, João e Josi, e ao meu irmão, Jr, por acreditarem em mim, por me dar todo o apoio necessário nos momentos difíceis, por compartilharem comigo as alegrias, por todo amor e carinho. À Leila e Fernando por toda amizade, carinho, paciência, conversas e risadas. Aos meus avós, pelo amor incondicional e por todo o apoio e incentivo.

Ao meu namorado, Ivan, pela compreensão e paciência durante esta jornada de 2 anos, pelo apoio e carinho nos momentos difíceis e por toda a alegria e incentivo para prosseguir.

À amiga, colega e professora Janice Giongo pelo incentivo, amizade, dedicação, orientação, conversas e momentos de descontração. À amiga e professora Loana pela ajuda e pela disponibilidade de emprestar o Span[®] 60. Aos mestres da minha graduação por todo apoio e incentivo. Aos meus amigos por entenderem a minha ausência, pelo apoio, por estarem sempre presentes nos momentos bons e ruins, pelas conversas, risadas e conselhos.

À minha orientadora Prof^ª Dr^ª Scheila Rezende Schaffazick que, mesmo sem me conhecer, me concedeu a oportunidade, pela confiança, por todos os ensinamentos que me fizeram crescer como profissional e pessoa, pela paciência e amizade.

À Prof^ª Dr^ª Letícia Cruz pelas colaborações, ensinamento e amizade. À Prof^ª Dr^ª Cristiane de Bona da Silva pela disponibilidade do equipamento Zetasizer. Ao Prof^º Dr^º Sérgio Luiz Dalmora e os seus alunos Clóvis e Rafaela pela análise de umidade e dureza.

À amiga Carolina, por toda a ajuda, por dias e noites no laboratório comigo, pela amizade, carinho e compreensão. Por todas as conversas, risadas e momentos que passamos nesses 2 anos. Por tornar as horas intermináveis de experimentos mais agradáveis.

À minha querida IC e amiga, Tainara, que chegou junto comigo ao laboratório, é estudiosa, inteligente e sempre disposta a ajudar e a saber mais. Tua ajuda durante o mestrado foi essencial para que eu concluísse essa caminhada. A companhia durante os longos experimentos, risadas e conversas, tornaram a jornada mais fácil. Agradeço também à Camila pela ajuda nos experimentos e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Natháli, Alessandra, Luana, Sabrina, Mailine, Juliane, Flabio, Marila, Milena, Taiane, Estevan, Allana, Cristina, Felipe, Fernanda, Laura, Luan, Verônica, Luis Eduardo, Daniela, Gabriele e Gabriela, agradeço o carinho com que me receberam no laboratório, a amizade, parceria, ajuda, descontração, mates e conversas. Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Farmacotécnica pelo coleguismo, auxílio e conversas.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas pela oportunidade. Ao CNPq e à CAPES pelo auxílio.

À FAPERGS pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e deram apoio ao longo desses 2 anos, muito obrigada.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE VIMPOCETINA ASSOCIADA A NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

AUTORA: Patrícia Garcia Pinheiro

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

A vimpocetina é um alcaloide derivado da vincamina, muito utilizada para o tratamento de doenças cerebrovasculares e cognitivas devido ao seu potente efeito neuroprotetor. Além disso, a vimpocetina também apresenta efeito antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral. Porém, possui baixa absorção no organismo e pouca solubilidade em água, limitando, assim, seu uso clínico. Sistemas nanoestruturados têm sido utilizados para aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos. Contudo, esses sistemas tendem a apresentar problemas de estabilidade durante o armazenamento. Assim, formas farmacêuticas sólidas têm sido desenvolvidas para contornar esses problemas, como os comprimidos. A obtenção dos comprimidos se dá por diferentes métodos, entre eles, a granulação via úmida, em que há a aglomeração de partículas para a formação de grânulos, utilizando um líquido de granulação. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver comprimidos de vimpocetina (2,5 mg) associada a nanocápsulas poliméricas de etilcelulose, empregando óleo de coco (OC) ou triglicerídeos de cadeia média (TCM) como núcleo, através da granulação via úmida, visando aumentar a biodisponibilidade oral desse fármaco. Além disso, objetivou-se realizar um estudo de estabilidade dos comprimidos e estudo de liberação do fármaco a partir dos sistemas desenvolvidos. Conforme os resultados, as suspensões de nanocápsulas apresentaram características físico-químicas adequadas (138-157 nm; - 11 a -18 mV) e elevada eficiência de encapsulamento. Entretanto, as suspensões apresentaram-se instáveis após 30 dias de armazenamento. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de formas sólidas utilizando esses sistemas como produtos intermediários para a produção de comprimidos, através da granulação via úmida, em que as nanocápsulas foram o líquido de granulação. Os granulados obtidos apresentaram características físico-químicas (teor de fármaco e diâmetro médio após ressuspensão em água) e tecnológicas (ângulo de repouso, índice de Carr e fator de Hausner) adequados. Os comprimidos desenvolvidos, a partir dos granulados, apresentaram baixa friabilidade, tempo de desintegração próximo a 1 minuto, dureza aceitável (8 a 11 N), teor de fármaco próximo a 100%, peso médio (550 mg) e espessura conforme o esperado. Estudo de estabilidade dos compactos demonstrou que não houve decaimento no teor de fármaco após 90 dias de armazenamento. Diferentes ensaios foram efetuados (difusão em sacos de diálise, diálise reversa e dissolução/aparato II), em tampão fosfato pH 6,8, para avaliar a liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das suspensões e/ou dos comprimidos. Os resultados demonstraram que as suspensões e os comprimidos contendo as nanocápsulas apresentaram perfil de liberação controlada da vimpocetina, em comparação a uma solução do fármaco, ao passo que comprimidos sem nanoestruturas apresentaram difusão/dissolução mais lenta em relação aos comprimidos nanotecnológicos, sendo que a metodologia empregada influenciou nos percentuais liberados. Em vista disso, pode-se concluir que os comprimidos contendo vimpocetina nanoencapsulada são sistemas promissores para o controle de liberação do fármaco.

Palavras-chave: Vimpocetina. Nanocápsulas. Óleo de coco. Triglicerídeos de cadeia média. Granulação via úmida. Comprimidos. Estabilidade. Liberação controlada.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF TABLETS CONTAINING VINPOCETINE-LOADED POLYMERIC NANOCAPSULES

AUTHOR: Patrícia Garcia Pinheiro

ADVISOR: Scheila Rezende Schaffazick

Vinpocetine is a derivative of the alkaloid vincamine, widely used for the treatment of cerebrovascular and cognitive disorders due to strong neuroprotective effect. Furthermore, Vinpocetine has also antioxidant, anti-inflammatory and antitumor effects. However, this drug has both low absorption and water solubility, limiting their clinical use. Nanostructures have been employed to increase the oral bioavailability of drugs. However, these systems can exhibit low stability during storage. In this sense, solid pharmaceutical dosage forms have been developed to minimize these problems, such as tablets. Tablets can be obtained by different methods, including the wet granulation, where there is the agglomeration of particles to form granules using a binder liquid. Hence, the objective of the present study was to develop tablets containing Vinpocetine (2,5 mg)-loaded ethylcellulose nanocapsules, using coconut oil (CO) or medium chain triglycerides (MCT) as the core, through the wet granulation, for increasing the oral bioavailability of this drug. Also, stability studies of tablets and experiments of in vitro drug release were performed. According to the results, the nanocapsule suspensions showed adequate physicochemical characteristics (138-157 nm; -11 a -18 mV) and high encapsulation efficiency. However, the suspensions were unstable after 30 days of storage. Thus, it is necessary to develop solid forms using these systems as intermediate products for the production of tablets by the wet granulation, acting as granulation liquid. The granules obtained showed suitable physico-chemical characteristics (drug content and mean diameter after resuspension in water) and adequate technological properties (angle of repose, Carr index and Hausner factor). The tablets developed from the granules showed low friability, disintegration time next to 1 minute, acceptable hardness (8 a 11 N), drug content close to 100%, average weight of 550 mg and thickness as expected. Stability studies of tablets showed no decrease in drug content after 90 days of storage. Different assays were performed (diffusion dialysis bags, reverse dialysis and dissolution/apparatus 2) to evaluate the in vitro Vinpocetine release from both suspensions and/or tablets, in phosphate buffer pH 6.8. The results demonstrate that the suspensions and tablets, containing the nanocapsules, exhibited controlled release of Vinpocetine as compared to the diffusion of free drug. Also, the tablets without nanostructures showed drug diffusion/dissolution slower than the nanotechnological tablets. The employed methodology can influence in the percentages of released drug. In view of this, it can be concluded that tablets containing Vinpocetine-loaded nanocapsules are promising systems for its controlled release.

Key-words: Vinpocetine. Nanocapsules. Coconut oil. Medium chain triglycerides. Wet granulation. Tablets. Stability. Controlled release

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da vimpocetina	24
Figura 2 – Desenho esquemático dos tipos de nanopartículas poliméricas	28
Figura 3 – Representação esquemática do método de deposição interfacial de polímero pré-formado	30
Figura 4 – Estrutura química da etilcelulose	34
Figura 5 – Representação esquemática do método de difusão em saco de diálise	37
Figura 6 – Representação esquemática da difusão reversa em membrana de diálise	38
Figura 7 – Representação esquemática da difusão lado a lado em membrana de diálise	39
Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos das formulações de nanocápsulas contendo vimpocetina (a) e das formulações sem o fármaco (b)	65
Figura 9 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das formulações desenvolvidas (n=3), obtidos através da espectroscopia de correlação de fótons	69
Figura 10 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas (n=3), obtidos através de difração a laser	69
Figura 11 – Gráficos do potencial zeta das formulações (n=3), obtidos através de eletroforese	70
Figura 12 – Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, após 30 dias de armazenamento	74
Figura 13 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas após 30 dias de armazenamento	75
Figura 14 – IPd das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, após 30 dias	76
Figura 15 – Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas após 30 dias de armazenamento	76
Figura 16 – Teor de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas, após o período de armazenamento	77
Figura 17 – Perfil de liberação in vitro da vimpocetina a partir das suspensões das nanocápsulas	79

Figura 18 – Foto dos sacos de diálise contendo a solução metanólica de vimpocetina após a formação dos cristais	79
Figura 19 - Aspecto macroscópico dos granulados obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina	82
Figura 20 - Imagens dos granulados contendo vimpocetina, obtidas através de microscópio óptico (aumento 40 vezes)	82
Figura 21 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas dos granulados (n=3), obtidos através da espectroscopia de correlação de fótons, após dispersão em água/filtração	85
Figura 22 – Aspecto macroscópico dos comprimidos (OC e TCM), após a preparação e 90 dias de armazenamento	91
Figura 23 – Teor de vimpocetina nos comprimidos preparados com NC-OC e NC-TCM obtido no estudo de estabilidade	92
Figura 24 – Perfil de liberação da vimpocetina a partir dos comprimidos contendo ou não nanocápsulas, empregando difusão reversa em sacos de diálise	94
Figura 25 – Perfil de liberação da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas, em comparação com a solução metanólica do fármaco, por diálise reversa	96
Figura 26 – Perfil de liberação das suspensões vs comprimidos contendo vimpocetina nanoencapsulada	97
Figura 27 – Comparação entre os perfis de liberação/difusão da vimpocetina, a partir das suspensões de nanocápsulas ou da solução, obtidos através da diálise convencional e reversa	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição quali-quantitativa das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina	48
Tabela 2 – Composição quali-quantitativa dos granulados contendo vimpocetina nanoencapsulada	54
Tabela 3 - Repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão entre-dia das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina	66
Tabela 4 – Análise de exatidão das suspensões de nanocápsulas	67
Tabela 5 – Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas (n=3) contendo vimpocetina (3,0 mg/mL), formadas com OC ou TCM, logo após a preparação	68
Tabela 6 – Mecanismo de liberação da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas	80
Tabela 7 - Características físico-químicas e tecnológicas dos granulados contendo vimpocetina (3,0 mg/mL) associada às nanocápsulas, preparadas com OC ou TCM	84
Tabela 8 – Repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão entre-dia dos granulados contendo vimpocetina nanoencapsulada	87
Tabela 9 – Análise de exatidão dos granulados contendo vimpocetina nanoencapsulada	88
Tabela 10 – Friabilidade, dureza e tempo de desintegração dos comprimidos contendo vimpocetina nanoencapsulada	89
Tabela 11 – Caracterização dos comprimidos contendo vimpocetina (2,5 mg) associada às nanocápsulas (n=3)	90
Tabela 12 – Comparação entre a dissolução e a diálise reversa dos comprimidos de vimpocetina (2,5 mg)	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE-UV ultravioleta	Cromatografia a líquido de alta eficiência; detecção na região ultravioleta
CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
CMC 102	Celulose microcristalina 102
CP-GR-NC-OC-BR	Comprimidos preparados com granulados obtidos a partir de nanocápsulas de óleo de coco sem fármaco
CP-GR-NC-TCM-BR	Comprimidos preparados com granulados obtidos a partir de nanocápsulas de triglicerídeos de cadeia média sem fármaco
CP-GR-NC-OC	Comprimidos preparados com granulados obtidos a partir de nanocápsulas contendo vimpocetina e óleo de coco
CP-GR-NC-TCM	Comprimidos preparados com granulados obtidos a partir de nanocápsulas contendo vimpocetina e triglicerídeos de cadeia média
CP S/NC	Comprimidos de vimpocetina sem nanocápsulas (forma não encapsulada)
DPR	Desvio padrão relativo
D _{4,3}	Diâmetro médio de volume
D _{3,2}	Diâmetro médio de superfície
EE	Eficiência de encapsulamento
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
FA	Fase aquosa
FH	Fator de Hausner
FO	Fase orgânica
GR-NC-OC-BR	Granulados preparados a partir de suspensões de nanocápsulas com óleo de coco sem fármaco
GR-NC-TCM-BR	Granulados preparados a partir de suspensões de nanocápsulas com triglicerídeos de cadeia média sem fármaco
GR-NC-OC	Granulados obtidos a partir de suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, preparadas com óleo de coco

GR-NC-TCM	Granulados obtidos a partir de suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, preparadas com triglicerídeos de cadeia média
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IC	Índice de Carr
IPd	Índice de polidispersão
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NC-OC	Suspensões de Nanocápsulas contendo vimpocetina e com óleo de coco
NC-OP palma	Suspensões de Nanocápsulas contendo vimpocetina e com óleo de palma
NC-TCM de cadeia média	Suspensões de Nanocápsulas contendo vimpocetina e com triglicerídeos
OC	Óleo de coco
OP	Óleo de palma
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PEG 6000	Polietilenoglicol 6000
PVP K-30	Polivilpirrolidona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1	VIMPOCETINA	23
3.2	SISTEMAS NANOESTRUTURADOS E A ASSOCIAÇÃO À VIMPOCETINA	26
3.3	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	28
3.4	ETILCELULOSE	32
3.5	ÓLEO DE COCO	34
3.6	LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS A PARTIR DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS	35
3.8	COMPRIMIDOS	40
3.9	GRANULAÇÃO VIA ÚMIDA	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	MATERIAIS	45
4.1.1	Matérias-primas	45
4.1.2	Solventes e outros materiais	45
4.1.3	Equipamentos	46
4.2	MÉTODOS	47
4.2.1	Preparação dos sistemas nanoestruturados	47
4.2.2	Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas	48
4.2.3	Validação do método analítico por CLAE-UV para quantificação da vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas	50
4.2.4	Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina ...	52
4.2.5	Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina	52
4.2.6	Preparação dos granulados a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina	53
4.2.7	Caracterização dos granulados produzidos a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina	54

4.2.8	Validação de método analítico por CLAE-UV para a quantificação de vimpocetina nos granulados desenvolvidos	56
4.2.9	Preparação dos comprimidos contendo vimpocetina (2,5 mg) associada às nanocápsulas.....	58
4.2.10	Caracterização dos comprimidos contendo vimpocetina associada a nanocápsulas.....	58
4.2.11	Estudo de estabilidade dos comprimidos contendo vimpocetina nanoencapsulada.....	59
4.2.12	Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> da vimpocetina a partir dos comprimidos.....	59
4.2.13	Ensaio de dissolução dos comprimidos contendo vimpocetina.....	60
4.2.14	Análise estatística	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	DESENVOLVIMENTO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA	63
5.2	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DA VIMPOCETINA NAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS	64
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA.....	67
5.4	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA	73
5.5	LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA VIMPOCETINA A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PELA TÉCNICA DE DIFUSÃO EM SACO DE DIÁLISE.....	78
5.6	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GRANULADOS A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA.....	81
5.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DA VIMPOCETINA NOS GRANULADOS.....	86
5.8	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPRIMIDOS CONTENDO VIMPOCETINA ASSOCIADA ÀS NANOCÁPSULAS.....	88
5.9	ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS COMPRIMIDOS CONTENDO VIMPOCETINA NANOENCAPSULADA	91

5.10 ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA VIMPOCETINA A PARTIR DOS COMPRIMIDOS	92
5.11 ESTUDO COMPARATIVO DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA VIMPOCETINA ATRAVÉS DOS SISTEMAS DESENVOLVIDOS	95
5.12 DISSOLUÇÃO DOS COMPRIMIDOS DE VIMPOCETINA ASSOCIADA OU NÃO ÀS NANOCÁPSULAS.....	99
6 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

A vimpocetina é um alcaloide derivado da vincamina que possui um potente efeito neuroprotetor, sendo utilizada para tratamento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e acidente vascular cerebral (AVC) (JINCAI et al., 2014; LI et al., 2014; PATYAR et al., 2011; WANG et al., 2014). Estudos ainda evidenciaram a atividade antioxidante da vimpocetina devido à inibição do Fe^{2+} /ascorbato (BÖNÖCZK et al., 2000; PEREIRA et al., 2003). No entanto, pesquisas demonstram que a vimpocetina possui baixa biodisponibilidade oral devido a sua reduzida solubilidade em água e ao seu extensivo metabolismo de primeira passagem (VERECZKEY, 1985; ZHUANG et al., 2010). Neste sentido, complexos de inclusão e sistemas nanoestruturados, baseados em lipídios, têm sido desenvolvidos, objetivando o aumento da biodisponibilidade oral desta substância (LUO et al., 2006; RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2005; RIBEIRO et al., 2007; ZHUANG et al., 2010). Além disto, em função da sua curta meia-vida biológica e necessidade de administração muitas vezes crônica, torna-se interessante o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação controlada, aumentando seu valor clínico em relação a formas farmacêuticas convencionais (RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2005).

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que possuem diâmetro inferior a 1 μm , dentre os quais se incluem as nanocápsulas, que são sistemas vesiculares (*core-shell*), formados por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso (COUVREUR et al., 2002; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Essas nanopartículas têm sido pesquisadas para a liberação modificada de fármacos (FRIEDRICH et al., 2010a), na veiculação de substâncias pouco solúveis, na vetorização de fármacos, aumentando o índice terapêutico, na proteção de substâncias lábeis no trato gastrointestinal e aumento da biodisponibilidade (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010). Além disto, nanoestruturas poliméricas são importantes estratégias para a liberação cerebral (vetorização) de fármacos, objetivando aplicações em doenças neurológicas (KREUTER, 2012; RONEY et al., 2005).

Óleos vegetais, com elevados teores de substâncias antioxidantes, apresentam potencial para serem empregados como núcleo oleoso na preparação de nanocápsulas. Destacam-se efeitos antioxidantes benéficos do óleo de coco, os quais têm sido comprovados

contra condições de estresse oxidativo (GANAFSA et al., 2002; MARINA; CHE MAN; AMIN, 2009; MARINA et al., 2009).

Os sistemas nanoestruturados apresentam limitada estabilidade em função de longo tempo de armazenamento, por se tratarem de sistemas líquidos aquosos, fato que limita a aplicabilidade industrial, devido à degradação de componentes e à agregação e sedimentação das partículas. Assim, estudos têm sido direcionados a obter formas farmacêuticas sólidas contendo nanoestruturas, empregando métodos de secagem por aspersão (*spray-drying*) (CARNEIRO et al., 2013; HONG et al., 2014; SCHAFFAZICK et al., 2003a; WANG et al., 2012) ou liofilização (SCHAFFAZICK et al., 2003a, 2003b; WANG et al., 2012), incluindo, ainda, a conversão em granulados e/ou comprimidos (FRIEDRICH et al., 2010a, 2010b; RACHMAWATI; YEE; RAHMA, 2014).

Formas farmacêuticas sólidas são muito comuns para a administração oral de medicamentos, uma vez que possuem vantagens quando comparadas a outras formas farmacêuticas, principalmente no que se refere à estabilidade desses produtos, além da maior adesão ao tratamento por parte dos pacientes (AULTON, 2005; BANKER; ANDERSON, 2001; PRISTA, 2011; WENING; BREITKREUTZ, 2011). A produção de comprimidos pode se dar por diferentes maneiras, dentre elas, a granulação via úmida, a qual utiliza um líquido de granulação para a formação de uma massa úmida após a mistura seca dos componentes pulverosos da formulação (AULTON, 2005; PRISTA, 2011). Alguns estudos têm reportado a obtenção de comprimidos a partir de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo dexametasona (FRIEDRICH et al., 2010a, 2010b; RACHMAWATI; YEE; RAHMA, 2014), ambas como líquido de granulação.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu, pela primeira vez, suspensões e liofilizados de nanocápsulas poliméricas (etilcelulose), utilizando o óleo de coco ou os triglicerídeos de cadeia média (TCM) como núcleo, para promover o controle de liberação da vimpocetina (BOLSON, 2015). Neste contexto, o presente trabalho baseou-se no desenvolvimento de granulados e de comprimidos, através de granulação via úmida, utilizando suspensões de nanocápsulas de etilcelulose contendo vimpocetina como líquido de granulação, tendo em vista o potencial destes sistemas coloidais poliméricos no incremento da biodisponibilidade oral e no controle da liberação de substâncias ativas associadas. Difusão em sacos de diálise, diálise reversa e dissolução/aparato II foram as técnicas empregadas para avaliar a liberação da vimpocetina a partir das formulações desenvolvidas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetivou preparar e caracterizar físico-quimicamente comprimidos de vimpocetina associada a nanocápsulas poliméricas, através da técnica de granulação via úmida, visando melhorar a estabilidade dos sistemas nanoestruturados e avaliar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco, a partir dos sistemas líquidos e sólidos desenvolvidos, empregando diferentes metodologias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina (3,0 mg/mL), pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, utilizando etilcelulose como polímero e TCM ou óleo de coco como núcleo;
- Caracterizar as formulações coloidais quanto ao tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas, potencial zeta, pH, teor, eficiência de encapsulamento da vimpocetina e conduzir um estudo de estabilidade durante 30 dias;
- Avaliar o perfil de liberação da vimpocetina utilizando a técnica de difusão em sacos de diálise, em comparação ao fármaco livre;
- Preparar granulados, a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, e caracterizá-los físico-quimicamente, além de avaliar propriedades tecnológicas;
- Preparar comprimidos de vimpocetina (2,5 mg) a partir dos granulados desenvolvidos;
- Caracterizar os comprimidos quanto à umidade, teor de fármaco, friabilidade, dureza, tempo de desintegração, peso médio e espessura;
- Avaliar a estabilidade dos comprimidos durante 3 meses.

- Realizar estudos de liberação da vimpocetina, a partir dos comprimidos, através da técnica de difusão em sacos de diálise reversa, em comparação à suspensão de nanocápsulas e a um comprimido sem nanoestruturas, em tampão fosfato pH 6,8;
- Avaliar a dissolução da vimpocetina incorporada nos comprimidos, empregando dissolutor e aparato II, em tampão fosfato pH 6,8, para fins comparativos.

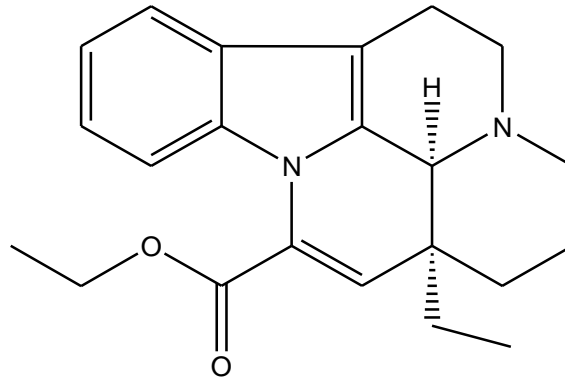
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 VIMPOCETINA

A vimpocetina (figura 1) é um fármaco etil éster sintético, derivado do alcaloide vincamina, extraída das folhas da *Vinca minor* (FEIGIN et al., 2001; PATYAR et al., 2011; RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015; SHARMA; DESHMUKH, 2015; VERECZKEY, 1985). Em 1978, este fármaco começou a ser comercializado na Hungria, com o nome comercial de Cavinton[®], para prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas e cognitivas, sendo, atualmente, comercializado em diversos países na forma de comprimidos orais de 5 mg, como estimulante da memória (BÖNÖCZK et al., 2000; CAI; LI; YAN, 2013; LIN et al., 2014; MEDINA, 2010; PATYAR et al., 2011). No Brasil, a vimpocetina é comercializada como Vicog[®] (5 mg - Marjan Indústria e Comércio LTDA). A vimpocetina tem sido estudada e revelada como um potente neuroprotetor, pois reduz a lesão neuronal em condições de hipóxia e isquemia, melhora a microcirculação sanguínea, diminui a agregação plaquetária, aumenta a absorção de oxigênio e a utilização de glicose pelo cérebro, previne a morte celular induzida por excitotoxinas. Além disso, é descrita como anticonvulsivante, antioxidante, suplemento dietético para memória e anti-inflamatório (GÓMEZ; BUIJS; SITGES, 2014; JINCAI et al., 2014; MISKOLCZI et al., 1990; PATYAR et al., 2011; PEREIRA et al., 2003; RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015; SHARMA; DESHMUKH, 2015). Sendo assim, ela é empregada para tratamento de doenças cerebrais degenerativas como acidente vascular cerebral (AVC) agudo, disfunção cerebral senil, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (JINCAI et al., 2014; LI et al., 2014; PATYAR et al., 2011; PEREIRA et al., 2003; ZAITONE; ABO-ELMATTY; ELSHAZLY, 2012; ZHUANG et al., 2010).

