

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FERNANDA MALAQUIAS BARBOZA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO ISRADIPINO COM POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR

PONTA GROSSA

2020

FERNANDA MALAQUIAS BARBOZA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO ISRADIPINO COM POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de concentração Fármaco, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA

2020

B239 Barboza, Fernanda Malaquias
Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo isradipino com potencial efeito neuroprotetor / Fernanda Malaquias Barboza. Ponta Grossa, 2020.
53 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1. Bloqueador de canais de cálcio. 2. Nanopartículas. 3. PCL. 4. PEG. 5. Doenças neurodegenerativas. I. Farago, Paulo Vitor. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615.321

Ponta Grossa, 26 de agosto de 2020.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 04/2020 DA DOUTORANDA FERNANDA MALAQUIAS BARBOZA REALIZADA NO DIA 26 DE AGOSTO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e seis dias de agosto de dois mil e vinte, às 13h30min, via videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Paulo Vitor Farago reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda Fernanda Malaquias Barboza, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelo Professor Doutor Paulo Vitor Farago (UEPG/PR) e demais Doutores (membros titulares): Jéssica Mendes Nadal (UEPG/PR), Patricia Mathias Doll Boscardin (UEPG/PR), Daniela Florencio Maluf (UFPR/PR) e Eliane Campesatto (UFAL/ICBS). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

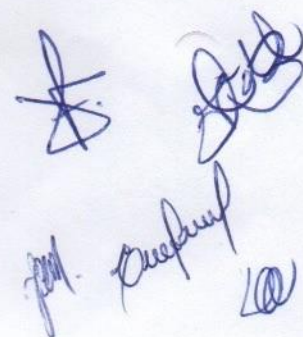
O título do trabalho foi: **“DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ISRADIPINO COM POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR”.**

Encerrada a defesa, a banca pronunciou-se pelo aprovação da tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia – Fone (42)
3220-3337 – ppgcf@hotmail.com

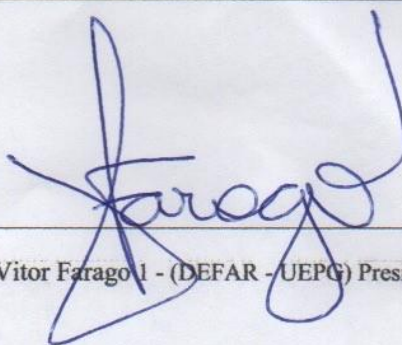
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900



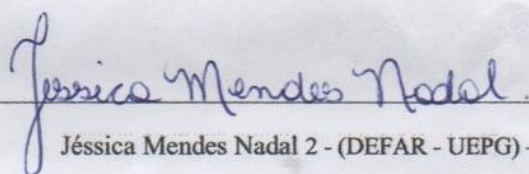
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____



Paulo Vitor Farago 1 - (DEFAR - UEPG) Presidente

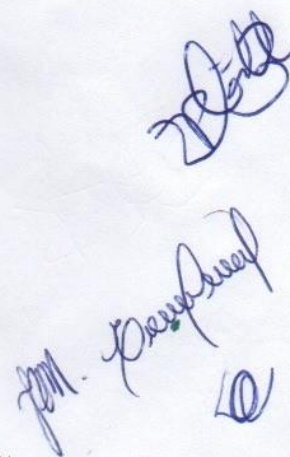


Jéssica Mendes Nadal 2 - (DEFAR - UEPG) – Titular

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia – Fone (42)
3220-3337 – ppgcf@hotmail.com

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900





Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa



Patricia Mathias Doll Bosacrdin 3 - (DEFAR - UEPG) – Titular

Daniela Florencio Maluf 4 – (Farmácia - UFPR) – Titular

Eliane Campesatto 5 - (ICBS-UFAL) – Titular

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia – Fone (42)
3220-3337 – ppgcf@hotmail.com

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de vida e inspiração, que me deu forças para perseverar em busca da realização deste feito.

À minha família, meu marido Thiago, minha filha Isabela e meus pais, que são os grandes incetivadores deste sonho e não mediram esforços para que eu pudesse concretizá-lo. Agradeço a paciência, o companheirismo e o amor durante esta caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por todos os ensinamentos e, em especial, pela paciência e incentivo fundamentais para a concretização deste sonho.

À Prof^a. Dr^a. Josiane de Fátima Padilha pelas considerações durante a qualificação desta tese.

À Prof^a. Dr^a. Jéssica Mendes Nadal, pela parceria e pelas considerações durante a qualificação e defesa desta tese.

À Prof^a. Dr^a. Daniela Florencio Maluf, à Prof^a. Dr^a. Eliane Campesatto e à Prof^a. Dr^a. Patrícia Mathias Doll Boscardin que contribuíram valiosamente ao participarem como banca da defesa deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos conhecimentos transmitidos em todos os momentos oportunos.

Aos meus colegas Guilherme e Loanda, por toda a ajuda e pelo incentivo diário. Palavras não serão suficientes para demonstrar minha gratidão, vocês são especiais.

Aos funcionários e aos técnicos dos laboratórios, sempre solícitos e dispostos a ajudar durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelas análises realizadas.

Certamente, estas palavras não são capazes de nomear todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho, acreditaram em mim e, hoje, orgulham-se desta conquista. Mas, estejam certas que todas fazem parte do meu pensamento e têm a minha gratidão.

“A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor.”
(Chico Xavier)

BARBOZA, F. M. **Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo isradipino com potencial efeito neuroprotetor**. Orientador: Paulo Vitor Farago. Ponta Grossa, 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.

RESUMO

O isradipino, bloqueador de canais de cálcio pertencente à classe das diidropiridinas, apresenta um mecanismo de neuroproteção associado a inibição da progressão de doenças neurodegenerativas. O principal desafio, neste caso, está em fazer com que este fármaco atravesse a barreira hematoencefálica em concentrações terapêuticas. Desta forma, nanocápsulas poliméricas apresentam uma aplicação particularmente interessante para a disponibilização de fármacos no sistema nervoso central, acompanhada da liberação controlada destes ativos no local. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar nanocápsulas contendo isradipino, empregando a blenda de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), 10000 g.mol⁻¹, e polietileglicol (PEG), 6000 g.mol⁻¹, e revestimento com polissorbato 80, visando aprimorar a disponibilização deste fármaco no sistema nervoso central. As nanocápsulas poliméricas contendo isradipino foram preparadas com êxito pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado e, posteriormente, foram revestidas com o tensoativo não iônico. Na sequência, a formulação foi caracterizada por meio de análises morfológicas e de superfície, tamanho de partícula e potencial zeta, além de análises espectroscópica e térmica. Para quantificação do fármaco encapsulado foi desenvolvido e validado um método analítico em cromatógrafo líquido de ultra eficiência com detecção na região do ultravioleta. Os sistemas nanoparticulados apresentaram uma forma esférica com uma superfície lisa e regular e tamanho médio de partícula de 251,3 nm, índice de polidispersão de 0,239 e potencial zeta de -36,7 mV. A difração de raios X confirmou que o método de encapsulação foi eficiente e o fármaco encontra-se prioritariamente em dispersão molecular no núcleo oleoso das nanocápsulas. O espectro de infravermelho com transformada de Fourier assegurou que o processo de nanoencapsulação não resultou em ligações químicas entre o isradipino e os polímeros. A análise térmica demonstrou que a formulação é estável até 86°C. A formulação apresentou eficiência de encapsulação superior a 98%, sendo que o método analítico empregado mostrou-se comprovadamente seletivo, linear para a faixa de aplicação proposta, preciso, exato e robusto, mostrando-se capaz de quantificar o isradipino nanoencapsulado nos sistemas poliméricos, fornecendo resultados confiáveis. Portanto, os resultados fornecem uma base experimental que viabiliza o uso de nanocápsulas contendo isradipino, obtidas a partir da blenda PCL-PEG e revestidas com polissorbato 80, como alternativa para a liberação do fármaco no sistema nervoso central.

Palavras-chave: bloqueador de canais de cálcio, nanopartículas, PCL, PEG, doenças neurodegenerativas.

BARBOZA, F. M. **Development and characterization of polymeric nanocapsules containing isradipine with potential neuroprotective effect.** Supervisor: Paulo Vitor Farago. Ponta Grossa, 2020. Thesis (PhD in Pharmaceutical Sciences) – State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.

ABSTRACT

Isradipine, a calcium channel blocker which belongs to the class of dihydropyridines, presents a neuroprotective mechanism associated with an inhibition of the progression of neurodegenerative diseases. The main challenge is to become this drug able to cross the blood-brain barrier in therapeutic concentrations. In this way, polymeric nanocapsules show an interesting application for providing drugs in the central nervous system, followed by the controlled release of these drugs at this site. In this sense, this work aims to develop and characterize nanocapsules containing isradipine, using the blend of poly(ϵ -caprolactone) (PCL), 10000 g.mol⁻¹, and polyethylene glycol (PEG), 6000 g.mol⁻¹, and polysorbate 80 coating, in order to improve the availability of this drug in the central nervous system. The polymeric nanocapsules containing isradipine were successfully prepared by the interfacial deposition of the preformed polymer procedure and were subsequently coated with polysorbate 80. The formulation was characterized by morphological and surface analyzes, particle size and zeta potential, as well as spectroscopic and thermal analyzes. In order to measure the amount of drug encapsulated, an analytical method was developed and validated employing an ultra-high performance liquid chromatography followed by an ultraviolet wavelength detection. The nanoparticulate systems presented a spherical shape with a smooth and regular surface and average particle size of 251.3 nm, polydispersion index of 0.239 and zeta potential of -36.7 mV. The X-ray diffraction pattern confirmed that the encapsulation method was efficient and the drug primarily is in molecular dispersion in the oily nucleus of the nanocapsules. The Fourier transform infrared spectrum ensured that the nanoencapsulation process did not result in chemical bonds between the isradipine and the polymers. Thermal analysis demonstrated that the formulation is stable up to 86 °C. The formulation presented an encapsulation efficiency greater than 98% and the analytical method employed proved to be selective, linear for the suggested range, precise, accurate and robust, and capable of quantifying nanoencapsulated isradipine in polymeric systems, providing reliable results. Therefore, the results provide an experimental basis in order to make feasible the use the blend of PCL-PEG nanocapsules containing isradipine, coated with polysorbate 80, as an alternative for drug releasing in the central nervous system.

Keywords: calcium channel blocker, nanoparticles, PCL, PEG, neurodegenerative diseases.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1	NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS	13
3.1.1	Nanopartículas poliméricas	13
3.1.2	Nanocápsulas poliméricas	15
3.1.3	Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)	15
3.1.4	Polietilenoglicol (PEG)	17
3.2	LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL ...	17
3.2.1	Polissorbato 80	19
3.3	ISRADIPINO COMO ALTERNATIVA NEUROPROTETORA	20
3.3.1	Doenças neurodegenerativas	20
3.3.2	Isradipino	21
3.3.3	Nanopartículas contendo isradipino	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	MATERIAL	25
4.2	PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ISRADIPINO	25
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	27
4.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (FEG-SEM)	27
4.3.2	Difração de raios X (XRD)	27
4.3.3	Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	27
4.3.4	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	27

4.3.5	Análise térmica	28
4.4	QUANTIFICAÇÃO DO ISRADIPINO NANOENCAPSULADO	28
4.4.1	Validação de método analítico para quantificação de isradipino	28
4.4.2	Determinação da eficiência de encapsulação	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ISRADIPINO	32
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	32
5.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (FEG-SEM)	32
5.2.2	Difração de raios X (XRD)	34
5.2.3	Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	35
5.2.4	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	36
5.2.5	Análise térmica	38
5.3	QUANTIFICAÇÃO DO ISRADIPINO NANOENCAPSULADO	38
5.3.1	Validação de método analítico para quantificação de isradipino	38
5.3.2	Determinação da eficiência de encapsulação	44
6	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da sobrevida da população verifica-se também o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas. Estas doenças estão frequentemente associadas a perda de funções fisiológicas e cognitivas importantes, o que resulta em sofrimento significativo aos pacientes e seus cuidadores, além de gerar altos custos econômicos.

O mecanismo de neuroproteção associado ao tratamento com isradipino, bloqueador de canais de cálcio pertencente à classe das diidropiridinas, propõe uma alternativa promissora. O principal desafio, neste caso, está em fazer com que este fármaco atravesse a barreira hematoencefálica em concentrações terapêuticas. Desta forma, a procura por estratégias que possibilitem desviar as limitações encontradas à ação de fármacos destinados ao sistema nervoso é crescente e atual.

