

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

Bárbara Felin Osmari

**DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PARA
ADMINISTRAÇÃO SUBLINGUAL DO NIFEDIPINO**

Santa Maria, RS
2022

Bárbara Felin Osmari

**DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PARA
ADMINISTRAÇÃO SUBLINGUAL DO NIFEDIPINO**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Leticia Cruz

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Osmari, Bárbara Felin
DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PARA
ADMINISTRAÇÃO SUBLINGUAL DO NIFEDIPINO / Bárbara Felin
Osmari.- 2022.
76 p.; 30 cm

Orientador: Letícia Cruz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2022

1. Nanopartículas 2. Administração sublingual 3.
Nifedipino. 4. Liberação controlada I. Cruz , Letícia II.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(s). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

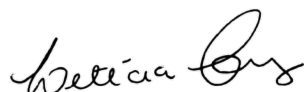
Declaro, BÁRBARA FELIN OSMARI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Bárbara Felin Osmari

**DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PARA
ADMINISTRAÇÃO SUBLINGUAL DO NIFEDIPINO**

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

Aprovado em 14 de março de 2022:



**Leticia Cruz, Dr^a. (UFSM)
(Presidente / Orientadora)**



Andréa Inês Horn Adams, Dr^a. (UFSM)



Ruy Carlos Ruver Beck, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, RS
2022

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo apoio, incentivo e amor do
começo ao fim dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais, Márcia e Josemar, pelo carinho, apoio, suporte e principalmente por não medirem esforços para que eu conseguisse conquistar meus objetivos. Da mesma forma, aos meus irmãos, Matheus e Isabelle, pelo companheirismo e amor.

Ao Bruno pelo amor, carinho, incentivo e por ser meu porto seguro. Também, pela compreensão nos momentos de ausência e estresse.

À minha orientadora professora Letícia, pela oportunidade de fazer parte do LabTec, desde a iniciação científica. Agradeço a confiança no meu trabalho, ensinamentos e o apoio.

À minha querida IC Giovana, pela ajuda e dedicação na execução dos experimentos. Também, pela relação de carinho que construímos, foi essencial para a realização desta dissertação. As alunas de iniciação científica do LabTec, Kauani e Daiane pela ajuda e amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, em especial agradeço a Camila, Charlene, Jéssica, Mailine e Vinicius, pelo convívio e troca de conhecimentos. Pela amizade que construímos, que levarei comigo para sempre.

Agradeço as minhas amigas do coração pela amizade, apoio e por momentos de descontração que tornaram essa jornada mais leve. Em especial, Brenda, Carolina, Janine e Luiza.

Aos colegas do laboratório de Farmacotécnica e Controle de Qualidade pelo coleguismo. Agradeço também a professora Cristiane de Bona da Silva pelo empréstimo do ZetaSizer.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade. À CAPES pelo suporte financeiro, proporcionando melhor desempenho para realização deste trabalho.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PARA ADMINISTRAÇÃO SUBLINGUAL DO NIFEDIPINO

AUTORA: Bárbara Felin Osmari

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Leticia Cruz

O nifedipino é um fármaco bloqueador dos canais de cálcio utilizado na prática clínica no tratamento de doenças cardiovasculares, angina e hipertensão. Entretanto, o nifedipino é fotoinstável, apresenta curta meia-vida biológica, além de apresentar baixa solubilidade aquosa e sofrer intenso metabolismo de primeira passagem, o que compromete a sua biodisponibilidade quando administrado pela via oral. Nesse contexto, o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo nifedipino pode ser uma alternativa interessante a fim de contornar as limitações deste fármaco, tendo em vista as vantagens que estes sistemas apresentam, como a proteção físico-química de ativos, o aumento da interação com tecidos ou células, liberação controlada e direcionada do fármaco melhorando a eficácia e reduzindo efeitos adversos. Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo nifedipino para administração pela via sublingual e avaliar a fotoestabilidade, a cito e genotoxicidade, o potencial de irritação, o perfil de liberação *in vitro* e a permeação *ex vivo* em mucosa sublingual suína. Suspensões de nanocápsulas de Eudragit[®] RS100 e triglicerídeos de cadeia média contendo nifedipino foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. As formulações desenvolvidas apresentaram tamanho de partícula em torno de 170 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,2, potencial zeta positivo e pH ácido. O teor de nifedipino foi de $0,98 \pm 0,03$ mg/mL e a eficiência de encapsulação de 99,9%. O experimento de fotodegradação à luz natural demonstrou que as nanocápsulas foram capazes de promover fotoproteção ao nifedipino quando comparado ao fármaco livre. Com relação às avaliações de toxicidade, as nanocápsulas reduziram a citotoxicidade do nifedipino e não apresentaram efeitos genotóxicos, pelo modelo de *Allium cepa*. Através do teste de HET-CAM, as formulações foram classificadas como não irritantes. O perfil de liberação *in vitro* em sacos de diálise demonstrou que as nanocápsulas controlaram a liberação do nifedipino. O ensaio de permeação *ex vivo* evidenciou que as nanocápsulas auxiliam na permeação do nifedipino através da mucosa sublingual para o meio receptor. Além disso, as nanocápsulas proporcionaram maior retenção do fármaco na mucosa, o que pode ser atribuído à característica catiônica dos nanossistemas. Assim, o desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo nifedipino mostrou que estas podem ser uma plataforma promissora para administração sublingual deste fármaco e podem originar outras formas farmacêuticas de base nanotecnológica.

Palavras-chave: Nanopartículas. Administração sublingual. Nifedipino. Liberação controlada.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NANOCAPSULE SUSPENSIONS FOR SUBLINGUAL ADMINISTRATION OF NIFEDIPINE

AUTHOR: Bárbara Felin Osmari

ADVISOR: Prof^ª. Dr^ª. Leticia Cruz

Nifedipine is a calcium channel blocker drug used in clinical practice in the treatment of cardiovascular diseases, angina and hypertension. However, nifedipine is photo unstable, has a short biological half-life, low aqueous solubility and undergoes intense first pass effect, which compromises its bioavailability when administered orally. In this context, the development of polymeric nanocapsules containing nifedipine may be an interesting alternative to avoid the limitations of this drug viewing the advantages that these systems present, such as the physicochemical protection of actives, increased interaction with tissues or cells, controlled and targeted drug release improved efficacy and reduced adverse effects. Thus, the objective of this work was to develop polymeric nanocapsules containing nifedipine for drug sublingual administration and to evaluate photostability, cyto and genotoxicity, irritation potential, *in vitro* release profile and *ex vivo* permeation in porcine sublingual mucosa. Nanocapsules suspensions of Eudragit[®] RS100 and medium chain triglycerides containing nifedipine and were prepared by the interfacial deposition method of the preformed polymer. The developed formulations showed particle size around 170 nm, polydispersity index below 0.2, positive zeta potential and acid pH. The nifedipine content was 0.98 ± 0.03 mg/mL and encapsulation efficiency of 99.9%. The natural light photodegradation experiment showed that the nanocapsules were able to promote photoprotection nifedipine when compared to the free drug solution. With respect to toxicity assessments the nanocapsules reduced the nifedipine cytotoxicity and showed no genotoxic effects, by the *Allium cepa* model. Through the HET-CAM test, the formulations were classified as non-irritating. The *in vitro* release profile in dialysis bags demonstrated that the nanocapsules controlled the release of nifedipine. The *ex vivo* permeation assay showed that the nanocapsules favored the nifedipine permeation to the receptor compartment. In addition, the nanocapsules provided greater drug retention in the mucosa, which can be attributed to its cationic character. Thus, the development of polymeric nanocapsules suspensions containing nifedipine showed that this system can be a promising platform for sublingual administration of this drug and can lead to the development of other nanobased-dosage forms.