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

Figura 1 – Estrutura química da vimpocetina



Estudos revelam que a vimpocetina parece ter múltiplos alvos celulares, dentre eles a fosfodiesterase (PDE), canais de Na^+ dependentes de voltagem, canais de Ca^{2+} e receptores de glutamato (BÖNÖCZK et al., 2000; MEDINA, 2010; PATYAR et al., 2011; PEREIRA et al., 2003; RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015; SHARMA; DESHMUKH, 2015). Os efeitos vasculares, como a melhora na circulação cerebral, diminuição da agregação plaquetária e melhor fluidez dos glóbulos vermelhos pelo uso da vimpocetina, devem-se à inibição da fosfodiesterase-GMPc Ca^+ /calmodulim-dependente, induzindo ao aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (BÖNÖCZK et al., 2000; JINCAI et al., 2014; PEREIRA et al., 2003). A neuroproteção e a atividade anticonvulsivante da vimpocetina podem ser atribuídas ao seu mecanismo de inibir, seletivamente, canais de Na^+ dependentes de voltagem, bloqueando assim, o acúmulo de Na^+ nos neurônios e diminuindo o dano da lesão de reperfusão e o efeito tóxico do estresse oxidativo (BÖNÖCZK et al., 2000; GÓMEZ; BUIJS; SITGES, 2014; PATYAR et al., 2011; PEREIRA et al., 2003). A vimpocetina também apresenta efeitos antioxidantes devido à inibição do ascorbato/ Fe^{2+} , estimulando o consumo de oxigênio e reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica (BÖNÖCZK et al., 2000; PATYAR et al., 2011; PEREIRA et al., 2003; SHARMA; DESHMUKH, 2015).

Em 2008, Nekrassov e Sitges compararam os efeitos agudo, crônico e de pós-tratamento da carbamazepina, um antiepiléptico clássico, com a vimpocetina, em convulsões induzidas por 4-aminopiridina. Este estudo foi realizado em porcos divididos em grupo controle, grupo que recebeu carbamazepina (17 mg/kg) e grupo que recebeu vimpocetina (3

mg/kg). Os animais foram avaliados através do teste de potencial evocado auditivo e encefalograma, antes e após receber 4-aminopiridina e após os tratamentos. Os resultados demonstraram que metade dos animais tratados com vimpocetina não apresentaram convulsões até 1 mês após a retirada deste fármaco, evidenciando, assim, vantagem da vimpocetina sobre a carbamazepina no controle de crises, prevenção e complicações da epilepsia. Além disso, a vimpocetina preveniu a sensibilidade auditiva induzida por 4-aminopiridina em uma menor concentração quando comparada com a carbamazepina.

Estudos mais recentes demonstram que a vimpocetina pode reduzir parcialmente a deposição lipídica e a lesão causada pela arteroesclerose em ratos, através da diminuição de receptores da lipoproteína de baixa densidade oxidada (ox-LDL), como o receptor LOX-1, e da inibição da captação ox-LDL (CAI; LI; YAN, 2013). Neste estudo, ratos foram alimentados com dieta normal ou dieta com alto teor de colesterol por 16 semanas, e, durante este tempo, os animais receberam, via intraperitoneal, vimpocetina (5 mg/kg) ou veículo. Após esse período, a formação da lesão arterosclerótica, pressão arterial, colesterol, acúmulo de ox-LDL, entre outros parâmetros, foram analisados e foi evidenciado que os animais tratados com vimpocetina apresentaram melhores resultados (CAI; LI; YAN, 2013). Trabalhos recentemente realizados demonstraram que a vimpocetina também possui atividade anti-inflamatória e antitumoral (HUANG et al., 2012; MEDINA, 2010; PATYAR et al., 2011; WANG et al., 2014).

Entretanto, estudos evidenciaram que, por possuir baixa solubilidade em água, a vimpocetina apresenta baixa biodisponibilidade oral em humanos cerca de 7%, além de sofrer um extensivo metabolismo de primeira passagem quando administrada por via oral, transformando-se em seu principal metabólito, o ácido apovincamínico. Quando administrada após a ingestão de alimentos, a biodisponibilidade da vimpocetina possui uma melhora significativa, porém ainda muito baixa, além disso, sua meia-vida é curta, cerca de duas horas, após a administração oral, sendo necessária, então, administrações frequentes. Neste contexto, os fatores acima acabam por limitar o uso clínico da vimpocetina (BÖNÖCZK et al., 2000; PATYAR et al., 2011; SZAKÁCS; VERES; VERECZKEY, 2001; VERECZKEY, 1985; ZHUANG et al., 2010). Com isso, tem-se desenvolvido sistemas diferenciados, na tentativa de melhorar a biodisponibilidade deste fármaco (LIN et al., 2014; LUO et al., 2006; ZHUANG et al., 2010) e/ou controlar a liberação do mesmo (EL-DAHMY et al., 2014; RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2005; RIBEIRO et al., 2007).

3.2 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS E A ASSOCIAÇÃO À VIMPOCETINA

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar que pode ser aplicada em diversos setores, inclusive o farmacêutico, e tem como finalidade manipular estruturas em nanoescala e integrá-las para formar componentes e sistemas maiores (FERREIRA; RANGEL, 2009; QUINA, 2004; TEDESCO; SIMIONI; PRIMO, 2007). O nanoencapsulamento de fármacos tem sido utilizado como proposta para melhorar a biodisponibilidade, diminuir a toxicidade, aumentar o índice terapêutico, além de proteger o fármaco contra a degradação e realizar sua vetorização (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; TEDESCO; SIMIONI; PRIMO, 2007). Com isso, novas técnicas de liberação e vetorização de fármacos em sítios específicos têm sido propostas, apresentando vantagens quando comparadas aos sistemas convencionais, como a liberação progressiva e controlada de fármacos, que proporciona maior eficácia terapêutica, diminuição dos efeitos tóxicos da substância ativa, maior tempo de circulação sistêmica, menor frequência de administração de doses, entre outras (GUTERRES; BENVENUTTI; POHLMANN, 2012; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; TEDESCO; SIMIONI; PRIMO, 2007).

Sistemas baseados em ciclodextrinas (RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2005, 2003; RIBEIRO et al., 2007), nanopartículas lipídicas sólidas (LUO et al., 2006), prolipossomas (XU et al., 2009), carreadores lipídicos nanoestruturados (ZHUANG et al., 2010), ciclodextrinas associadas a carreadores lipídicos nanoestruturados (LIN et al., 2014), micelas poliméricas (EL-DAHMY et al., 2014) e nanocápsulas (BOLSON, 2015) têm sido desenvolvidos na tentativa de aumentar a biodisponibilidade oral da vimpocetina e/ou controlar a sua liberação.

Luo e colaboradores, em 2006, desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo vimpocetina na concentração de 1,0 mg/mL. As características físico-químicas foram analisadas, obtendo-se tamanho médio de partículas de 70 a 200 nm, potencial zeta de -17 mV a -40 mV, e eficiência de encapsulamento de 97% a 99%. Duas formulações foram selecionadas para avaliação da estabilidade, após seis meses e um ano de armazenamento a 4°C, em que não se observou um aumento significativo no tamanho médio de partículas, tendo uma mínima redução (aproximadamente 2%) na eficiência de encapsulamento. Também foi realizado um estudo de farmacocinética por via oral, conduzido em ratos machos,

e os resultados indicaram que as NLS apresentaram biodisponibilidade oral da vimpocetina quatro vezes maior que a do fármaco livre.

Nos estudos de Zhuang e colaboradores, em 2010, a vimpocetina foi associada a carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN_s), na concentração de 1,0 mg/mL, pelo método de homogeneização a alta pressão, utilizando diferentes lipídios e tensoativos. As formulações apresentaram tamanho médio de partículas de 107 a 177 nm, potencial zeta de -13 mV a -25 mV, e eficiência de encapsulamento de 83% a 95%. No ensaio de liberação *in vitro*, observou-se que a vimpocetina ficou retida no sistema (CLN_s), apresentando um perfil de liberação sustentada do fármaco, sem efeito *burst*, em pH 6,8. O estudo de farmacocinética *in vivo*, em ratos Wistar, através da administração oral, demonstrou que a biodisponibilidade relativa da formulação nanoestruturada foi 322% maior em comparação com a suspensão de vimpocetina, sendo promissora na otimização da sua biodisponibilidade.

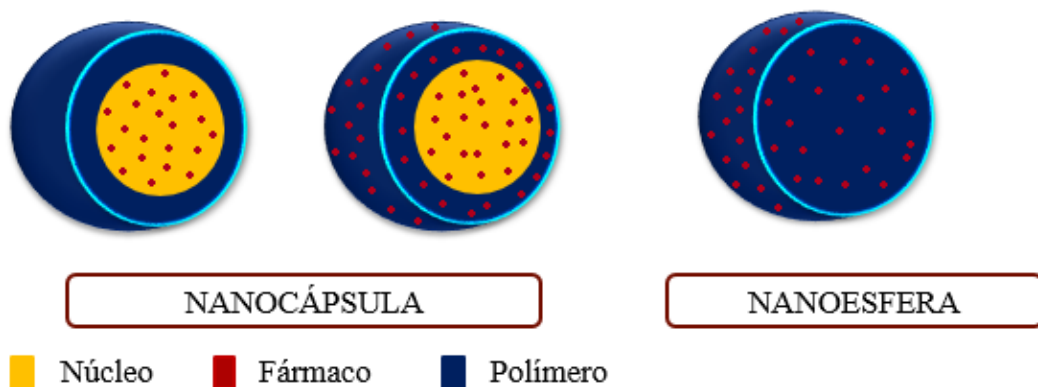
Em outro estudo, Lin e colaboradores (2014) associaram a vimpocetina a ciclodextrinas incorporadas a CLNs (5,0 mg), com a finalidade de melhorar a absorção oral do fármaco, e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade. As formulações desenvolvidas apresentaram tamanho médio de partículas entre 89 e 152 nm, potencial zeta de -12,5 a +13,1 mV, índice de polidispersão (IPd) entre 0,14 e 0,44 e eficiência de encapsulamento de 59,4 a 85,7%. Nos estudos de farmacocinética, realizados em coelhos machos, os CLNs contendo vimpocetina, associada à β -ciclodextrina e ácido tartárico apresentaram biodisponibilidade relativa de 592% comparada ao fármaco livre.

Recentemente, Bolson (2015), em nosso grupo de pesquisa, desenvolveu nanocápsulas contendo vimpocetina (1,0 mg/mL), empregando como polímero a etilcelulose e como núcleo o TCM ou o óleo de coco (OC). As formulações apresentaram diâmetro médio de partículas entre 113 e 169 nm, índice de polidispersão (IPd) inferior a 0,2, caracterizando o sistema como homogêneo, potencial zeta negativo, eficiência de encapsulamento próxima a 100% e teor de fármaco de cerca de 95%. Além disso, foram realizados estudos de liberação *in vitro*, pela técnica de difusão em sacos de diálise, em que as formulações desenvolvidas foram comparadas a uma solução do fármaco livre, demonstrando que as nanocápsulas controlaram a liberação da vimpocetina (44 a 64% em 72 horas) em comparação ao fármaco livre (100% em 15 horas).

3.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos com diâmetro submicrométrico (inferior a 1 μm) e incluem nanocápsulas e nanoesferas (Figura 2) (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; BENVENUTTI; POHLMANN, 2012; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; TEDESCO; SIMIONI; PRIMO, 2007). As nanocápsulas diferem das nanoesferas pela organização estrutural e pela presença de um núcleo, oleoso ou aquoso (GUTERRES; BENVENUTTI; POHLMANN, 2012; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; PLAPIED et al., 2011; TEDESCO; SIMIONI; PRIMO, 2007). As nanoesferas são sistemas matriciais, em que o fármaco encontra-se disperso no polímero, ou seja, está retido ou adsorvido na matriz polimérica, enquanto que, as nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o fármaco encontra-se confinado em uma cavidade envolta por uma membrana polimérica. Entretanto, além do fármaco poder dissolver-se no núcleo oleoso, pode ficar adsorvido à parede polimérica (COUVREUR et al., 2002; PLAPIED et al., 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003a; TEDESCO; SIMIONI; PRIMO, 2007).

Figura 2 – Desenho esquemático dos tipos de nanopartículas poliméricas



Estudos têm sido realizados com o propósito de demonstrar que nanopartículas poliméricas são sistemas potenciais para aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos com baixa solubilidade ou controlar sua liberação (ITALIA et al., 2007; JANA et al., 2015; MORA-HUERTAS et al., 2012; MORGEN et al., 2012), até mesmo associando essas nanoestruturas a comprimidos através da granulação via úmida (FRIEDRICH et al., 2010a, 2010b). Além disto, nanoestruturas poliméricas têm resultado em importantes estratégias para a veiculação de substâncias neuroprotetoras e antioxidantes, a fim de proporcionar estabilidade ao ativo encapsulado, controlar a liberação do fármaco e potencializar seus efeitos terapêuticos (BRENDLE, 2013; CORADINI et al., 2014; NORONHA et al., 2013; ROUSSAKI et al., 2014; SCHAFFAZICK et al., 2005, 2008).

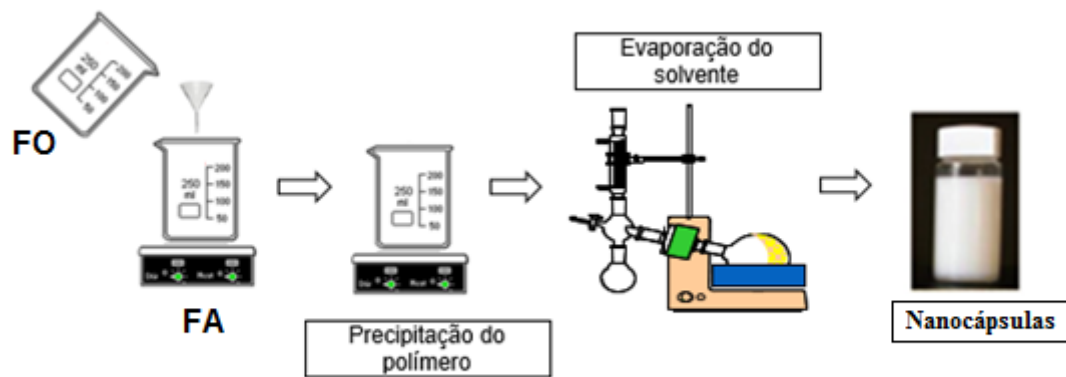
As nanocápsulas de núcleo oleoso são constituídas por: a) um polímero, sintético ou natural, sendo que para a administração oral deve ser obrigatoriamente biocompatível; b) um ou dois tensoativos (de alta e baixa hidrofília), que são importantes para a estabilização dos sistemas formados, prevenindo ou retardando a aglomeração das partículas; c) um óleo; d) uma substância ativa a encapsular (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; RONEY et al., 2005).

A escolha do núcleo oleoso é de fundamental importância no desenvolvimento de nanocápsulas, uma vez que, dependendo da tensão interfacial, viscosidade e concentração, podem influenciar o tamanho das partículas formadas, além de influenciar diretamente na capacidade de encapsulamento de fármacos. Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) são muito utilizados na preparação de nanocápsulas, assim como os óleos vegetais, devido à capacidade de solubilizar diversos fármacos. Cabe ressaltar que os requisitos para a escolha dos óleos, como matérias-primas para a preparação de nanocápsulas, são ausência de toxicidade, boa capacidade de dissolução dos fármacos a serem encapsulados e não serem capazes de solubilizar o polímero formador das partículas (BADEA et al., 2015; COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS et al., 2012; SANTOS et al., 2014; SCHAFFAZICK et al., 2003a).

Existem diferentes métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas, baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilatos de alquila), ou na precipitação de polímeros pré-formados, sendo que neste último, o polímero já está formado no momento da preparação das nanopartículas (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al.,

2003a; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Um dos métodos mais utilizados para a veiculação de fármacos lipofílicos em nanocápsulas é a deposição interfacial de polímero pré-formado, em que a fase orgânica, contendo um polímero, um tensoativo de baixa hidrofília (opcional), um óleo e um fármaco, dissolvidos em um solvente orgânico miscível em água, é vertida lentamente em uma fase aquosa, contendo um tensoativo de alta hidrofília, levando à formação instantânea de vesículas devido à emulsificação espontânea, enquanto o solvente difunde-se para a fase aquosa. Assim, o polímero, insolúvel na fase aquosa e no óleo, precipita na interface e por fim, o solvente orgânico é evaporado sob pressão reduzida para ajuste final da concentração do fármaco (Figura 3) (FESSI et al., 1989; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

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



Fonte: Próprio autor

Após o preparo das nanopartículas, é de fundamental importância realizar a caracterização físico-química, pois se verifica a adequação dos sistemas formados às aplicações delineadas (FONTANA et al., 2014; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; WU; ZHANG; WATANABE, 2011). A caracterização das

nanopartículas apresenta algumas dificuldades técnicas devido ao seu tamanho reduzido, sendo necessário utilizar, simultaneamente, várias análises físico-químicas, tornando o processo multidisciplinar e complexo (FONTANA et al., 2014; GUTERRES; BENVENUTTI; POHLMANN, 2012; MORA-HUERTAS et al., 2012; SCHAFFAZICK et al., 2003a; WU; ZHANG; WATANABE, 2011). A determinação das características físico-químicas desses sistemas envolve a avaliação macroscópica e morfológica, a determinação do pH, da densidade, do potencial zeta, do diâmetro médio das partículas e do índice de polidispersão (IPd). A eficiência de encapsulamento do fármaco ao sistema carreador e a cinética de liberação do mesmo também são aspectos fundamentais que devem ser avaliados (FONTANA et al., 2014; MORA-HUERTAS et al., 2012; PLAPIED et al., 2011; ROUSSAKI et al., 2014).

A avaliação macroscópica das suspensões se dá através da visualização de um fluido branco opaco, com um reflexo azulado (efeito Tyndall), já a avaliação morfológica é realizada através de microscopia eletrônica, onde as nanocápsulas, geralmente, apresentam forma esférica (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). O diâmetro médio de partículas e o IPd podem ser determinados por espectroscopia de correlação de fótons e, geralmente, as suspensões apresentam IPd baixo, denotando homogeneidade do sistema, e diâmetros entre 100 e 500 nm (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MOHANRAJ; CHEN, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As características de superfície das nanopartículas manifestam-se pela composição e organização dos componentes na interface das mesmas e podem ser avaliadas através do potencial zeta, que reflete o potencial elétrico de superfície, podendo ser positivo ou negativo, dependendo da natureza do polímero. Este parâmetro é importante pois possui relação com a estabilidade do sistema formado, ou seja, potenciais zeta de valor elevado (em módulo) são indicativos de repulsão entre as partículas, dificultando, assim, a agregação dos mesmos (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MOHANRAJ; CHEN, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A eficiência de encapsulamento determina a capacidade que o carreador formado possui em associar o fármaco desejado, e isso depende das características físico-químicas do sistema formado, do seu modo de preparo e das características do fármaco. Para nanocápsulas com núcleo oleoso é interessante que o fármaco seja hidrofóbico e possua alta solubilidade no óleo escolhido. A eficiência de encapsulamento pode ser calculada pela diferença entre o teor total de fármaco existente na suspensão e a concentração de fármaco livre no sistema

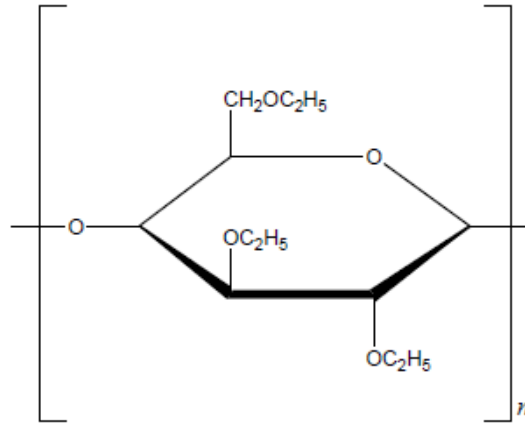
(MOHANRAJ; CHEN; CHEN, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Por sua vez, o percentual de fármaco a ser liberado pelo nanocarreador depende da degradabilidade do polímero utilizado, da solubilidade do fármaco e da sua difusão através da parede polimérica, ou seja, substâncias ativas adsorvidas à superfície das nanocápsulas tendem a ser liberadas mais rapidamente do que aquelas confinadas no núcleo (MOHANRAJ; CHEN, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

No entanto, os sistemas nanoestruturados tendem a apresentar limitada estabilidade após longo tempo de armazenamento, pois são sistemas líquidos aquosos, fato que limita a aplicabilidade industrial, devido à possibilidade de degradação de componentes, agregação e sedimentação das partículas. Em função disto, pesquisas têm sido conduzidas visando à obtenção de formas farmacêuticas sólidas contendo os nanossistemas, empregando métodos de secagem por aspersão (*spray-drying*) (CARNEIRO et al., 2013; HONG et al., 2014; SCHAFFAZICK et al., 2003a; WANG et al., 2012) ou liofilização (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003a, 2003b; WANG et al., 2012) ou, ainda, convertendo-os em granulados e/ou comprimidos (FRIEDRICH et al., 2010a, 2010b; RACHMAWATI; YEE; RAHMA, 2014).

3.4 ETILCELULOSE

A etilcelulose (Figura 4) é um polímero semissintético, biocompatível, derivado da celulose em que alguns grupamentos hidroxila são modificados para grupamento etil éter, sendo assim, também chamada de etil éter de celulose (MURTAZA, 2012). É um polímero de cadeia longa de β -anidroglicose unidas por ligações acetal (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A etilcelulose é um pó branco, inodoro e insípido, insolúvel em água, porém solúvel em solventes orgânicos (MURTAZA, 2012; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Não é biodegradável, podendo assim ser utilizada somente em formulações orais ou tópicas, não é tóxica, nem irritante (ARIAS et al., 2009; LOKHANDE et al., 2013a, 2013b; MURTAZA, 2012).

Figura 4 – Estrutura química da etilcelulose



Fonte: Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A etilcelulose é muito utilizada no desenvolvimento de comprimidos e grânulos, como agente de revestimento hidrofóbico, atuando na liberação de fármacos através da difusão destes pela película de revestimento (MURTAZA, 2012; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Outra aplicação muito comum da etilcelulose é no desenvolvimento de microcápsulas, protegendo o fármaco contra interações, hidrólise ou oxidação, além de controlar a cinética de liberação do composto ativo (DUBERNET; ROULAND; BENOIT, 1990; GRATTARD et al., 2002; MURTAZA, 2012; ZINUTTI et al., 1996). Estudos demonstraram que a utilização de etilcelulose de menor peso molecular proporcionou uma velocidade de liberação mais rápida quando comparada às formulações com etilcelulose de alto peso molecular (GRATTARD et al., 2002; MURTAZA, 2012). Alguns estudos mais recentes têm utilizado a etilcelulose para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (CHASSOT et al., 2014; LOKHANDE et al., 2013a, 2013b; PAN-IN et al., 2014; SUWANNATEEP et al., 2012; UBRICH et al., 2004).

Suwannateep e colaboradores (2012) associaram curcumina a nanoesferas de etilcelulose, apresentando características físico-químicas adequadas (diâmetro médio de partículas de 276 nm, potencial zeta de -30 mV, IPd de 0,19 e eficiência de encapsulamento de 95%).

Em outro estudo, Lokhande e colaboradores (2013b) desenvolveram nanopartículas poliméricas de etilcelulose contendo repaglinida, com o objetivo de comparar diferentes concentrações de polímero frente às características físico-químicas do sistema. Foi observado que quanto maior a concentração de etilcelulose maior foi o tamanho das partículas (90 a 240 nm), potencial zeta (-21 a -33 mV), eficiência de encapsulamento (76 a 97%), além disso, a maior concentração de polímero interferiu no controle de liberação da repaglinida.

Em 2014, Chassot e colaboradores desenvolveram nanocápsulas poliméricas de etilcelulose, utilizando como núcleo o óleo de amêndoas, para o encapsulamento do dipropionato de beclometasona, visando à liberação pulmonar. As nanocápsulas apresentaram características adequadas para os sistemas formados (tamanho de 158 a 185 nm, IPd de 0,08 a 0,15, potencial zeta de -11,7 a -15,9 mV), liberação controlada do fármaco, teor de substância ativa próximo a 100% e eficiência de encapsulamento superior a 98%.

No estudo de Pan-In e colaboradores (2014), nanopartículas de etilcelulose contendo a claritromicina foram desenvolvidas para avaliar a atividade *in vitro* do fármaco frente a bactérias *H. pilory*. Os sistemas desenvolvidos apresentaram tamanho médio de partículas de 223 nm, eficiência de encapsulamento de 86% e capacidade de erradicar as bactérias *H. pilory* em ratos infectados, em comparação ao fármaco livre.