Neste contexto, as nanocápsulas poliméricas apresentam uma aplicação particularmente interessante para a disponibilização de fármacos no sistema nervoso central, acompanhada da liberação controlada destes fármacos no local. Estes sistemas mostram-se ainda capazes de proteger moléculas da rápida degradação enzimática e de propriedades farmacocinéticas desfavoráveis.

Diante das vantagens oferecidas pelos sistemas nanoparticulados, aliadas a necessidade de aumentar a disponibilidade do isradipino no sistema nervoso central, o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo isradipino torna-se uma estratégia promissora. Pesquisa bibliográfica realizada em periódicos da área demonstrou um número restrito de trabalhos envolvendo sistemas nanoparticulados contendo isradipino para este fim.

Sendo assim, o propósito deste trabalho é desenvolver e caracterizar nanocápsulas contendo isradipino, empregando os polímeros poli(ϵ -caprolactona) e polietileglicol, objetivando aprimorar a disponibilização deste fármaco no sistema nervoso central.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo isradipino e capazes de melhorar a disponibilidade deste fármaco no sistema nervoso central.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanocápsulas contendo isradipino, a partir da blenda dos polímeros poli(ϵ -caprolactona) (10000 g.mol^{-1}) e polietilenoglicol (6000 g.mol^{-1}), revestidas com polissorbato 80;
- Caracterizar o sistema polimérico obtido quanto às características morfológicas, de superfície, de tamanho e dispersão granulométrica e potencial zeta;
- Caracterizar espectroscopicamente na região do infravermelho e termicamente o sistema polimérico obtido;
- Desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção na região do ultravioleta para a quantificação de isradipino;
- Quantificar o fármaco livre na formulação para determinação indireta da eficiência de encapsulação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

3.1.1 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas aplicadas à liberação controlada de fármacos podem ser definidas como estruturas nanométricas sólidas compostas por polímeros biodegradáveis ou biocompatíveis. Nas últimas décadas, as nanopartículas poliméricas têm-se destacado como sistemas carreadores de ativos por conferirem vantagens importantes, tais como: maior eficácia terapêutica, liberação progressiva e controlada do fármaco, diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de ação, além do direcionamento a alvos específicos sem imobilização significativa das espécies bioativas (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

As nanopartículas são capazes de proteger o fármaco da degradação garantindo estabilidade física durante o armazenamento e nos fluídos biológicos, bem como, propiciam interessantes propriedades *in vivo*, como o aumento da sua absorção, a maior capacidade de ultrapassar barreiras biológicas e a distribuição diferenciada e otimizada. Desta forma, podem ser direcionadas para células e tecidos específicos, como macrófagos, células tumorais, cérebro, entre outros, uma vez que a superfície e a carga superficial podem ser modificadas pela inserção de determinados ligantes como, por exemplo, anticorpos, tensoativos, polímeros, entre outros. Assim, são estratégias de alto desempenho para prolongar a liberação do fármaco e, conseqüentemente, potencializar o tempo de meia-vida nos compartimentos biológicos (ALLÉMAN *et al.*, 1993).

As propriedades das nanopartículas dependem do seu tamanho e de características da sua superfície, como potencial zeta, hidrofobicidade, presença de ligantes e morfologia e a escolha do polímero é determinante no desenvolvimento destas partículas. A literatura tem comumente relatado nanopartículas com tamanho entre 100 e 500 nm, a fim de evitar a depuração rápida do meio intravenoso, prolongar a meia-vida de circulação e, ao mesmo tempo, aumentar a probabilidade de transpor algumas barreiras biológicas e prevenir o acúmulo em capilares ou outros órgãos (DENG, 2020).

Entre as propriedades consideradas essenciais relacionadas aos polímeros usados em aplicações farmacêuticas destaca-se a biodegradabilidade, que corresponde à capacidade de degradar-se em ambiente biológico gerando compostos atóxicos que são metabolizados ou excretados, e a biocompatibilidade, que significa que não causa efeito adverso local ou sistêmico após sua administração (LI *et al.*, 2008).

Os métodos de preparação de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados, como os poliésteres alifáticos, são particularmente adaptados para incorporar fármacos lipofílicos. As nanopartículas devem ser preparadas com base em uma razão fármaco/polímero adequada à obtenção de uma eficiência de encapsulação elevada e toxicidade reduzida. Em comparação aos métodos de produção de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros, a preparação utilizando polímeros pré-formados é de fácil controle, de maior rendimento, e pode ser realizada pelo método de emulsão-evaporação do solvente (WANG *et al.*, 2010), por deslocamento do solvente (TAHARA *et al.*, 2010), por *salting-out* (WHEATLEY; LEWANDOWSKI, 2010) ou por emulsão-difusão do solvente (SOUTO *et al.*, 2012).

Diferentes materiais poliméricos, com pequena ou nenhuma toxicidade, podem ser empregados na obtenção de nanopartículas nas quais a substância farmacologicamente ativa está dispersa ou dissolvida. Nesse contexto, o poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico) e correlatos, o poli(álcool vinílico), a poli(acrilamida), o polietilenoglicol (PEG), o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico) (PLA), os copolímeros do ácido láctico e do ácido glicólico (PLGA) e a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) têm sido os biomateriais considerados clássicos e mais comuns à formação de nanopartículas contendo fármacos, peptídeos, proteínas e antígenos (CHAKRAPANI, 2006).

As nanopartículas poliméricas podem ser divididas em nanocápsulas ou nanoesferas que diferem entre si pela sua composição e organização estrutural. Nanocápsulas são estruturas vesiculares heterogêneas compostas por um núcleo confinado por uma parede polimérica, na qual o fármaco pode ser dissolvido ou disperso no núcleo e/ou adsorvido no material polimérico. Estas são formuladas na presença de tensoativos para assegurar a estabilização das partículas. Por sua vez, nanoesferas não apresentam um núcleo definido e, sim, um sistema monolítico em

que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica (KUMARI *et al.*, 2010).

3.1.2 Nanocápsulas poliméricas

As nanocápsulas têm apresentado características mais promissoras na liberação de fármacos, quando comparadas as nanoesferas, graças à sua capacidade aumentada de transportar ativos empregando pequenas quantidades da matriz polimérica. Além disto, o fármaco encapsulado encontra-se protegido pelo revestimento polimérico, evitando assim a degradação ou liberação rápida induzida por pH, temperatura, enzimas e outros fatores. Esta estratégia tem ainda demonstrado que é capaz de reduzir a toxicidade e os efeitos colaterais associados ao medicamento, mantendo sua atividade farmacológica (DENG, 2020).

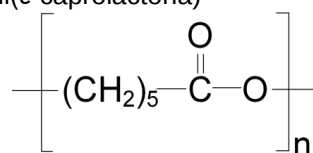
Alguns estudos demonstraram que as nanocápsulas poliméricas tem o potencial de fornecer um espaço interno considerável para manter dosagens relativamente altas de fármacos, uma vez que o invólucro polimérico pode controlar a liberação dos mesmos (DUBEY *et al.*, 2019; HUU *et al.*, 2015).

Os polímeros que compõe o invólucro desempenham um papel crítico no desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas para carregar, proteger e liberar substâncias bioativas. As propriedades dos polímeros exercem influência significativa sobre a estabilidade, o perfil de liberação, eficiência de encapsulação e a biodistribuição da nanocápsula no organismo humano (DENG, 2020).

3.1.3 Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)

A PCL (Figura 1) é um polímero sintético, biodegradável e biocompatível, pertencente à classe dos poliésteres alifáticos. Trata-se de um material semicristalino, cuja fusão ocorre entre 59 e 64°C, e que forma soluções coloidais em uma grande variedade de solventes orgânicos. Graças a sua biocompatibilidade, apresenta grande interesse para o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos, com diversas aplicações no campo biomédico e na indústria farmacêutica (ROA *et al.*, 2010; SINHA *et al.*, 2004).

FIGURA 1 - Estrutura química da poli(ε-caprolactona)



Fonte: A autora.

A PCL é capaz de sofrer degradação por meio de hidrólise das ligações éster da cadeia polimérica, gerando como produto final do processo o ácido ε-hidroxicapróico. Entretanto, sua degradação é muito lenta devido a sua elevada hidrofobicidade, o que dificulta a penetração de água nas cadeias poliméricas e, consequentemente, a ocorrência dessa reação (SINHA *et al.*, 2004).

A lenta degradação da PCL em sistemas poliméricos de liberação modificada de fármacos não gera um microambiente ácido, como o produzido pelos polímeros PLA e PLGA. Esse fato é uma vantagem da PCL no desenvolvimento de partículas contendo proteínas, uma vez que essas macromoléculas podem desnaturar em função do pH e perder a sua atividade biológica. Outras vantagens relacionadas à PCL, frente aos polímeros PLA e PLGA, são o menor custo e a possibilidade de liberação de fármacos por um período mais prolongado (AL HAUSHEY *et al.*, 2007).

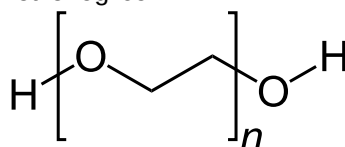
O emprego isolado da PCL no desenvolvimento de nanossistemas torna a superfície da nanopartícula bastante acessível à opsonização e fagocitose, devido a sua característica hidrofóbica, sendo grande parte rapidamente removida da circulação após administração intravenosa, normalmente pelas células de Kupffer do fígado e macrófagos do baço, principais representantes do sistema fagocítico mononuclear (ALLEN, 1994).

A fim de contornar tais inconvenientes que limitariam a utilização terapêutica dos nanossistemas, nos últimos anos aprimorou-se o conceito de modificação superficial e a formação de nanopartículas furtivas ao sistema fagocítico mononuclear. Esses processos podem se dar a partir da adsorção ou ligação covalente de polímeros hidrofílicos na superfície dos colóides, modificação da carga superficial, tamanho, hidrofiliabilidade ou mudança da conformação do polímero (MOSQUEIRA *et al.*, 2001).

3.1.4 Polietilenoglicol (PEG)

O PEG (Figura 2) é um polímero não-iônico que possui característica hidrofílica, e, por isso, menos imunogênica e compatível com o meio gastrointestinal (OWENS, 2006), que pode ser adsorvido fisicamente ou ligado covalentemente à superfície dos coloides hidrofóbicos ou, no caso de nanopartículas biodegradáveis, as cadeias de PEG podem ser incorporadas como copolímeros em toda a partícula de modo que estarão sempre disponíveis, mesmo após a degradação das camadas de superfície (MOSQUEIRA et al, 2001; OWENS, 2006). Além disso, as cadeias flexíveis desse polímero quando hidratadas formam uma nuvem estérica que se estende a partir da partícula produzindo uma repulsão às proteínas plasmáticas. Entre os polímeros capazes de reduzir drasticamente a interação com proteínas do sangue, o PEG tem sido um dos mais investigados (NEEDHAM; MCINTOSH; LASIC, 1992).

FIGURA 2 - Estrutura química do polietilenoglicol



Fonte: A autora.

3.2 LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Atualmente, o aumento da sobrevida da população traz consigo um aumento nos casos de distúrbios neurológicos. Doenças neurológicas são altamente associadas à incapacidade crônica ou ao declínio das funções neurológicas, o que resulta em sofrimento significativo aos pacientes e seus cuidadores, além de gerar altos custos econômicos. Diante disto, esforços significativos da pesquisa farmacológica vêm sendo direcionados ao desenvolvimento de novos fármacos ou formas farmacêuticas capazes de disponibilizar fármacos no sistema nervoso central (SNC). O principal desafio, neste caso, está em fazer com que estes fármacos atravessem a barreira hematoencefálica (BHE) em concentrações terapêuticas (LINDNER, 2014).

Segundo Paul Ehrlich, a BHE é composta, principalmente, por células endoteliais polarizadas que revestem a microvasculatura cerebral e os elementos

perivasculares circundantes. Essas células possuem poucas vias de transporte alternativas e formam plexos com as proteínas transmembranares e citoplasmáticas, que restringem fortemente a difusão paracelular de moléculas solúveis em água a partir do sangue ao cérebro, além disto, estão intimamente ligadas a um conjunto de enzimas intra e extracelulares que inativam a tentativa de substâncias endógenas de ultrapassar a BHE e a um grande número de transportadores de efluxo (AL-JAMAL; KOSTARELOS, 2012).

As estratégias utilizadas para a vetorização de fármacos ao SNC podem ser divididas em invasivas, fisiológicas ou farmacológicas. As abordagens farmacológicas se concentram na modulação das características físico-químicas do agente terapêutico desfavoráveis à penetração da molécula através da BHE (LINDNER, 2014).