Keywords: Nanoparticles. Sublingual administration. Nifedipine. Controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do nifedipino.....	16
Figura 2 – Ilustração dos produtos de degradação do nifedipino.....	18
Figura 3 – Representação estrutural de nanocápsulas e nanoesferas.....	20
Figura 4 – Estrutura química do polímero Eudragit® RS100.....	22
Figura 5 – Representação ilustrativa dos ensaios de liberação <i>in vitro</i> em sacos de diálise e da permeação <i>ex vivo</i> em células de <i>Franz</i>	23
Figura 6 – Representação da anatomia da região sublingual.....	25
Figura 7 – Cromatogramas do placebo e do padrão contendo nifedipino do método utilizado para teor, eficiência de encapsulação, experimentos de fotoestabilidade e liberação <i>in vitro</i>	40
Figura 8 – Cromatogramas do placebo e do padrão contendo nifedipino do método utilizado para permeação <i>ex vivo</i>	41
Figura 9 – Gráficos de potencial zeta das suspensões de nanocápsulas.....	44
Figura 10 – Gráficos da análise de tamanho por volume das suspensões de nanocápsulas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons	44
Figura 11 – Gráficos da análise de tamanho por intensidade das suspensões de nanocápsulas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons.....	45
Figura 12 – Representação do perfil de distribuição granulométrica por volume das suspensões de nanocápsulas pela técnica de difração a laser	45
Figura 13 - Representação do perfil de distribuição granulométrica por número das suspensões de nanocápsulas pela técnica de difração a laser.....	46
Figura 14 – Teor residual de nifedipino livre ou nanoencapsulado após exposição a luz do dia.....	47
Figura 15 – Índice mitótico (IM%) obtido pelo ensaio de <i>Allium cepa</i>	50

Figura 16 – Aberrações cromossômicas (AC%) obtidas pelo ensaio de <i>Allium cepa</i>	51
Figura 17 – Imagem representativa das células em diferentes fases de mitose (A) e aberrações cromossômicas (B) observadas no ensaio de <i>Allium cepa</i>	52
Figura 18 – Imagens da membrana cório-alantóide (MCA) antes e após exposição às formulações.....	53
Figura 19 – Representação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do nifedipino livre e nanoencapsulado.....	54
Figura 20 - Perfil de permeação em mucosa sublingual suína expressos em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	56
Figura 21 – Quantidade de nifedipino retido na mucosa sublingual suína, dados expressos em $\mu\text{g}/\text{g}$	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos relacionando o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para aplicação sublingual.....	28
Tabela 2 – Caracterização das suspensões de nanocápsulas desenvolvidas.....	43
Tabela 3 – Coeficiente de correlação (r), constante de degradação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos a partir da regressão linear dos dados de fotodegradação do nifedipino.....	48
Tabela 4 – Total de células aberrantes e índice de aberrações cromossômicas (AC%) obtidos pelo ensaio de <i>Allium Cepa</i>	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 NIFEDIPINO.....	16
3.2 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS.....	19
3.3 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS PARA ADMINISTRAÇÃO SUBLINGUAL DE FÁRMACOS.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAIS.....	30
4.1.1 Matérias primas.....	30
4.1.2 Solventes.....	30
4.1.3 Equipamentos e outro materiais.....	30
4.2 MÉTODOS.....	32
4.2.1 Procedimentos analíticos.....	32
4.2.2 Teste de solubilidade do nifedipino no óleo.....	33
4.2.3 Preparo das suspensões de nanocápsulas.....	34
4.2.4 Caracterização das suspensões de nanocápsulas.....	34
4.2.5 Avaliação da fotoestabilidade.....	35
4.2.6 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade em modelo de <i>Allium cepa</i>	36
4.2.7 Avaliação do potencial de irritação em membrana córneo-alantóide (HET-CAM)	37
4.2.8 Perfil de liberação <i>in vitro</i> do nifedipino a partir das suspensões de nanocápsulas...	38

4.2.9 Perfil de permeação <i>ex vivo</i> do nifedipino a partir das suspensões de nanocápsulas.	39
4.2.10 Análises estatísticas.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	40
5.2 TESTE DE SOLUBILIDADE DO NIFEDIPINO NO ÓLEO.....	42
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS.....	42
5.4 AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE.....	46
5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM MODELO DE <i>ALLIUM CEPA</i>	49
5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO EM MEMBRANA CÓRIO-ALANTÓIDE (HET-CAM)	52
5.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO NIFEDIPINO A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS.....	53
5.8 PERFIL DE PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> DO NIFEDIPINO A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS.....	55
6 CONCLUSÕES.....	58
7 PERSPECTIVAS.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O nifedipino é um fármaco classificado como bloqueador dos canais de cálcio, frequentemente utilizado na prática clínica para prevenção de doenças cardiovasculares, angina e hipertensão (ODANI et al., 2019). Comercialmente, encontra-se na forma de cápsulas e comprimidos para administração por via oral. Entretanto, sua elevada lipofilia e a ocorrência de metabolismo de primeira passagem no fígado ocasionam limitada biodisponibilidade oral, em torno de 45% da dose administrada. Além disso, apresenta meia-vida biológica curta, resultando em administrações diárias frequentes. Outra limitação do nifedipino é a sua elevada instabilidade frente a luz, podendo levar à degradação do fármaco e à ineficácia do tratamento (FILGUEIRA et al., 2017; GRANADA et al., 2013).

Ao longo dos anos a nanotecnologia vem ganhando destaque na área farmacêutica, pois como sistemas nanocarreadores são reconhecidos por suas capacidades de melhorar o desempenho de fármacos (DENG et al., 2020). Dentre tais sistemas, as nanocápsulas poliméricas são dispositivos vesiculares compostos por um núcleo oleoso envolto por um invólucro polimérico e possuem vantagens como aumentar a estabilidade físico-química de fármacos, aumentar a interação com tecidos ou células, promover uma liberação controlada e direcionada do fármaco, melhorando a eficácia e reduzindo efeitos adversos (FRANK et al., 2015; ZIELINSKA et al., 2020).

Os polímeros são os principais componentes das nanocápsulas, pois estes influenciam na carga superficial das partículas, além de serem capazes de controlar a liberação do fármaco (ZIELINSKA et al., 2020). Dentre os polímeros, o Eudragit® RS100 é um copolímero biocompatível que confere característica catiônica às nanopartículas, levando a obtenção de sistemas mucoadesivos através da interação eletrostática com a superfície da mucosa que é carregada negativamente (CHAVES et al., 2018). Diferentes tipos de óleos são utilizados para compor as nanocápsulas, entre eles, os triglicerídeos de cadeia média (TCM) (ABBAS et al., 2015; PRADO et al., 2021). Em nosso grupo de pesquisa foram desenvolvidas nanocápsulas poliméricas de Eudragit® RS100 e TCM e estas foram capazes de proteger o clotrimazol da fotodegradação, além de serem capazes de prolongar a liberação do ativo (SANTOS et al., 2013).

Trabalhos encontrados na literatura relatam o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados promissores contendo nifedipino, pois aumentaram a biodisponibilidade e a

dissolução do fármaco, além de demonstrarem perfil de liberação controlada, aumentando o tempo de meia-vida do nifedipino. Estudos também evidenciaram que nanossistemas forneceram efeito de fotoproteção ao nifedipino (BI et al., 2020; TAGLIARI et al., 2015; WEERAPOL et al., 2014).