3.5 ÓLEO DE COCO

O óleo de coco (OC) é extraído da *Cocos nucifera* Linné (Família Palmae) e se caracteriza por sua cor branca a levemente amarelada, sabor suave, odor característico e, quando refinado, apresenta-se como uma massa untuosa branca (EDEM, 2002; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). É constituído, principalmente, de ácidos graxos saturados em que o ácido láurico (40 – 50%) e o ácido mirístico (15 - 20%) estão presentes em maiores concentrações (HAMSI et al., 2014; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). O óleo de coco é utilizado na indústria farmacêutica como emoliente, em bases de pomadas, xampus, sabonetes e sabonetes líquidos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Alguns relatos da literatura indicaram efeitos antifúngicos do óleo de coco contra espécies de *Candida* (AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2010; OGBOLU et al., 2007; SANTOS et al., 2014) e outros estudos

demonstraram atividade antioxidante desse óleo (MARINA; CHE MAN; AMIN, 2009; MARINA et al., 2009; VYSAKH et al., 2014).

No estudo de Santos e colaboradores (2014), o óleo de coco foi utilizado como núcleo de nanocápsulas de Eudragit RS[®] para a veiculação do clotrimazol, um antifúngico lipofílico. As nanocápsulas apresentaram diâmetro médio de partículas inferior a 200 nm, baixos IPd, potencial zeta positivo e pH ácido. A eficiência de encapsulamento do clotrimazol foi próxima a 100% e a liberação do fármaco, em pH 4,5, foi controlada e sem efeito *burst*. Além disso, as nanocápsulas demonstraram ser mais eficazes contra *C. albicans* e *C. glabrata* quando comparadas ao fármaco livre.

Em outro estudo, Brendle (2013) desenvolveu nanocápsulas utilizando o óleo de coco como núcleo e o Eudragit RS[®] como polímero, para o encapsulamento do antioxidante idebenona. Os sistemas desenvolvidos apresentaram propriedades físico-químicas adequadas ($166 \pm 0,9$ nm, IPd de $0,120 \pm 0,01$, $+ 11,5 \pm 0,9$ mV) e teor de aproximadamente 91%, sendo capazes de controlar a liberação da idebenona.

Lorenzoni (2016) desenvolveu suspensões de nanocápsulas de etilcelulose contendo crisina (0,3 ou 0,75 mg/mL), contendo óleo de coco, com diâmetro médio de 136-137 nm, baixo IPd (0,12-0,13), potencial zeta negativo (-11 a -29 mV) e elevada capacidade de encapsulamento (>99%). Estes sistemas controlaram a liberação da crisina e apresentaram maior atividade antioxidante em relação às formulações preparadas com TCM, na concentração de 0,05 mg/mL de crisina, no ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). As suspensões também não foram tóxicas *in vitro*, frente à cultura de fibroblastos (3T3), nas concentrações avaliadas (equivalente a 1,25-5,0 µg/mL de crisina).

3.6 LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS A PARTIR DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

A avaliação do perfil de liberação de fármacos, a partir de sistemas nanométricos é de suma importância, entretanto, constitui-se um grande desafio, visto que, devido ao tamanho reduzido, esses sistemas proporcionam maior área de superfície de contato, fazendo com que as propriedades químicas, físicas e biológicas das formulações desenvolvidas sejam alteradas,

modificando a farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco (SOUZA, 2014). Além disto, tecnicamente, é difícil a separação entre o fármaco liberado, para o meio, e as nanoestruturas (MAGENHEIM; LEVY; BENITA, 1993).

A liberação do fármaco a partir de nanocápsulas depende de muitos fatores, como as características físico-químicas do fármaco e a sua concentração, as propriedades do polímero e do óleo utilizados, além das condições do experimento, como o meio de liberação e o pH (BHARDWAJ; BURGESS, 2010; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SOUZA, 2014). Testes *in vitro* são muito utilizados como preditores do comportamento *in vivo* do sistema desenvolvido, devendo ser realizados de modo mais semelhante possível ao *in vivo*, como por exemplo, tampão fosfato pH 6,8 ou 7,4 a 37 °C, como meio de liberação para experimentos destinados a simular a liberação gastrointestinal de fármacos (SOUZA, 2014).

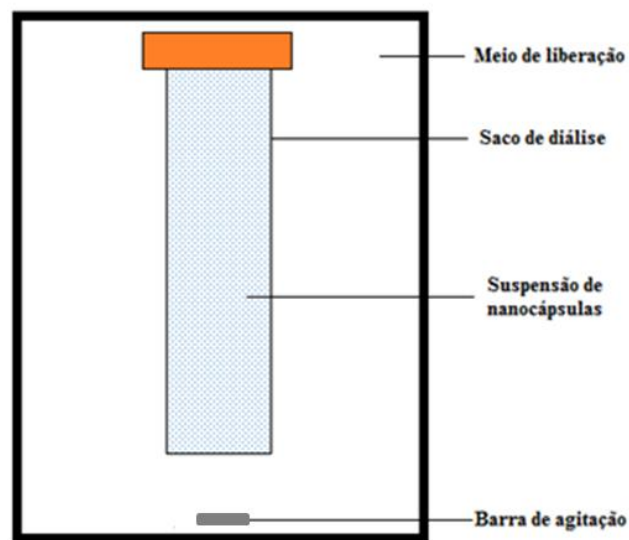
Os estudos de liberação de fármaco, a partir de sistemas nanoestruturados, podem ser realizados através de três diferentes metodologias: dissolução, membrana de diálise e fluxo contínuo (HENG et al., 2008; SIEVENS-FIGUEROA et al., 2012; SOUZA, 2014). Os ensaios de dissolução podem ser realizados utilizando o aparato I ou II da USP e, geralmente, dependem do volume de meio utilizado. Além disso, a agitação do meio é um fator determinante na dissolução de formas nanoestruturadas, uma vez que reduz o potencial de agregação da formulação. Neste método, deve-se realizar uma separação física entre as nanopartículas e o meio de dissolução, como o uso de membranas de nylon (0,45 µm), ultracentrifugação ou ultrafiltração. Apesar de ser um método simples, a dissolução de sistemas nanoestruturados não é muito eficiente, pois nem sempre o método de separação física utilizado é eficaz, como por exemplo o fármaco pode ficar retido na membrana de filtração (SOUZA, 2014).

O método de fluxo contínuo monitora a liberação de fármacos utilizando o aparato IV da USP, em que há um fluxo contínuo do meio de liberação através de uma coluna contendo o sistema nanoestruturado (SOUZA, 2014). Esse método pode ser considerado mais discriminatório, ou seja, mais eficiente para sistemas nanoestruturados. Entretanto, essa técnica necessita de equipamentos mais caros, o fármaco também pode ficar retido no filtro presente no equipamento e possui dificuldade em manter o fluxo constante (SOUZA, 2014).

O método mais popularmente utilizado para o estudo de liberação *in vitro* de fármacos, a partir de sistemas nanoestruturados, é a difusão em sacos de diálise (SOUZA, 2014), tendo sido relatado para uma variedade de substâncias ativas associadas a diferentes nanossistemas

(BOLSON, 2015; BRENDLE, 2013; LIN et al., 2014; LORENZONI, 2015; MUSAZZI et al., 2014; RIGO et al., 2014; SANTOS et al., 2014; XU et al., 2009). Este método consiste na separação, através da utilização de uma membrana, da suspensão e do meio de liberação, conforme apresentado na figura 5. Neste ensaio, o fármaco difunde-se através da membrana de diálise para o meio (SOUZA, 2014).

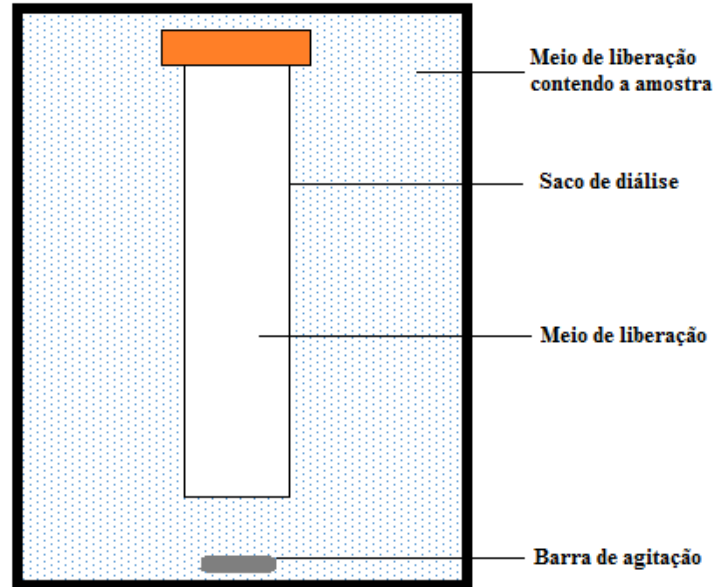
Figura 5 – Representação esquemática do método de difusão em saco de diálise



Fonte: Próprio autor, adaptado de SOUZA, 2014

Este método também pode ser realizado de maneira reversa, ou seja, o fármaco deve ser adicionado no compartimento juntamente com o meio de liberação, sendo que no interior do saco de diálise apenas o meio de liberação deve estar presente (figura 6). Na diálise convencional, como a amostra é adicionada dentro do saco de diálise, ela não é diluída no meio, fazendo com que a liberação seja mais lenta e não simulando a realidade *in vivo*. Por sua vez, na diálise reversa, a amostra fica diluída no meio, levando a uma perfeita condição *sink* (BHARDWAJ; BURGESS, 2010; SOUZA, 2014; ZHUANG et al., 2010).

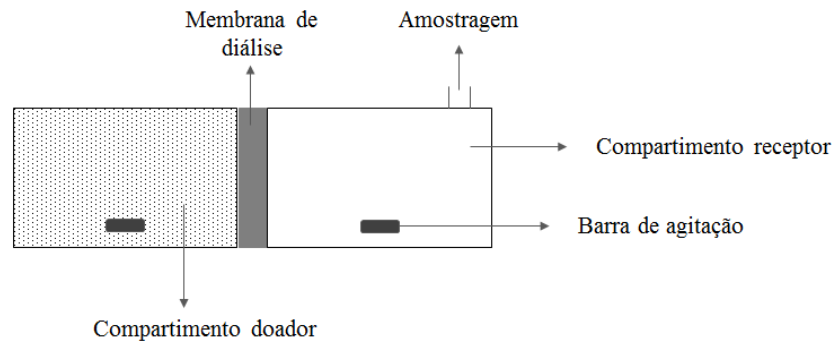
Figura 6 – Representação esquemática da difusão reversa em membrana de diálise



Fonte – Próprio autor, adaptado de SOUZA, 2014

Outra variação desta técnica é a diálise lado a lado (figura 7), em que um dos lados é o compartimento doador, o qual possui o meio de liberação juntamente com a formulação, o outro lado é o compartimento receptor, somente com o meio de liberação, onde ocorre a coleta das amostras. Os compartimentos são separados pela membrana de diálise (SOUZA, 2014).

Figura 7 – Representação esquemática da difusão lado a lado em membrana de diálise



Fonte – Próprio autor, adaptado de SOUZA, 2014

Além dos métodos citados, alguns trabalhos utilizam as técnicas já existentes com algumas adaptações, com a finalidade de aprimorar o estudo de liberação *in vitro* de sistemas nanoestruturados (SOUZA, 2014). El-Dahmy e colaboradores (2014) estudaram a liberação *in vitro* da vimpocetina, a partir de liofilizados de micelas poliméricas, utilizando o aparato I da USP juntamente com o saco de diálise, em que um cilindro de vidro continha, em sua parte inferior, a membrana de diálise. Neste estudo, após 40 minutos de ensaio, a liberação da vimpocetina foi próxima a 90%.

Alguns estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de analisar o melhor método de avaliação da liberação *in vitro* de sistemas contendo nanopartículas. No trabalho de Bhardwaj e Burgess (2010), foi realizada a comparação entre 3 métodos de liberação *in vitro* de fármacos, utilizando lipossomas como sistema modelo (diálise convencional, diálise reversa e o aparato IV da USP), demonstrando diferenças na liberação do fármaco entre os mesmos. Em outro estudo, Gao e colaboradores (2013) avaliaram a liberação *in vitro* de fármacos associados a nanopartículas através da dissolução, utilizando o aparato I da USP adaptado com membrana de diálise, e através da técnica de difusão em saco de diálise, em diferentes pH (7,4, 4,0 e 1,2). Os resultados demonstraram que o aparato I da USP modificado facilitou a identificação do modelo de cinética de liberação, o que pode ser atribuído a menor área superficial proporcionada pelo método de difusão em saco de diálise.

3.8 COMPRIMIDOS

A via oral é a mais comum para administração de medicamentos, e, dentre as formas farmacêuticas que podem ser administradas por esta via, os comprimidos são os que possuem maior destaque (AULTON, 2005; BANKER; ANDERSON, 2001; PRISTA, 2011; WENING; BREITKREUTZ, 2011). Sua grande utilização deve-se às vantagens que possui em relação às demais formas farmacêuticas de uso oral, como: precisão de dose, conservação, economia, bom rendimento e, principalmente, facilidade de produção (BANKER; ANDERSON, 2001; PRISTA, 2011). Os comprimidos são constituídos por um ou mais fármacos e por substâncias que possuem a finalidade de diluir o produto, aglutinar as suas partículas, facilitar a desagregação do comprimido, evitar a aderência do pó aos punções e à matriz e facilitar o escoamento, ou seja, são excipientes tecnológicos destinados a proporcionar características adequadas a esta forma farmacêutica compactada (AULTON, 2005; PRISTA, 2011). Os comprimidos podem ser obtidos por compressão direta ou por granulação (via úmida ou seca) com posterior compressão. A compressão de pós e/ou grânulos força a aproximação das partículas entre si, possibilitando a coesão e a formação de um sólido com geometria definida (AULTON, 2005; PECK; SOH; MORRIS, 2008; PRISTA, 2011).

Os comprimidos, assim como todas as outras formas farmacêuticas, devem apresentar características químicas, físicas e biológicas adequadas, atendendo a critérios como: possuir aparência boa e constante, peso e dimensões uniformes, concentração correta do fármaco e liberação reprodutível da substância ativa. Além disso, devem ser biocompatíveis, possuir resistência mecânica adequada, para evitar fraturas durante o manuseio, estabilidade química, física e microbiológica durante seu tempo de vida útil e acondicionamento apropriado (AULTON, 2005; BANKER; ANDERSON, 2001; PECK; SOH; MORRIS, 2008).

Em 2005, Ribeiro e colaboradores desenvolveram comprimidos matriciais contendo vimpocetina (20 ou 30 mg), associada ou não ao complexo ciclodextrina-ácido tartárico (CD-AT), utilizando como matriz hidrofílica HPMC K15 MCR para liberação controlada *in vitro* do fármaco. Após o estudo, foi possível observar que os comprimidos em que a vimpocetina encontrava-se associada ao complexo CD-AT prolongaram a liberação do fármaco por até 12 horas. Ao analisar a liberação da vimpocetina em diferentes pH (1,2 e 6,8), foi possível observar que o pH não foi capaz de influenciar a solubilidade do fármaco, pois a presença do ácido tartárico levou à formação de um microambiente dentro do comprimido, facilitando a

sua dissolução mesmo em meio com pH mais elevado. Assim, os comprimidos matriciais contendo vimpocetina, associada ao complexo CD-AT, apresentaram uma liberação prolongada independente do pH. Em 2007, Ribeiro e colaboradores desenvolveram, novamente, comprimidos matriciais com HPMC e vimpocetina associada ao complexo CD-AT para otimização da biodisponibilidade oral do fármaco. Neste estudo, foi possível observar que os comprimidos matriciais apresentaram uma biodisponibilidade oral relativa cerca de três vezes superior aos comprimidos de liberação imediata.

Em outro estudo, Ning e colaboradores (2011) desenvolveram sistemas de bombas osmóticas para a associação da vimpocetina, empregando diferentes excipientes. Neste estudo, foi avaliada a influência do ácido cítrico, presente na formulação em diferentes concentrações (0 a 19,2 mg), no ensaio de dissolução *in vitro* da vimpocetina, demonstrando que o aumento da concentração do ácido aumentou a dissolução do fármaco (acima de 90%). Além disso, testes *in vivo* foram realizados a fim de comparar a liberação da vimpocetina a partir do sistema osmótico desenvolvido com os comprimidos convencionais. Nesse ensaio, pode-se observar que a bomba osmótica prolongou a liberação do fármaco e a biodisponibilidade oral da vimpocetina teve um aumento de até 117,44% em relação aos comprimidos convencionais.

3.9 GRANULAÇÃO VIA ÚMIDA

A granulação é a operação na qual se procede a aglomeração de partículas pulveréas primárias, gerando partículas novas, os grânulos, que variam de tamanho conforme o uso pretendido (AULTON, 2005; PECK; SOH; MORRIS, 2008). A granulação se torna necessária para prevenir a segregação dos constituintes de uma mistura, melhorar as propriedades de fluxo e/ou a compactação da mistura dos pós (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; AULTON, 2005). Existem dois métodos para realizar a granulação, por via úmida ou por via seca (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; AULTON, 2005; BANKER; ANDERSON, 2001; PECK; SOH; MORRIS, 2008; PRISTA, 2011).

A granulação via úmida utiliza um líquido de granulação volátil, atóxico e que seja facilmente removido após a secagem, para a formação de uma massa úmida, obtida a partir da

mistura de pós. Esse líquido pode ser empregado em conjunto com um aglutinante, que é utilizado para garantir a coesão do granulado seco. Após a formação da massa úmida, esta é forçada a passar por um tamis, produzindo os grânulos úmidos que serão, posteriormente, secos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; AULTON, 2005; PRISTA, 2011).

Durante o processo de granulação, é fundamental obter boa homogeneidade de distribuição do líquido de granulação. Para isso, deve-se, primeiramente, pesar e misturar os pós a seco e então, adicionar o líquido de granulação até a formação da massa úmida, de modo que se consiga homogeneizar toda a mistura (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; AULTON, 2005; BANKER; ANDERSON, 2001; PRISTA, 2011). A quantidade de líquido a ser utilizada não pode ser estabelecida *a priori*, uma vez que diversas condições influenciam o processo. Na prática, o ponto de granulação pode ser observado através da consistência da massa úmida, que, quando comprimida pelas mãos, deve apresentar-se firme e não aderente (PRISTA, 2011). O líquido de granulação possui fundamental importância no processo de granulação via úmida, pois a sua adição proporciona a formação de pontes líquidas entre as partículas, as quais conferem maior resistência, proporcionando, assim, a formação inicial dos grânulos (BANKER; ANDERSON, 2001).

Após o preparo dos granulados, estes são calibrados e, em seguida, se necessário, excipientes extragranulares podem ser adicionados, como lubrificante e/ou deslizante para auxiliar o fluxo do alimentador para a matriz, evitar a adesão dos comprimidos aos punções durante a compressão, minimizar o atrito entre o comprimido e a matriz durante a ejeção, além de conferir brilho aos comprimidos acabados. Por fim, os grânulos são submetidos à compressão para a formação dos comprimidos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; BANKER; ANDERSON, 2001; PRISTA, 2011).

Friedrich e colaboradores (2010 a, b) demonstraram a viabilidade da preparação de granulados e comprimidos, a partir de dexametasona associada a nanocápsulas de PCL, com o objetivo de melhorar a estabilidade físico-química, durante o armazenamento, em relação à suspensão coloidal aquosa. Os grânulos foram produzidos por granulação via úmida, empregando a suspensão de nanocápsulas poliméricas, contendo dexametasona, em associação a um aglutinante (PVP), como líquido de granulação. Após, os grânulos foram ressuspensos em água e filtrados, para análise do tamanho médio de partículas (200 nm), que permaneceu semelhante ao diâmetro médio das partículas da suspensão de origem (240 nm). Os granulados apresentaram propriedades de fluxo adequadas (índice de Carr, fator de

Hausner e ângulo de repouso) e foram estáveis quanto ao teor de fármaco (98%) após 6 meses. Em seguida, foram produzidos comprimidos a partir desses granulados, os quais apresentaram características físico-químicas apropriadas para a forma farmacêutica proposta (dureza= 79 N, friabilidade= 0,39%, tempo de desintegração= 23 minutos, teor de fármaco = 95%). De acordo com o estudo de liberação *in vitro*, realizado em dissolutor (método de cestas), os comprimidos contendo as nanocápsulas prolongaram a liberação do fármaco em comparação aos comprimidos que não continham as nanoestruturas. Por fim, a análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou a presença de nanopartículas intactas na superfície, bem como no interior dos comprimidos.

Recentemente, Rachmawati e colaboradores (2014) desenvolveram comprimidos contendo curcumina associada à nanoemulsão, através da granulação via úmida. Os grânulos apresentaram propriedades de fluxo adequadas (índice de Carr= 14,38%; fluidez= 6,44 g/s). O tamanho médio de partículas dos comprimidos ressuspensos (134 nm), em água, manteve-se adequado em comparação à nanoemulsão original (200 nm). Os comprimidos foram caracterizados quanto as suas propriedades físico-químicas, apresentando-se adequados (friabilidade= 0,15%, tempo de desintegração= 6,23 minutos, teor= 99,76%; dureza= 5,95 KgF). A análise dos comprimidos por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que a compressão não alterou a estrutura da nanoemulsão e o teste de dissolução *in vitro* da curcumina a partir desses comprimidos liberou aproximadamente 100% do fármaco após 60 minutos de ensaio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas

- Celulose microcristalina 102 (Microcel[®] 102) – Blanver (Brasil);
- Croscarmelose sódica – Blanver (Brasil);
- Etilcelulose (Cotia, Brasil):

Ethocel[®]TM Standard 10 Premium Ethylcellulose– Colorcon

- Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) – Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Óleo de coco (OC) virgem orgânico (TheraHerb VCO, Filipinas) – Fignelli Comércio Importação e Exportação (Niterói, RJ, Brasil);
- Polietilenoglicol 6000 – Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) – Delaware (Porto Alegre, RS, Brasil);
- Polivinilpirrolidona (PVP K-30) – Delaware (Porto Alegre, RS, Brasil);
- Triglicérides de cadeia média (TCM) – Alpha Química (Porto Alegre, RS, Brasil);
- Vimpocetina (valor declarado 101,16%) – Pharmanostra (Anápolis, GO, Brasil).

4.1.2 Solventes e outros materiais

- Acetona – Química Moderna (Barueri, SP, Brasil)

- Água ultrapura – Mega Purity Water Purification;
- Metanol grau HPLC – Merck (Alemanha);
- Dispositivo de ultrafiltração-centrifugação (Amicon[®] Ultra, 0,5 mL; Ultracel 10 K-membrana de celulose regenerada; 10,000 MWCO; Millipore);
- Membranas hidrofílicas (nylon; 0,45 µm; Sartorius-EUA; diâmetro de 13 mm ou 47 mm);
- Membrana de celulose para tubos de diálise, 10 mm (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich, MO, USA);
- Papel filtro qualitativo, gramatura: 80 g/m²; espessura: 205 µm – J Prolab (São José dos Pinhais, Brasil).
- Outros solventes/reagentes apresentaram grau analítico e foram empregados como recebidos.

4.1.3 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, Japan), equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A (arranjo de diodos – PDA) e sistema controlador com injeção automática;
- Desintegrador – Ética;
- Dissolutor – Pharma Test;
- Durômetro – Pharma Test – PTB 211
- Karl Fischer – Metrohm – Tritino Plus 870

- Estufa de ar circulante – Armando Vilardo e CIA Ltda
- Evaporador Rotatório – Buchi Rotavapor R-3;
- Friabilômetro – Ética;
- Máquina de comprimir excêntrica – Neuberger;
- MasterSizer[®] 3000 E - Malvern
- Microcentrífuga – Sigma 1-14;
- Microscópio óptico - Olympus PM-PBK-3
- Potenciômetro – pH 21 pH/mV meter - Hanna Instruments;
- Ultrassom – ALT Sonic Clean 3PA;
- Volúmetro de compactação – Pharma Test, modelo PT-TD;
- ZetaSizer[®] Nano series Nano-Zs – Malvern Instruments.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação dos sistemas nanoestruturados

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado (BOLSON, 2015; FESSI et al., 1989). Desta forma, a vimopocetina, o polímero (etilcelulose), o tensoativo de baixo EHL (monoestearato de sorbitano - Span 60[®]) e o óleo (OC ou TCM) foram adicionados à acetona (solvente miscível em água) constituindo, assim, a fase orgânica, que foi mantida sob agitação a 40°C até a dissolução completa dos componentes. Em seguida, a fase orgânica foi adicionada, lentamente, sobre a fase aquosa, contendo o tensoativo de alto EHL (polissorbato 80-Tween 80[®]), sendo a mistura mantida, sob agitação moderada, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após, esta mistura foi levada ao evaporador rotatório para total remoção do

solvente orgânico e ajuste do volume final (50 mL; 3,0 mg/mL de vimpocetina), sob pressão reduzida. Por fim, as suspensões foram submetidas à filtração a vácuo utilizando papel filtro de 80 g/m². As formulações foram preparadas em triplicata e a composição quali-quantitativa das mesmas pode ser observada na tabela 1, sendo denominadas de NC-OC ou NC-TCM, conforme o óleo utilizado. Formulações sem fármaco também foram preparadas para fins comparativos.

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

Formulação	Polímero (%)*	Óleo (%)*	Span 60® (%)*	Tween 80® (%)*	Vimpocetina (%)*	Água/Acetona (mL)	Volume final** (mL)
NC-OC	2,0	6,0	1,54	1,54	0,3	500/500	50
NC-TCM	2,0	6,0	1,54	1,54	0,3	500/500	50

*Percentuais considerando o volume final, após a evaporação.**Volume de suspensão após a evaporação da acetona e 90 % da água empregada durante a preparação.