Nanopartículas apresentam uma aplicação particularmente interessante de direcionamento de fármacos ao cérebro, acompanhado da liberação controlada destes fármacos no local. Estes sistemas mostram-se ainda capazes de proteger moléculas da rápida degradação enzimática e de propriedades farmacocinéticas desfavoráveis (SINGH; LILLARD JR, 2009).

Nanopartículas feitas de poli(*n*-butilcianoacrilato) (PBCA) foram intensamente investigadas desde os primeiros trabalhos, em 1995, que mostram que, quando revestidas com o polissorbat 80, permitiam a administração de fármacos ao cérebro. Apesar dos resultados interessantes, as nanopartículas de PBCA têm limitações que podem impedir, ou pelo menos limitar, suas potenciais aplicações clínicas. Em meados de 1990, nanopartículas de PLA ou PLGA peguiladas de longa circulação mostraram-se importantes estratégias para o direcionamento cerebral de ativos. As abordagens mais comuns utilizadas para escapar do sistema reticuloendotelial são formular partículas com carga de superfície neutra, usar partículas de tamanho pequeno e revestir a sua superfície com diferentes surfactantes (OLIVER, 2005). O quadro abaixo apresenta um resumo das propriedades ideais para nanopartículas com direcionamento cerebral (Quadro 1).

QUADRO 1 - Propriedades ideais para nanopartículas com direcionamento cerebral

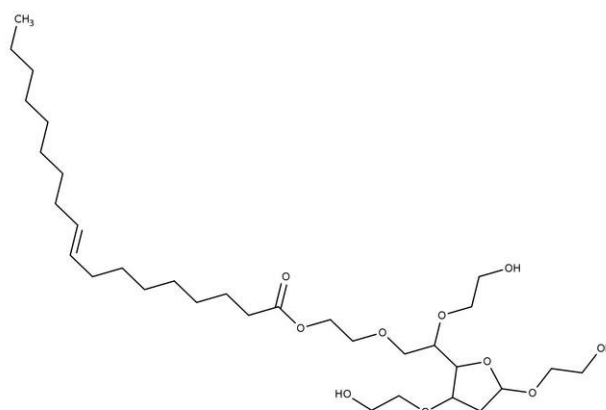
- Atóxicas, biodegradáveis e biocompatíveis;
- Diâmetro de partícula inferior a 100 nm;
- Estabilidade física no sangue (sem agregação);
- Evitar opsoinização pelo sistema mononuclear fagocítico;
- Direcionamento cerebral (transcitose mediada pelo receptor através das células endoteliais capilares do cérebro);
- Processo de reprodução com escala transponível e de baixo custo;
- Apresentar o mínimo de interações químicas ou alterações induzidas por excipientes;
- Controle do perfil de liberação de fármacos.

Fonte: Adaptado de OLIVER, 2005.

3.2.1 Polissorbato 80

O Polissorbato 80 (Figura 3) é um surfactante não iônico, biodegradável e atóxico, em baixas concentrações, portanto, é amplamente empregado na formulação de alimentos e medicamentos. A cadeia de ácido graxo (hidrofóbica) e as unidades de óxido de etileno (hidrofílica) fornecem suas propriedades anfifílicas. Uma série de estudos demonstraram que ele pode ser aplicado à superfície de nanopartículas e pode atravessar a BHE por meio de endocitose mediada por receptor, ou outros mecanismos, e aumentar a disponibilização de fármacos ao cérebro, direcionando e aprimorando seus efeitos terapêuticos. Adicionalmente, o revestimento com o tensoativo não iônico inibe diretamente o sistema reticuloendotelial e, portanto, ajuda a prolongar o tempo de circulação das nanopartículas no corpo humano, além de prolongar a liberação do ativo (TAO, 2018).

FIGURA 3 - Estrutura química do polissorbato 80



Fonte: A autora.

Kreuter *et al.* demonstraram aprimoramento da liberação do fármaco através da BHE empregando nanopartículas de PBCA cobertas com polissorbato 80. Por meio da adsorção de apolipoproteínas à superfície do polissorbato 80, as nanopartículas imitam as partículas de lipoproteína, atravessando BHE através da endocitose mediada por lipoproteína de baixa densidade. Os macrófagos estão fortemente envolvidos em processos inflamatórios e, conseqüentemente, nas doenças em geral, tornando essas células alvos atraentes para aplicações terapêuticas (KREUTER *et al.*, 2002).

Nanopartículas de PLGA revestidas com polissorbato 80 foram produzidas por Gelperina *et al.* e demonstraram ser eficientes para otimizar a liberação cerebral de fármacos (GELPERINA *et al.*, 2010).

3.3 ISRADIPINO COMO ALTERNATIVA NEUROPROTETORA

3.3.1 Doenças neurodegenerativas

O aumento da incidência de doenças neurodegenerativas traz um importante impacto à saúde pública, já que estas doenças estão frequentemente associadas a perda de funções fisiológicas e cognitivas importantes. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa de maior prevalência no mundo, seguida da doença de Parkinson. Em 2016, estima-se que 43,8 milhões de pessoas tinham demência no mundo, sendo que a doença de Alzheimer é a causa mais comum desta condição, e 6,1 milhões de pessoas tinham doença de Parkinson (GBD 2016 DEMENTIA COLLABORATORS, 2019; GBD 2016 PARKINSON'S DISEASE COLLABORATORS, 2018). Estes números vêm apresentando uma tendência crescente graças ao aumento da expectativa de vida da população.

Chan *et al.* investigaram sobre o dano seletivo de neurônios produtores de dopamina da substância nigra na idade avançada. Esses neurônios dependem de canais de cálcio do tipo L para manter a atividade autônoma, portanto, a desregulação desses canais de poderia representar um estresse sustentado na fosforilação oxidativa geradora de ATP mitocondrial, aceleração da senescência celular e morte. Portanto, os bloqueadores dos canais de cálcio do tipo L podem ser úteis para reduzir o influxo deste íon, com o objetivo de atenuar o processo de senescência dos

neurônios produtores de dopamina e, conseqüentemente, retardar a progressão de doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (YU *et al.*, 2013).

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de células dopaminérgicas nigroestriatais e por déficits motores como acinesia, bradicinesia e tremores de repouso. Estudos demonstraram que a morte neuronal na doença de Parkinson está possivelmente relacionada à atividade marcapasso dos canais de cálcio tipo L Cav 1.3 da substância nigra *pars compacta*, os quais substituem canais de sódio voltagem dependentes nessa região durante o envelhecimento (CHAN *et al.*, 2007).

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa incapacitante em idosos e as opções de tratamento são muito limitadas. O maior desafio tem sido identificar e definir mecanismos confiáveis para retardar os sintomas clínicos. Neste sentido, bloqueadores de canais de cálcio que se ligam seletivamente ao canal de cálcio tipo L subtipo Cav1.2 no hipocampo são capazes de atenuar a toxicidade do oligômero beta-amiloide, suprimindo o influxo de cálcio no citoplasma e suprimindo a expressão de Cav1.2. Estudos adicionais são necessários para elucidar os efeitos deste tipo de terapia no tratamento de pacientes com Alzheimer (ANEKONDA; QUINN, 2011).

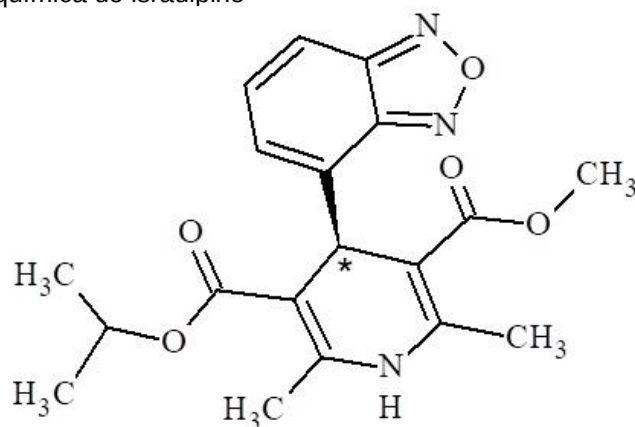
Neste contexto, um dos maiores desafios referentes à cura ou controle de doenças neurodegenerativas consiste em encontrar estratégias que possibilitem desviar as limitações encontradas em fármacos destinados ao SNC.

3.3.2 Isradipino

Bloqueadores de canal de cálcio são anti-hipertensivos eficazes, cuja ação anti-hipertensiva decorre da redução da resistência vascular periférica por diminuição da concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares (NEAL; MACMAHON; CHAPMAN, 2000; DAHLOF *et al.*, 2005). Apesar do mecanismo final comum, esse grupo é dividido em três subgrupos, com características químicas e farmacológicas diferentes: fenilalquilaminas (verapamil), benzotiazepinas (diltiazem) e diidropiridinas (anlodipino, felodipino, isradipino, lacidipino, lecardipino, manidipino, nifedipino, nisoldipino, nitrendipino) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

O isradipino, 3-metil 5-propano-2-il 4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-il)-2,6-dimetil-1,4-diidropiridine-3,5-dicarboxilato (Figura 4), é um potente bloqueador de canal de cálcio voltagem dependentes tipo-L pertencente a classe das diidropiridinas, aprovado para o tratamento de hipertensão arterial, e tem mostrado um potencial neuroprotetor importante em modelos pré-clínicos (CHAN *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2013; GUZMAN *et al.*, 2018).

FIGURA 4 - Estrutura química do isradipino



Fonte: A autora.

Trata-se de um fármaco com massa molecular de 371,39 g.mol⁻¹, praticamente insolúvel em água (<10 mg.L⁻¹ a 37°C; log P 4,28) e livremente solúvel em acetona, com ponto de fusão entre 168 e 170°C e pode ser degradado em presença de luz (DRUGBANK, 2020; LEROUEIL-LE VERGER *et al.*, 1998). Após uma absorção de 90 a 95% a partir do trato gastrointestinal, o isradipino sofre um intenso metabolismo de primeira passagem hepática resultando em uma biodisponibilidade de 15-24%. Aproximadamente 95% do fármaco ligam-se as proteínas plasmáticas e apresenta eliminação bifásica com meia vida terminal de 8,4 horas. Cerca de 60-65% da dose administrada é excretada na urina e 25-30% nas fezes sob a forma de metabólitos (DRUGBANK, 2020).

O isradipino apresenta um átomo de carbono quiral na posição 4 do anel diidropiridina e está disponível comercialmente como uma mistura racêmica de (S+)(R-)isradipino. A farmacocinética da mistura racêmica é bem documentada e sabe-se que o enantiômero (S+)isradipino demonstrou feitos farmacológicos até 160 vezes mais potentes (HOF *et al.*, 1986, HOF; RUEGE, 1988).

Um estudo clínico randomizado denominado *Study of Isradipine as a disease modifying agent in patients with early Parkinson's disease* (STEADY-PD III), finalizado em 2019, demonstrou que a dose diária de 10 mg de isradipino, administrada na forma de comprimidos convencionais com liberação imediata do ativo, não foi capaz de atingir os canais de cálcio cerebrais, associados com o efeito neuroprotetor, em concentrações suficientes para que o estudo demonstrasse efeito terapêutico estatisticamente significativo em relação ao placebo (PARKINSON STUDY GROUP INVESTIGATORS, 2020; MAITI; PERLMUTTER, 2020). As limitações do estudo foram a falta de um biomarcador adequado para medir a progressão da doença de Parkinson e, a principal, está na falta de direcionamento da forma farmacêutica empregada. O principal questionamento é se a dose administrada foi capaz de atingir os canais de cálcio tipo-L no cérebro dos participantes. A administração de uma dose maior, em uma forma farmacêutica de liberação imediata, é inviável devido a hipotensão ortostática que já ocorre com frequência nos pacientes com doença de Parkinson e pode ser exacerbada com o isradipino, uma vez que trata-se de um agente hipotensor. Sendo assim, os resultados deste estudo não depreciaram o impacto clínico desta nova terapia em inibir a progressão da doença de Parkinson, ao contrário, estimularam a pesquisa no sentido de encontrar biomarcadores para a progressão da neurodegeneração e desenvolver de formas farmacêuticas estratégicas, capazes de liberar o ativo no sistema nervoso central em concentrações efetivas (MAITI; PERLMUTTER, 2020).

Ensaio em ratos também demonstraram que o tratamento sistêmico com isradipino diminui as oscilações citosólicas de íons cálcio em neurônios produtores de dopamina da substância nigra sem alterar o aumento autônomo ou a expressão dos canais de cálcio, um efeito imitado pela eliminação seletiva da expressão das subunidades do canal Cav1.3. Assim, o tratamento crônico com isradipino remodelou os neurônios produtores de dopamina da substância nigra de uma forma que não deve apenas diminuir sua vulnerabilidade aos desafios mitocondriais, mas também ao estresse autofágico (GUZMAN *et al.*, 2018).