A administração sublingual pode favorecer a biodisponibilidade de fármacos que sofrem metabolismo de primeira passagem, como é o caso do nifedipino, no entanto, devido ao seu curto tempo de meia-vida, que leva a uma maior frequência de administração quando o fármaco é usado cronicamente, é desejável uma formulação que proporcione liberação controlada. Assim, o desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas poliméricas para administração sublingual do nifedipino é relevante e inédito. Cabe ressaltar que a abordagem selecionada visou a obtenção de partículas com polímero catiônico com potencial mucoadesivo para aumentar o tempo de permanência do fármaco no local de aplicação, visto que a região sublingual é amplamente exposta ao fluxo salivar e que parte do fármaco pode ser deglutido (MASEK et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo nifedipino para administração pela via sublingual.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar as suspensões de nanocápsulas contendo nifedipino utilizando Eudragit[®] RS100 como polímero e triglicerídeos de cadeia média como núcleo oleoso;
- Caracterizar as formulações quanto ao pH, teor de nifedipino, eficiência de encapsulação, tamanho de partículas e potencial zeta;
- Avaliar a fotoestabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo nifedipino;
- Determinar a segurança das formulações quanto a cito e genotoxicidade;
- Avaliar o potencial de irritação das suspensões de nanocápsulas;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do nifedipino a partir das suspensões de nanocápsulas;
- Estudar a permeação *ex vivo* do nifedipino a partir das suspensões de nanocápsulas em mucosa sublingual suína.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 NIFEDIPINO

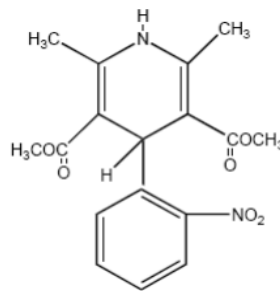
O nifedipino é um fármaco bloqueador dos canais de cálcio, do subgrupo dihidropiridinas, utilizado na prática clínica na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, angina e hipertensão (MANCIA et al., 2007; ODANI et al., 2019; TOAL; MEREDITH; ELLIOTT, 2012). Farmacologicamente, atua inibindo seletivamente o influxo de íons de cálcio nas células do músculo liso vascular e cardíaco, influenciando na contratilidade. No coração, dilata as artérias coronárias em regiões normais e isquêmicas sendo considerado um inibidor de espasmo da artéria coronária. Assim, ocorre o aumento do fluxo de sangue coronariano pós-estenótico, bem como o fornecimento de oxigênio ao miocárdio, reduzindo a resistência periférica total e a necessidade de oxigênio (PARODI, 2005; PONTREMOLI; LEONCINI; KIRIYAMA et al., 2016).

Listado como medicamento essencial pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2021), o composto éster dimetílico do ácido 1,4-diidro-2,6-dimetilpino -4-(2- nitrofenil)-3,5-piridinocarboxílico, conhecido como nifedipino (Figura 1), apresenta pKa de 5,3 e peso molecular de 346,3 g/mol, sendo um composto lipofílico, com um coeficiente de partição (log P) de 2,2 (JANNIN et al., 2015). Pertence à Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, que caracteriza fármacos com baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade intestinal (BAGHEL; CATHCART; REILLY, 2016).

No mercado mundial, o nifedipino é encontrado sob forma de comprimidos de liberação retardada e cápsulas de liberação imediata. A dose e a frequência de administração variam para cada tipo de formulação, sendo que comprimidos de liberação modificada podem ser administrados uma ou duas vezes/dia, com dose máxima de 60 mg/dia, enquanto cápsulas de liberação imediata são prescritas em doses de 5 a 10 mg três vezes ao dia (MANTAS; MIHRANYAN, 2019; TOAL, 2004). Devido à meia-vida biológica curta (2 a 4 horas) do nifedipino, torna-se interessante o desenvolvimento de formulações de liberação controlada a fim de prolongar o efeito anti-hipertensivo e reduzir a frequência de administrações diárias. Nesse sentido, já são comercializados comprimidos bomba osmótica de liberação prolongada do nifedipino, representado comercialmente pelo Adalat[®] Oros, que possui um controle osmótico no sistema de liberação de fármacos, com diferentes mecanismos para obtenção

adequada da dissolução do medicamento (BAYER, 2016; GRANADA et al., 2013; HUANG et al., 2006). Apesar das vantagens, esses sistemas apresentam elevado custo de produção, além de ser uma técnica limitada para aplicação com substâncias ativas pouco solúveis em água (HAZNAR-GARBACZ et al., 2018).

Figura 1 – Estrutura molecular do nifedipino



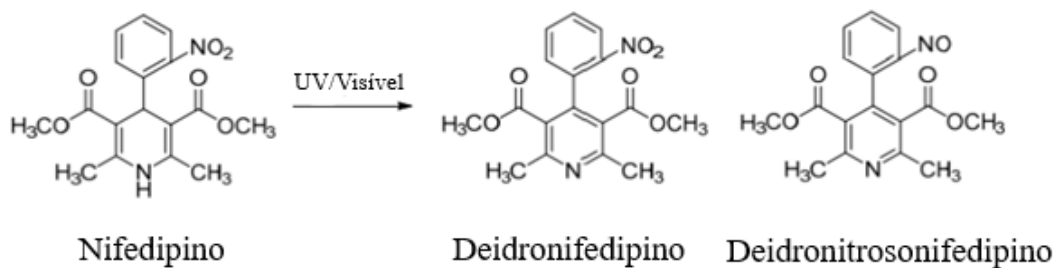
Fonte: Adaptado de BALTAZAR, 2013.

Além disso, a utilização de formas de liberação imediata do nifedipino reduziu após relatos de efeitos adversos graves como hipotensão, infarto do miocárdio, arritmias e acidente vascular cerebral (EL-MASRY; EL-KHODARY, 2020). Existem diferentes mecanismos para a ocorrência desses eventos, entre eles o “fenômeno de roubo” no qual, leitos vasculares coronários que não foram afetados pela aterosclerose, provavelmente dilatam e desviam o sangue dos ramos sanguíneos afetados, o que levaria menos oxigênio ao coração ocasionando isquemia miocárdica. Também, é possível que haja uma liberação excessiva de catecolaminas, devido à rápida vasodilatação periférica, o que pode levar a arritmias cardíacas. Além disso, acidentes vasculares cerebrais podem ocorrer com a redução abrupta da pressão arterial (MEANS et al., 2016). Nesse sentido, formulações de liberação sustentada do nifedipino podem ser promissoras a fim de reduzir seus efeitos adversos indesejáveis (GAO et al., 2019; GRANADA et al., 2013; PAWAR et al., 2012).

O nifedipino apresenta biodisponibilidade comprometida (aproximadamente 45%), especialmente em formas de administração oral, devido à baixa solubilidade e ao intenso metabolismo de primeira passagem no fígado (BORDALLO; TORNEIRO; LAZZARI, 2020; FILGUEIRA et al., 2017). Outra limitação do nifedipino relatada na literatura é a fotossensibilidade (AHMMED et al., 2017; FUJIMOTO et al., 2016; GROOFF et al., 2013). Estudos afirmam que a degradação deste fármaco ocorre sob luz ultravioleta-visível (400-600

nm) e radiação ultravioleta, especialmente a radiação UVA (320-400 nm), sendo esta a responsável por 95% da radiação UV solar que atinge a superfície terrestre (BARANDA et al., 2006; BREM; GUVEN; KARRAN, 2017; DURAN et al., 2015; MAAFI; MAAFI, 2013). Os produtos da fotodegradação do nifedipino estão ilustrados na Figura 2, onde o deidronitrosnifedipino é resultante da exposição à luz ultravioleta-visível, e a formação do deidronifedipino ocorre através da oxidação por luz ultravioleta. Ambos os produtos de fotodegradação do nifedipino são considerados farmacologicamente inertes (ALI, 1989; HAYASE et al., 1994; WASAN et al., 2019).

Figura 2- Produtos de degradação do nifedipino



Fonte: Adaptado de WASAN et al., 2019.

Embora o nifedipino seja amplamente prescrito na clínica, apesar das limitações relatadas, alguns trabalhos relatam o desenvolvimento de formulações de liberação modificada para melhorar o seu efeito terapêutico. Weerapol e colaboradores (2014) desenvolveram um sistema de entrega de fármacos auto-nanoemulsionante, utilizando como fármaco modelo o nifedipino, e a formulação demonstrou aumentar a biodisponibilidade oral em ratos em relação ao pó de nifedipino. Além disso, foi observado que em 60 minutos o nanossistema forneceu dissolução do nifedipino superior à 80%, enquanto a dissolução do pó livre foi inferior a 20%. Assim, foi possível concluir neste estudo que as formulações nanoestruturadas melhoraram a biodisponibilidade oral e o perfil de dissolução do nifedipino.