Cabe destacar que também foram testadas suspensões de nanocápsulas utilizando como núcleo o óleo de palma (NC-OP), nas etapas preliminares deste trabalho.

4.2.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

Cada lote (n=3) de formulação foi avaliado, logo após a preparação, através da determinação dos seguintes parâmetros: pH, diâmetro médio de partículas, índice de polidispersão (IPd), potencial zeta, teor de fármaco e eficiência de encapsulamento (EE).

4.2.2.1 Determinação do tamanho médio de partículas, potencial zeta e índice de polidispersão (IPd)

Empregando o equipamento Zetasizer[®] Nano Series (Malvern Instruments), o diâmetro médio e o índice de polidispersão (IPd) das partículas, em suspensão, foram avaliados por espectroscopia de correlação de fótons a 25°C, após diluição das amostras (500 vezes) com água MilliQ[®].

Além disso, o diâmetro médio também foi avaliado através de difração a laser, utilizando o Mastersizer 3000 E[®], após diluição adequada das amostras em 250 mL de água destilada. O índice de refração da etilcelulose (1,47) (DOW CELLULOSICS, 2005) foi empregado na análise.

O potencial zeta foi determinado por eletroforese, também no Zetasizer[®] Nano Series (Malvern Instruments), após diluição das amostras em NaCl 10 mM (500 vezes).

4.2.2.2 Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados nas suspensões aquosas, logo após a preparação, utilizando potenciômetro (Hanna Instruments) calibrado, com solução tampão pH 4,0 e 7,0.

4.2.2.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulamento da vimpocetina associada às nanocápsulas

O teor total de vimpocetina nas formulações foi avaliado por cromatografia a líquido de alta eficiência em fase reversa (CLAE-UV), após a extração da vimpocetina das amostras com metanol, utilizando como base a metodologia descrita por Elbary e colaboradores (2002) e Bolson (2015) com algumas modificações, em que o comprimento de onda de detecção do fármaco foi de 274 nm, fase móvel composta de metanol:água (85:15 v/v), contendo 0,1% de trietilamina e ácido acético glacial (ajuste do pH 7,0), coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, 110 Å – Phenomenex, e pré-coluna C₁₈, 4 x 3,0 mm – Phenomenex) e vazão de 1,0 mL/min (BOLSON, 2015). A técnica consistiu em pipetar 90 µL da amostra em um balão volumétrico

de 10 mL, adicionar metanol e levar ao ultrassom por 30 minutos. Depois de completado o volume do balão volumétrico com metanol (27 µg/mL de fármaco), a amostra foi filtrada em membrana de nylon (0,45 µm) e injetada no cromatógrafo [Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japan), equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A (arranjo de diodos –PDA), sistema controlador CBM-20A e com injeção automática (volume de injeção de 50 µL)].

A concentração da substância ativa associada às nanocápsulas (eficiência de encapsulamento) foi determinada através da diferença entre as concentrações total e livre do fármaco presentes nas formulações, de acordo com a equação 1:

Equação 1

$$EE = \frac{\text{Teor total} - \text{Teor livre}}{\text{Teor total}} \times 100$$

A concentração de fármaco livre no sistema (não associado) foi determinada no ultrafiltrado, após a ultrafiltração-centrifugação de 200 µL das suspensões no dispositivo Amicon® (Millipore, 10 kDa) por 10 minutos a 3.615 xg. O método de doseamento foi baseado em cromatografia a líquido (CLAE-UV), conforme as condições acima descritas.

4.2.3 Validação do método analítico por CLAE-UV para quantificação da vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas

A validação do método analítico seguiu os parâmetros preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e pela International Conference on Harmonisation (ICH, 2005): especificidade, linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão. As condições cromatográficas validadas foram as descritas no item 4.2.2.3.

A especificidade do método foi verificada através da análise da pureza do pico da vimpocetina, além da comparação dos cromatogramas das suspensões contendo vimpocetina e das mesmas formulações sem a presença do fármaco, com o objetivo de averiguar se os componentes existentes nas formulações poderiam influenciar na detecção do fármaco.

Para a linearidade, foram preparadas três curvas padrão em metanol, partindo-se de 3 soluções mãe de vimpocetina (3 mg/mL), em três dias diferentes, constituídas das seguintes concentrações: 9,0, 18,0, 27,0, 36,0 e 45,0 µg/mL, em que os dados foram analisados através da regressão linear pelo método de mínimos quadrados ($n = 3$). O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos a partir da média das três curvas de calibração, seguindo as equações 2 e 3:

Equação 2:

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{IC}$$

Equação 3:

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

Onde DP é o desvio padrão do intercepto e IC é a inclinação da curva analítica.

Para a análise da precisão do método foi realizada a repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (entre-dias). A extração do fármaco das suspensões de nanocápsulas se deu através do preparo de seis amostras de uma mesma formulação contendo vimpocetina, em que 90 µL da suspensão foram adicionados a balões volumétricos de 10 mL juntamente com metanol, ultrassonicadas por 30 minutos e, após completar o volume dos balões volumétrico com metanol (27 µg/mL), as amostras foram filtradas em membrana de nylon 0,45 µm para posterior análise em CLAE-UV. Para a avaliação da repetibilidade, seis amostras preparadas

no mesmo dia foram analisadas. Para a precisão intermediária, novas amostras (n=6), preparadas em dia diferente, foram analisadas (total n=12). Os resultados foram expressos através do desvio padrão relativo (DPR%).

Quanto à exatidão do método, este foi realizado através da análise da recuperação de fármaco, onde foram avaliados três níveis de concentração, baixo (21 µg/mL), médio (27 µg/mL) e alto (33 µg/mL). A análise consistiu em adicionar, em balões de 10 mL, 50 µL das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina para todos os níveis de concentrações, e 20,0, 40,0 e 60,0 µL da solução mãe de vimpocetina (3.000 µg/mL), para cada nível de concentração, respectivamente. Logo após, as amostras foram preparadas e analisadas conforme a extração já citada (n=3).

4.2.4 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

A fim de avaliar a estabilidade das formulações, as suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina foram armazenadas, por 30 dias, à temperatura ambiente e protegidas da luz (frascos de vidro âmbar). Nos tempos 0 e 30 dias, foram coletadas amostras das formulações, sendo estas submetidas às análises de diâmetro médio, IPd, potencial zeta e teor de vimpocetina, conforme anteriormente descritas. O estudo foi realizado em triplicata de lote (n = 3).

4.2.5 Estudo do perfil de liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

A avaliação do perfil de liberação *in vitro* da vimpocetina, a partir das suspensões de nanocápsulas, foi conduzida através da técnica de difusão em sacos de diálise (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich), em condição *sink*, utilizando tampão fosfato pH 6,8 com 30% de etanol como meio de liberação à 37 ± 2 °C (BOLSON, 2015). Para fins comparativos, uma solução metanólica do fármaco (3,0 mg/mL) foi utilizada na mesma concentração das suspensões. Neste experimento, os sacos de diálise (8 cm) foram preenchidos com 833 µL da

suspensão de nanocápsulas (equivalente a 2,5 mg de vimpocetina) e colocados em béqueres contendo 250 mL do meio de liberação, mantidos sob agitação magnética à 37° C. Em intervalos de tempo pré-determinados, foram coletadas alíquotas de 1,0 mL do meio de liberação e analisadas em CLAE-UV sob as condições descritas no item 4.2.2.3. A quantidade de meio coletada foi repostada com meio fresco, também a 37° C. O experimento teve duração de 120 horas para as suspensões de nanocápsulas e 12 horas para a solução metanólica do fármaco. As amostras foram quantificadas frente à curva analítica, preparadas na faixa de 0,2 a 20 µg/mL, utilizando o mesmo meio de liberação, partindo-se de uma solução mãe metanólica de 1,0 mg/mL. Também foi realizado o teste de regressão linear das curvas analíticas. O experimento foi feito em triplicata.

O mecanismo de liberação da vimpocetina, a partir das suspensões de nanocápsulas, foi inferido aplicando-se a Lei das Potências/Korsmeyer-Peppas (equação 4), utilizando Scientist 2.0 Software (MicroMath®, USA), em que ft corresponde à fração de fármaco liberado no tempo t (horas), a é a constante relacionada a características estruturais e geométricas do sistema de liberação e n indica o mecanismo de liberação do fármaco.

Equação 4:

$$ft = a \times t^n$$

4.2.6 Preparação dos granulados a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

Os granulados contendo vimpocetina associada às nanocápsulas foram preparados através de granulação por via úmida. Foram misturados, por espatulação, celulose microcristalina 102 (CMC 102) (11,51 g), croscarmelose sódica (0,6125 g) e polivinil pirrolidona (PVP K-30) (1,4 g), conforme concentrações apresentadas na tabela 2, durante 10 minutos. Em seguida, o pó resultante (13,52 g) foi adicionado, gradualmente, à suspensão de nanocápsulas contendo vimpocetina (35 mL, equivalente a 105 mg de fármaco) e

homogeneizado por mais 10 minutos. Logo após, a mistura foi levada à estufa de ar circulante, a 40° C, por 4 horas e 30 minutos para atingir o ponto de granulação (pré-secagem). Após formar a massa úmida, a mesma foi forçada, manualmente, a passar por um tamis (ABNT 16), originando os granulados, que foram secos durante 12 horas (etapa de secagem), em estufa de ar circulante a 40°C. Os granulados foram preparados em triplicata de lote.

Tabela 2 – Composição quali-quantitativa dos granulados contendo vimpocetina nanoencapsulada

Formulação	Suspensão de NC contendo vimpocetina (3,0 mg/mL) (%) p/p***	CMC 102 (%) p/p	Croscarmelose sódica (%) p/p	PVP – K30 (%) p/p
GR-NC-TCM*	22,74	65,76	3,5	8,0
GR-NC-OC**	22,74	65,76	3,5	8,0

*Granulados preparados a partir da suspensão de nanocápsulas com TCM

** Granulados preparados a partir de suspensão de nanocápsulas com OC

*** Peso dos componentes desconsiderando a água – 3,98 g

Cabe salientar que também foram produzidos granulados sem vimpocetina, a partir de nanocápsulas preparadas sem fármaco (GR-NC-OC-BR e GR-NC-TCM-BR).

4.2.7 Caracterização dos granulados produzidos a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

A capacidade de fluxo dos granulados foi avaliada através da técnica do ângulo de repouso, realizada pela determinação da altura do cone formado pelo escoamento de 10 g de produto em uma base de 2 cm de raio e calculado através da equação 5, em que foi utilizado a função inversa da tangente (arc tg), para obter o ângulo correspondente (AULTON, 2005; BANKER; ANDERSON, 2001; FRIEDRICH et al., 2010b; GUO; BEDDOW; VETTER,

1985; PRISTA, 2011). A densidade bruta foi determinada através do volume ocupado por 10 g de granulado, medido em uma proveta. A densidade de compactação foi determinada em volúmetro de compactação (Pharma Test, modelo PT-TD), até volume constante após sucessivas quedas de 1.250 vezes (< 1 mL de variação entre leituras consecutivas). O índice de Carr (IC) e o Fator de Hausner (FH) (equações 6 e 7, respectivamente) foram determinados a partir destas densidades, também para avaliação das propriedades de fluxo (AULTON, 2005; BANKER; ANDERSON, 2001; FRIEDRICH et al., 2010b; GUO; BEDDOW; VETTER, 1985; PRISTA, 2011).

Equação 5:

$$\tan \alpha = \frac{h}{r}$$

Em que h é a altura do cone formado pelo escoamento e r é o raio da base.

Equação 6:

$$IC = \frac{dc - db}{dc} \times 100$$

Equação 7:

$$FH = \frac{dc}{db}$$

Em que dc é a densidade de compactação e db é a densidade bruta.

O teor de umidade dos granulados foi determinado através de titulação, empregando Karl Fischer (Metrohm – Tritino), em que 0,1 g de granulado foi adicionado ao equipamento para a titulação com iodo e reagente de Karl Fischer.

A análise morfológica foi realizada através de microscópio óptico (Olympus PM-PBK-3), empregando aumento de 40 vezes, após distribuir os granulados em uma lâmina. Uma câmera digital foi utilizada para fotografar a imagem obtida através da objetiva.

O teor de vimpocetina nos granulados foi analisado por CLAE-UV, após a extração do fármaco com etanol, utilizando como base a metodologia descrita por Elbary e colaboradores (2002) com algumas modificações, conforme as condições cromatográficas descritas no item 4.2.2.3. A técnica consistiu em pesar 250 mg de granulado em balão volumétrico de 50 mL, adicionar etanol e levar ao ultrassom por 60 minutos. Após completar o volume do balão volumétrico com etanol (30 µg/mL de fármaco), a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 20 minutos. Em seguida, uma alíquota do sobrenadante foi colocada em um balão volumétrico de 10 mL, juntamente com etanol, e submetida ao ultrassom por 30 minutos. Depois de completado o volume do balão volumétrico com etanol, gerando uma concentração teórica de fármaco de 5,0 µg/mL, a amostra foi filtrada (membrana de nylon – 0,45 µm) e injetada no cromatógrafo [Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japan), equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A (arranjo de diodos –PDA), sistema controlador CBM-20A e com injeção automática (volume de injeção de 50 µL)].

A análise de diâmetro dos granulados foi realizada através da diluição de 500 mg destes em 10 mL de água ultrapura e ultrassonicada por 15 minutos. Em seguida, uma alíquota (20 µL) foi adicionada à 10 mL de água ultrapura, filtrada em membrana de nylon 0,45 µm e analisada através do equipamento Zetasizer® Nano Series (Malvern Instruments) (FRIEDRICH et al., 2010b).

4.2.8 Validação de método analítico por CLAE-UV para a quantificação de vimpocetina nos granulados desenvolvidos

A validação do método analítico seguiu os parâmetros preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e pela International Conference on

Harmonisation (ICH, 2005): especificidade, linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão. As condições cromatográficas foram as mesmas citadas no item 4.2.2.3.

A especificidade do método foi avaliada através da análise da pureza do pico da vimpocetina, além da comparação do cromatograma dos granulados contendo vimpocetina (GR-NC-OC e GR-NC-TCM) com as mesmas formulações sem a presença do fármaco (GR-NC-OC-BR e GR-NC-TCM-BR), com o objetivo de verificar se os componentes existentes nas formulações poderiam coeluir com o pico do fármaco.

Para a linearidade, foram preparadas três curvas analíticas em etanol, partindo-se de 3 soluções mãe de vimpocetina (1,0 mg/mL), em três dias diferentes (1,0, 3,0 5,0 7,0, e 9,0 µg/mL), em que os dados foram analisados através da regressão linear pelo método de mínimos quadrados ($n = 3$). O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos a partir da média das três curvas de calibração, seguindo as equações 2 e 3 citadas no item 4.2.3.

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (entre-dias). Neste caso, seis amostras de 250 mg de granulado foram colocadas em balões volumétricos de 50 mL, juntamente com etanol, submetidas ao ultrassom por 60 minutos e, após completar o volume dos balões com etanol (30 µg/mL de fármaco), as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 20 minutos, em seguida, uma alíquota do sobrenadante de cada amostra foi diluída em etanol e ultrassonicada por mais 30 minutos, gerando uma concentração teórica de 5,0 µg/mL (item 4.2.7). Posteriormente, as amostras foram filtradas em membrana de nylon 0,45 µm e analisadas em CLAE-UV. As análises foram realizadas intra-dia e entre-dias. Os resultados foram expressos através do desvio padrão relativo (DPR%).

A exatidão do método foi verificada através da análise da recuperação de fármaco, onde foram avaliados três níveis de concentração, baixo (4,0 µg/mL), médio (5,0 µg/mL) e alto (6,0 µg/mL). A análise consistiu em adicionar, em balões de 10 mL, 667 µL da diluição etanólica (30 µg/mL de vimpocetina), preparada a partir dos granulados contendo o fármaco nanoencapsulado, e 20, 30 ou 40 µL da solução mãe de vimpocetina (1.000 µg/mL) para cada nível de concentração, respectivamente. Logo após, as amostras foram preparadas e analisadas conforme a extração já citada. As amostras foram preparadas em triplicata.

4.2.9 Preparação dos comprimidos contendo vimpocetina (2,5 mg) associada às nanocápsulas

Foram produzidos lotes contendo 30 comprimidos, com peso médio de 550 mg, correspondente a 2,5 mg de vimpocetina. Para isto, os granulados, em quantidade equivalente a 2,5 mg de fármaco por comprimido, foram misturados aos seguintes excipientes extragranulares: PEG 6000 (lubrificante; 0,5% p/p), croscarmelose sódica (desintegrante; 1,5% p/p) e CMC 102 (diluyente; qsp 550 mg). Após misturar, por espatulação, durante 10 minutos, os grânulos foram submetidos à compressão em máquina alternativa/excêntrica (Neuberger Press), com punção de 13 mm, em modo manual. Os comprimidos produzidos foram denominados de CP-GR-NC-OC, quando produzidos a partir das suspensões de nanocápsulas/granulados contendo óleo de coco, e CP-GR-NC-TCM, quando provenientes das suspensões de nanocápsulas/granulados com TCM. Também foram produzidos comprimidos de vimpocetina, por compressão direta, utilizando-se os mesmos excipientes dos comprimidos nanotecnológicos, sem a presença de nanocápsulas (CP-S/NC), para fins comparativos.

4.2.10 Caracterização dos comprimidos contendo vimpocetina associada a nanocápsulas

A análise do peso médio dos comprimidos foi realizada através da média aritmética do peso de 20 comprimidos. A dureza e a espessura foram determinadas através da análise de 10 comprimidos em durômetro (Pharma Test). Para a friabilidade, 20 comprimidos foram pesados, colocados no friabilômetro (Ética) e submetidos a 100 rotações/5 minutos. Posteriormente, os comprimidos foram pesados, novamente, e a diferença entre o peso inicial e final dos compactos foi analisada, não podendo ser superior a 1,5%, além disso, nenhum comprimido pode apresentar-se lascado ou quebrado. No teste de desintegração, 6 comprimidos foram colocados no desintegrador (Ética), juntamente com a água destilada, como meio, a 37°C. Todos os testes foram realizados conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (ANVISA, 2010).

O teor de vimpocetina nos comprimidos foi determinado através CLAE-UV, após a extração do fármaco com etanol, utilizando como base a metodologia citada no item 4.2.2.3. A técnica consistiu em triturar 5 comprimidos e pesar 550 mg do pó em balão volumétrico de 50 mL, adicionar etanol e levar ao ultrassom por 60 minutos. Após completar o volume do balão volumétrico com etanol, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 20 minutos. Em seguida, uma alíquota do sobrenadante foi colocada em um balão volumétrico de 10 mL, juntamente com etanol, e submetida ao ultrassom por 30 minutos. Depois de completado o volume do balão volumétrico com etanol (concentração teórica de 5,0 µg/mL), a amostra foi filtrada e injetada no cromatógrafo [Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japan), equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A (arranjo de diodos –PDA), sistema controlador CBM-20A e com injeção automática (volume de injeção de 50 µL)].

Cabe salientar que foi realizado teste de otimização da extração da vimpocetina, a partir dos granulados, avaliando-se diferentes tempos de ultrassom, sendo a metodologia acima a mais adequada.

4.2.11 Estudo de estabilidade dos comprimidos contendo vimpocetina nanoencapsulada

A fim de avaliar a estabilidade dos comprimidos, estes foram armazenados durante 90 dias à temperatura ambiente, em dessecador e protegidos da luz (envoltos por papel alumínio). Nos tempos 0, 60 e 90 dias, foi realizada a análise de teor de vimpocetina, conforme metodologia já descrita, em triplicata de lote (n=3).

4.2.12 Estudo do perfil de liberação *in vitro* da vimpocetina a partir dos comprimidos

Experimentos de cinética de liberação dos comprimidos (2,5 mg) foram realizados utilizando a técnica de difusão em sacos de diálise reversa (ZHUANG et al., 2010), em condição *sink*, utilizando como meio de liberação o tampão fosfato pH 6,8 (900 mL) a 37 ± 2 °C. O experimento foi realizado utilizando os CP-GR-NC-OC e CP-GR-NC-TCM. Para fins comparativos, comprimidos sem nanocápsulas (2,5 mg de vimpocetina) também foram

avaliados (CP-S/NC). Neste ensaio, cada comprimido de vimpocetina, encapsulada ou não, foi adicionado a um béquer contendo 900 mL de meio de liberação, sob agitação magnética a 37° C. Em cada béquer, antes da adição dos comprimidos, foi inserido um saco de diálise, contendo 2,0 mL de meio de liberação. Em intervalos de tempo previamente estabelecidos, foram coletadas alíquotas de 1,0 mL de dentro de cada saco de diálise (ZHUANG et al., 2010), as quais foram analisadas por CLAE-UV, como previamente descrito no item 4.2.2.3. O volume coletado do saco de diálise foi imediatamente repostado com meio fresco sob as mesmas condições. Para este experimento, foi realizada uma curva analítica (0,125 a 7,0 µg/mL) usando meio de liberação como diluente, partindo-se de uma solução estoque em metanol (1,0 mg/mL). É importante salientar que foi realizado teste de linearidade da curva através da regressão linear. Este ensaio também foi realizado em triplicata.

Visando à comparação dos perfis, também foram realizados teste de liberação/difusão da vimpocetina, através da técnica de diálise reversa, a partir de suspensões de nanocápsulas e de uma solução metanólica, na mesma concentração dos comprimidos (2,5 mg de vimpocetina).

4.2.13 Ensaio de dissolução dos comprimidos contendo vimpocetina

O experimento de dissolução (ANVISA, 2010) da vimpocetina, a partir dos comprimidos, contendo o fármaco encapsulado ou não (CP-GR-NC-OC, CP-GR-NC-TCM e CP-S/NC), foi conduzido em equipamento de dissolução, utilizando tampão fosfato pH 6,8 (900 mL) desgaseificado, em condição *sink*. Esse experimento baseou-se na adição dos comprimidos (n=6) de vimpocetina em cubas contendo os 900 mL de meio, sob agitação de pás (aparato 2) (50 rpm) a $37 \pm 0,5$ °C. Após 6 e 8 horas de experimento, uma alíquota de 5,0 mL foi retirada da cuba, centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi filtrado em membrana de nylon 0,45 µm e analisado em CLAE-UV, conforme descrito no item 4.2.2.3. Após a coleta de 6 horas, o meio foi repostado.

Para este ensaio, foi realizada uma curva analítica (0,125 a 7 µg/mL), diluída no meio de liberação, partindo-se de uma solução metanólica de vimpocetina (1,0 mg/mL). Foi efetuado teste de regressão linear para a curva analítica. Além disso, verificou-se a

especificidade do método empregando o meio de dissolução e o placebo para avaliar se os componentes da formulação poderiam interferir na quantificação do fármaco. A precisão do método também foi avaliada, através da coleta de seis amostras de uma mesma cuba de dissolução, após 6 horas de experimento. Essas amostras foram tratadas conforme anteriormente citado.

4.2.14 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de 1 ou 2 vias, além de teste *t* ou Tukey, a um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA

No presente trabalho, o desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas, contendo vimpocetina, baseou-se em formulações preparadas por Bolson (2015), em que as nanocápsulas foram constituídas por etilcelulose (1,0 %, p/v) como polímero, óleo de coco ou TCM (3,0 %, p/v) como núcleo, Span 60[®] (0,77%, p/v) como tensoativo de baixo EHL, Tween 80[®] (0,77%, p/v) como tensoativo de alto EHL e 1,0 mg/mL de fármaco. Para isto, partiu-se de 27 mL de acetona e 53 mL de água, para a formação de 10 mL de suspensão final, após a evaporação de 87,5 % do volume inicial, empregando o método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Primeiramente, buscou-se preparar as mesmas formulações, porém com o triplo de fármaco na fase orgânica, visando obter suspensões de 3,0 mg/mL de vimpocetina, que seriam mais adequadas para a conversão em comprimidos. Entretanto, estas formulações não foram adequadas, pois ocorreu a rápida precipitação do sistema.

Com isso, para obter maior concentração de fármaco na formulação, realizou-se adequação no método descrito por Bolson (2015), que consistiu no aumento do volume de solvente evaporado, com conseqüente redução do volume final das suspensões e aumento da concentração dos componentes, a saber: 3,0 mg/mL de vimpocetina, 6,0 % de óleo, 2,0 % de polímero, 1,54% de cada tensoativo. Para isto, partiu-se de 500 mL de acetona e 500 mL de água para a preparação de suspensão de nanocápsulas com volume final de 50 mL (tabela 1), correspondendo a uma redução de 95% do volume inicial.

Cabe salientar também que o polímero utilizado no preparo das nanocápsulas, além de ser insolúvel no meio aquoso, deve ser insolúvel no óleo escolhido, formando, assim, o invólucro polimérico depositado ao redor do núcleo oleoso (LEGRAND et al., 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Estudos do nosso grupo avaliaram a influência do óleo de coco em filmes de etilcelulose (Ethocel[®]TM Standard 10 Premium), em que foi possível observar que esses filmes não sofreram alteração de peso quando submersos no óleo

de coco (a 37°C) por 90 dias. Quando os filmes foram submersos em TCM, foi possível verificar uma leve alteração do peso (3,19%), durante os 90 dias de avaliação (BOLSON, 2015). Desta forma, como não ocorreu dissolução e apenas um pequeno aumento (TCM), estes óleos foram considerados adequados para a preparação de nanocápsulas de etilcelulose, considerando um sistema *core-shell*.