3.3.3 Nanopartículas contendo isradipino

A literatura relata um número restrito de sistemas nanoparticulados contendo isradipino, sendo que a maioria deles destina-se ao tratamento da hipertensão arterial.

Leroueil-Le Verger *et al.* encapsularam o isradipino pelo método de nanoprecipitação usando polímeros PCL, PLA e PLGA. Os diâmetros médios das nanopartículas variaram de 110 nm a 208 nm. Os resultados desta investigação sugeriram que nanoesferas são capazes de controlar a liberação do fármaco, por administração oral e, desta forma, reduzir o pico hipotensivo inicial e prolongar o efeito anti-hipertensivo do isradipino (LEROUEIL-LE VERGER *et al.*, em 1998).

Tran *et al.* formularam nanossuspensões de hidroxipropilmetilcelulose e polióxido de etileno contendo isradipino com o objetivo de melhorar o perfil de dissolução deste fármaco (Tran *et al.*, 2014).

Havanoor *et al.* apresentaram nanopartículas lipídicas sólidas para aprimorar o tratamento da hipertensão. A formulação de nanopartículas liberou cerca de 99% do fármaco em 12 horas, seguindo cinética de primeira ordem e mecanismo de liberação por difusão e erosão (HAVANOOR *et al.*, 2014).

Venugopal *et al.* otimizaram o desenvolvimento de nanopartículas a partir do polímero polimetacrilato de metila. A formulação foi capaz de controlar a liberação do fármaco por até 24 horas e, em modelo animal para estudo anti-hipertensivo, demonstrou melhor biodisponibilidade do que o isradipino em solução (VENUGOPAL *et al.*, 2016).

Kumar *et al.* desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas revestidas com rutina usando polímero (Eudragit L100) e uma mistura de monoestearato de glicerol e lecitina de soja. O estudo farmacocinético mostrou aumento de 3,2 a 4,7 vezes na biodisponibilidade oral do fármaco nanoencapsulado (KUMAR *et al.*, 2018)

Sadoon e Ghareeb prepararam uma nanoemulsão de isradipino (óleo: água) para administração oral do fármaco, de modo que ele possa ser absorvida pelo transporte linfático intestinal, a fim de evitar o metabolismo de primeira passagem hepática e, assim, aumentar a biodisponibilidade do medicamento (SADOON; GHAREEB, 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

- Cloridrato de isradipino (97,0% de pureza, Wuhan Vanz Pharm, Shanghai, China);
- Cloridrato de isradipino (Padrão de referência da Farmacopeia Europeia, número CAS 75695-93-1),
- Poli- ϵ -caprolactona (PCL) ($M_w = 10000 \text{ g.mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Polietilenoglicol (PEG) ($M_w = 6.000 \text{ g.mol}^{-1}$, Fluka, St. Louis, MO, EUA);
- Polissorbato 80 (Neon, São Paulo, SP, Brasil).

4.2 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ISRADIPINO

As suspensões de nanocápsulas obtidas a partir da blenda dos polímeros PCL (10000 g.mol^{-1}) e PEG (6000 g.mol^{-1}) (80:20) contendo isradipino (NC-ISR) foram preparadas, em triplicata, pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado desenvolvido e descrito por Fessi *et al.* (FESSI *et al.*, 1989), conforme formulação descrita na Tabela 1. Além das formulações carregadas com o fármaco, nanocápsulas sem o fármaco também foram produzidas, em triplicata, como controle negativo (NC-0).

Resumidamente, a blenda polimérica foi solvatada em acetona em presença de mono-oleato de sorbitano 80, isradipino e de triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico, constituindo assim a fase orgânica. Em seguida, a fase orgânica foi gotejada lentamente na fase aquosa, previamente preparada com água ultrapurificada e polissorbato 80, e mantida sob agitação magnética vigorosa em temperatura entre 40 e 50°C. Adicionalmente, a agitação magnética foi mantida por 10 minutos após o término do gotejamento e o solvente foi, então, eliminado por rotaevaporação a 50°C, atingindo um volume final de 10 mL e concentração de fármaco de 2 mg.mL^{-1} .

TABELA 1 - Formulações das suspensões de nanocápsulas a partir da blenda PCL-PEG

Formulação	Fase Orgânica						Fase Aquosa	
	ISR (mg)	PCL (mg)	PEG (mg)	TCC (mg)	Acetona (mL)	Monooleato de sorbitano 80 (mg)	Polissorbato 80 (mg)	Água (mL)
NC-ISR	20	80	20	300	27	77	77	53
NC-0	-	80	20	300	27	77	77	53

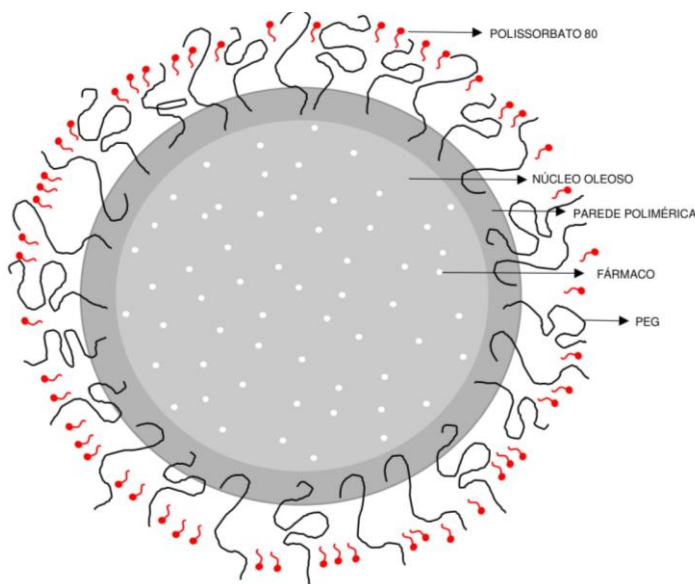
ISR: isradipino, PCL: poli(ϵ -caprolactona) 10000 g.mol⁻¹, PEG: polietilenoglicol 6000 g.mol⁻¹, TCC: triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico.

Fonte: A autora.

Na sequência, a nanossuspensão obtida foi acrescida de 5% de sacarose (p/v), como agente crioprotetor, congelada a temperatura de -80°C, por 24 horas, e liofilizada em liofilizador Terroni® modelo LD1500, por 48 horas.

Com a finalidade de modificar a superfície das partículas, elas receberam o revestimento com polissorbato 80 após a finalização do processo convencional de obtenção do sistema nanoparticulado. Para isto, o pó resultante da liofilização das nanopartículas obtidas foi redisperso em 2 mL de solução de polissorbato 80 (1%, p/v), conforme descrito por Kreuter *et al.* (KREUTER *et al.*, 2002) e reproduzido por Gelperina *et al.* (GELPERINA *et al.*, 2010). A suspensão permaneceu encubada a temperatura ambiente por 30 minutos e foi novamente congelada, a -80°C por 24 horas, e liofilizada por 72 horas. Desta forma, a formulação final apresentou-se na forma de pó, e tem sua estrutura representada, esquematicamente, na Figura 5.

FIGURA 5 – Representação da nanocápsula obtida a partir da blenda PCL-PEG revestida com polissorbato 80



Fonte: A autora.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (FEG-SEM)

As micrografias para avaliação morfológica das amostras foram obtidas após a visualização do fármaco e das nanopartículas em microscópio eletrônico de varredura de alta resolução Tescan®, modelo Mira 3. O registro foi obtido em uma aceleração de 15 kV e magnitudes de 5000 e 30000 vezes para o fármaco puro e o sistema polimérico, respectivamente.

A formulação obtida foi ressuspensa e diluída em água ultrapurificada e, posteriormente, depositada em um fragmento de muscovita incolor, muito fino e com superfície perfeitamente plana, com posterior secagem a temperatura ambiente. As amostras foram devidamente fixadas em suporte metálico e submetidas ao processo de metalização com ouro (IC-50 Ion Coater), anteriormente a análise.

4.3.2 Difração de raios X (XRD)

A formulação obtida, o fármaco puro e os polímeros de partida foram examinadas em difratômetro de raios X Shimadzu®, modelo XRD-6000, com radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) em 2θ de 5° a 80° , em varredura contínua com velocidade de $2^\circ/\text{min}$ e, corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV. Os difratogramas foram analisados para observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.3.3 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta foi medido por espectroscopia de correlação de fótons em equipamento Malvern®, modelo NanoZS90, após a ressuspensão e diluição (1:500) de uma alíquota da formulação em água ultrapurificada.

4.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A formulação obtida foi analisada em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu®, modelo IR Prestige-21, utilizando pastilhas de

KBr, a 64 scans.min⁻¹, resolução de 2 cm⁻¹, em intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm⁻¹.

Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, dos polímeros de partida e da mistura física entre os fármacos e polímeros. A mistura física foi preparada a partir da simples mistura do fármaco e dos polímeros, na mesma proporção de concentração PCL:PEG:isradipino em que eles estão presentes na formulação das nanopartículas (4:1:1).

4.3.5 Análise térmica

A estabilidade térmica do fármaco, polímeros e formulação foi estudada por meio das curvas termogravimétricas (TG) obtidas em equipamento Perkin Elmer®, modelo STA 6000, na faixa de temperatura entre 313 K (40°C) e 873 K (600°C) sob atmosfera dinâmica de ar sintético (50 mL.min⁻¹), com rampa de aquecimento de 10°C.min⁻¹. As amostras foram analisadas em célula calorimétrica de alumina e o equipamento foi calibrado usando índio (p.f. = 156,6°C, $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$) como padrão.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DO ISRADIPINO NANOENCAPSULADO

4.4.1 Validação de método analítico para quantificação de isradipino

A quantificação do isradipino foi desenvolvida e validada em cromatógrafo líquido de ultra eficiência Shimadzu Nexera System®, com bomba quaternária (LC-30AD), degaseificador (DGU-20A), amostrador automático (SIL-30 AC), compartimento de coluna termostatizado (CTO-20AC) e um detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A). A coluna analítica empregada foi uma Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (C18; 2,0 mm de diâmetro interno × 75 mm de comprimento; tamanho de partícula de 1,6 µm). A fase móvel foi constituída de metanol: água (85:15); com fluxo de 0,5 mL. min⁻¹; temperatura de 25°C volume de injeção de 10 µL e detecção no comprimento de onda de 327 nm. O tempo total de corrida analítica foi de 1,5 min. A aquisição e processamento dos dados foram obtidos com o *Software* LabSolutions® (Shimadzu, Japão).

O método foi validado conforme o preconizado na RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA, 2017) e com as recomendações da ICH (2005). Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de quantificação (LQ) e detecção (LD), precisão, exatidão e robustez.

A solução padrão de isradipino (1 mg.ml^{-1}) foi preparada dissolvendo 10 mg do fármaco em metanol, em um balão volumétrico de 10 ml. A solução foi posteriormente diluída em fase móvel para preparar as soluções com concentração entre 10 e $40 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$. As soluções finais foram filtradas através de um filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno (filtro de membrana Durapore®, tamanho de poro de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$) antes da injeção no sistema UPLC.

A seletividade foi determinada a partir da comparação do espectro gerado pela solução padrão e o ultrafiltrado da formulação NC-0 ressuspensa em água ultrapurificada. O ultrafiltrado foi obtido a partir da centrifugação a 2200 rcf, por 30 min, da formulação obtida sem a presença do fármaco (filtro Amicon® *Mw cutoff* = 10000 g.mol^{-1} , Merck Milipore). Ambas as soluções foram cromatografadas nas condições previamente definidas.