Mais recentemente, Bi e colaboradores (2020) desenvolveram prolipossomas a fim de melhorar a biodisponibilidade oral do nifedipino. O teste de liberação *in vitro* evidenciou uma menor liberação do nifedipino quando incorporado aos prolipossomas devido ao efeito de

liberação controlada destas formulações. Além disso, com base nos resultados farmacocinéticos (aumento de 3,76 vezes da C_{max} e 10,09 vezes da área sob a curva) concluiu-se que os prolipossomas aumentaram a biodisponibilidade do nifedipino. Isso pode ser explicado através do perfil de liberação controlada, que reduz as flutuações plasmáticas e aumenta a biodisponibilidade oral do fármaco. Também, foi observado que os prolipossomas aumentaram o tempo de meia-vida de eliminação do nifedipino de 1,57 horas para 6,61 horas.

No estudo de Chinh e colaboradores (2018) nanopartículas de ácido poliático (PLA)/quitosana contendo nifedipino foram desenvolvidas. Os resultados *in vivo* demonstraram que os nanossistemas foram capazes de controlar melhor a pressão arterial e por maior tempo. Além disso, a pressão arterial do grupo tratado com os nanossistemas foi menor que o grupo tratado com nifedipino livre. Os autores observaram também uma redução na frequência cardíaca dos camundongos tratados com as nanopartículas.

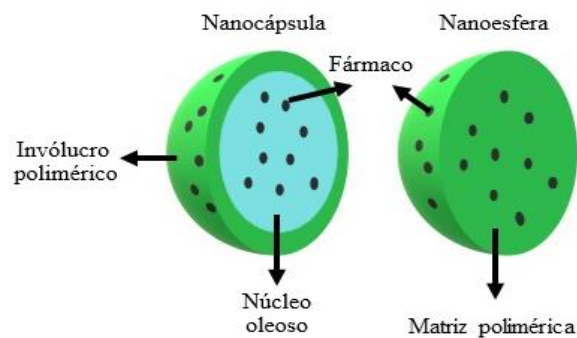
Granada e colaboradores (2013) desenvolveram nanocápsulas poliméricas contendo nifedipino utilizando diferentes polímeros, acetato de polivinila (PVA) e pluronic F68 (PF68), e observaram para ambas as formulações uma liberação de 70% do fármaco em 4 dias, característico de liberação controlada. Logo após, Tagliari e colaboradores (2015) avaliaram a estabilidade físico-química e o efeito anti-hipertensivo *in vivo* destas suspensões de nanocápsulas e observaram que as nanoestruturas protegem significativamente o nifedipino frente à degradação por irradiação da luz do dia, devido as camadas poliméricas atuarem como um filtro que protegem o fármaco da luz. Além disso, os estudos *in vivo* mostraram que a formulação estabilizada com PVA apresentou início de ação em 15 minutos, enquanto para o nifedipino livre foi observado o começo da redução da pressão arterial em 1 hora após a administração intragástrica. Os estudos *in vivo* também sugerem que as nanocápsulas são sistemas potenciais para aprimorar as propriedades biofarmacêuticas do nifedipino.

3.2 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

O interesse de pesquisadores e da indústria farmacêutica pela nanotecnologia vem crescendo devido às suas vantagens frente às formulações convencionais. Diversos medicamentos nanotecnológicos foram introduzidos no mercado visando o tratamento de diferentes patologias, dentre elas o câncer, doenças do sistema nervoso central, doenças

cardiovasculares e doenças infecciosas (AL-NEMRAWI; ABUALSAMEN; ALZOUBI, 2020). Nanopartículas são sistemas coloidais com tamanho entre 10 e 1000 nm, sendo que o termo nanopartícula polimérica engloba tanto nanoesferas quanto nanocápsulas (Figura 3), as quais diferem entre si pela organização estrutural. As nanoesferas são sistemas constituídos por uma rede polimérica contínua, e o fármaco pode estar retido dentro e/ou adsorvido à superfície. Já as nanocápsulas são compostas por um núcleo oleoso envolto por um invólucro polimérico, sendo que o fármaco pode estar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido ao polímero (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SOPPIMATH et al., 2001; ZIELINSKA et al., 2020). Dentre as vantagens desses nanocarreadores, destacam-se o aumento da estabilidade físico-química, solubilidade, tempo de meia-vida e biodisponibilidade de fármacos, melhora a biodistribuição e o direcionamento para tecidos/células alvos, redução de interações indesejáveis e de efeitos adversos, além de modular a liberação de fármacos (DAUDT et al., 2013; SÁNCHEZ; MEJÍA; OROZCO, 2020).

Figura 3- Imagem representativa de nanocápsulas e nanoesfera



Fonte: Próprio autor.

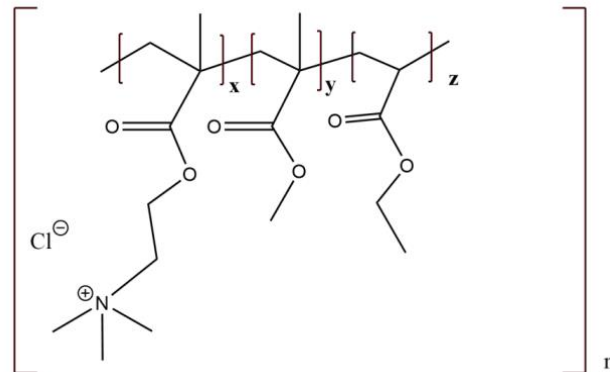
As nanocápsulas poliméricas de um modo geral se destacam frente às formulações convencionais, pois sua estrutura “*core-shell*” promove uma liberação controlada do ativo e evita o contato direto da substância com o tecido/célula, promovendo a redução de efeitos adversos (FRANK et al., 2015). Ainda, a organização estrutural das nanocápsulas fornece

capacidade de proteção para ativos susceptíveis à fotodegração (GEHRCKE et al., 2018; MATTIAZZI et al., 2019). Além disso, as nanocápsulas poliméricas já demonstraram aumentar significativamente a biodisponibilidade de fármacos, e conseqüentemente sua eficácia (KHATTAB; EL-DEIN; EL-GIZAWY, 2020). Outra vantagem destes nanossistemas é a sua elevada capacidade de veicular substâncias hidrofóbicas, com base na solubilidade aprimorada do fármaco no núcleo oleoso das nanocápsulas (GAO et al., 2020).

Para o desenvolvimento das nanocápsulas é necessário realizar a escolha dos constituintes que compõem estes sistemas. A escolha do óleo é de extrema importância, considerando que ele pode influenciar na solubilização da substância ativa, na estabilidade das formulações, além de controlar a liberação de fármacos (CONTRI et al., 2013). Triglicerídeos de cadeia média (TCM) são comumente utilizados para compor o núcleo oleoso das nanocápsulas (GEHRCKE et al., 2017; ROSA et al., 2019; SARI et al., 2018). Este óleo se destaca pela capacidade de solubilizar diferentes fármacos, por ser biocompatível além de ser compatível com diversos polímeros (ENGLERT et al., 2020; MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2010; SANTOS et al., 2013).

Dentre os polímeros os polimetacrilatos (Eudragit[®]) englobam uma série de copolímeros biocompatíveis e apesar de não serem biodegradáveis, trabalhos evidenciam a utilização desse biomaterial em nanopartículas para diferentes vias de administração (SEREMETA; CHIAPPETTA; SOSNIK, 2013). O Eudragit[®] RS100 (Figura 4) é um subtipo desse polímero, com peso molecular de 3200 g/mol e contém 4,5 a 6,8% de grupos amônio quaternário. Tais grupos fornecem caráter catiônico ao polímero, favorecendo a interação eletrostática com membranas biológicas que são carregadas negativamente, obtendo partículas bio/mucoadesivas. Essa propriedade favorece a permanência das formulações no local de aplicação pretendido, aumentando a eficácia e a adesão ao tratamento (CHAVES et al., 2017; KATARA; SACHDEVA; MAJUMDAR, 2019; OSMARI et al., 2020). Além disso, o Eudragit[®] RS100 é insolúvel em pH fisiológico, apesar de apresentar características hidrofílicas que fazem com que ele inche. Nesse sentido, pode haver uma maior captação celular da estrutura fármaco-polímero. Assim, o Eudragit[®] RS100 fornece uma entrega localizada, controlada e prolongada de substâncias nos fluídos fisiológicos (ADIBKIA et al., 2011; JANA et al., 2014). Trabalho encontrados na literatura utilizam o Eudragit[®] RS100 para obtenção de nanocápsulas poliméricas visando a administração de substâncias por diferentes vias de aplicação (CERVI et al., 2021; CHAVES et al., 2017; GEHRCKE et al., 2018; KATZER et al., 2014; OSMARI et al., 2020).