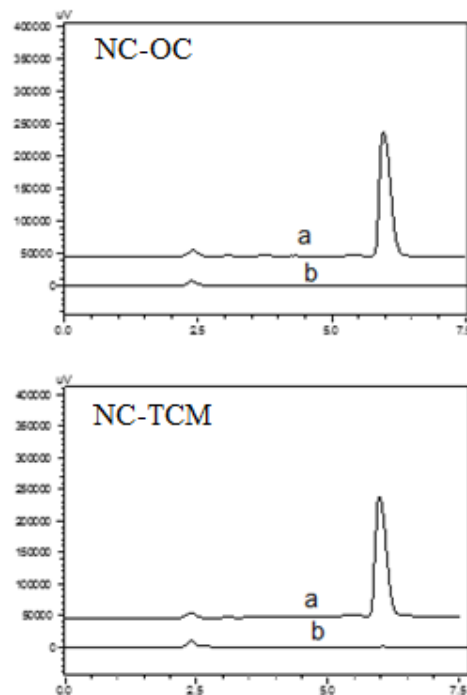
Destaca-se, ainda, que também foram desenvolvidas nanocápsulas utilizando como núcleo o óleo de palma (NC-OP), contudo, essas formulações não apresentaram características adequadas e reprodutíveis. O teor de vimpocetina, no experimento de validação, variou de 89 a 94 % ($91,49 \pm 1,82$ %), além disso, em demais testes de quantificação da vimpocetina (triplicata), houve variação do teor, o qual, na maioria das vezes era inferior a 90%, não sendo reprodutível. O tamanho médio de partículas foi de $203,7 \pm 1,3$ nm e o IPd de $0,238 \pm 0,017$. O $D_{4,3}$ foi superior a 1 μm (1,23 μm), $D_{3,2}$ de 0,229 μm e span igual a 1,084. A eficiência de encapsulamento foi próxima a 100%. Em função de problemas de reprodutibilidade das formulações com óleo de palma, além do diâmetro médio em volume ($D_{4,3}$) não estar na faixa nanométrica, optou-se por continuar o estudo somente com as formulações preparadas com OC e TCM.

5.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DA VIMPOCETINA NAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

A validação de métodos analíticos é essencial para garantir a qualidade do produto que se está desenvolvendo, pois expressa o quanto o resultado obtido é confiável, com isso, métodos analíticos devem ser validados frente aos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, LQ, LD e robustez. No entanto, os parâmetros avaliados dependem da finalidade do método (ANVISA, 2003; GIL, 2010; ICH, 2005; STORPIRTIS et al., 2011). Assim, para que fosse realizada a correta quantificação da vimpocetina a partir dos sistemas desenvolvidos foi, primeiramente, realizada a validação do método analítico utilizado para a quantificação do fármaco a partir das suspensões de nanocápsulas.

Um método é considerado específico quando possui a capacidade de medir exatamente a substância de interesse sem que haja a interferência dos demais componentes da formulação ou de impurezas (ANVISA, 2003; GIL, 2010; STORPIRTIS et al., 2011). Neste trabalho, foi realizada a análise de amostras das formulações contendo ou não vimopcetina. De acordo com os cromatogramas, observou-se que o método utilizado é específico para a determinação da vimopcetina, pois não houve interferência dos componentes das formulações preparadas com óleo de coco ou TCM. A especificidade pode ser confirmada também através do detector do tipo PDA (índice de pureza de pico = 1,000).

Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos das formulações de nanocápsulas contendo vimopcetina (a) e das formulações sem o fármaco (b)



A linearidade expressa a relação diretamente proporcional entre o sinal emitido pelo equipamento e a concentração do fármaco na amostra analisada, a qual deve ser realizada empregando no mínimo 5 concentrações diferentes (ANVISA, 2003; GIL, 2010; ICH, 2005). Neste trabalho, a linearidade foi verificada através da regressão linear das curvas analíticas

(n=3), descrita pela equação $y = 110.842x - 47.732$ com coeficiente de correlação maior que 0,99, ou seja, o método proposto foi linear (ANOVA $p < 0,05$) na faixa de concentração analisada (9,0 a 45,0 $\mu\text{g/mL}$) e apresentou limite de detecção de 0,452 $\mu\text{g/mL}$ e limite de quantificação de 1,506 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando a sensibilidade do método para baixas concentrações de vimpocetina.

A precisão de um método é a avaliação da repetibilidade dos resultados de uma série de análises da mesma amostra, e deve ser avaliada através da repetibilidade intra-dia e precisão intermediária (entre-dias) (ANVISA, 2003; GIL, 2010; ICH, 2005). Na tabela 3, é possível observar os resultados de precisão obtidos intra e entre-dias para as suspensões, em que, em todas as análises, o desvio padrão relativo foi inferior a 5%, demonstrando que o método é preciso (ANVISA, 2003).

Tabela 3 - Repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão entre-dia das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	27,00	25,97 \pm 0,49	96,18 \pm 1,8	1,87
Dia 2 (n=6)	27,00	26,05 \pm 0,50	96,46 \pm 1,84	1,91
Entre-dias (n=12)	27,00	26,01 \pm 0,47	96,32 \pm 1,74	1,81

A exatidão de um método analítico demonstra o quão verdadeiros são os resultados obtidos (ANVISA, 2003; ICH, 2005; STORPIRTIS et al., 2011). No presente trabalho, a exatidão foi verificada através da análise de três níveis de concentração da vimpocetina (baixo, médio e alto) e os valores de recuperação obtidos neste ensaio são apresentados na tabela 4, demonstrando que o método proposto é exato.

Tabela 4 – Análise de exatidão das suspensões de nanocápsulas

Nível de concentração	Amostra conhecida (µg/mL)	Concentração adicionada (µg/mL)	Valor obtido (µg/mL)	Recuperação (%)
Baixo	14,55	6,00	21,03 ± 0,28	102,35 ± 1,37
Médio	14,55	12,00	26,74 ± 0,73	100,71 ± 2,74
Alto	14,55	18,00	32,70 ± 0,46	100,47 ± 1,43

Assim, com esses resultados, é possível concluir que o método analítico para a quantificação de vimpocetina nas formulações desenvolvidas, adaptado de Elbary e colaboradores (2002) é adequado.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA

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

A caracterização dos sistemas nanoestruturados desenvolvidos se deu em triplicata de lote e envolveu a análise do tamanho médio de partículas, IPd, potencial zeta, pH, diâmetro médio de volume (D_{4,3}), diâmetro médio de superfície (D_{3,2}), span, teor de vimpocetina presente nas nanocápsulas e porcentagem de fármaco encapsulado.

Os resultados estão apresentados na tabela 5 e, nas figuras 9 e 11, é possível observar os gráficos de distribuição de tamanho de partículas e potencial zeta (n=3) obtidos através da espectroscopia de correlação de fótons e microeletroforese, respectivamente. Na figura 10, é

possível observar a distribuição de tamanho das suspensões obtidas através da difração a laser.

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

Parâmetro	NC-OC	NC-TCM
pH	6,61 ± 0,01	6,31 ± 0,03*
Diâmetro médio (nm)	157,34 ± 4,68	137,79 ± 4,20*
IPd	0,102 ± 0,008	0,152 ± 0,021*
Potencial zeta (mV)	- 17,9 ± 1,8	- 11, 3 ± 2,5*
D_{4,3} (µm)	0,778 ± 0,483	0,252 ± 0,007
D_{3,2} (µm)	0,220 ± 0,012	0,216 ± 0,002
Span	0,835 ± 0,212	0,673 ± 0,083
Teor (%)	94,53 ± 1,85	94,84 ± 0,62
Eficiência de encapsulamento (%)	99,94 ± 0,01	99,97 ± 0,01

* Diferença significativa entre as formulações

Figura 9 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das formulações desenvolvidas (n=3), obtidos através da espectroscopia de correlação de fótons

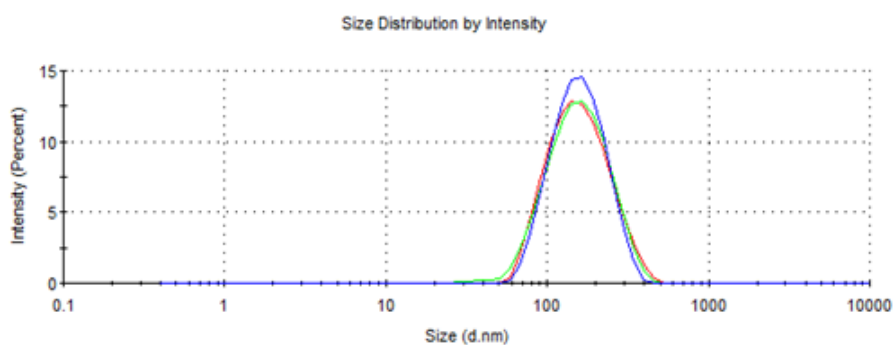
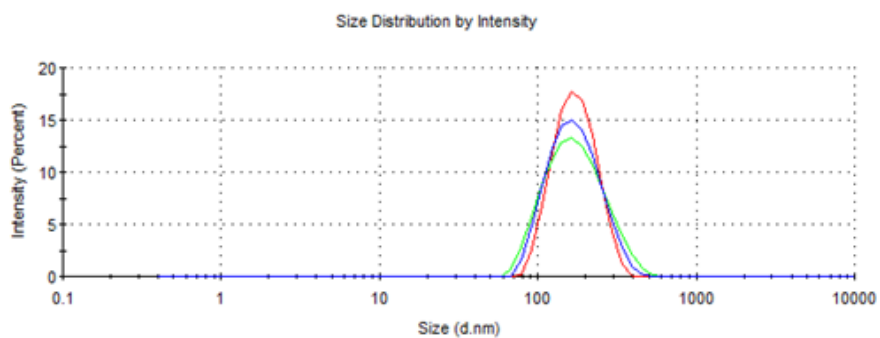


Figura 10 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas (n=3), obtidos através de difração a laser

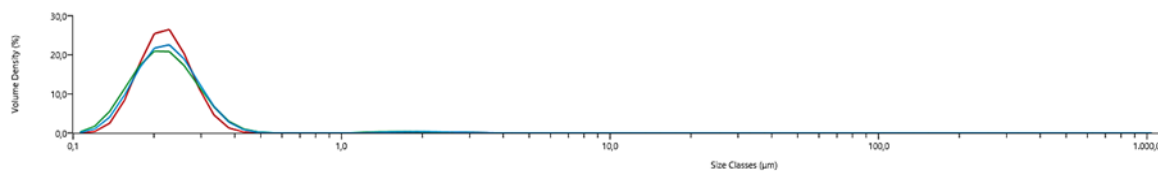
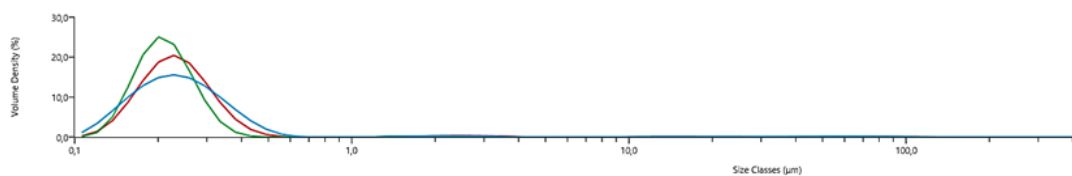
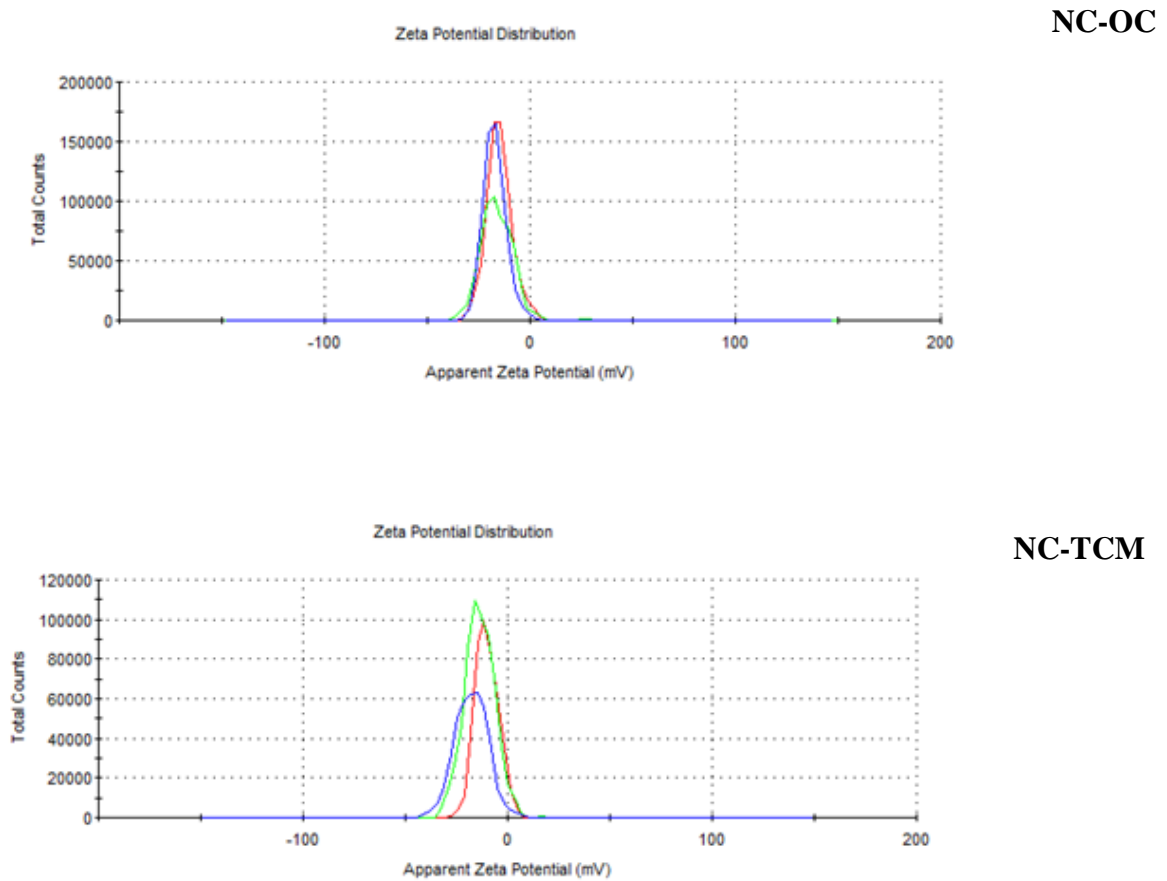


Figura 11 – Gráficos do potencial zeta das formulações (n=3), obtidos através de eletroforese



Como é possível observar na tabela 5, as suspensões apresentaram diâmetro médio de partículas entre 138 e 157 nm, quando analisadas por espectroscopia de correlação de fótons, apresentando faixa de tamanho condizente com o método de deposição interfacial de polímero pré-formado (CHARÃO et al., 2015; CORADINI et al., 2014; FONTANA et al., 2014; LOBATO et al., 2015, 2013; LORENZONI, 2015). No método por difração a laser, as suspensões também apresentaram diâmetro médio em volume ($D_{4,3}$) e diâmetro médio de superfície ($D_{3,2}$) na faixa nanométrica.

Lobato e colaboradores, em 2015, desenvolveram nanocápsulas de núcleo lipídico contendo o antioxidante bixina, através da técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado. As nanoestruturas desenvolvidas apresentaram $D_{4,3}$ de 195 ± 27 nm, $D_{3,2}$ de 138 ± 13 nm e o diâmetro médio de partículas analisado por espectroscopia de correlação de fótons foi de 190 ± 9 nm.

Trabalhos que utilizaram etilcelulose como polímero e/ou óleo de coco como núcleo no desenvolvimento de nanocápsulas, com outros fármacos, por deposição interfacial de polímero pré-formado, também encontraram diâmetros médios correlacionáveis aos deste trabalho (130-260 nm) (CHASSOT et al., 2014; LORENZONI, 2015; SANTOS et al., 2014). Também foi possível observar que o tipo de óleo empregado influenciou significativamente o tamanho médio das partículas, onde as formulações contendo TCM apresentaram diâmetros inferiores aos das formulações com OC. Segundo a literatura, sabe-se que a natureza do óleo pode influenciar no diâmetro médio das nanocápsulas, pois a viscosidade, tensão interfacial e hidrofobicidade dos óleos empregados podem interferir no tamanho das partículas formadas (LOSA et al., 1993; SCHAFFAZICK et al., 2003a; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Além disso, os óleos mais viscosos, devido a maior resistência a tensão interfacial, podem originar nanocápsulas com diâmetros superiores (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

O IPd e o span indicam a homogeneidade de distribuição de tamanho do sistema formado, em que valores inferiores a 0,2 e 2,0, respectivamente, são indicativos de sistemas com homogeneidade de distribuição de tamanho (GUTERRES; BENVENUTTI; POHLMANN, 2012; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; LOBATO et al., 2015, 2013; OURIQUE et al., 2014). A análise de tamanho de partícula e homogeneidade do sistema, através da difração a laser, é muito utilizada devido a sua ampla faixa de medição, ou seja, a análise possui a finalidade de detectar partículas maiores presentes em sistemas submicrométricos, uma vez que a espectroscopia de correlação de fótons, apesar de muito eficaz na determinação de tamanho de partículas nanométricas, não é capaz de detectar partículas maiores. Sendo assim, a difração a laser é uma importante ferramenta para a verificação de sistemas unimodais (KECK; MÜLLER, 2008). As nanocápsulas desenvolvidas apresentaram IPd entre 0,102 e 0,152, indicando estreita distribuição de tamanho, e esses resultados corroboraram com o valor de span, para ambas as formulações, que foi inferior a 2,0. As suspensões contendo OC apresentaram IPd menor ($p < 0,05$).

O diâmetro médio de partículas e a homogeneidade dos sistemas são parâmetros fundamentais que devem ser avaliados ao se desenvolver sistemas nanométricos, pois essas características são capazes de influenciar a estabilidade dos sistemas durante armazenamento, toxicidade, capacidade de liberação do fármaco e sua distribuição *in vivo*, como por exemplo, quanto menor e mais homogêneo o sistema, maior a área superficial (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

O potencial zeta caracteriza a carga superficial das nanopartículas e pode ser influenciado pela composição das partículas e sua dispersão no meio, natureza do polímero e do agente estabilizante utilizados e pH do meio. Além disso, o potencial zeta pode ser utilizado para prever a estabilidade das suspensões, uma vez que quanto maior o potencial zeta, em módulo, menores as chances de ocorrer a agregação de partículas, devido à repulsão eletrostática. O mecanismo de impedimento estérico também pode estar envolvido na estabilização (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MOHANRAJ; CHEN, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003a). O potencial zeta das suspensões apresentou-se negativo, para ambas as formulações, variando entre -11 e -18 mV, devido à natureza química do polímero (etilcelulose). Em outros estudos em que a etilcelulose também foi empregada, foi possível observar potencial zeta negativo, com valores próximos aos encontrados neste trabalho (-10 a -24 mV) (BOLSON, 2015; CHASSOT et al., 2014; LORENZONI, 2015). Além disso, houve diferença significativa ($p < 0,05$) no potencial zeta para as formulações preparadas com diferentes óleos (TCM ou OC), indicando interferência do núcleo oleoso na carga de superfície das nanopartículas.

O pH é uma medida de grande importância nos sistemas nanométricos, fornecendo informações sobre a estabilidade dos sistemas desenvolvidos, já que alterações significativas durante o armazenamento podem indicar degradação de algum componente da formulação ou mesmo difusão de alguns fármacos (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003a). Estudos relatam que, normalmente, quando se utiliza o método de deposição interfacial de polímero pré-formado, as medidas de pH variam na faixa ácida a neutra (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). No presente estudo, ambas as formulações apresentaram valores levemente ácidos de pH, e a formulação NC-TCM diferiu significativamente ($p < 0,05$) da NC-OC, indicando uma leve interferência do óleo no pH das formulações desenvolvidas.

Quanto ao teor total de vimpocetina nas nanocápsulas, este foi adequado, aproximadamente 95%, para ambas as formulações, sem apresentar diferença significativa entre elas ($p > 0,05$). A eficiência de encapsulamento (EE) do fármaco nos sistemas nanoestruturados foi de aproximadamente 100%, indicando que, provavelmente, o fármaco está associado às nanocápsulas, independente do óleo utilizado. Este parâmetro possui fundamental importância na caracterização de sistemas nanoparticulados, visto que a quantidade de fármaco encapsulada vai refletir na sua cinética de liberação. Isto se deve, possivelmente, à natureza lipofílica da vimpocetina, fazendo com que possua maior afinidade

pelas nanocápsulas do que pelo meio dispersante. Outros sistemas nanométricos contendo vimopocetina também apresentaram EE semelhantes ao encontrado neste trabalho. Em 2010, Zhuang e colaboradores desenvolveram carreadores lipídicos nanoestruturados, pela técnica de homogeneização a alta pressão, para a veiculação de vimopocetina, as quais apresentaram EE entre 83,2% e 95,3%. El-Dahmy e colaboradores (2014) desenvolveram micelas poliméricas contendo vimopocetina, pela técnica do filme hidratado, em que algumas formulações desenvolvidas apresentaram EE de aproximadamente 95%.

Recentemente, Bolson (2015) desenvolveu nanocápsulas contendo vimopocetina, pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado, utilizando o mesmo polímero (etilcelulose) e os mesmos óleos (OC ou TCM) empregados neste trabalho. O tamanho médio de partículas foi de 169 ± 09 nm e 134 ± 17 nm para as nanocápsulas contendo OC e TCM, respectivamente, valores que são similares aos do presente trabalho ($157,34$ nm e $137,79$ nm para NC-OC e NC-TCM, respectivamente), apesar dos sistemas terem sido preparados com diferentes concentrações. Além disso, Bolson também verificou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tamanhos médio de partículas, em que as NC-TCM também se apresentaram menores que as NC-OC. O IPd foi $0,111 \pm 0,01$ para NC-OC e $0,124 \pm 0,07$ para NC-TCM, indicando também a homogeneidade do sistema proposto. O potencial zeta foi negativo, devido à natureza da etilcelulose e apresentou-se alto em módulo ($-24 \pm 1,5$ mV e $-20 \pm 2,2$ mV para NC-OC e NC-TCM, respectivamente). O pH, assim como neste trabalho, foi levemente ácido (entre 6,42 e 6,69) com diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações preparadas com OC ou TCM. O teor de vimopocetina em ambas as formulações foi de $95 \pm 0,01$ % e a eficiência de encapsulamento foi próxima a 100%, corroborando com o presente estudo.

5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA

Suspensões coloidais não tendem a separar fases devido ao tamanho das partículas/movimento Browniano, porém é possível que ocorra aglomeração das partículas com consequente sedimentação, instabilidade do polímero, fármaco ou demais componentes utilizados, ou ainda, a liberação antecipada do fármaco (MORA-HUERTAS; FESSI;

ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003a; WU; ZHANG; WATANABE, 2011). Com isso, as características físico-químicas dos sistemas particulados devem ser reavaliadas após um período de armazenamento, como aspecto macroscópico, tamanho médio de partículas, potencial zeta, IPd e teor (WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

Assim, as suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina foram armazenadas, por 30 dias, em temperatura ambiente e protegidas da luz, para avaliação da estabilidade destes sistemas. Durante este período, as suspensões de nanocápsulas apresentaram uma leve alteração na cor, passando de branca leitosa para branca amarelada. Além disso, foi possível perceber alteração no odor de ambas formulações. Não se observou a presença de precipitados nas formulações.

A análise do diâmetro médio de partículas, por espectroscopia de correlação de fótons (figura 12), demonstrou que não houve diferença significativa entre o tempo inicial e após 30 dias ($p > 0,05$), sendo que todas as formulações mantiveram-se na faixa nanométrica durante o armazenamento. Pela análise por difração a laser, evidenciou-se a presença de partículas em escala micrométrica. Os valores de $D_{4,3}$ foram de $2,39 \pm 1,87 \mu\text{m}$ para NC-OC e $2,59 \pm 0,45 \mu\text{m}$ para NC-TCM e os valores de $D_{3,2}$ foram de $0,228 \pm 0,026 \mu\text{m}$ para NC-OC e $0,251 \pm 0,012 \mu\text{m}$ para NC-TCM.