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de uma curva de calibração, em triplicata. Para isso, os pontos da curva foram obtidos a partir de diluições da solução padrão na fase móvel, com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta. A faixa de trabalho foi definida com base na intensidade dos picos gerados no cromatograma, contemplando um intervalo de $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $40 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. A análise da regressão linear ocorreu pelo método dos mínimos quadrados e o coeficiente angular foi testado por ANOVA, em um nível de significância de 0,05.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir dos parâmetros de três curvas analíticas, conforme representado nas Equações 2 e 3, onde σ é o desvio padrão dos coeficientes lineares e IC é a média dos coeficientes angulares das curvas.

$$(2) \quad LD = \left(\frac{3,3 \sigma}{IC} \right)$$

$$(3) \quad LQ = \left(\frac{10 \sigma}{IC} \right)$$

A repetitividade foi avaliada por meio da análise da concentração média da curva ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), totalizando seis determinações em diferentes períodos de um mesmo dia (manhã, tarde e noite), pelo mesmo analista. A precisão intermediária foi determinada pela análise da mesma concentração utilizadas para a repetitividade, porém as medidas foram realizadas em dias diferentes, com analistas diferentes. Os resultados destas análises foram expressos na forma de Desvio Padrão Relativo (DPR), de acordo com a equação abaixo (3), onde DP é o desvio padrão da série de medições e CMD a concentração média determinada.

$$(4) \quad DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100$$

A exatidão foi determinada aplicando o método proposto na análise da amostra, na qual quantidade conhecida de isradipino (0,1 mg) foi adicionada às soluções padrão contendo $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do fármaco. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados da exatidão foram expressos na forma de porcentagem de recuperação do analito, a partir da Equação 5.

$$(5) \quad \text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

A robustez do método foi testada frente a pequenas variações no fluxo da fase móvel ($\pm 0,02 \text{ mL.min}^{-1}$), comprimento de onda de detecção do fármaco ($\pm 2 \text{ nm}$) e concentração da fase móvel ($\pm 2\%$).

4.4.2 Determinação da eficiência de encapsulação

A determinação de isradipino encapsulado nas nanopartículas foi realizada a partir do ensaio de quantificação desenvolvido por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta (UPLC-PDA), devidamente validado conforme a descrição acima.

A formulação foi ressuspensa em água ultrapurificada e a eficiência de encapsulação (%) foi determinada a partir da nanossuspensão ($500 \mu\text{L}$), que foi submetida à ultrafiltração em dispositivo Amicon® (Mw = 10000, Milipore) por meio de

centrifugação a 2200 rcf por 30 minutos. O isradipino livre foi quantificado no ultrafiltrado. As análises foram realizadas em triplicata.

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada pela diferença entre a concentração total de fármaco adicionado à formulação e a concentração de fármaco livre, quantificada pelo método de cromatográfico proposto, conforme descrito na Equação 1.

$$(1) \quad EE (\%) = \frac{\text{Concentração teórica} - \text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ISRADIPINO

As nanocápsulas foram obtidas com sucesso pelo método inicialmente proposto, a partir da blenda dos polímeros PCL 10000 g.mol⁻¹ e PEG 6000 g.mol⁻¹, e revestidas com polissorbato 80. As formulações apresentaram aspecto de pó fino, sendo que a NC-ISR apresentou coloração ligeiramente amarelada. A concentração final do fármaco na NC-ISR foi 1 mg de isradipino a cada 45 mg de formulação.

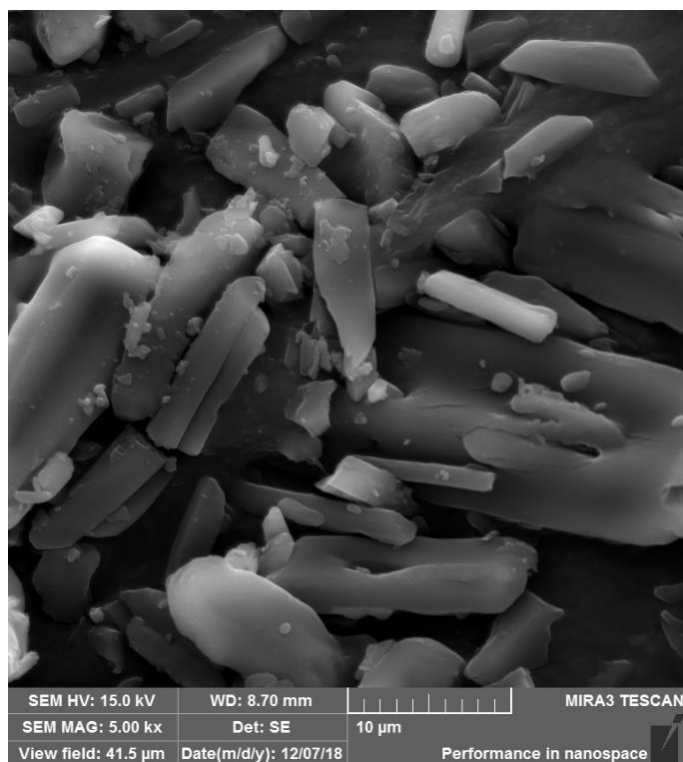
As nanopartículas foram obtidas a partir de componentes atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, contudo, é importante atentar que o emprego da PCL aumenta o custo econômico agregado a este produto. O método selecionado mostrou-se eficiente, porém, a principal limitação da sua utilização é o tempo total de execução e a dificuldade de transposição para produção em grande escala.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (FEG-SEM)

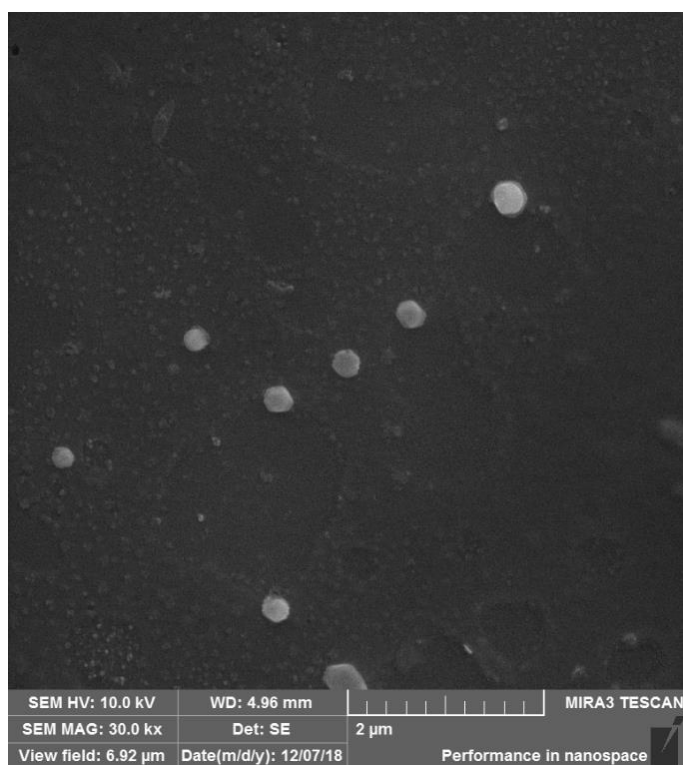
As micrografias do fármaco puro evidenciaram o formato cristalino do isradipino (Figura 6). As imagens do sistema polimérico demonstraram que as partículas obtidas apresentaram tamanho nanométrico, formato esférico, com superfície lisa e regular (Figura 7).

FIGURA 6 – Fotomicrografia do isradipino obtida por FEG-SEM, em um aumento de 5000 vezes



Fonte: A Autora.

FIGURA 7 – Fotomicrografia das nanocápsulas poliméricas obtida por FEG-SEM, em um aumento de 30000 vezes



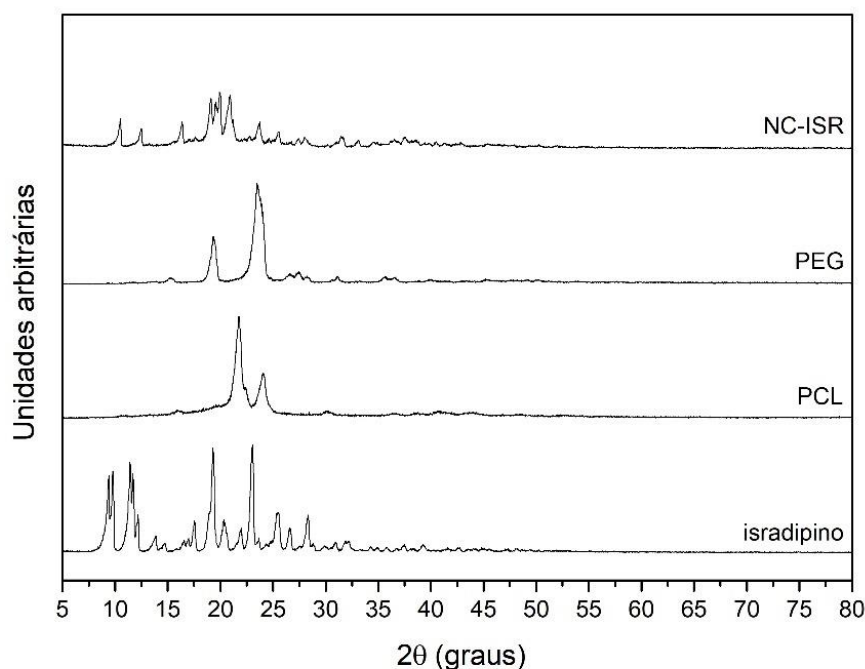
Fonte: A Autora.

4.2.2 Difração de raios X (XRD)

A Figura 8 sumariza os resultados obtidos por XRD para o isradipino puro, polímeros (PCL 10000 g.mol⁻¹ e PEG 6000 g.mol⁻¹) e nanopartículas contendo o fármaco (NC-ISR). No caso do fármaco puro, foram verificados diferentes picos relacionados com a sua estrutura cristalina, sendo que os picos principais aparecem em 9,4; 9,8; 11,4; 11,7; 19,3 e 23,1 graus, enquanto a PCL apresentou picos em 21,6; 21,8 e 24,1 graus e o PEG apresentou picos em 19,3 e 23,5 graus.

O difratograma de raios X demonstrou que o material nanoparticulado apresentou perfil de difração cristalina muito semelhante aos polímeros isolados, com desaparecimento ou redução da intensidade de difração cristalina dos picos característicos do isradipino. Este resultado sugere que o método de encapsulação foi eficiente e o fármaco encontra-se prioritariamente em dispersão molecular no núcleo apolar das partículas, impedindo sua detecção por técnicas de análise de superfície, ou seja, confirmando tratar-se de nanocápsulas.

FIGURA 8 – Difratograma do isradipino, polímeros (PCL 10000 g.mol⁻¹ e PEG 6000 g.mol⁻¹) e da formulação contendo o fármaco (NC-ISR)



Fonte: A Autora.

5.2.3 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

Os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas contendo isradipino (NC-ISR), bem como do controle negativo (NC-0), estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanossuspensões obtidas

Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
NC-ISR	251,3 ± 34,8*	0,239 ± 0,023*	-36,7 ± 3,7*
NC-0	249,1 ± 58,2*	0,331 ± 0,132*	-39,7 ± 5,4*

*Valores de desvio padrão relativo obtidos para as triplicatas.

Fonte: A autora.

O tamanho da partícula e a distribuição granulométrica (índice de polidispersão) são análises fundamentais para avaliar a viabilidade e segurança da utilização de nanopartículas, uma vez que a presença de partículas micrométricas aumenta o risco de embolia, bem como compromete a estabilidade do sistema. Em geral, nanopartículas com diâmetros de até aproximadamente 500 nm tendem a ser mais seguras para o uso parenteral (DAL PIZZOL, 2014).

Saraiva *et al.* apresentam sistemas terapêuticos nanoparticulados utilizados em estudos pré-clínicos de doença de Parkinson (SARAIVA *et al.*, 2016), sendo que as partículas obtidas por Kurakhmaeva *et al.*, a partir do polímero polibutílcianoacrilato e revestimento com polissorbato 80, apresentaram diâmetro médio de 250 ± 30 nm e foram capazes de reduzir significativamente sintomas básicos da doença de Parkinson, ou seja, garantindo que a liberação do agente ativo ocorreu na região cerebral desejada (KURAKHMAEVA *et al.*, 2009). Sabe-se que doenças neurodegenerativas alteram a permeabilidade da BHE (MASSERINI, 2013), desta forma, é possível afirmar que o diâmetro médio das nanocápsulas poliméricas obtidas neste trabalho não é um fator limitante a sua liberação no sistema nervoso central.

Com relação ao índice de polidispersão, as formulações apresentaram valores inferiores a 0,5, o que representa uma estreita distribuição das partículas em relação ao diâmetro médio, apresentando comportamento monomodal.

Como demonstrado na TABELA 2, as análises de potencial zeta indicaram a obtenção de partículas de carga negativa, próximo a 30 mV, independente da

presença ou ausência do fármaco na formulação, sugerindo que o fármaco não alterou significativamente o potencial zeta das nanopartículas poliméricas, uma vez que não está, prioritariamente, na superfície das mesmas.