Figura 4 - Estrutura química do Eudragit® RS100



Fonte: Adaptado de DALCIN; OURIQUE; GOMES, 2017.

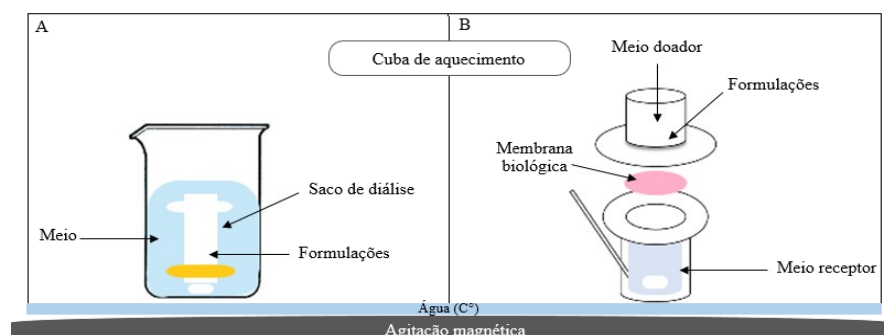
As principais técnicas de preparo das nanocápsulas poliméricas são a polimerização interfacial, polimerização *in situ*, deposição interfacial do polímero pré-formado, emulsificação-difusão e emulsificação-evaporação do solvente (DIMER et al., 2013; SOLANKI; KITAWAT; DASHORA, 2017). O método de deposição interfacial do polímero pré-formado será abordado neste trabalho e é o método mais utilizado na preparação de nanocápsulas poliméricas, devido à fácil execução, aplicabilidade a diversas matérias-primas e à baixa energia necessária para a obtenção dos nanossistemas com tamanho adequado (POHLMANN et al., 2016). Basicamente, uma fase orgânica, composta por polímero, óleo, tensoativo lipofílico, fármaco e solvente orgânico miscível em água é vertida em uma fase aquosa composta por água e um tensoativo hidrofílico (GEHRCKE et al., 2017; FESSI et al., 1989). Na sequência, a rápida difusão do solvente orgânico promove a precipitação do polímero na interface água/solvente orgânico, obtendo-se as suspensões de nanocápsulas (JAHANGIRI; BARGHI, 2018).

É de extrema importância avaliar as características físico-químicas das nanocápsulas. Dentre as análises, o tamanho médio de partícula representa uma avaliação essencial pois, influencia na biodistribuição e depuração sanguínea dos nanossistemas. Além disso, mudanças no tamanho das partículas ao longo do tempo podem ser indicativo de agregação ou sedimentação (CRECENTE-CAMPO et al., 2019; SCHAFFAZICK et al., 2003). A determinação do potencial zeta fornece informações sobre o caráter da carga superficial das nanoestruturas, além de ser um indicativo de estabilidade das formulações (HONARY; ZAHIR,

2013). A avaliação do pH das nanocápsulas poliméricas é importante a fim de determinar a compatibilidade dos nanossistemas com a via de aplicação pretendida, além de ser um fator determinante para avaliar a estabilidade de substâncias (DE LIMA et al., 2017; OSMARI et al., 2020). O teor de fármaco é geralmente determinado por cromatografia líquida de alta eficiência e deve ser verificado a fim de garantir que não houve perda/degradação da substância durante o preparo das nanocápsulas poliméricas (MICHELS et al., 2019; PEGORARO et al., 2018). A eficiência de encapsulação determina a porcentagem de fármaco encapsulado em relação ao total de fármaco adicionado na formulação, sendo um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento de nanossistemas, pois está diretamente relacionada com o desempenho da formulação em relação ao ativo encapsulado (APOLINÁRIO et al., 2020; ONG et al., 2016).

Após o desenvolvimento das nanoestruturas, é importante verificar se os nanossistemas serão capazes de liberar o ativo para a ocorrência do efeito desejado. Assim, o perfil de liberação *in vitro* de fármacos através das nanocápsulas poliméricas é uma das avaliações mais estudadas. Através desses dados é possível obter informações de controle de qualidade para sistemas de liberação de fármacos, além de ser uma técnica importante para determinar a correlação biológica esperada em métodos *in vivo* (DE ANDRADE et al., 2015). Difusão em sacos de diálise (Figura 5-A) é o método frequentemente utilizado para avaliar o perfil de liberação de fármacos a partir de nanossistemas. Tecnicamente, a formulação é colocada dentro do saco de diálise (compartimento doador), em seguida o fármaco irá permear através da membrana para atingir a solução fora do saco de diálise (compartimento receptor). Alíquotas do meio receptor são obtidas a fim de determinar a quantidade de fármaco liberada (D'SOUZA, 2014; YU et al., 2019).

Figura 5 - Imagem representativa da liberação em saco de diálise (A) e da permeação em células de Franz (B)



Fonte: Próprio autor.

Outra avaliação importante no desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas é o estudo de permeação, especialmente para fármacos que é necessário permear a membrana biológica para atingir a circulação sanguínea. Células de difusão do tipo *Franz* é o aparato comumente relatado para avaliação de permeação de ativos (CARDOSO et al., 2017; CHAVES et al., 2017; ESTEVES et al., 2021). Esse sistema é composto por um meio doador e um meio receptor e entre os meios é acoplada a membrana biológica, podendo ser humana, animal ou sintética (CHANDRA et al., 2018; FILON et al., 2016). A solução que compõe o meio receptor é preferencialmente composta por um fluido (geralmente tampão) que mimetize as condições fisiológicas da via de administração pretendida, permanecendo sob agitação magnética. Alíquotas do meio são coletadas a fim de verificar se o ativo permeou através da membrana (CHAVES et al., 2017; CHITTASUPHO et al., 2020). Na Figura 5-B consta a representação ilustrativa da célula de *Franz*.

Visando garantir a segurança da administração desses nanossistemas, é de grande importância avaliar o perfil toxicológico das formulações desenvolvidas. O modelo de *Allium cepa* foi padronizado por Fiskejö (1985) e é um ensaio eficaz, econômico e de elevada reprodutibilidade (MANGALAMPALLI; DUMALA; GROVER, 2018; NAWALAGE; PATHIRATNE, 2020). É um modelo vegetal que determina os efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade de agentes químicos através da observação de alterações na atividade mitótica e anormalidade cromossômicas das células meristemáticas obtidas das raízes deste vegetal (CASILLAS-FIGUEROA et al., 2020; GHOSH et al., 2016). Grillo e colaboradores (2012) desenvolveram nanocápsulas poliméricas contendo diferentes herbicidas e observaram resultados semelhantes ao controle negativo para os eventos de cito e genotoxicidade em modelo de *Allium cepa*.