Figura 12 – Diâmetro médio das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, após 30 dias de armazenamento

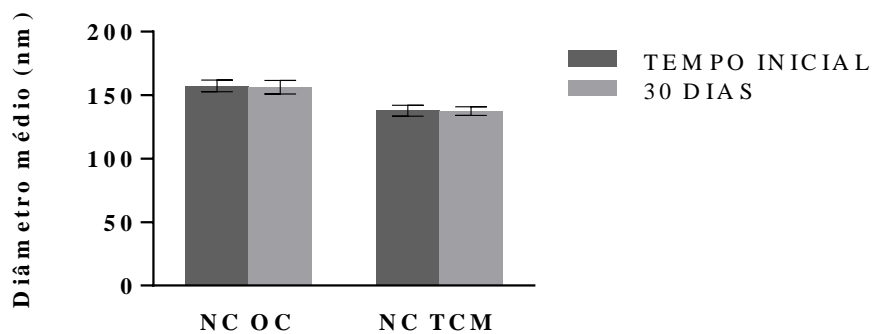
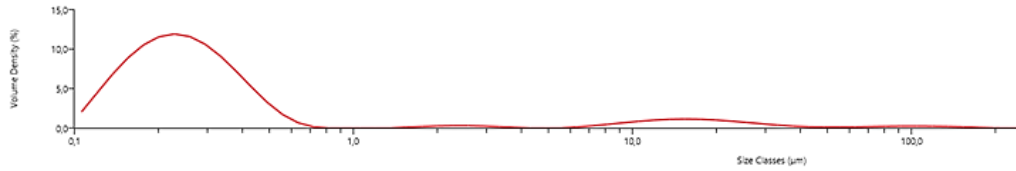
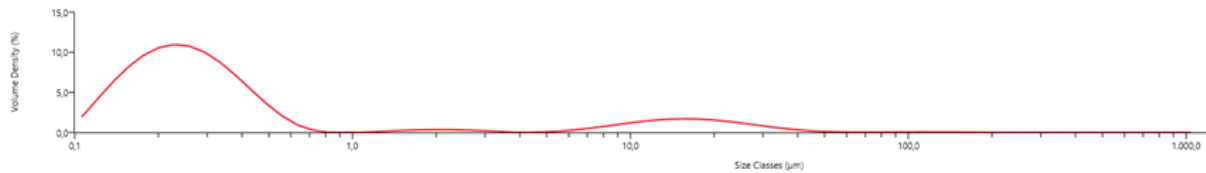


Figura 13 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas das suspensões de nanocápsulas após 30 dias de armazenamento

NC-OC

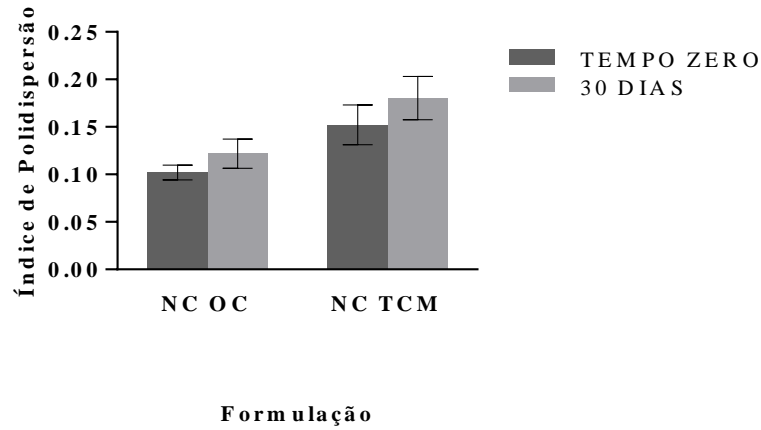


NC-TCM



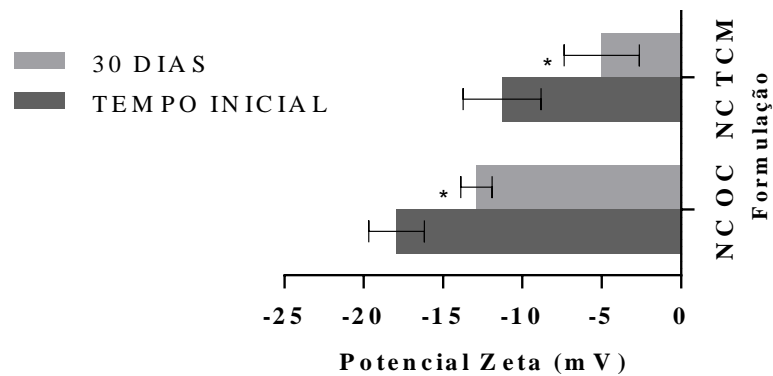
Os sistemas desenvolvidos apresentaram valores de IPd adequados (inferiores a 0,180), para ambas as formulações, após os 30 dias de armazenamento (figura 14), não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao tempo inicial. Porém, os valores de span ($11,18 \pm 17,28$ para NC-OC e $25,60 \pm 22,41$ para NC-TCM) não foram adequados, indicando falta de homogeneidade do sistema, uma vez que populações micrométricas foram detectadas através de difração a laser.

Figura 14 – IPd das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, após 30 dias



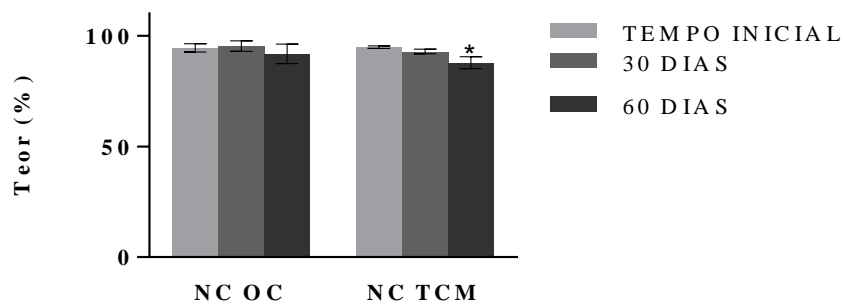
O potencial zeta das formulações também é um parâmetro importante a ser avaliado na estabilidade das mesmas, pois a diminuição do potencial zeta, em módulo, pode favorecer a agregação das partículas. No presente trabalho, o potencial zeta diminuiu significativamente, em módulo ($p < 0,05$), quando comparado com as formulações logo após a preparação, para ambas as suspensões (NC-OC e NC-TCM), como pode ser observado na figura 15.

Figura 15 – Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas após 30 dias de armazenamento



Por fim, foi observado que o teor total de fármaco, nas formulações preparadas com OC ou TCM, não sofreu decaimento significativo ($p > 0,05$) após 30 dias de armazenamento, mantendo-se acima de 90%. Para este parâmetro, análise também foi realizada após 60 dias de armazenamento, demonstrando que a formulação NC-TCM teve um decaimento significativo ($p < 0,05$) no teor da vimpocetina, ficando em $87,81 \pm 2,64 \%$, conforme pode ser observado na figura 16.

Figura 16 – Teor de vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas, após o período de armazenamento



Apesar das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina apresentarem alguns parâmetros satisfatórios após o armazenamento por 30 dias, o aspecto macroscópico, o potencial zeta e, principalmente, as análises obtidas pelo Mastersizer ($D_{4,3}$ e span), como mencionado anteriormente, sofreram modificações. É de conhecimento que sistemas nanoestruturados tendem a apresentar limitada estabilidade em função de longo tempo de armazenamento. Com a finalidade de contornar estes problemas, formas farmacêuticas sólidas contendo as nanoestruturas têm sido desenvolvidas, como os granulados e comprimidos (FRIEDRICH et al., 2010a, 2010b).

5.5 LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA VIMPOCETINA A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PELA TÉCNICA DE DIFUSÃO EM SACO DE DIÁLISE

A cinética de liberação *in vitro* da vimpocetina nas suspensões de nanocápsulas foi realizada através do método de difusão em saco de diálise, a 37 °C, como descrito anteriormente, sendo usual para sistemas nanométricos. No presente trabalho, o estudo foi conduzido por 120 horas para as suspensões de nanocápsulas e por 12 horas para a solução metanólica do fármaco (controle), sendo respeitada, durante todo o experimento, a condição *sink*. É importante salientar que o método utilizado apresentou-se específico, ou seja, o meio de liberação (tampão fosfato pH 6,8/etanol 70:30 v/v) não interferiu na quantificação do fármaco. Além disso, o método foi linear (ANOVA $p < 0,05$) para a faixa de concentração de 0,2 a 20 µg/mL, com a equação $y = 109.085x + 3.823$ ($r = 0,9994$), obtida a partir de três curvas analíticas e LD igual a 0,005 µg/mL e LQ de 0,017 µg/mL.

Conforme pode ser observado na figura 17, as suspensões de nanocápsulas, independentemente do óleo utilizado, controlaram a liberação da vimpocetina, quando comparadas com a solução metanólica do fármaco. Em 12 horas de experimento, a suspensão NC-OC liberou $6,64 \pm 0,23$ % e a suspensão NC-TCM $5,48 \pm 0,13$ % de fármaco, enquanto que a solução metanólica de vimpocetina difundiu o correspondente a $23,41 \pm 2,36$ %. Em 120 horas, as suspensões de nanocápsulas apresentaram uma liberação média semelhante, de $38,74 \pm 0,69$ % e $38,43 \pm 0,44$ % para NC-OC e NC-TCM, respectivamente. Cabe ressaltar que o experimento com a solução metanólica de vimpocetina foi conduzido somente até 12 horas, pois, durante esse período, houve a formação de cristais, semelhantes a agulhas, dentro do saco de diálise (figura 18).

Figura 17 – Perfil de liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das suspensões das nanocápsulas

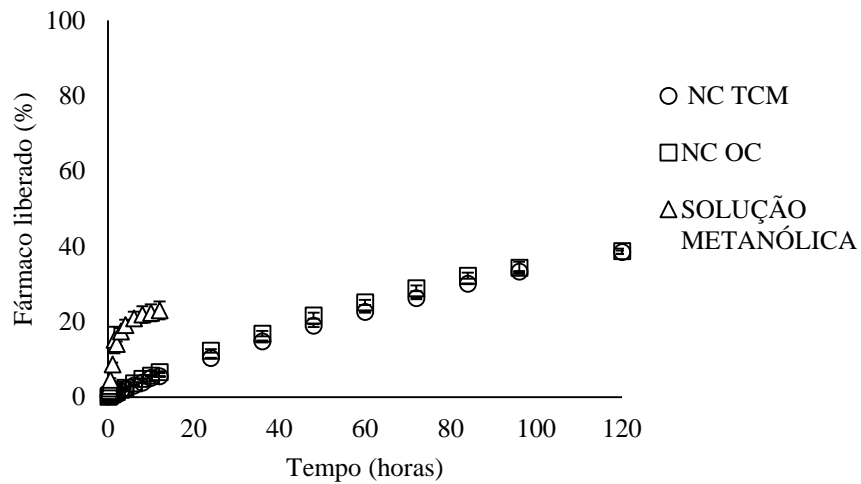
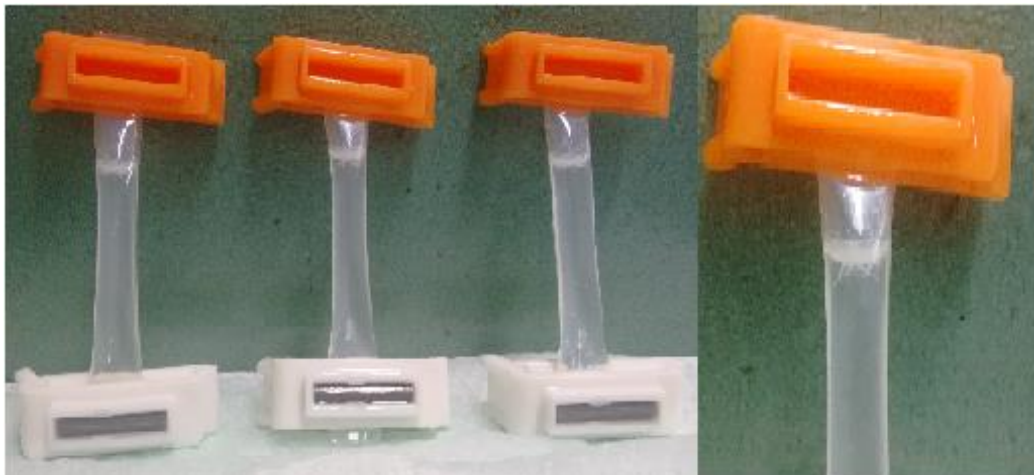


Figura 18 – Foto dos sacos de diálise contendo a solução metanólica de vimpocetina após a formação dos cristais



No trabalho de Bolson (2015) também foi realizado o teste de liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das nanocápsulas de etilcelulose, em que foram capazes de controlar a liberação do fármaco (44 – 64% em 72 horas), quando comparadas à solução metanólica da

vimopocetina (100% em 16 horas), empregando o mesmo meio do presente trabalho e a mesma técnica (difusão em saco de diálise).

O mecanismo de liberação da vimopocetina a partir das nanocápsulas (tabela 6) foi avaliado empregando a Lei da Potência. Neste modelo, a liberação do fármaco é exponencialmente relacionada com o tempo (LOBO; COSTA, 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002) e é, geralmente, utilizada para a liberação de formas farmacêuticas poliméricas, em que o mecanismo de liberação não é conhecido ou quando pode ocorrer mais de um fenômeno de liberação (AGNES; GONZÁLEZ ORTEGA, 2003; RITGER; PEPPAS, 1987). No modelo de Korsmeyer-Peppas, o n é utilizado para caracterizar o comportamento, que pode ser classificado em Fickiano (caso I) e não Fickiano (transporte anômalo e transporte de caso II) (AGNES; GONZÁLEZ ORTEGA, 2003; LOBO; COSTA, 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; RITGER; PEPPAS, 1987). O mecanismo de difusão fickiana ocorre quando n é inferior a 0,43, para valores de n maiores ou igual a 0,43 e inferiores a 0,85 o mecanismo de liberação do fármaco é por transporte anômalo e para valores de n superiores ou igual a 0,85 o mecanismo é por transporte de caso II (RITGER; PEPPAS, 1987).

Tabela 6 – Mecanismo de liberação da vimopocetina a partir das suspensões de nanocápsulas

Lei da Potência	NC-OC	NC-TCM
r	0,9983 ± 0,0002	0,9995 ± 0,0001
a	0,0295 ± 0,0014	0,0201 ± 0,0001
n	0,7464 ± 0,0092	0,8221 ± 0,0015

Como pode ser observado na tabela acima, os valores do expoente de liberação (n), de ambas as formulações, indicaram que a liberação é do tipo transporte anômalo, em que a liberação do fármaco depende da erosão ou relaxamento do polímero, seguido pela difusão do princípio ativo (RITGER; PEPPAS, 1987). O transporte anômalo é um modelo de difusão não

Fickiana que geralmente é observado em sistemas contendo polímeros vítreos, ou seja, a temperatura do sistema é inferior à temperatura de transição vítrea do polímero (T_g) (AGNES; GONZÁLEZ ORTEGA, 2003). De acordo com o Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), a T_g da etilcelulose é de 129 a 133° C, ou seja, muito superior à temperatura do experimento (37° C), corroborando com o resultado obtido neste trabalho. Assim, o mecanismo de liberação da vimpocetina, a partir das nanocápsulas desenvolvidas, depende do relaxamento da etilcelulose e da difusão do princípio ativo.

Bolson (2015) ao avaliar o mecanismo de liberação da vimpocetina (1,0 mg/mL) a partir de nanocápsulas de etilcelulose (1,0 % de polímero), encontrou o transporte anômalo como mecanismo de liberação da vimpocetina para as nanocápsulas que utilizavam como núcleo o OC. Contudo, para as formulações desenvolvidas com o TCM, o mecanismo de liberação foi o transporte de caso II, podendo ser devido à pequena tendência ao inchamento apresentada pelo polímero, quando submerso no TCM. Lorenzoni (2015) desenvolveu nanocápsulas de etilcelulose, contendo como núcleo o OC ou TCM para a associação da crisina, as quais apresentaram como mecanismo de liberação do princípio ativo o transporte anômalo, independente do tipo de óleo utilizado, assim como neste trabalho.

Considerando o conjunto de resultados até então relatado, as suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina são sistemas adequados para funcionarem como produtos intermediários para a preparação de granulados e comprimidos.

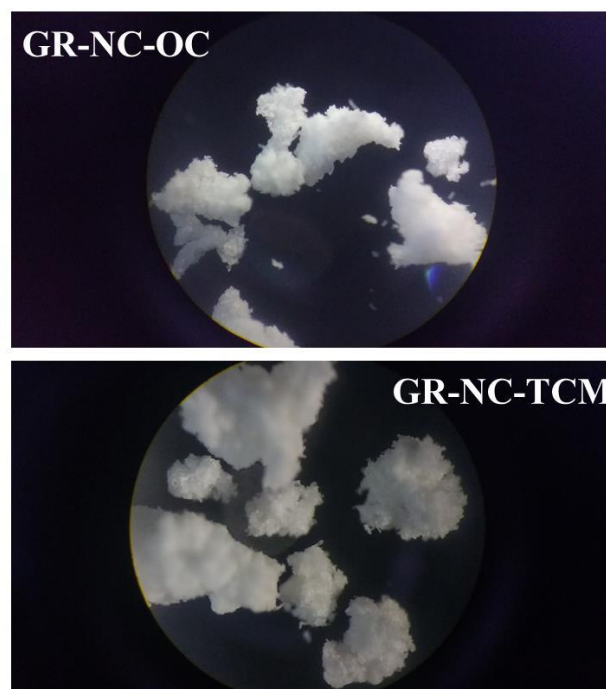
5.6 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GRANULADOS A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO VIMPOCETINA

Os granulados contendo vimpocetina nanoencapsulada, obtidos através de granulação via úmida, foram preparados utilizando-se concentrações preconizadas pelo Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), sendo PVP K-30 o aglutinante, croscarmelose sódica o desintegrante e CMC 102 o diluente. A figura 19 mostra o aspecto macroscópico dos granulados, após secagem em estufa, e a figura 20 apresenta uma imagem dos mesmos, obtida através de microscópio óptico.

Figura 19 - Aspecto macroscópico dos granulados obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina



Figura 20 - Imagens dos granulados contendo vimpocetina, obtidas através de microscópio óptico (aumento 40 vezes)



Conforme a tabela 2, do item 4.2.6, após o preparo, os granulados contendo vimpocetina associada a nanocápsulas foram caracterizados quanto ao teor de fármaco, tamanho médio de partículas/IPd (após dispersão) e umidade. Além disso, foi realizada a caracterização dos aspectos tecnológicos dos granulados, como ângulo de repouso, densidade bruta, densidade de compactação, Índice de Carr e Fator de Hausner. Todas as análises foram realizadas em triplicata de lote (n=3), com os granulados preparados a partir das nanocápsulas de OC (GR-NC-OC) e a partir das nanocápsulas contendo TCM (GR-NC-TCM).

Como pode ser observado na tabela 7, o teor de vimpocetina nos granulados foi de aproximadamente 5 mg/g, correspondente a $92,62 \pm 0,79$ % para GR-NC-OC e $91,84 \pm 2,42$ % para GR-NC-TCM, valores próximos aos encontrados para as suspensões de nanocápsulas contendo vimpocetina, demonstrando que o processo utilizado para o preparo dos granulados foi adequado. Friedrich e colaboradores, em 2010, produziram granulados a partir de suspensões de nanocápsulas de PCL, através da granulação via úmida, e encontraram teores de fármaco (dexametasona) na faixa de 84% a 94%, semelhantes ao encontrado nas nanocápsulas que deram origem aos granulados.

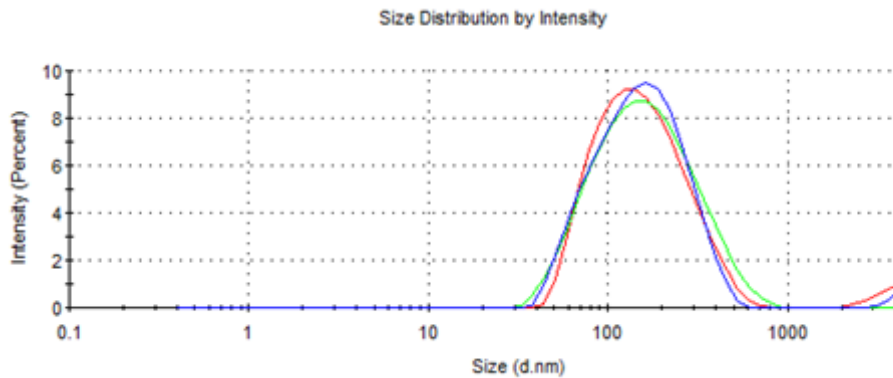
Diâmetros médios na faixa nanométrica foram encontrados, após a dispersão e filtração dos granulados (tabela 7), semelhantes aos diâmetros das suspensões de origem. Os valores de IPd também foram aceitáveis para as formulações desenvolvidas, tendo em vista o processamento das formulações e demais componentes. Na figura 21, é possível observar os gráficos de distribuição de tamanho de partículas, obtidos através da espectroscopia de correlação de fótons, após dispersão em água.

Tabela 7 - Características físico-químicas e tecnológicas dos granulados contendo vimpocetina (3,0 mg/mL) associada às nanocápsulas, preparadas com OC ou TCM

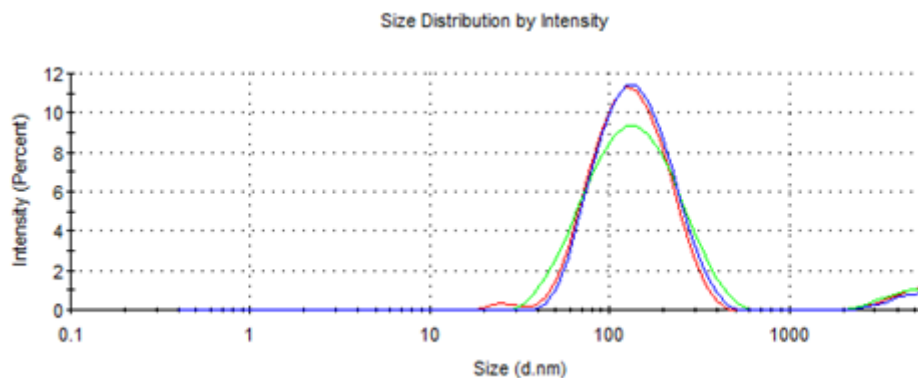
Parâmetro	GR-NC-OC	GR-NC-TCM
Teor (mg/g de granulado)	5,16 ± 0,04	5,11 ± 0,13
Diâmetro médio (nm) após dispersão em água	137 ± 4	133 ± 12
IPd	0,305 ± 0,02	0,284 ± 0,02
Umidade (%)	9,02 ± 0,55	8,45 ± 0,37
Ângulo de repouso (°)	31 ± 0	30 ± 1
Densidade bruta (g/mL)	0,300 ± 0,05	0,259 ± 0,01
Densidade de compactação (g/mL)	0,358 ± 0,05	0,313 ± 0,02
Índice de Carr (%)	15,73 ± 1,43	17,26 ± 1,55
Fator de Hausner	1,19 ± 0,02	1,21 ± 0,02

Figura 21 – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas dos granulados (n=3), obtidos através da espectroscopia de correlação de fótons, após dispersão em água/filtração.

GR-NC-OC



GR-NC-TCM



O teor de umidade dos granulados foi inferior a 10%. Sabe-se que a avaliação da umidade de granulados é um parâmetro crítico no desenvolvimento de formulações, uma vez que pode interferir nas propriedades físico-químicas das formulações, como fluxo, dureza e compressibilidade, com isso, é preconizado que o teor de umidade fique na faixa de 1% a 3% (HOAG; DAVE; MOOLCHANDANI, 2008). Além disso, a umidade pode provocar aderência do pó aos punções (AULTON, 2005). Apesar dos teores de umidade terem sido superiores a 3%, não foi observada interferência negativa da umidade nos parâmetros tecnológicos. Cabe ressaltar que, com a intenção de diminuir o teor de umidade dos granulados, foi realizado um teste preliminar de secagem, porém, não houve modificação do mesmo após 6 ou 12 horas de secagem. Rachmawati e colaboradores (2014), ao produzirem

granulados a partir de nanoemulsões de curcumina, obtiveram teores de umidade de 1,1%. Já Friedrich e colaboradores (2010b) obtiveram teores de umidade próximos aos encontrados neste trabalho (aproximadamente 8%), e também obtiveram adequadas características tecnológicas.

Sabendo-se que os grânulos podem ser convertidos em comprimidos, é de suma importância avaliar as propriedades de fluxo dos granulados, como através da determinação do ângulo de repouso, Índice de Carr (IC) e Fator de Hausner (FH) (AULTON, 2005; FRIEDRICH et al., 2010b; LAMOLHA; SERRA, 2007). Os granulados obtidos apresentaram propriedades de fluxo aceitáveis (tabela 7), logo não foi necessária a adição de deslizantes à formulação, uma vez que IC inferior a 20% e FH menor que 1,25 são indicativos de fluxo bom ou tolerável, juntamente com um ângulo de repouso inferior ou igual a 30° (AULTON, 2005; GIL, 2010). No trabalho de Friedrich e colaboradores (2010b), os valores de IC e FH encontrados para os granulados, contendo nanocápsulas de PCL, foram superiores aos encontrados neste trabalho ($24,34 \pm 3,59$ % e $1,32 \pm 0,06$, respectivamente), além disso, o ângulo de repouso foi de 35°, com isso, optaram por aprimorar a capacidade de escoamento dos grânulos através da adição de um deslizante (dióxido de silício coloidal ou talco; 0,05%).

5.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DA VIMPOCETINA NOS GRANULADOS

O método para quantificação da vimpocetina nos granulados foi validado quanto à especificidade, linearidade, precisão (inter e intra-dias) e exatidão. A especificidade foi avaliada através da análise dos granulados obtidos a partir de suspensões de nanocápsulas contendo ou não vimpocetina. A análise dos cromatogramas permitiu observar que os componentes da formulação não são capazes de interferir na quantificação da vimpocetina, ou seja, o método é específico para a determinação do fármaco a partir dos granulados (GR-NC-OC e GR-NC-TCM). Além disso, o pico da vimpocetina apresentou-se puro, índice de pureza de pico igual a 1,000, quando analisada através do detector do tipo PDA.

A linearidade foi verificada através da análise das curvas analíticas (n=3), descrita pela equação $y = 102.452x + 23.319$, apresentando coeficiente de correlação maior que 0,99, ou

seja, o método proposto é linear (ANOVA $p < 0,05$) e apresenta limite de detecção de 0,034 $\mu\text{g/mL}$ e limite de quantificação de 0,113 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando sensibilidade do método para baixas concentrações de vimpocetina.