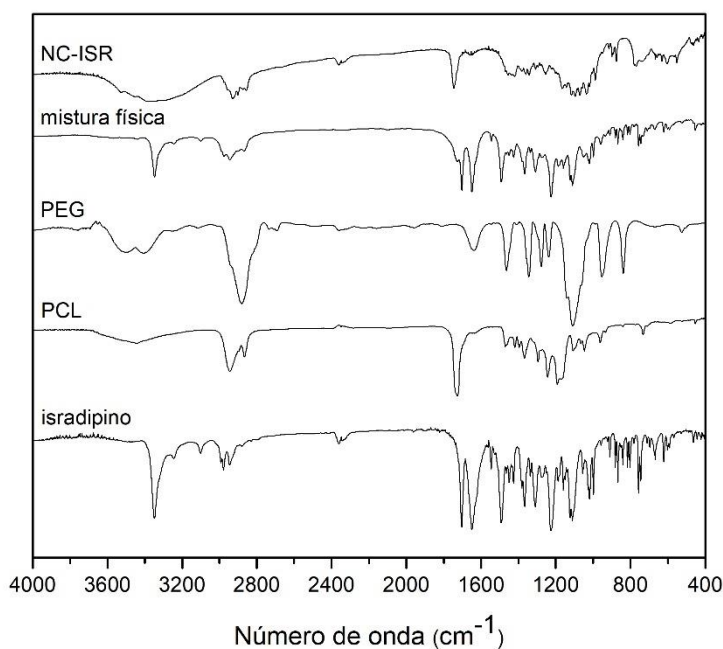
A carga superficial pode influenciar significativamente a estabilidade de uma partícula em suspensão. De um modo geral, quanto maior for o valor absoluto do potencial zeta, mais estável será o sistema formado. Essa forte influência está ligada as características de repulsão eletrostática entre as partículas, sendo que, as interações repulsivas entre elas aumentam proporcionalmente ao aumento do potencial zeta, conduzindo à formação de partículas mais estáveis (FROZZA *et al.*, 2010; JAIN; SARAF, 2009). Em geral, as partículas podem ser consideradas estáveis quando o valor absoluto do potencial zeta é próximo de 30 mV, enquanto potenciais próximos a 0 e 5 mV podem produzir o fenômeno de floculação mais facilmente (NEVES *et al.*, 2013). Portanto, as nanocápsulas poliméricas desenvolvidas são consideradas estáveis fisicamente.

Shao *et al.* demonstraram que nanopartículas com cargas com potenciais zeta negativos demonstraram efeitos citotóxicos menores do que as nanopartículas com potenciais zeta positivos, considerando cargas semelhantes (SHAO *et al.*, 2015). Além disso, a característica negativa da superfície das nanopartículas, pode proporcionar maior tempo de permanência no sangue, já que partículas carregadas positivamente, muitas vezes exibem uma rápida depuração do sangue juntamente com uma elevada acumulação no pulmão e no fígado (LI; HUANG, 2008).

5.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR obtidos para o isradipino, polímeros (PCL 10000 g.mol⁻¹ e PEG 6000 g.mol⁻¹), mistura física entre o fármaco e os respectivos polímeros e nanocápsulas contendo o fármaco (NC-ISR) estão representados na Figura 9.

FIGURA 9 – Espectro de FTIR do isradipino, polímeros (PCL 10000 g.mol⁻¹ e PEG 6000 g.mol⁻¹), mistura física e da formulação contendo o fármaco (NC-ISR)



Fonte: A Autora.

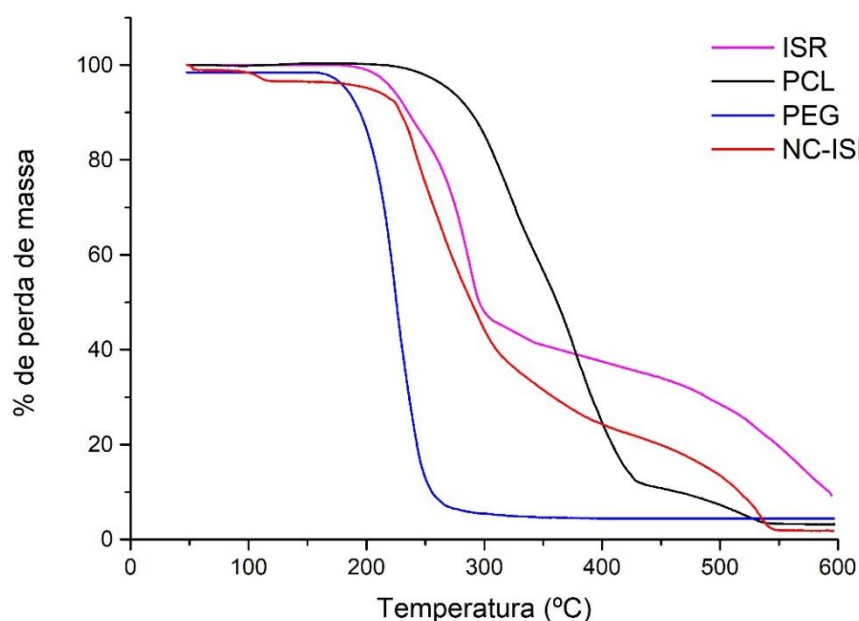
O espectro de FTIR do isradipino puro indicou bandas características do estiramento de N-H em 3349 cm⁻¹, vibração de deformação axial de N-H em 1648 cm⁻¹ e estiramento de C-N de aromáticos em 1221 cm⁻¹. Os espectros dos polímeros mostraram para a PCL uma banda forte em 1728 cm⁻¹, correspondente a deformação axial de C=O e duas bandas em 2945 e 2867 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico C-H₂; enquanto para o PEG ficou evidente uma banda típica de vibração de estiramento de C-H (2887 cm⁻¹) e de C-O de éter alifático (1110 cm⁻¹).

A análise espectroscópica, além de confirmar dados anteriormente relatados na literatura para o fármaco e os polímeros assegurou que o processo de nanoencapsulação não resultou em ligações químicas entre o isradipino e os polímeros, já que o espectro obtido para o sistema nanoparticulado apresentou bandas de absorção nas mesmas faixas de número de onda observados para a respectiva mistura física. Adicionalmente, o espectro da formulação NC-ISR apresentou uma banda larga entre 3600 e 3200 cm⁻¹, característica de grupos O-H, e indicam a presença de polissorbato 80, adsorvido na superfície das nanocápsulas.

5.2.5 Análise térmica

A estabilidade térmica do fármaco, polímeros e formulação foi estudada por meio das curvas termogravimétricas representadas na Figura 10. A formulação exibiu três eventos de decomposição térmica. A primeira fase de perda de massa foi associada à perda de água. A segunda e a terceira fase foram atribuídas a uma combinação da degradação da cadeia polimérica e do fármaco e da volatilização dos seus produtos de decomposição, respectivamente. Além disso, o termograma indicou que a temperatura de início de decomposição térmica foi em 86 °C, o que indica que as nanopartículas obtidas apresentam uma estabilidade adequada.

FIGURA 10 – Curva termogravimétrica do isradipino, polímeros (PCL 10000 g.mol⁻¹ e PEG 6000 g.mol⁻¹) e da formulação contendo o fármaco (NC-ISR)



Fonte: A Autora.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DO ISRADIPINO NANOENCAPSULADO

5.3.1 Validação de método analítico para quantificação de isradipino

A pesquisa científica de qualidade requer que seus resultados sejam confiáveis e reprodutíveis. Para isso, deve-se utilizar métodos que atendam estas exigências e, ainda, sejam rápidos e de fácil execução.

Os principais parâmetros relativos ao método desenvolvido para quantificação de isradipino estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3 – Principais parâmetros relativos ao método de UPLC-PDA desenvolvido

Parâmetros	Resultado
Tempo de retenção (min)	0,699 ± 0,001*
Largura do pico a 5% da altura (min)	0,208 ± 0,001*
Fator de simetria do pico (<i>tailing factor</i>)	1,485 ± 0,006*

*Valores de desvio padrão relativo obtidos para as replicatas.

Fonte: A autora.

O método desenvolvido teve um tempo total de análise de 1,5 min, ou seja, trata-se de uma análise muito rápida. Adicionalmente, é importante destacar que a fase móvel composta apenas por metanol e água ultrapurificada (85:15) torna este método simples e de fácil execução, adequado a rotina do controle de qualidade, e mantendo a eficiência desejável para a quantificação do isradipino (YANG *et al.*, 2013; ASWINI *et al.*, 2012; CHAITANYA *et al.*, 2012; RAO *et al.*, 2005; AL-SUWAYEH, 2002).

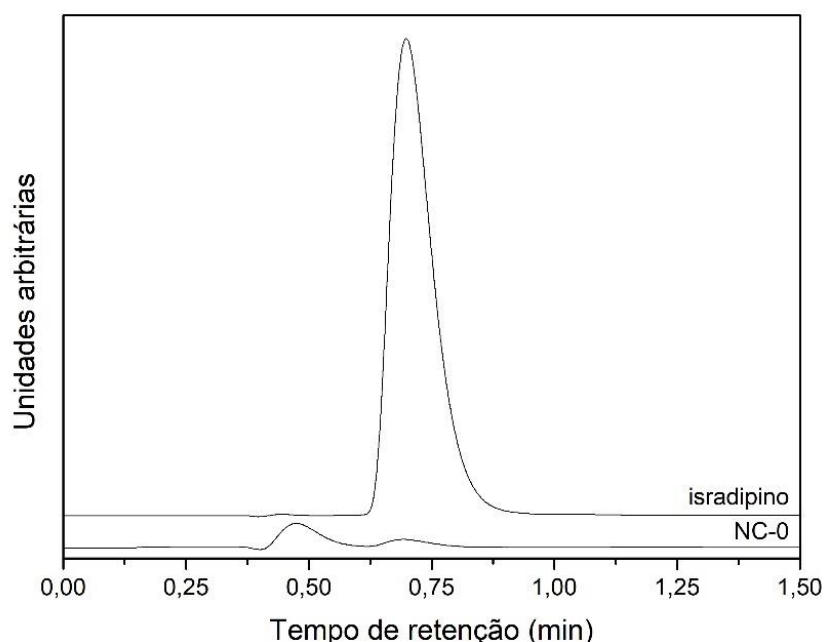
Analiticamente, podemos afirmar que a largura do pico na base está adequada para garantir a qualidade do método desenvolvido, já o fator de simetria do pico (Tf) mostra que ele não é perfeitamente simétrico, já que a simetria ideal é representada por valores iguais a 1. Entretanto, Petersson *et al.* descrevem que a UPLC, que apresenta colunas com tamanhos de partículas inferiores a 2 µm, produzem valores de Tf significativamente maiores que a HPLC equivalente, com partículas de 3 µm, quando a mesma quantidade de amostra é injetada (PETERSSON *et al.*, 2011). Expressões tem demonstrado que os valores de Tf se alteram com o tamanho da partícula e número de pratos teóricos e, mesmo assim, a UPLC produz separações mais eficientes, quando consideramos os picos adjacentes. Desta forma, o valor do Tf deve ser analisado não isoladamente e sim associado aos valores de largura dos picos na base para obter um parâmetro mais adequado de medida da qualidade do método.

O processo de validação é responsável por garantir que os resultados obtidos são adequados. Além disso, uma vez rigorosamente respeitados os parâmetros exigidos pelas agências reguladoras, a validação é capaz de empregado produz

resultados confiáveis e é adequado para a finalidade pretendida (ANVISA, 2017, NADAL *et al.*, 2015).

O método desenvolvido para quantificação do isradipino mostrou-se seletivo, já que não houve sobreposição de leitura da formulação F0 na mesma faixa de leitura do fármaco (Figura 11), indicando que nenhum componente da formulação apresentou absorção da radiação eletromagnética no comprimento de onda de detecção selecionado (GOMES *et al.*, 2015). Desta forma, está assegurada a capacidade do método de identificar ou quantificar a substância em estudo, em meio a qualquer outro componente que não se tenha interesse, como impurezas, diluentes e componentes de matriz. O método gera uma resposta exclusiva para o isradipino, permitindo garantir um resultado positivo para o analito e negativo para as demais substâncias (ANVISA, 2017).