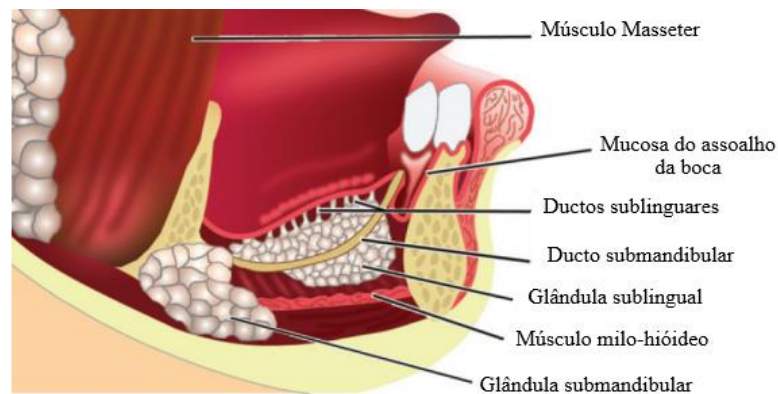
Outro modelo alternativo para avaliação do potencial irritativo comumente utilizado é o ensaio da membrana cório-alantóide (HET-CAM), introduzido por Luepke (1985), e é aceito como uma alternativa ao teste de Draize em coelhos (RIBATTI, 2016). O objetivo desse teste é visualizar reações irritantes como lise, hemorragia e coagulação na membrana cório-alantóide de ovos de galinha fertilizados no décimo dia de desenvolvimento embrionário, considerando que nesse período o sistema nervoso central ainda não está completamente desenvolvido, não havendo percepção de dor (PRADO et al., 2021; RIVERO et al., 2021). Em testes *in vivo* utilizados para avaliações de irritações em mucosas é documentado o surgimento de alterações vasculares, nesse contexto justifica-se a escolha do HET-CAM para avaliar o potencial de irritação em mucosa sublingual, considerando que este possibilita observar fenômenos

vasculares na membrana cório-alantóide (CORRADO, 2007). Trabalhos do nosso grupo de pesquisa utilizaram o HET-CAM para avaliar o potencial de irritação de nanocápsulas poliméricas (ENGLERT et al., 2021; GEHRCKE et al., 2020; OSMARI et al., 2020; PRADO et al., 2021).

3.3 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS PARA ADMINISTRAÇÃO SUBLINGUAL DE FÁRMACOS

A região sublingual compreende a superfície ventral da língua e o assoalho da boca (GOSWAMI; JASTI; LI, 2008). Com configuração triangular, estende-se da face interna da margem alveolar da mandíbula com sua base voltada para a língua. É envolta por mucosa bucal lisa e rosada, podendo ser visualizadas as vênulas raninas. A mucosa é uma membrana composta por uma camada epitelial coberta por muco, que é formado por lipídeos, glicoproteínas e sais inorgânicos suspensos em água. A mucina é a glicoproteína responsável pela adesividade da mucosa, sendo o principal componente dessa estrutura (CHAVES et al., 2018). As glândulas sublinguais são as menores glândulas salivares, localizadas no terço anterior da parte lateral do soalho da boca, abaixo da mucosa (SOUZA; JUNIOR; VOLPATO, 2003). A Figura 6 é uma representação ilustrativa da organização anatômica da via sublingual.

Figura 6 - Imagem representativa da anatomia da região sublingual



Fonte: Adaptado de LA'PORTE; JUTTLA; LINGAM, 2011.

A via sublingual é considerada uma eficiente alternativa para administração de fármacos com vantagens sobre as outras formas de administração (MORSI et al., 2017). A anatomia da mucosa é provida de epitélio escamoso não-queratinizado de espessura relativamente fina (HUA, 2019). O epitélio queratinizado é considerado uma barreira eficaz a passagem de substâncias pois, na sua composição contém proteínas reticuladas insolúveis, tornando o epitélio queratinizado seco e impermeável à água (SHETTY; GOKUL, 2012). Nesse contexto, a associação da fina espessura do epitélio e a não-queratinização fornece à mucosa sublingual maior permeabilidade, permitindo absorção mais rápida do fármaco. Além disso, a região sublingual é bastante vascularizada, com um rico suprimento de vasos sanguíneos que permite que o fármaco vá diretamente para a corrente sanguínea, favorecendo a rápida absorção e contornando o metabolismo de primeira passagem pelo fígado (WANG; CHOW, 2014). Outra característica interessante da região sublingual, é o pH da boca ser relativamente neutro (pH 6,8) quando comparado ao pH de outros tecidos biológicos do trato gastrointestinal. Essa propriedade pode favorecer a estabilidade dos fármacos. Além disso, na região sublingual a saliva não apresenta elevada permanência, ocasionando menor contato do fármaco com mucina e enzimas salivares (HUA et al., 2019). A via sublingual oferece ainda a facilidade de administração para pacientes com dificuldades de deglutição, além de não ser invasiva (ILLANGAKOON et al., 2014).

Solari e colaboradores (2017) avaliaram a viabilidade da administração sublingual e compararam com a administração oral do imunossupressor tacrolimus. Considerando que o tacrolimus é amplamente metabolizado no fígado e no intestino delgado resultando em baixa biodisponibilidade (15%), se faz necessário administrar doses excessivamente altas para atingir o efeito desejado. Os resultados obtidos revelaram uma redução de 37% na dose quando administrados por via sublingual, sugerindo melhor absorção do fármaco, e provavelmente contornando o metabolismo de primeira passagem. No estudo de Lai e colaboradores (2018) foram desenvolvidos filmes para administração bucal/sublingual do ropinirol, um fármaco utilizado no tratamento de Parkinson o qual sofre extenso metabolismo de primeira passagem, possui curta meia-vida biológica e formas farmacêuticas de dosagem oral sólida podem ser desafiadoras para pacientes que sofrem de tremores, rigidez e mobilidade reduzida, ademais a absorção do ropinirol é limitada. Estudos farmacocinéticos realizados *in vivo* em coelhos evidenciaram que o ropinirol foi detectado em 15 minutos no plasma, indicando rápida absorção sistêmica do fármaco. Além disso, a biodisponibilidade por administração bucal/sublingual aumentou cerca de 7 vezes em relação à administração oral do medicamento.

A administração de fármacos por via sublingual é muito explorada quando há condições patológicas que necessitam de ação rápida, porém formulações de liberação prolongada também podem ser administradas através desta via (MASEK et al., 2017). O uso do nifedipino em formulações de curta duração por via sublingual pode ocasionar de efeitos adversos graves (SINGH et al., 2012). Nesse contexto, o nifedipino é um fármaco cardiovascular candidato a incorporação em formulações de liberação prolongada para administração sublingual, a fim de melhorar sua biodisponibilidade e contornar efeitos indesejáveis.

Ao desenvolver formas farmacêuticas destinadas a aplicação sublingual devem ser consideradas algumas características específicas, sendo o tempo de desintegração e de dissolução as mais relevantes (AODAH et al., 2017). Assim, diversas formas farmacêuticas vêm sendo empregada para administração sublingual de medicamentos como comprimidos (CHAVES et al., 2020; MINKOWITZ et al., 2017), filmes (HABIB et al., 2021; LAI et al., 2018) e sprays (ALBERTS et al., 2016; RAUCK et al., 2018). Além disso, a cavidade oral está continuamente exposta ao fluxo salivar, e parte do fármaco pode ser deglutido antes que ocorra sua absorção (ILLANGAKOON et al., 2014; PATEL; LIU; BROWN, 2011). Nesse sentido, o desenvolvimento de nanossistemas com propriedades mucoadesivas para administração sublingual torna-se interessante, a fim de aumentar o tempo de permanência da formulação no local de aplicação, melhorando a absorção e a biodisponibilidade de fármacos (MAZZARINO et al., 2014; PARODI et al., 2017).

Nanoformulações são capazes de permear mais rápida e profundamente no epitélio da membrana basal no tecido conjuntivo subjacente da mucosa oral, e o tamanho reduzido dos nanossistemas favorece seu aprisionamento e imobilização na rede do muco (HOLPUCH et al., 2010; HUA et al., 2019; TEUBL et al., 2013). Além disso, Roblegg e colaboradores (2012) avaliaram a permeabilidade de nanossistemas em mucosa bucal suína. As formulações catiônicas permearam a camada de muco e penetraram em regiões mais profundas do tecido epitelial da mucosa enquanto partículas carregadas negativamente interagiram com o muco, formaram aglomerados e não penetraram no tecido epitelial. Conforme abordado na tabela 1, atualmente diferentes estudos têm desenvolvido nanossistemas contendo substâncias para aplicação sublingual.