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade intra-dia e precisão intermediária (entre-dias) (ANVISA, 2003; GIL, 2010; ICH, 2005). Na tabela 8, é possível observar os resultados de precisão obtidos para os granulados, onde em todas as análises o desvio padrão relativo foi inferior a 5%, demonstrando que o método é preciso (ANVISA, 2003).

Tabela 8 – Repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão entre-dia dos granulados contendo vimpocetina nanoencapsulada

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	5,00	4,67 \pm 0,11	93,30 \pm 2,26	2,42
Dia 2 (n=6)	5,00	4,55 \pm 0,10	91,05 \pm 1,93	2,12
Entre-dias (n=12)	5,00	4,61 \pm 0,12	92,18 \pm 2,32	2,52

Por fim, a exatidão foi verificada através da análise de três níveis de concentração da vimpocetina (baixo, médio e alto) e os valores de recuperação obtidos neste ensaio são apresentados na tabela 9, demonstrando que o método proposto é exato. Conforme preconizado os valores de exatidão devem ser entre 95% e 105% (ICH, 2005).

Tabela 9 – Análise de exatidão dos granulados contendo vimpocetina nanoencapsulada

Nível de concentração	Amostra conhecida (µg/mL)	Concentração adicionada (µg/mL)	Valor obtido (µg/mL)	Recuperação (%)
Baixo	1,53	2,00	3,95 ± 0,21	105,60 ± 3,81
Médio	1,53	3,00	4,71 ± 0,14	104,08 ± 3,14
Alto	1,53	4,00	5,83 ± 0,23	105,38 ± 4,18

Com esses resultados, é possível concluir que o método analítico para a quantificação de vimpocetina a partir dos granulados, adaptado de Elbary e colaboradores (2002), é adequado.

5.8 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPRIMIDOS CONTENDO VIMPOCETINA ASSOCIADA ÀS NANOCÁPSULAS

Após a caracterização dos granulados, foi possível concluir que estes são adequados para a preparação de comprimidos. Então, para a produção dos compactos contendo vimpocetina (2,5 mg) associada a nanocápsulas, os granulados foram misturados a excipientes extragranulares [PEG 6000 (lubrificante), croscarmelose sódica (desintegrante) e CMC 102 (diluente)], conforme recomendações do Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Primeiramente, foi produzido um lote de comprimidos a partir dos granulados contendo óleo de coco (CP-GR-NC-OC), e um lote de comprimidos a partir dos granulados contendo TCM (CP-GR-NC-TCM), para avaliação de algumas propriedades, como friabilidade, dureza e tempo de desintegração, conforme preconizado na Farmacopeia (ANVISA, 2010). Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Friabilidade, dureza e tempo de desintegração dos comprimidos contendo vimpocetina nanoencapsulada

Parâmetro	Friabilidade (%) (n=20)	Dureza (N) (n=10)	Tempo de desintegração (minutos) (n=6)
CP-GR-NC-OC	0,60	12,25 ± 6,56	< 1,5
CP-GR-NC-TCM	0,68	17,34 ± 8,51	< 1,5

A friabilidade e a dureza expressam a resistência mecânica do comprimido em relação ao desgaste que podem sofrer até o medicamento chegar ao consumidor, e são testes considerados oficiais pela nossa farmacopeia, que visam demonstrar a resistência dos comprimidos à quebra e/ou à fricção (ALDERBORN; FRENNING, 2008; ANVISA, 2010; GIL, 2010). O teste de friabilidade determina a resistência dos comprimidos à abrasão, enquanto que o teste de dureza determina a resistência dos comprimidos ao esmagamento ou à ruptura por pressão radial (ALDERBORN; FRENNING, 2008; ANVISA, 2010).

O teste de friabilidade preconiza que nenhum comprimido, ao final do ensaio, deve estar quebrado, lascado ou rachado, sendo que a perda de peso deve ser de no máximo 1,5%. Já quanto à dureza, o resultado possui caráter informativo (ANVISA, 2010). Assim sendo, os comprimidos de vimpocetina, produzidos a partir de granulados contendo nanocápsulas, apresentaram-se adequados.

O teste de desintegração permite verificar se os comprimidos são capazes de se fragmentar em um intervalo de tempo que, para comprimidos sem revestimento, não deve ser superior a 30 minutos (ANVISA, 2010; AULTON, 2005). O tempo de desintegração, para ambos os comprimidos desenvolvidos, foi de aproximadamente 1 minuto (tabela 10). Um superdesintegrante (croscarmelose sódica), dentro e fora dos granulados, foi inserido para favorecer este parâmetro, o que é importante para a liberação das subunidades, no caso de sistemas multiparticulados.

Segundo Rachmawati e colaboradores (2014), comprimidos contendo nanoemulsão de curcumina apresentaram tempo de desintegração de aproximadamente 6 minutos. Já nos

estudos de Friedrich e colaboradores (2010), o tempo de desintegração para comprimidos de dexametasona nanoencapsulada foi de 23,68 minutos.

Após caracterizar inicialmente os comprimidos quanto a esses parâmetros, foram produzidos 3 lotes de cada formulação (CP-GR-NC-OC e CP-GR-NC-TCM) para a avaliação dos demais parâmetros (tabela 11).

Tabela 11 – Caracterização dos comprimidos contendo vimopocetina (2,5 mg) associada às nanocápsulas (n=3)

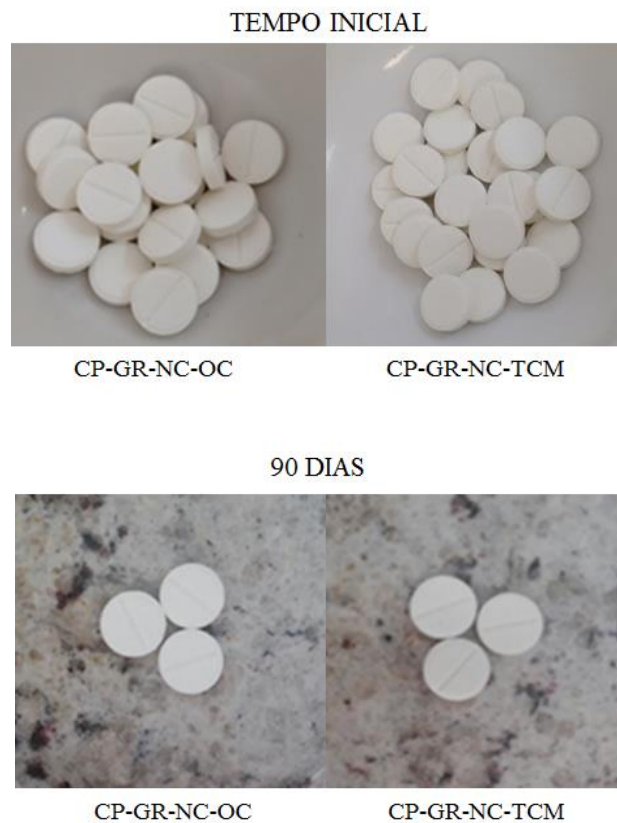
Parâmetro	Teor (%)	Peso médio (mg)	Dureza (N)	Umidade (%)	Espessura (mm)
CP-GR-NC-OC	99,01 ± 0,85	547 ± 0,001	7,6 ± 1,5	9,84 ± 0,24	3,68 ± 0,05
CP-GR-NC-TCM	101,84 ± 3,49	546 ± 0,001	10,6 ± 2,0	9,07 ± 0,60	3,68 ± 0,00

Conforme a tabela acima, o peso médio dos comprimidos foi adequado ao planejado (550 mg) e os teores de umidade foram inferiores a 10%, próximos aos valores obtidos para os granulados. O teor de vimopocetina nos comprimidos foi condizente ao valor teórico (2,5 mg). Rachmawati e colaboradores (2014) também encontraram teores próximos a 100% para comprimidos contendo nanoemulsão de curcumina. Em outro estudo, Friedrich e colaboradores (2010a) obtiveram teor de 95,26 ± 3,34 % para comprimidos contendo nanocápsulas de dexametasona.

5.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS COMPRIMIDOS CONTENDO VIMPOCETINA NANOENCAPSULADA

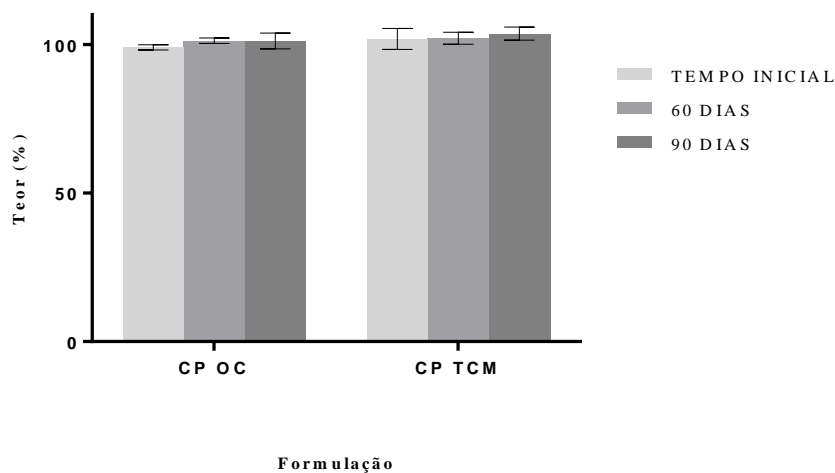
O objetivo do estudo de estabilidade dos comprimidos é avaliar se suas características físico-químicas, como teor, sofrem influências das variáveis ambientais, tais como luz, temperatura e umidade, durante um período de tempo (ROMAN, 2008). No presente trabalho, os comprimidos desenvolvidos foram avaliados quanto ao teor de vimpocetina, durante 90 dias, em temperatura ambiente, protegidos da luz e umidade. Verificou-se que não houve alteração no aspecto macroscópico das unidades após o período de armazenamento. A figura 22 mostra o aspecto macroscópico dos compactos após a preparação e após 90 dias.

Figura 22 – Aspecto macroscópico dos comprimidos (OC e TCM), após a preparação e 90 dias de armazenamento



De acordo com a figura 23, os comprimidos mantiveram o teor de vimpocetina próximo a 100%, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre o teor inicial e após os 90 dias de armazenamento, para ambas as formulações (CP-GR-NC-OC ou CP-GR-NC-TCM). Cabe ressaltar que o estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas apresentou um decaimento no teor de fármaco, enquanto que, nos comprimidos, o teor manteve-se estável por 90 dias, demonstrando, assim, a necessidade da transformação das suspensões em formas farmacêuticas sólidas, a fim de garantir maior possibilidade de aplicação industrial.

Figura 23 – Teor de vimpocetina nos comprimidos preparados com NC-OC e NC-TCM obtido no estudo de estabilidade



5.10 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA VIMPOCETINA A PARTIR DOS COMPRIMIDOS

O estudo de liberação *in vitro* da vimpocetina, a partir dos comprimidos desenvolvidos, foi um desafio, uma vez que a dissolução, método clássico para avaliar estas formas farmacêuticas, fornece somente a quantidade de fármaco total liberada dos comprimidos, não correspondendo necessariamente ao percentual de vimpocetina liberado das nanoestruturas. Além do mais, a técnica usual para a avaliação da liberação de fármacos a

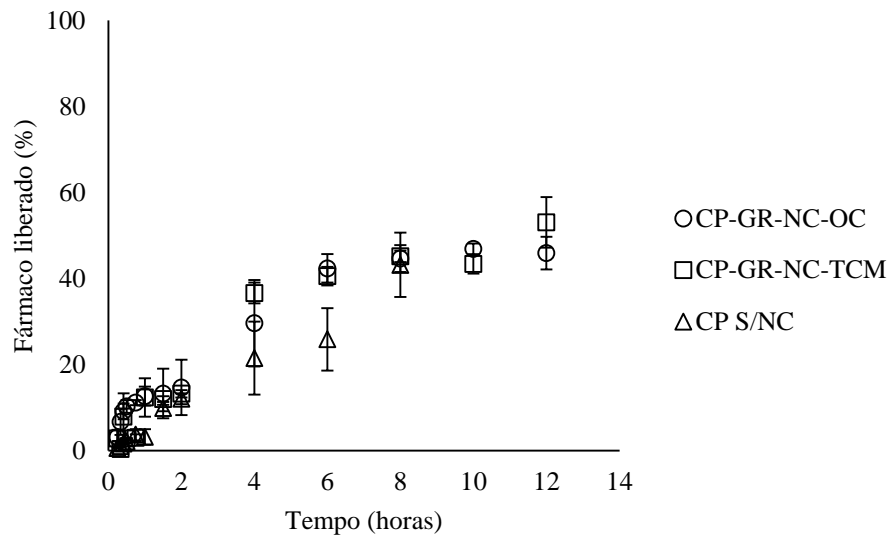
partir de nanoestruturas, a difusão em sacos de diálise, não foi viável para os comprimidos, pois não proporcionava a desintegração dos mesmos, em função da possibilidade de inserir somente pequeno volume de meio no interior dos sacos.

Como alternativa, foi proposta a técnica da difusão reversa em sacos de diálise para promover a desintegração do comprimido e, ao mesmo tempo, separar o fármaco livre efetivamente da formulação nanoparticulada. Cabe ressaltar que não foram encontrados relatos do uso dessa técnica para estudos de liberação *in vitro* de fármacos a partir de comprimidos de base nanotecnológica, sendo que os trabalhos existentes utilizam o dissolutor tradicional para realizar o teste de dissolução dos comprimidos contendo um fármaco associado a nanoestruturas (FRIEDRICH et al., 2010a; RACHMAWATI; YEE; RAHMA, 2014).

Este experimento foi realizado seguindo a metodologia utilizada por Zhuang e colaboradores (2010), com algumas modificações. Neste ensaio, utilizou-se como meio de liberação 900 mL de tampão fosfato pH 6,8, em que CP-GR-NC-OC, CP-GR-NC-TCM ou, ainda, comprimidos de vimpocetina não encapsulada (CP S/NC) foram adicionados ao meio e permaneceram sob agitação (50 rpm) a 37° C, por 12 horas. O método demonstrou ser específico, uma vez que o meio de liberação não interagiu com o pico de quantificação da vimpocetina, e linear (ANOVA $p < 0,05$) na faixa de 0,125 a 7 $\mu\text{g/mL}$, sendo a curva analítica representada pela equação $y = 92.492x + 8017$ ($r = 0,9969$), obtida a partir de três curvas analíticas.

Os perfis de liberação da vimpocetina a partir dos comprimidos com nanocápsulas e dos comprimidos sem nanoestruturas (controle) são apresentados na figura 24. Nas primeiras 6 horas, o CP-GR-NC-OC liberou $42,35 \pm 3,32$ %, o CP-GR-NC-TCM $40,55 \pm 2,14$ %, enquanto que o CP S/NC liberou em média $25,86 \pm 7,26$ %. Em 8 horas, o CP S/NC liberou $43,15 \pm 7,48$ %, enquanto o CP-GR-NC-OC e CP-GR-NC-TCM liberaram $44,61 \pm 3,13$ % e $45,17 \pm 1,35$ %, respectivamente. Após 12 horas de ensaio, $45,89 \pm 3,76$ % e $53,03 \pm 5,88$ % de vimpocetina difundiram a partir do CP-GR-NC-OC e do CP-GR-NC-TCM, respectivamente.

Figura 24 – Perfil de liberação da vimpocetina a partir dos comprimidos contendo ou não nanocápsulas, empregando difusão reversa em sacos de diálise



Ao comparar os comprimidos com os diferentes óleos, é possível observar diferença significativa somente entre os tempos de 30 e 45 minutos e em 4 e 12 horas de experimento. Comparando os perfis de CP-GR-NC-OC com o CP S/NC, foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) em 25 e 30 minutos de experimento, além de 1, 4 e 6 horas. O CP-GR-NC-TCM, quando comparado com o CP S/NC, apresentou diferença significativa em 1, 4 e 6 horas, sendo que maior percentual de vimpocetina difundiu a partir das formulações CP-GR-NC-OC e o CP-GR-NC-TCM.

No trabalho de Zhuang e colaboradores (2010), foi observado que a liberação de uma suspensão de vimpocetina (dispersão de comprimidos comerciais) ocorreu de forma mais lenta (menos de 5 %) em relação aos carreadores lipídicos nanoestruturados (menos de 20 %), empregando tampão pH 6,8, após 48 h. No experimento *in vivo* (ratos Wistar), observou-se que esses sistemas coloidais lipídicos proporcionaram uma biodisponibilidade relativa oral de 322% do fármaco, em relação aos comprimidos comerciais, salientando-se que as nanoestruturas também mostraram liberação controlada da vimpocetina.

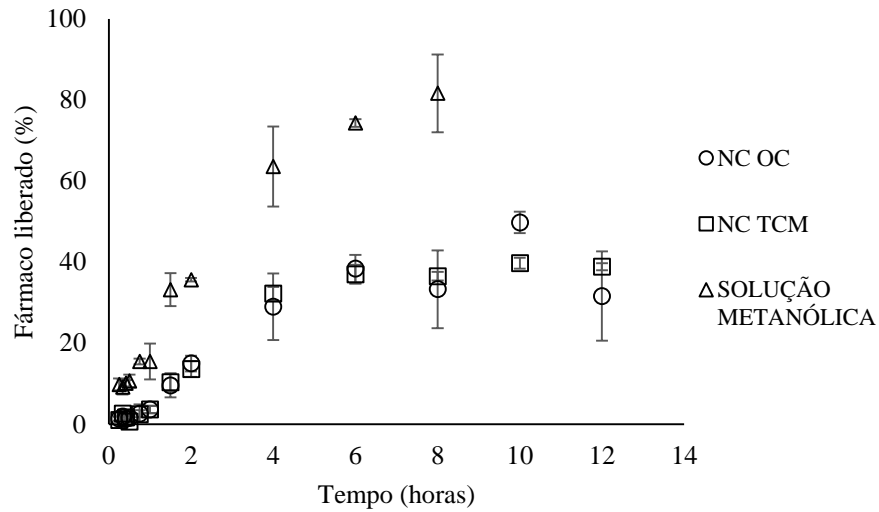
5.11 ESTUDO COMPARATIVO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA VIMPOCETINA ATRAVÉS DOS SISTEMAS DESENVOLVIDOS

Para fins comparativos, também foi realizado ensaio de liberação da vimpocetina, através da técnica de diálise reversa, com as suspensões de nanocápsulas (NC-OC e NC-TCM) e com a solução metanólica de vimpocetina. O estudo foi realizado nas mesmas condições empregadas para os comprimidos (900 mL de tampão fosfato pH 6,8, 37° C, 50 rpm, 12 horas, com quantidade de amostra equivalente a 2,5 mg de vimpocetina).

Na figura 25, é possível observar os perfis de liberação/difusão da vimpocetina a partir das suspensões coloidais e da solução metanólica do fármaco, obtidos por diálise reversa. Em 12 horas, a suspensão de nanocápsulas com óleo de coco liberou $31,62 \pm 11,04$ % e a suspensão de nanocápsulas com TCM liberou $38,87 \pm 0,89$ %, enquanto que a solução metanólica de vimpocetina difundiu $81,65 \pm 9,61$ % em 8 horas.

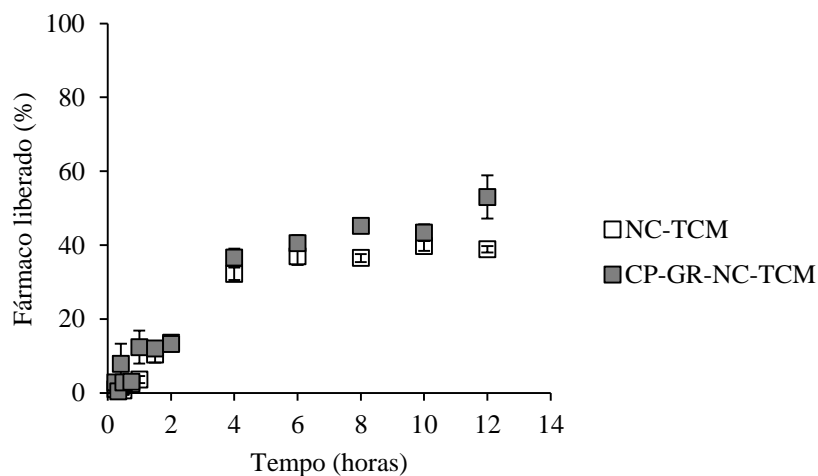
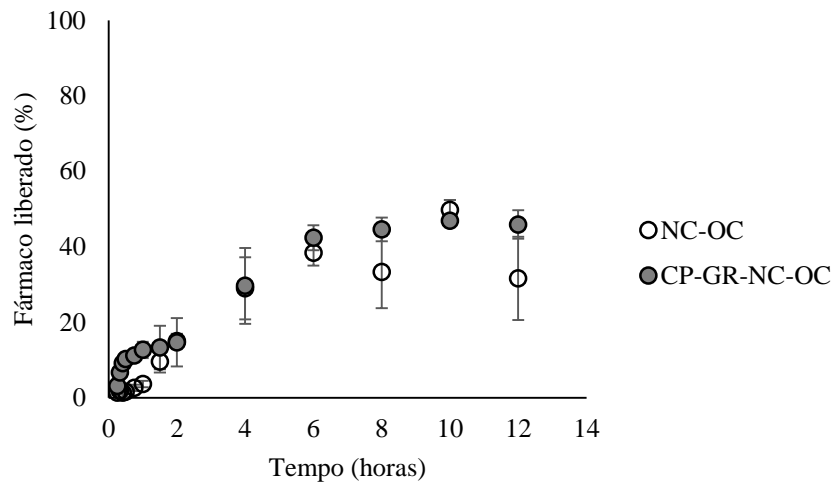
As suspensões de nanocápsulas, preparadas com os diferentes óleos, somente apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em 10 horas de experimento, em que a NC-OC liberou $49,79 \pm 2,63$ %, enquanto a NC-TCM liberou $39,75 \pm 1,35$ %. Quando as suspensões foram comparadas com a solução metanólica, houve diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os tempos coletados para ambas as formulações, exceto em 20 minutos considerando a formulação NC-TCM, sendo que a vimpocetina livre difundiu mais rápido, demonstrando, assim como na diálise convencional, controle de liberação do fármaco a partir das nanocápsulas desenvolvidas.

Figura 25 – Perfil de liberação da vimpocetina a partir das suspensões de nanocápsulas, em comparação com a solução metanólica do fármaco, por diálise reversa



Ao analisar as suspensões de nanocápsulas com seus respectivos comprimidos, é possível observar, conforme a figura 26, que os perfis de liberação ficaram relativamente próximos, sendo possível notar diferença significativa ($p < 0,05$) nas formulações preparadas com o óleo de coco somente em 12 horas de experimento, e em 25 minutos, 1, 8 e 12 horas nas formulações contendo TCM, sendo que, em ambos os casos, os comprimidos apresentaram liberação superior às suspensões.

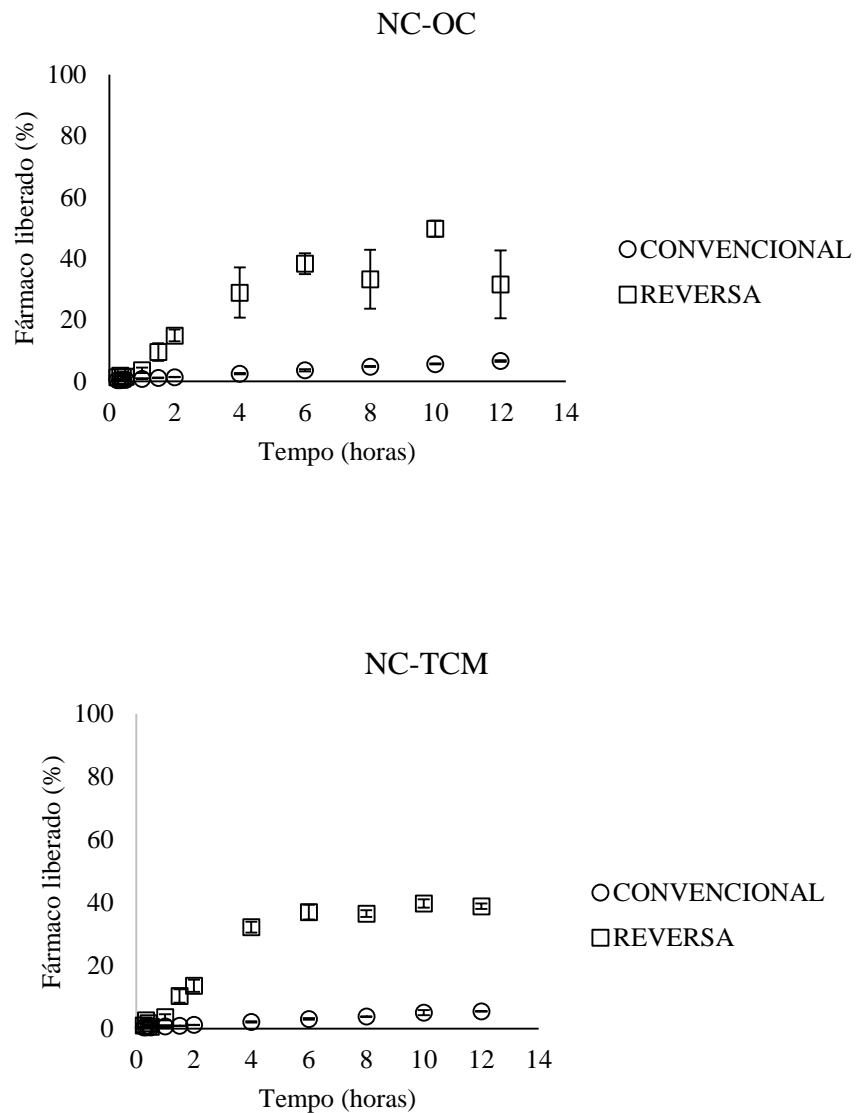
Figura 26 – Perfil de liberação das suspensões vs comprimidos contendo vimpocetina nanoencapsulada

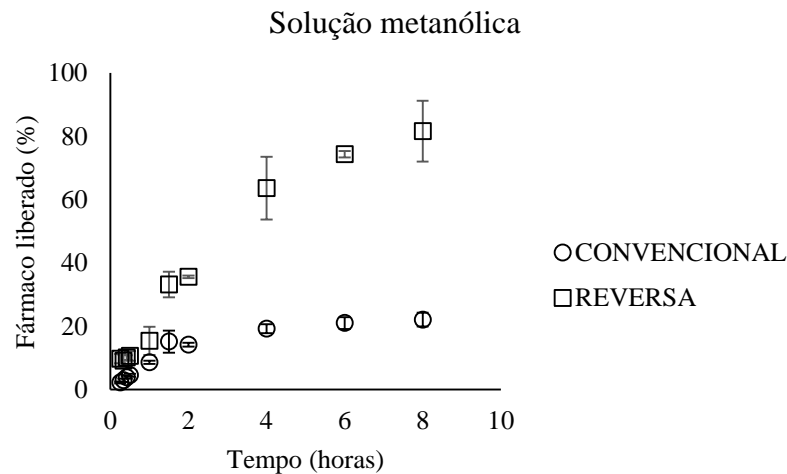


Uma análise comparativa entre os resultados obtidos na liberação convencional das suspensões com a liberação reversa das mesmas foi também realizada. Foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre os perfis de liberação da vimpocetina, a partir das suspensões de nanocápsulas, empregando os dois métodos (figura 27), durante 12 horas de experimento, em que a diálise reversa demonstrou um perfil de liberação mais rápido do fármaco. O mesmo fato foi observado para a difusão do fármaco livre ($p < 0,05$). Isso se deve, provavelmente, ao fato de a diálise reversa proporcionar o contato da formulação diretamente com o meio, ocorrendo diluição da amostra, favorecendo a partição do fármaco. Cabe

evidenciar, ainda, que o meio de liberação empregado na diálise convencional foi acrescido de solvente orgânico (etanol), o que poderia favorecer o gradiente de concentração devido a maior solubilidade da vimopocetina, entretanto, a liberação foi significativamente mais lenta do que no modo reverso, sobressaindo o efeito da diluição.