FIGURA 11 – Cromatograma do isradipino e formulação NC-0

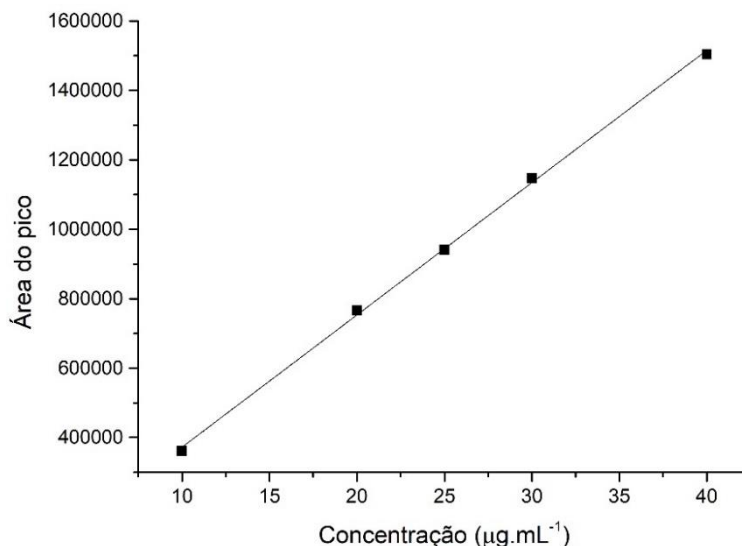


Fonte: A Autora.

O teste da linearidade demonstrou a capacidade do método em obter respostas proporcionalmente equivalentes a concentração do analito em estudo, dentro de uma determinada faixa de trabalho. Para isso, o teste foi realizado em cinco

concentrações diferentes do analito. A curva analítica média obtida está representada na Figura 12.

FIGURA 12 – Representação gráfica da curva analítica média obtida para a quantificação de isradipino por UPLC-PDA, na faixa de concentração de 10 a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Fonte: A Autora.

Por meio da análise de regressão linear, foram obtidos os valores de coeficiente angular (inclinação da reta), coeficiente linear (intercepto com o eixo y) e coeficiente de determinação (r^2) e coeficiente de correlação de Pearson (r), sendo este último o valor responsável por evidenciar a qualidade da regressão linear obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor é a dispersão entre os pontos e maior a segurança dos resultados (ANVISA, 2017, ALMEIDA *et al.*, 2018). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.

TABELA 4 – Parâmetros relativos a linearidade do método UPLC-PDA desenvolvido

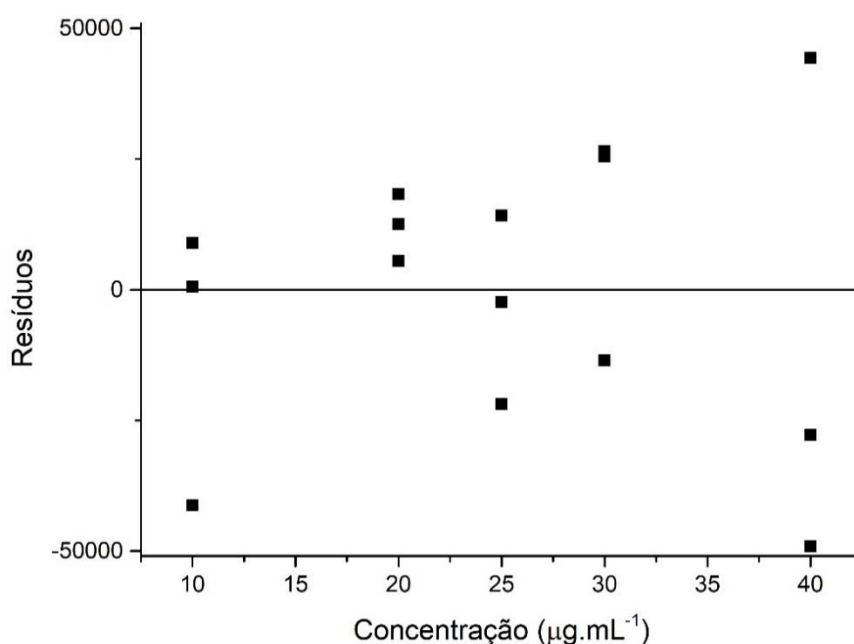
Parâmetros	Resultado
Faixa de trabalho	10 a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Equação da reta	$y = 38100x - 8723,8$
Inclinação da reta (a)	38100,0
Intercepto com o eixo Y (b)	-8723,8
Coeficiente de correlação de Pearson (r)	0,99962
Coeficiente de determinação (r^2)	0,99899

Fonte: A autora.

Os resultados revelaram um coeficiente de correlação estatisticamente igual a 1 e coeficiente angular diferente de zero (nível de significância de 0,05%). Desta forma, fica claro a necessidade de utilização de curva de calibração ao invés de um ponto único para padronização na rotina de análise.

Com o objetivo de demonstrar que y realmente varia em função de x é necessário demonstrar que a variação devida à regressão (modelo) é suficientemente maior que a devida ao erro (resíduos). Desta forma, os resíduos foram plotados graficamente na Figura 13.

FIGURA 13 – Representação gráfica dos resíduos obtidos para cada replicata das concentrações das curvas analíticas



Fonte: A Autora.

A análise visual indicou que os resíduos são independentes e homogeneamente distribuídos em função da média, garantindo a confiabilidade da resposta gerada pelo método (GASPAR *et al.*, 2020).

O Limite de Detecção (LD), que se refere a menor concentração do analito o qual o método deve ser capaz de detectar, e o Limite de Quantificação (LQ), que é a menor quantidade de substância que a metodologia utilizada consegue quantificar com precisão e exatidão, asseguraram a viabilidade de aplicação do método dentro da faixa de trabalho definida (ANVISA, 2017; LYRA *et al.*, 2017). Os valores de LD e LQ encontrados foram, respectivamente, 2,90 e 8,78 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Agências oficiais descrevem que a precisão deve ser capaz de avaliar a proximidade entre os valores encontrados nos experimentos e deve ser expressa como repetitividade e precisão intermediária (ANVISA, 2017). Neste trabalho, a repetitividade mostrou a concordância entre os resultados encontrados para o método executado nas mesmas condições, em um breve intervalo de tempo. Quando a precisão intermediária foi testada, o método demonstrou a ocorrência de pequenas variações nos resultados da análise, quando executadas em dias diferentes e operadores diferentes, dentro de um mesmo laboratório (LOPES *et al.*, 2017). Os resultados de repetitividade e precisão intermediária obtidos para o método desenvolvido encontram-se na Tabela 5.

TABELA 5 – Parâmetros relativos a precisão do método de UPLC-PDA desenvolvido

Parâmetros	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR (%)*
Repetitividade (n=6)	25	4,02
Precisão intermediária (n=12)	25	3,7

*Valores de desvio padrão relativo obtidos para as replicatas.

Fonte: A autora.

Os valores de desvio padrão relativo obtidos foram inferiores a 5,0 %, portanto, o método foi considerado preciso.

Os resultados encontrados no teste de exatidão comprovaram a concordância entre os dados obtidos frente a um valor de referência real (CARTAGENA-MOLINA *et al.*, 2016). Os valores de porcentagem de recuperação do isradipino estão entre 95,24 e 96,53 para as diferentes concentrações avaliadas. A Tabela 6 descreve os dados do estudo.

TABELA 6 – Parâmetros relativos a exatidão do método de UPLC-PDA desenvolvido

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (n=3)	Recuperação do analito (%)
20	95,95
25	95,24
30	96,53

Fonte: A autora.

Adicionalmente, o método foi avaliado quanto a habilidade de suportar pequenas variações nas condições de análise, sem comprometer sua exatidão. Os

valores obtidos para robustez estão descritos na Tabela 7. Diante dos valores de recuperação obtidos, com variação inferior a 5%, o método foi considerado robusto frente a pequenas alterações no fluxo da fase móvel, comprimento de onda de detecção e concentração da fase orgânica na fase móvel. Neste caso, a robustez valoriza os resultados obtidos com a aplicação deste método, uma vez que assumimos que ele pode ser reproduzido sem maiores problemas (LYRA *et al.*, 2017).

TABELA 7 – Parâmetros relativos a robustez do método de UPLC-PDA desenvolvido

Parâmetros		Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (n=3)	Recuperação do analito (%)
Fluxo da fase móvel	0,48 mL.min ⁻¹	25	104,21
($\pm 0,02 \text{ mL.min}^{-1}$)	0,52 mL.min ⁻¹	25	96,21
Comprimento de onda de	325 nm	25	99,98
detecção ($\pm 2\text{nm}$)	329 nm	25	99,94
Concentração da fase móvel	83:17 (metanol:água)	25	100,41
($\pm 2\%$ de metanol)	87:13 (metanol:água)	25	100,78

Fonte: A autora.

Por fim, diante dos resultados apresentados o método foi considerado seletivo, linear para a faixa de aplicação proposta, preciso, exato e robusto portanto, está devidamente validado. Sendo assim, é possível concluir que se trata de um método capaz de quantificar o isradipino nanoencapsulado nos sistemas poliméricos fornecendo resultados confiáveis.

5.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação

A quantificação do fármaco nanoencapsulado foi realizada a partir do método cromatográfico desenvolvido e validado.

Os cromatogramas obtidos a partir das amostras dos ultrafiltrados não apresentaram picos, ou seja, não há concentração detectável de isradipino livre na nanossuspensão. Desta forma, é possível afirmar que o sistema polimérico obtido foi capaz de incorporar o isradipino em seu interior, com eficiência superior a 98,55%, considerando a concentração correspondente ao limite de detecção do método.

Quando o método de UPLC-PDA foi testado para quantificar o isradipino nanoencapsulado nas partículas poliméricas ele resultou em alta taxa de encapsulação. Esta taxa é completamente esperada devido à alta lipofilicidade do

fármaco (solubilidade em água $<10 \text{ mg.L}^{-1}$ a 37°C), o que otimiza sua incorporação no núcleo oleoso deste nanonossistema (RAMASAHAYAM *et al.*, 2015).

6 CONCLUSÕES

- As nanocápsulas contendo isradipino foram obtidas com sucesso, empregando componentes atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis;
- Os sistemas nanoparticulados apresentaram forma esférica e tamanho médio adequado diante da proposta de liberação no sistema nervoso central em pacientes com doenças neurodegenerativas, além de se apresentarem homogeneamente dispersas e estáveis;
- A difração de raios X confirmou que o método de encapsulação foi eficiente e o fármaco encontra-se prioritariamente no núcleo, confirmando a obtenção de nanocápsulas;
- O espectro de infravermelho com transformada de Fourier assegurou que o processo de nanoencapsulação não resultou em ligações químicas entre o isradipino e os polímeros;
- A análise térmica demonstrou que a formulação é estável a temperatura corporal;
- A formulação apresentou alta eficiência de encapsulação e o método analítico empregado mostrou-se capaz de quantificar o isradipino nanoencapsulado nos sistemas poliméricos, fornecendo resultados confiáveis.

Os resultados fornecem uma base experimental estruturada para viabilizar a realização de ensaios *in vivo* empregando as nanocápsulas poliméricas contendo isradipino como alternativa para a liberação do fármaco no sistema nervoso central, sendo que esta formulação é uma estratégia promissora à utilização deste bloqueador de canal de cálcio na inibição da progressão de doenças neurodegenerativas, acrescentando segurança, eficácia e qualidade à farmacoterapia.

REFERÊNCIAS

- AL HAUSHEY, L.; BOLZINGER, M. A.; BORDES, C.; GAUVRIT, J. Y.; BRIANCON, S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 344, p. 16-25, 2007.
- ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting issues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 39, p. 173-191, 1993.
- ALLEN, T. M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 13, p. 285-309, 1994.
- ALMEIDA, M. A. *et al.* Innovative phytoformulation containing capsaicinoids: Microparticles development, analytical method validation, and anti-ulcer effect. *Pharmacognosy Magazine*, v. 14, p. 290-296, 2018.
- AL-SUWAYEH, S. A. Quick, simple, and sensitive HPLC methos for determination of isradipine in plasma and its application in pharmacokinetic studies. *Analytical Letters*, v. 35, n. 7, p. 1205-1213, 2002.
- ANEKONDA, T. S. e QUINN, J. F. Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1812, p. 1584-1590, 2011.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Resolução da Diretoria Colegiada RDC 166 de 24 de julho de 2017*. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília, 2017.
- ASWINI, G. L.; DACHINAMOORTY, D.; BABU, Y. R.; SUREKHA M. L., SWAMY, G. K. Development and validation of isradipine in bulk and in its pharmaceutical formulations by RP-HPLC method. *International Research Journal of Pharmacy*, v. 3, n.9, p. 131-133, 2012.
- CARTAGENA-MOLINA, A. F.; KLEIN, T., LYRA, A. M.; URBAN, A. M.; FARAGO, P. V.; CAMPANHA, N. H. Development and validation of an RP-HPLC/UV method for determination of miconazole nitrate in spray-dried polymeric microparticles. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 35, p. 1354-1360, 2016.
- CHAITANYA, K. K.; SANKAR, D. G.; ISRAEL, D. S.; LAKSHMI, A. V.; KUMAR, C. H. N. Isocratic-Reverse Phase Liquid Chromatographic method for the quantification of isradipine by UV detection in tablets. *European Journal of Applied Engineering and Scientific Research*, v. 1, n. 4, p. 220-227, 2012.
- CHAKRAPANI, A. *Processing and characterization of polymer microparticles for controlled drug delivery systems*. Doutorado em Filosofia, The Ohio State University, Columbus, 2006.