Tabela 1- Estudos que demonstram o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para aplicação sublingual

Nanossistema	Ativo	Performance	Referência
NPs de alginato	Insulina	Elevada disponibilidade farmacológica e aumento da biodisponibilidade	PATIL; DEVARAJAN, 2016
NPs de hidroxiapatita	Calcitonina de salmão	Permeação mais profunda na mucosa sublingual, melhora nos biomarcadores séricos com aumento de massa óssea	KOTAK; DEVARAJAN, 2020
NC de PCL e Eudragit® RS100	Carvedilol	Propriedades mucoadesivas, liberação controlada e capacidade de permeação na mucosa	CHAVES et al., 2017
Lipossoma	Alfa-galactosilceramida	Aumento da eficácia terapêutica	SUZUKI et al., 2019
NE	Astaxantina	Capacidade de permeação na mucosa e aumento da biodisponibilidade	FRATTER; BIAGI; CICERO, 2019
NPs de PLGA	Curcumina	Melhor efeito modulador no tratamento de rinite	SHAHGORDI et al., 2020
NPs revestidas de ouro	Ovalbumina	Redução da inflamação e infiltração celular, melhorando as respostas imunomoduladoras	SADEGHI et al., 2020

NPs: nanopartículas; PLGA: poli (D,L-lactídeo-co-glicolídeo); PCL: poli-ε-caprolactona; NE: nanoemulsão

Chaves e colaboradores (2017) prepararam nanocápsulas poliméricas de poli-ε-caprolactona (PCL) e Eudragit® RS100 contendo carvedilol como fármaco modelo para

administração sublingual. As nanocápsulas preparadas com o polímero Eudragit[®] RS100 apresentaram maior capacidade mucoadesiva quando comparada as suspensões de PCL, o que foi atribuído à interação eletrostática entre a mucosa e o polímero catiônico Eudragit[®] RS100. Além disso, ambas formulações demonstraram liberação *in vitro* do carvedilol mais lenta que o fármaco em solução e esse resultado foi semelhante ao estudo de permeação *ex vivo* em mucosa sublingual suína. As formulações de nanocápsulas de Eudragit[®] RS100 foram selecionadas para dar segmento aos estudos. Nesse contexto, foi avaliado a influência da nanoencapsulação em monocamada de células SCC4, como modelo alternativo de barreira sublingual. Foi observado que o carvedilol nanoencapsulado permeou de forma controlada pela monocamada de células SCC4, resultado semelhante à permeação em mucosa suína e proporcionado pela característica de liberação controlada das nanocápsulas. Ainda, as suspensões de nanocápsulas não causaram efeitos citotóxicos em células SCC4 (CHAVES et al., 2019). Posteriormente, as nanocápsulas foram incorporadas em comprimidos sublinguais, os quais foram capazes de controlar a liberação do carvedilol evidenciando a manutenção do efeito de liberação controlada das nanocápsulas (CHAVES et al., 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas

- Nifedipino: Infinity Pharma[®], Brasil;
- Triglicerídeos de cadeia média (TCM): Fagron, Brasil;
- Eudragit[®] RS100: Röhm Pharma, Alemanha;
- Polissorbato 80 (Tween[®]80): Infinity Pharma[®], Brasil;
- Monooleato de sorbitano (Span[®] 80): Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América;
- Polietilenoglicol (PEG 400): Labimpex, Brasil.

4.1.2 Solventes

- Acetona P. A.: CQR, Brasil;
- Dimetilsulfóxido (DMSO): Vetec, Brasil;
- Metanol grau HPLC: Dinâmica, Brasil;
- Acetonitrila grau HPLC: Dinâmica, Brasil;
- Acetonitrila grau HPLC: LiChrosolv, Alemanha;
- Ácido acético glacial: Vetec, Brasil.

4.1.3 Equipamentos e outros materiais

- Agitador magnético: Tecnal, Brasil;
- Balança analítica: Shimadzu, Japão;
- Células de difusão vertical de Franz: Vidrotec, Brasil;
- Coluna Brownlee Validated C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5µm);
- Evaporador rotatório Fisatom: Fisatom, Brasil;

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE): Shimadzu, Japão;
- Potenciômetro: modelo pH 140, Servylab, Brasil;
- Pré-coluna SecurityGuard Phenomenex C₁₈ (4 x 3,0 mm) Brasil;
- Cuba ultrassônica: Q3.0L, Servylab, Brasil;
- Vórtex - modelo AP-56: Phoenix Lufesco, Brasil;
- Zetasizer Nanoseries: Malvern Instruments, Reino Unido;
- Mastersizer[®] 3000 E: Malvern Instruments, Reino Unido;
- Placa de agitação com aquecimento multiposições: Velp scientifica, Itália;
- Termostato de aquecimento: IKA, Brasil;
- Microcentrífuga sigma 1-14: Biovera, Brasil;
- Balança analítica: Shimadzu, Brasil;
- Centrífuga: Solab, Brasil.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Procedimentos analíticos

As análises quantitativas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no sistema LC 10A HPLC (Shimadzu, Japão) equipado com uma bomba LC-20AT, um detector UV-VIS SPD-M20A e um injetor automático de amostra de válvula SIL-20A HT. A separação foi obtida a temperatura ambiente usando uma coluna Brownlee Validated C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5µm) acoplada a uma pré coluna de proteção C₁₈. A fase móvel isocrática consistiu em acetonitrila e água (65:35, v/v) em fluxo de 0,8 mL/min. O nifedipino foi detectado a 235 nm com tempo de retenção em torno de 7 min. Para análises de teor e eficiência de encapsulação de fármaco foi utilizado volume de injeção de 20 µL. Para liberação *in vitro* e permeação *ex vivo* o volume de injeção utilizado foi de 50 µL a fim de diminuir o limite de quantificação. Além disso, para o teste de permeação *ex vivo* a fase móvel foi alterada para acetonitrila e água (55:45, v/v) para melhorar a pureza dos picos cromatográficos.

4.2.1.1 Validação de métodos analíticos por CLAE para quantificação do nifedipino

Especificidade, linearidade, precisão intradia e interdia, robustez e exatidão foram avaliadas para ambos os métodos de acordo com as diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005).

A especificidade dos métodos foi determinada através da comparação entre os cromatogramas de uma amostra placebo (NC-BR) e do nifedipino, com o intuito de excluir a interferência de algum excipiente da formulação no mesmo tempo de retenção do nifedipino.

Para determinação da linearidade dos métodos, construíram-se curvas analíticas ($n=3$) utilizando uma solução de nifedipino em acetonitrila com cinco concentrações diferentes (1; 2,5; 5; 10; 15 µg/mL). A solução estoque foi preparada adicionando 10 mg de nifedipino em balão volumétrico de 10 mL contendo acetonitrila, a partir desta os volumes adequados para preparação das curvas foram pipetados e adicionados em balão volumétrico de 10 mL. Foram

construídos gráficos de concentração *versus* área do pico a partir das curvas, e determinou-se a equação da reta pelo estudo de regressão linear.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados conforme as equações 1 e 2, respectivamente. Baseados no desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas de calibração obtidas no ensaio de linearidade e a média dos coeficientes angulares.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (2)$$

Onde: IC é a inclinação da curva; σ é o desvio padrão.

A precisão foi determinada através do ensaio de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia). Para isso, foram preparadas seis amostras de nanocápsulas de nifedipino na concentração de 5 µg/mL no mesmo dia e em dois dias consecutivos, respectivamente, através da adição de 50 µL de suspensões de nanocápsulas em balão volumétrico de contendo 10 mL de acetonitrila. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR).

Para avaliação da robustez, foram realizadas modificações em algumas condições dos métodos (mudança no fluxo e na proporção da fase móvel) e o teor de soluções de nanocápsulas obtidas após análise nas condições modificadas foi comparado ao obtido nas condições usuais do método. Os resultados foram expressos em DRP em relação aos teores obtidos em cada uma das condições.

A fim de avaliar a exatidão dos métodos, foi adicionada quantidades conhecidas da solução estoque de nifedipino (1 mg/mL) em formulações de nanocápsulas brancas (NC-BR) e determinada a recuperação do fármaco. Adicionaram-se alíquotas em três níveis de concentração: baixa (em torno de 75% do ponto médio), média (em torno de 100% do ponto médio) e alta (em torno de 125% do ponto médio). As amostras foram preparadas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de recuperação e DPR.