Figura 27 – Comparação entre os perfis de liberação/difusão da vimopocetina, a partir das suspensões de nanocápsulas ou da solução, obtidos através da diálise convencional e reversa





5.12 DISSOLUÇÃO DOS COMPRIMIDOS DE VIMPOCETINA ASSOCIADA OU NÃO ÀS NANOCÁPSULAS

O ensaio de dissolução de formas farmacêuticas sólidas é fundamental para avaliar a liberação do fármaco e, então, predizer sua possível atuação *in vivo*, sendo necessária para avaliar os fatores que poderão influenciar a biodisponibilidade do produto desenvolvido (AULTON, 2005).

Neste trabalho, realizou-se ensaio de dissolução com os comprimidos contendo vimpocetina nanoencapsulada (CP-GR-NC-OC e CP-GR-NC-TCM) e também com comprimidos de vimpocetina livre (CP S/NC). O ensaio foi realizado por 8 horas, nas mesmas condições da liberação reversa, ou seja, 900 mL de tampão fosfato pH 6,8, em aparato de dissolução de pás (II), n = 6, a 37° C, sob agitação constante (50 rpm).

O meio de liberação não interferiu na quantificação do fármaco e o método é linear (ANOVA $p < 0,05$) na faixa de 0,125 a 7 $\mu\text{g/mL}$, sendo a curva analítica representada pela equação $y = 90.330x + 9225$ ($r = 0,9964$), obtida a partir de três curvas analíticas. Um teste de especificidade dos componentes da formulação foi realizado a partir de um comprimido contendo nanocápsulas sem a presença da vimpocetina (CP-GR-NC-BR), deixado na cuba durante 6 horas sob agitação, demonstrando não haver interferência dos componentes/nanoestruturas na sua quantificação. Por fim, foi realizada a precisão intra-dia, em que 6 amostras de um mesmo comprimido, em uma mesma cuba de dissolução, foram

coletadas, após 6 horas de ensaio, centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos, filtradas em membrana de nylon (0,45 μm) e analisada em CLAE-UV, onde o DPR entre as 6 amostras foi inferior a 10% (7,12 %). Com isso, o método de dissolução empregado é específico para a quantificação da vimpocetina, linear na faixa de concentração estudada e preciso.

A tabela 12 mostra os resultados da dissolução da vimpocetina, obtidos a partir dos comprimidos com ou sem nanocápsulas, comparando com os dados da diálise reversa. Após 6 horas de ensaio, os CP-GR-NC-OC liberaram cerca de 75% de vimpocetina, os CP-GR-NC-TCM, 67% e os CP S/NC, 62%. Em 8 horas de experimento, foram liberados 76%, 98% e 60% de fármaco para CP-GR-NC-OC, CP-GR-NC-TCM e CP S/NC, respectivamente. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) somente em 8 horas de experimento entre os CP-GR-NC-TCM e CP S/NC.

Tabela 12 – Comparação entre a dissolução e a diálise reversa dos comprimidos de vimpocetina (2,5 mg)

Tempo	Formulação	Diálise Reversa (%)	Dissolução (%)
6 hs	CP-GR-NC-OC	42,35 \pm 3,32	74,49 \pm 7,35
	CP-GR-NC-TCM	40,55 \pm 2,14	66,58 \pm 8,52
	CP S/NC	25,86 \pm 7,26	61,83 \pm 2,57
8 hs	CP-GR-NC-OC	44,61 \pm 3,13	76,14 \pm 3,12
	CP-GR-NC-TCM	45,17 \pm 1,35	97,93 \pm 46,01
	CP S/NC	43,15 \pm 7,48	59,92 \pm 3,85

Friedrich e colaboradores (2010) avaliaram a dissolução *in vitro* da dexametasona nanoencapsulada associada a comprimidos. Neste ensaio, as formulações contendo a dexametasona na forma encapsulada promoveram uma liberação mais lenta do princípio ativo (45 minutos para liberar 95,99 \pm 2,48 % do fármaco) quando comparados a comprimidos

convencionais de dexametasona (100% em 30 minutos). Em outro estudo, Rachmawati e colaboradores (2014) realizaram ensaio de dissolução de comprimidos contendo nanoemulsão de curcumina, em que a formulação liberou 100 % do fármaco em 60 minutos de experimento.

Ao comparar as percentagens de fármaco liberada em 6 e 8 horas no ensaio de dissolução com os mesmos intervalos de tempo da liberação baseada em diálise reversa (tabela 12), foi possível notar diferença significativa ($p < 0,05$) em ambos os intervalos para as duas formulações (OC e TCM), sendo que, no ensaio de dissolução, as percentagens de fármaco liberado foram superiores às da liberação reversa, refletindo nítida diferença entre o tipo de metodologia empregada. Este fato poderia ser explicado considerando que, no ensaio de dissolução, a quantidade de vimpocetina liberada corresponde ao valor total de fármaco liberado dos comprimidos, mas não necessariamente à quantidade liberada das nanocápsulas, pois este teste não garante a separação completa do fármaco livre em relação ao encapsulado. Já na liberação reversa, a percentagem de fármaco liberado encontrada corresponde à quantidade de fármaco livre, ou seja, liberado pela forma farmacêutica/nanocápsulas, devido à separação física promovida pela difusão através da membrana de diálise.

Cabe evidenciar que, ao comparar a dissolução dos CP-S/NC com o ensaio de liberação através da diálise reversa dos mesmos, também foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$), demonstrando a interferência da metodologia na avaliação da liberação da vimpocetina, molécula muito lipofílica, com problemas de biodisponibilidade devido à baixa solubilidade. Houve nítida influência da presença da membrana de diálise, necessitando da etapa de difusão através da mesma, sobretudo em 6 h de ensaio.

Por fim, foi possível desenvolver comprimidos a partir de granulados, preparados com suspensões de nanocápsulas, para a veiculação de vimpocetina, com características adequadas. Novamente salienta-se que a técnica de difusão reversa, até o presente momento, não havia sido utilizada para a avaliação da liberação *in vitro* de comprimidos nanotecnológicos, uma vez que a literatura preconiza o ensaio de dissolução *in vitro* para estas formas farmacêuticas. Neste sentido, frente ao exposto, é possível verificar a necessidade de se estabelecer metodologias mais eficientes para o estudo da liberação *in vitro* de fármacos veiculados a sistemas nanoestruturados incorporados a comprimidos, ou seja, uma técnica que proporcione uma real separação entre o fármaco liberado do sistema e àquele ainda associado às nanoestruturas, como sugerido pela difusão reversa em saco de diálise.

6 CONCLUSÃO

Foi viável a preparação de suspensões de nanocápsulas de etilcelulose contendo vimpocetina na concentração de 3,0 mg/mL, empregando, como núcleo, o óleo de coco ou triglicerídeos de cadeia média, através da técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado. As suspensões de nanocápsulas apresentaram características físico-químicas adequadas e elevada eficiência de encapsulamento. Entretanto, as suspensões de nanocápsulas apresentaram alguns problemas ligados à instabilidade durante o armazenamento, reforçando o interesse na conversão das mesmas em produtos intermediários para o desenvolvimento de comprimidos, através da granulação via úmida.

Os granulados obtidos, a partir das suspensões de nanocápsulas, apresentaram características físico-químicas e propriedades tecnológicas apropriadas, sendo possível sua conversão em comprimidos. Os compactos obtidos apresentaram teores de vimpocetina próximos a 100%, resistência adequada (suficiente dureza e baixa friabilidade), rápida desintegração, além de peso médio e espessura conforme o esperado. Os comprimidos mantiveram-se estáveis após 90 dias de armazenamento, sem alteração no teor de fármaco ou modificações macroscópicas.

Diferentes testes foram realizados (difusão em sacos de diálise, diálise reversa e dissolução/aparato II), em tampão fosfato pH 6,8, para avaliar a liberação *in vitro* da vimpocetina a partir das suspensões e/ou dos comprimidos desenvolvidos. Conforme os resultados, foi verificado que as suspensões e os comprimidos contendo as nanocápsulas apresentaram perfil de liberação controlado da vimpocetina, em comparação a uma solução do fármaco. Por outro lado, comprimidos sem nanoestruturas tenderam a apresentar difusão/dissolução mais lenta em relação aos comprimidos nanotecnológicos. Este fato poderia, em hipótese, favorecer a biodisponibilidade oral do fármaco, o que necessita de estudos *in vivo* para confirmação.

Os percentuais de vimpocetina liberados/difundidos, a partir das suspensões ou solução, foram superiores para a técnica de diálise reversa em relação à diálise normal. Por outro lado, os percentuais de vimpocetina liberados, a partir dos comprimidos contendo ou não nanoestruturas, foram menores quando o método de diálise reversa foi utilizado em comparação à dissolução clássica, evidenciando influência da membrana de diálise.

Como próximas etapas deste trabalho estão a avaliação morfológica dos comprimidos, através de microscopia eletrônica/força atômica, e permeação intestinal *ex-vivo* da vimpocetina a partir dos sistemas desenvolvidos.

Frente ao exposto, os comprimidos contendo vimpocetina nanoencapsulada são sistemas promissores para futuros tratamentos associados às suas inúmeras atividades terapêuticas, com perspectivas de promoção de aumento da biodisponibilidade oral da vimpocetina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 87–94, 2006.
- AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 43, n. 5, p. 447–451, 2010.
- AGNES, E. J.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Modelos matemáticos e físico-química da difusão. **Caderno de Farmácia**, v. 19, p. 9–19, 2003.
- ALDERBORN, G.; FRENNING, G. Mechanical strength of tablets. In: AUGSBURGE, L.; HOAG, S. (Eds.). **Pharmaceutical Dosage Forms - Tablets**. 3ª edição ed. Nova York, EUA: Informa, Healthcare, 2008.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª edição ed. São Paulo: Artmed, 2007.
- ANVISA. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003 Guia para a 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.
- ARIAS, J. L. et al. Development of iron/ethylcellulose (core/shell) nanoparticles loaded with diclofenac sodium for arthritis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, n. 1-2, p. 270–276, 2009.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª edição ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005.
- BADEA, G. et al. Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 18–24, 2015.
- BANKER, G. S.; ANDERSON, N. R. Comprimidos. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. (Eds.). **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: F. C. Gulbenkan, 2001. p. 509–597.
- BHARDWAJ, U.; BURGESS, D. J. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1-2, p. 287–294, 2010.
- BOLSON, S. N. **Desenvolvimento tecnológico de nanocápsulas para a liberação controlada do neuroprotetor vimpocetina**. [s.l.] Universidade Federal de 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.

BRENDLE, M. . **Desenvolvimento tecnológico de suspensões e liofilizados de nanocápsulas poliméricas para a veiculação do neuroprotetor Idebenona.** [s.l.] Universidade federal de Santa Maria, RS, 2013.

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

CARNEIRO, H. C. F. et al. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 443–451, 2013.

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

CHASSOT, J. M. et al. Beclomethasone Dipropionate-Loaded Polymeric In Vivo Evaluation of Acute Lung Injury. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1–10, 2014.

CORADINI, K. et al. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 178–185, 2014.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule Technology: A Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99–134, 2002.

DOW CELLULOSICS. Ethocel, ethylcellulose polymers. **Technical Handbook**, p. 1–27, 2005.

DUBERNET, C.; ROULAND, J. C.; BENOIT, J. P. Comparative study of two ethylcellulose forms (raw material and microspheres) carried out through thermal analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 64, p. 99–107, 1990.

EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 319–41, 2002.

ELBARY, A. A. et al. Reversed phase liquid chromatographic determination of vinpocetine in human plasma and its pharmacokinetic application. **Analytical Letters**, v. 35, n. 6, 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, n. 1-2, p. 39–46, 2014.

FEIGIN, V. L. et al. Vinpocetine treatment in acute ischaemic stroke: a pilot single-blind randomized clinical trial. **European Journal of Neurology**, v. 8, n. 1, p. 81–5, 2001.

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

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

FONTANA, M. C. et al. Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on in

vitro antiproliferative activity of human breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 2979–91, 2014.

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, 2010a.

FRIEDRICH, R. B. et al. Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: the wet granulation process as a promising approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 616–621, 2010b.

GANAFSA, A. A. et al. Effect of Palm Oil on oxidative stress-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. **American Journal of Hypertension**, v. 15, n. 8, p. 725–731, 2002.

GAO, Y. et al. In Vitro Release Kinetics of Antituberculosis Drugs from Nanoparticles Assessed Using a Modified Dissolution Apparatus. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GIL, E. . **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3ª edição ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

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, n. 6, p. 770–779, 2014.

GRATTARD, N. et al. Study of release kinetics of small and high molecular weight substances dispersed into spray-dried ethylcellulose microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 84, n. 3, p. 125–135, 2002.

GUO, A.; BEDDOW, J. K.; VETTER, A. F. A simple relationship between particle shape effects and density, flow rate and Hausner Ratio. **Powder Technology**, v. 43, n. 3, p. 279–284, 1985.

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

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Preparação e Aplicações de Nanopartículas para Liberação Controlada de Fármacos. In: MORALES, M. M. (Ed.). . **Terapias Avançadas Células-tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: [s.n.]. p. 247–264.

HAMSI, M. A. et al. Effect of consumption of fresh and heated virgin coconut oil on the blood pressure and inflammatory biomarkers: An experimental study in Sprague Dawley rats. **Alexandria Journal of Medicine**, 2014.

HENG, D. et al. What is a suitable dissolution method for drug nanoparticles? **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1696–1701, 2008.

HOAG, S. W.; DAVE, V. S.; MOOLCHANDANI, V. Compression and compaction. In: AUGSBURGE, L.; HOAG, S. (Eds.). . **Pharmaceutical Dosage Forms - Tablets**. 3ª edição ed. Nova York, EUA: Informa, Healthcare, 2008.

HONG, L. et al. Impact of particle size and surface charge density on redispersibility of spray-dried powders. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 459, p. 274–281, 2014.

HUANG, E.-W. et al. Vinpocetine inhibits breast cancer cells growth in vitro and in vivo. **Apoptosis**, v. 17, n. 10, p. 1120–1130, 2012.

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

INDEX, T. M. **THE MERCK INDEX an encyclopedia of chemical, drugs, and biological**. Disponível em: <<https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m11458/vinpocetine?q=unauthorize>>. Acesso em: 30 set. 2015.

ITALIA, J. L. et al. PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: Nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral?? **Journal of Controlled Release**, v. 119, n. 2, p. 197–206, 2007.

JANA, S. et al. Pharmacokinetic evaluation of testosterone-loaded nanocapsules in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 28–30, 2015.

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

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.

KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 213–222, 2012.

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

LAMOLHA, M. A.; SERRA, C. H. D. R. Avaliação das propriedades de fluxo dos granulados e dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida 50 mg obtidos por granulação úmida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 435–446, 2007.

LEGRAND, P. et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 33–43, 2007.

LI, C. et al. Excipient-Assisted Vinpocetine Nanoparticles : Experiments and Molecular Dynamic Simulations. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, p. 4023–4035, 2014.

LIN, C. et al. A novel oral delivery system consisting in “drug-in cyclodextrin-in nanostructured lipid carriers” for poorly water-soluble drug: Vinpocetine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 465, n. 1-2, p. 90–96, 2014.

LOBATO, K. B. D. S. et al. Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 8–14, 2015.

LOBATO, K. B. DE S. et al. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules.

Food Chemistry, v. 141, n. 4, p. 3906–3912, 2013.

LOBO, M. S.; COSTA, P. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

LOKHANDE, A. B. et al. Influence of different viscosity grade ethylcellulose polymers on encapsulation and in vitro release study of drug loaded nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 5, p. 414–420, 2013a.

LOKHANDE, A. B. et al. Preparation and characterization of repaglinide loaded ethylcellulose nanoparticles by solvent diffusion technique using high pressure homogenizer. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 5, p. 421–426, 2013b.

LORENZONI, A. S. **Desenvolvimento de nanocápsulas para a liberação controlada de crisina: avaliação da atividade antioxidante e da citotoxicidade in vitro**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2015.

LOSA, C. et al. Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metipranolol. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 1, p. 80–87, 1993.

LUO, Y. et al. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 53–59, 2006.

MAGENHEIM, B.; LEVY, M. Y.; BENITA, S. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low pressure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 94, p. 115–123, 1993.

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

MARINA, A. M. et al. Chemical Properties of Virgin Coconut Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 4, p. 301–307, 2009.

MARINA, A. M.; CHE MAN, Y. B.; AMIN, I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 10, p. 481–487, 2009.

MEDINA, A. E. Vinpocetine as a potent antiinflammatory agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 22, p. 9921–9922, 2010.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 9–24, 2010.

MISKOLCZI, P. et al. Pharmacokinetics of vinpocetine and its main metabolite apovincaminic acid before and after the chronic oral administration of vinpocetine to humans. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 15, n. 1, p. 1–5, 1990.

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

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y.; CHEN, M. &. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research Trop J Pharm Res**, v. 5, n. 51, p. 561–561, 2006.

- MORA-HUERTAS, C. E. et al. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: Comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 235–239, 2012.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113–142, 2010.
- MORGEN, M. et al. Polymeric nanoparticles for increased oral bioavailability and rapid absorption using celecoxib as a model of a low-solubility, high-permeability drug. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 2, p. 427–440, 2012.
- MURTAZA, G. Ethylcellulose microparticles: A review. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 1, p. 11–22, 2012.
- MUSAZZI, U. M. et al. Resveratrol-loaded nanocarriers: Formulation, optimization, characterization and in vitro toxicity on cochlear cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 234–242, 2014.
- 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, n. 11, p. 2608–2614, 2008.
- NING, M. et al. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of vinpocetine elementary osmotic pump system. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2011, 2011.
- NORONHA, C. M. et al. Optimization of alfa-tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 896–903, 2013.
- OGBOLU, D. O. et al. In vitro antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria. **Journal of Medicinal Food**, v. 2, p. 384–387, 2007.
- OURIQUE, A. F. et al. Redispersible liposomal-N-acetylcysteine powder for pulmonary administration: Development, in vitro characterization and antioxidant activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, p. 174–182, 2014.
- PAN-IN, P. et al. Ethyl cellulose nanoparticles: Clarithromycin encapsulation and eradication of *H. pylori*. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 22–27, 2014.
- PATYAR, S. et al. Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 3, p. 618–628, 2011.
- PECK, G. E.; SOH, J. L. P.; MORRIS, K. R. Dry Granulation. In: AUGSBURGE, L. L.; HOAG, S. W. (Eds.). **Pharmaceutical Dosage Forms - Tablets**. 3^a edição ed. Nova York, EUA: Informa, Healthcare, 2008.
- PEREIRA, C. et al. Neuroprotection strategies: effect of vinpocetine in vitro oxidative stress models. **Acta Medica Portuguesa**, v. 16, n. 6, p. 401–406, 2003.
- PLAPIED, L. et al. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 228–237, 2011.
- PRISTA, L. N. **Tecnologia Farmacêutica**. 8^a edição ed. Lisboa: F. C. Gulbenkan, 2011.
- QUINA, F. Nanotecnologia eo meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028–1029, 2004.

- RACHMAWATI, H.; YEE, C.; RAHMA, A. Formulation of tablets containing curcumin nanoemulsion. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 3, 2014.
- RIBEIRO, L.; FERREIRA, D. C.; VEIGA, F. J. B. In vitro controlled release of vinpocetine-cyclodextrin-tartaric acid multicomponent complexes from HPMC swellable tablets. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 2, p. 325–339, 2005.
- RIBEIRO, L. S. S. et al. Cyclodextrin Multicomponent Complexation and Controlled Release Delivery Strategies to Optimize the Oral Bioavailability of Vinpocetine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 2018 – 2028, 2007.
- 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 sulfbutyl ether derivative in solution and solid state. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 3, p. 253–266, 2003.
- 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.
- 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.
- ROMAN, R. Stability Kinetics. In: AUGSBURGER, L. L.; HOAG, S. W. (Eds.). . **Pharmaceutical Dosage Forms - Tablets**. 3ª edição ed. Nova York, EUA: Informa, Healthcare, 2008. p. 485–517.
- RONEY, C. et al. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. **Journal of Controlled Release**, v. 108, n. 2-3, p. 193–214, 2005.
- ROUSSAKI, M. et al. Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles. **Polymer Degradation and Stability**, v. 108, p. 182–187, 2014.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. ed. London: [s.n.].
- 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.
- SANTOS, S. S. et al. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270–276, 2014.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003a.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: Nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 3, p. 501–505, 2003b.

- 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.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 64–71, 2008.
- SHARMA, S.; DESHMUKH, R. Vinpocetine attenuates MPTP-induced motor deficit and biochemical abnormalities in Wistar rats. **Neuroscience**, v. 286, p. 393–403, 2015.
- SIEVENS-FIGUEROA, L. et al. Using USP I and USP IV for discriminating dissolution rates of nano- and microparticle-loaded pharmaceutical strip-films. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 4, p. 1473–82, 2012.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados - parte II. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 22, p. 101–106, 2012.
- SOUZA, S. D. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances in Pharmaceutics**, n. 304757, p. 1–12, 2014.
- STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica - Ciências Farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- SUWANNATEEP, N. et al. Encapsulated curcumin results in prolonged curcumin activity in vitro and radical scavenging activity ex vivo on skin after UVB-irradiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 3, p. 485–490, 2012.
- SZAKÁCS, T.; VERES, Z.; VERECZKEY, L. In vitro-in vivo correlation of the pharmacokinetics of vinpocetine. **Pharmacological Reports**, v. 53, n. 6, p. 623–628, 2001.
- TEDESCO, A. C.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L. Introdução à Nanotecnologia. In: MORALES, M. M. (Ed.). **Terapias Avançadas Células-tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: [s.n.]. p. 237–246.
- UBRICH, N. et al. Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 97, n. 2, p. 291–300, 2004.
- VERECZKEY, L. Pharmacokinetics and metabolism of vincamine and related compounds. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 10, n. 2, p. 89–103, 1985.
- VYSÁKH, A. et al. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 124–130, 2014.
- WANG, H. et al. Anti-inflammatory effects of vinpocetine on the functional expression of nuclear factor-kappa B and tumor necrosis factor-alpha in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury. **Neuroscience Letters**, v. 566, p. 247–251, 2014.
- WANG, Y. et al. A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. **International**

Journal of Pharmaceutics, v. 424, n. 1-2, p. 98–106, 2012.

WENING, K.; BREITKREUTZ, J. Oral drug delivery in personalized medicine: Unmet needs and novel approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 1–9, 2011.

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

XU, H. et al. Optimized preparation of vinpocetine proliposomes by a novel method and in vivo evaluation of its pharmacokinetics in New Zealand rabbits. **Journal of Controlled Release**, v. 140, n. 1, p. 61–68, 2009.

ZAITONE, S. A.; ABO-ELMATTY, D. M.; ELSHAZLY, S. M. Piracetam and vinpocetine ameliorate rotenone-induced Parkinsonism in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 774–779, jan. 2012.

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, n. 1-2, p. 179–185, 2010.

ZINUTTI, C. et al. Influence of the casting solvent on the physico-chemical properties of 5-fluorouracil loaded microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 133, p. 97–105, 1996.