CHAN, C. S.; GUZMAN, J. N.; ILIJIC, E.; MERCER, J. N.; RICK, R. C.; TKATCH, T.; MEREDITH, G. E.; SURMEIER, D. J. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature*, v. 447, p. 1081-1089, 2007.

CHAN, C. S.; GERTLER, T. S.; SURMEIER, D. J. A molecular basis for the increased vulnerability of substantia nigra dopamine neurons in senescence and Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v. 25, p. S63-S70, 2010.

DAHLOF, B. *et al.* Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required. *Lancet*, v. 366, p. 895-906, 2005.

DAL PIZZOL, C. *Desenvolvimento de nanopartícula lipídica sólida contendo um análogo de pirimidina e avaliação in vitro da atividade antitumoral*. Universidade Federal de Santa Catarina: Tese de doutorado, 2014.

DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 42-57, 2004.

DENG, S.; GIGLIOBIANCO, M. R.; CENSI, R.; DI MARTINO, P. Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities. *Nanomaterials*, v. 10, p. 1-36, 2020.

DRUGBANK. *Isradipine*. Disponível em <<http://www.drugbank.ca>>, 2020.

DUBEY, V.; MOHAN, P.; DANGI, J. S.; KESAVAN, K. Brinzolamide loaded chitosan-pectin mucoadhesive nanocapsules for management of glaucoma: Formulation, characterization and pharmacodynamic study. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 152, p. 1224-1232, 2019.

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.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; PAESE, K.; HOPPE, J. B.; da SILVA, T.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 6, n. 6, p. 694703, 2010.

GASPAR, M. D. R. *et al.* Development and Validation of a Reversed-Phase UHPLC-PDA Method for Determination of Chlorhexidine in Meth(Acrylic) Nanocapsules. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 39, p. 792-798, 2020.

GBD 2016 DEMENTIA COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, v. 18, p. 88-106, 2019.

GBD 2016 PARKINSON'S DISEASE COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, v. 17, p. 939-953, 2018.

GELPERINA, S.; MAKSIMENKO, O.; KHALANSKY, A.; VANCHUGOVA, L.; SHIPULO, E.; ABBASOVA, K.; BERDIEV, R.; WOHLFART, S.; CHEPURNOVA, N.; KREUTER, J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 74, p. 157-163, 2010.

GIRON, D.; GOLDBRONN, C.; MUTZ, M.; PFEFFER, S.; PIECHON, P.; SCHWAB, P. Solid state characterizations of pharmaceutical hydrates. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 68, p. 453 – 465, 2002.

GOMES, M. L. S. *et al.* A simple RP-HPLC/UV method for determination of cilostazol in polymeric nanoparticles suspensions: development and validation. *Acta Pharmaceutica*, v. 34, p. 803-809, 2015.

GUZMAN, J. N.; ILIJIC, E.; YANG, B.; SANCHEZ-PADILLA, J.; WOKOSIN, D.; GALTIERI, D.; KONDAPALLI, J.; SCHUMACKER, P. T.; SURMEIER, J. Systemic isradipine treatment diminishes calcium-dependent mitochondrial oxidant stress. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 128, p. 2266-2280, 2018.

HAVANOOR, S. M.; MANJUNATH, K.; BHAGAWATI, S. T.; VEERAPUR, V. P. Solid lipid nanoparticles for better treatment of hypertension – preparation, characterization and *in vivo* evaluation. *International Journal of Biopharmaceutics*, v. 5, n. 3, p. 218, 2014.

HOF, R. P., HOF, A., RUEGG, U. T., COOK, N. S., VOGEL, A., J. Stereoselectivity at the calcium channel: different profiles of hemodynamic activity of the enantiomers of the dihydropyridine derivative PN 200-110. *Cardiovascular Pharmacology*, v. 8, 221–226, 1986.

HOF, R. P., RUEGG, U. T., Pharmacology of the New Calcium Antagonist Isradipine and its Metabolites. *American Journal of Medicine*, v. 84 (3B), 13-17, 1988.

HUU, V. A. N.; LUO, J.; ZHU, J.; ZHU, J.; PATEL, S.; BOONE, A.; MAHMOUD, E.; MCFEARIN, C.; OLEJNICZAK, J.; DE GRACIA LUX, C. Light-responsive nanoparticle depot to control release of a small molecule angiogenesis inhibitor in the posterior segment of the eye. *Journal of Controlled Release*, v. 200, p. 71–77, 2015.

ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) Q2 (R1). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, 2005.

JAIN, S.; SARAF, S. Influence of processing variables and *in vitro* characterization of glipizide loaded biodegradable nanoparticles. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 3, n. 2, p. 113-117, 2009.

KOHANE, D. S. *et al.* Effectiveness of muscimol-containing microparticles against pilocarpine-induced focal seizures. *Epilepsia*, v. 43, p. 1462-1468, 2002.

KREUTER, J. *et al.* Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *Journal of Drug Targeting*, v. 10, p. 317–325, 2002.

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

KUMAR, V.; CHAUDHARY, H.; KAMBOJ, A. Development and evaluation of isradipine via rutin-loaded coated solid–lipid nanoparticles. *Interventional Medicine & Applied Science*, v. 10, p. 236–246, 2018.

KURAKHMAEVA, K. B.; DJINDJIKHASHVILI, I. A.; PETROV, V. E.; BALABANYAN, V. U.; VORONINA, T. A.; TROFIMOV, S. S. *et al.* Brain targeting of nerve growth factor using poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, v. 17, p. 564-574, 2009.

LEROUEIL-LE VERGERA, M.; FLUCKIGERA, L.; KIMB, Y.; HOFFMANA, M.; MAINCENTA, P. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 46, p. 137-143, 1998.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 363, p. 26-39, 2008.

LI, S. D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, n. 4, p. 496–504, 2008.

LINDNER, G. R. *Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo resveratrol e avaliação da ação neuroprotetora sobre um modelo experimental de doença de Parkinson*. Universidade Estadual do Centro Oeste: Dissertação de mestrado, 2014.

LOPES, C. E.; LANGOSKI, G.; KLEIN, T.; FERRARI, P. C., FARAGO, P. V. A simple HPLC method for the determination of halcinonide in lipid nanoparticles: development, validation, encapsulation efficiency, and in vitro drug permeation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, p. 1-9, 2017.

LYRA, A. M.; NADAL, J. M.; KLEIN, T.; FARAGO, P. V. Development and Validation of a Simple RP-HPLC Method for Determination of Efavirenz in Polymeric Microparticles. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 36, p. 2354-2362, 2017.

MAITI, B.; PERLMUTTER, J. S. A Clinical Trial of Isradipine: What Went Wrong? *Annals of Internal Medicine*, v. 172, p. 625-626, 2020.

MASSERINI, M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. *ISRN Biochemistry*, v. 2013, p. 1-18, 2013.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-42, 2010.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON O. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

NADAL, J. M.; TOLEDO, M. G.; PUPO, Y. M.; DE PAULA, J. P.; FARAGO, P. V.; ZANIN, S. M. W. A Stability-Indicating HPLC-DAD Method for Determination of Ferulic Acid into Microparticles: Development, Validation, Forced Degradation, and Encapsulation Efficiency. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v. 2015, p. 1-10, 2015.

NEAL, B.; MACMAHON, S.; CHAPMAN, N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. *Lancet*, v. 355, p. 1955-1964, 2000.

NEEDHAM, D., MCINTOSH, T. J.; LASIC, D. D. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafter lipid membranes. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1108, p. 40-48, 1992.

NEVES, A. R.; LÚCIO, M.; MARTINS, S.; LIMA, J. L.; REIS, S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p.177-187, 2013.

OLIVIER, J. C. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, v. 2, p. 108-119, 2005.

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

PARKINSON STUDY GROUP STEADY-PD III INVESTIGATORS. Isradipine Versus Placebo in Early Parkinson Disease: A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine*, v. 172, p. 591-598, 2020.

PEREIRA, R. N. *Caracterização no estado sólido: hidratos de levofloxacino*. Universidade Federal de Santa Catarina: Tese de Doutorado, 2014.

PETERSSON, P.; FORSSEN, P.; EDSTROM, L.; SAMIE, F.; TATTERTONE, S. CLARKE, A.; FORNSTEDT, T. Why ultra high performance liquid chromatography produces more tailing peaks than high performance liquid chromatography, why it does not matter and how it can be addressed. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 6914-6921, 2011.

RAMASAHAYAM, B.; EEDARA, B. B.; KANDADI, P.; JUKANTI, R.; BANDARI, S. Development of Isradipine Loaded Self-Nano Emulsifying Powders for Improved Oral Delivery: In Vitro and in Vivo Evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 41, p. 753-763, 2015.

RAO, R. N.; NAGARU, P.; SRINIVASULU, C.; KRISHNAMURTHY, P. R.; SIREESHA, D.; BHASKAR, S. U. Reverse phase HPLC method for the estimation of isradipine in pharmaceutical dosage forms. *Asian Journal of Chemistry*, v. 17, p. 1406-1410, 2005.

ROA, J. P. B.; MANO, V.; FAUSTINO, P. B.; FELIX, E. B.; SILVA, M. E. S. R. e; SOUZA, J. D. FILHO. Síntese e caracterização do copolímero poli(3 Hidroxibutirato-co-εCaprolactona) a partir de poli(3 Hidroxibutirato) e poli(εCaprolactona). *Polímeros*, v. 20, n. 3, p. 221-226, 2010.

SADOON, N. A. e GHAREEB, M. M. Formulation and Characterization of Isradipine as Oral Nanoemulsion. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, p. 143-153, 2020.

SARAIVA, C.; PRAÇA, C.; FERREIRA, R.; SANTOS, T.; FERREIRA, L. BERNARDINO, L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 34-47, 2016.

SHAO, X.; WEI, X.; SONG, X.; HAO, L.; CAI, X.; ZHANG, Z.; PENG, Q.; LIN, Y. Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell proliferation*, v. 48, p. 465-474, 2015.

SINGH, R.; LILLARD JR, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental Molecular Pathology*, v. 86, p. 215-223, 2009.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, V. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 1-23, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7ª Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 107, p. 1-83, 2016.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – parte II. *Polímeros*, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

TAHARA, K.; FURUKAWA, S.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Hybrid-modified poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres for a novel cellular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* v. 392, p. 311-313, 2010.

TAO, X.; LI, Y.; HU, Q.; ZHU, L.; HUANG, Z.; YI, J.; YANG, X.; HU, J.; FENG, X. Preparation and Drug Release Study of Novel Nanopharmaceuticals with Polysorbate 80 Surface Adsorption. *Journal of Nanomaterials*, v. 2018, p. 1-11, 2018.

TRAN, T. T. *et al.* Amorphous isradipine nanosuspension by the sonoprecipitation method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 474, p. 146-150, 2014.

VENUGOPAL, V.; KUMAR, K. J.; MURALIDHARAN, S.; PARASURAMAN, S.; RAJ, V.

KUMAR, K. V. Optimization and in-vivo evaluation of isradipine nanoparticles using Box-Behnken design surface response methodology. *The Open Nanoscience Journal*, v. 1, p. 1-16, 2016.

WANG, J.; LIU, W.; TU, Q.; SONG, N.; ZHANG, Y.; NIE, N. Folate-decorated hybrid polymeric nanoparticles for chemically and physically combined paclitaxel loading and targeted delivery. *Biomacromolecules*, v. 10, p. 228-234, 2010.

WHEATLEY, M. A.; LEWANDOWSKI, J. Nano-sized ultrasound contrast agent: salting-out method. *Molecular Imaging*, v. 9, n. 2, p. 96-107, 2010.

YANG, X.; XU, H.; GAN, J.; LI, L.; LI, J.; JIN, Y.; YUAN, B. Quantitative determination of isradipine in dog plasma by an ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, p. 312-313, 2013.

YU, X.; LI, X.; JIANG, G.; WANG, X.; CHANG, H. C.; HSU, W. H.; LI, Q. Isradipine prevents rotenone-induced intracellular calcium rise that accelerates senescence in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, v. 246, p. 243-253, 2013.