4.2.2 Teste de solubilidade do nifedipino no óleo

Para avaliação da solubilidade do nifedipino no TCM, adicionou-se um excesso de nifedipino em 2 mL de óleo, a mistura foi mantida em agitação magnética por 12 h ($n=3$). Após, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e uma alíquota (50 μ L) do sobrenadante foi diluída em acetonitrila (25 mL) e quantificada por CLAE, de acordo com metodologia previamente validada (mencionado no item 4.2.1).

4.2.3 Preparo das suspensões de nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al., 1989) ($n=3$), no qual uma fase orgânica composta por Eudragit[®] RS100 (0,1 g), TCM (0,3 g), monooleato de sorbitano (0,077 g) e acetona (27 mL) foi mantida sob agitação magnética por 60 min à 40 °C. Após completa dispersão dos componentes, o nifedipino (10 mg) foi adicionado à fase orgânica que permaneceu em agitação magnética por mais 10 min à 40 °C ao abrigo da luz. Posteriormente, essa fase foi vertida através de um funil em uma dispersão aquosa (53 mL) de polissorbato 80 (0,077 g), a qual permaneceu sob agitação magnética durante 10 min à temperatura ambiente. Após, a formulação foi concentrada em evaporador rotatório à 40 °C, até o volume final de 10 mL, correspondendo a concentração final de nifedipino de 1,0 mg/mL, sendo esta denominada de NC-NIFE. Todas as etapas de preparo foram realizadas ao abrigo da luz a fim de evitar a degradação do nifedipino. Para fins comparativos, formulações sem nifedipino também foram preparadas (NC-BR).

4.2.4 Caracterização das suspensões de nanocápsulas

A determinação do pH das suspensões de nanocápsulas foi realizada em potenciômetro previamente calibrado (pH 140, Servylab), inserindo o eletrodo diretamente nas formulações desenvolvidas. O tamanho das partículas das formulações desenvolvidas foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer[®] Nanoseries, Malvern), após diluição das

suspensões de nanocápsulas em água ultrapura (1:500). Os resultados foram expressos em diâmetro médio de partícula e índice de polidispersão (IPD). Além disso, a distribuição do tamanho das partículas também foi avaliada por difratometria a laser (Mastersizer[®] 3000E, Malvern). Para isso, as amostras foram inseridas no amostrador contendo água até atingir o índice de obscuração mínimo (10%) utilizando o índice de refração do polímero Eudragit[®] RS100 (1,38). Foram analisados o diâmetro médio baseado em volume (D [4;3]) e a polidispersão do sistema (SPAN). Por sua vez, o potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi analisado por mobilidade eletroforética (Zetasizer[®] Nanoseries, Malvern) após diluição das amostras em solução de NaCl 10 mM (1:500).

O teor de nifedipino foi analisado por CLAE conforme metodologia descrita anteriormente (item 4.2.1). As suspensões de nanocápsulas foram diluídas (50 µL) em balão volumétrico de 10 mL contendo acetonitrila para extração do ativo. Após, as amostras foram filtradas em membrana de nylon (0,45 µm) e analisadas por CLAE. A eficiência de encapsulação (EE%) foi avaliada por ultrafiltração/centrifugação. Inicialmente, uma alíquota de 300 µL das suspensões de nanocápsulas (NC-NIFE) foi adicionada ao dispositivo de filtração (Amicon[®] Ultra MW 10.000, Millipore). Posteriormente, o dispositivo foi levado à centrifugação por 10 min a 2,200 xg e o ultrafiltrado obtido foi analisado por CLAE. A EE% foi calculada através da diferença de nifedipino total e livre obtidas nas suspensões de nanocápsulas e no ultrafiltrado, respectivamente (equação 3).

$$EE\% = \frac{Teor\ total - Teor\ livre}{Teor\ total} \times 100 \quad (3)$$

4.2.5 Avaliação da fotoestabilidade

Para determinar a fotoestabilidade das formulações foi aplicado um método previamente descrito com adaptações (TAGLIARI et al., 2015). Alíquotas (1 mL) das suspensões de nanocápsulas (NC-NIFE) ou uma solução do nifedipino em acetonitrila (NIFE) (1 mg/mL) foram adicionadas em *vials* transparentes ($n=3$) e posicionados sob uma mesa de forma equidistantes em ambiente iluminado com irradiação da luz do dia filtrada por um vidro transparente. Os testes foram conduzidos à 25 °C com exposição solar no período das 9 às 13 h e foram utilizados *vials* individuais para cada tempo de exposição. Além disso, foram analisadas

amostras protegidas da luz (controle escuro), revestindo previamente os *vials* com papel alumínio. Em tempos pré-determinados (0, 1, 2, 3 e 4 h) foram coletadas alíquotas de 50 µL e diluídas em balão volumétrico de 10 mL contendo acetonitrila, as amostras foram filtradas e analisadas por CLAE (item 4.2.1), a fim de determinar a quantidade remanescente de nifedipino.

A fim de determinar a cinética de degradação do fármaco, os dados experimentais foram testados para as equações de ordem zero (equação 4) e de primeira ordem (equação 5). Para a cinética de ordem zero, os dados foram plotados como concentração (µg/mL) *versus* tempo (h) e para cinética de primeira ordem (equação 5) os dados foram plotados como logaritmo natural da concentração (µg/mL) *versus* tempo (h). Os valores de coeficiente de correlação (*r*) e constante de velocidade de degradação (*k*) foram determinados a partir das equações. Além disso, o tempo de meia-vida foi calculado utilizando as equações 6 e 7, para ordem zero e primeira ordem, respectivamente.

$$C = C_0 - k_0 \cdot t \quad (4)$$

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (5)$$

$$t_{1/2} = \frac{0,5 \times C}{k_0} \quad (6)$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (7)$$

Onde: *C* = concentração inicial de fármaco; *k* = constante de velocidade de degradação obtida das equações.

4.2.6 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade em modelo de *Allium cepa*

Para o teste em células meristemáticas de *Allium cepa*, as cebolas foram lesionadas com auxílio de palitos de madeira e foram colocadas em contato com água destilada por 72 h a fim de favorecer o enraizamento. Posteriormente, a água foi removida e as raízes foram colocadas em contato com os tratamentos ($n=3$) por mais 24 h. Foram avaliados os tratamentos NC-NIFE; NC-BR; NIFE em veículo (1 mg/mL); veículo (5% Tween 80[®] em água); controle negativo (água destilada); controle positivo (glifosato 7,5 µg/mL). Após cada tratamento, utilizou-se etanol: ácido acético 3:1 (v/v) por 24 h para fixar os bulbos que posteriormente foram armazenados em etanol 70% (v/v) sob refrigeração (4 ± 2 °C).

Para preparar as lâminas histológicas, a parte meristemática foi separada e hidrolisada com HCl 0,2 M por 5 min. O excesso de HCl foi removido com auxílio de papel absorvente e orceína acética 2% (p/v) foi utilizada para corar as raízes, que foram esmagadas a fim de favorecer a visualização histológica. Foram preparadas duas lâminas (contagem de 1000 células em cada lâmina) para cada cebola e analisadas em microscópio (aumento de 40x). Para determinar o índice mitótico (IM%) foi observado o número de células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. O índice de aberrações cromossômicas (AC%) foi determinado por anormalidades cromossômicas. Os dados foram calculados e expressos em porcentagem, conforme as equações 8 e 9 (MARCHIORI et al., 2010; SCHERER et al., 2019).

$$IM(\%) = \frac{\text{Número de células em mitose}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100 \quad (8)$$

$$AC(\%) = \frac{\text{Número de aberrações}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100 \quad (9)$$

4.2.7 Avaliação do potencial de irritação em membrana cório-alantóide (HET-CAM)

O potencial de irritação das formulações foi avaliado pelo método da membrana cório-alantóide (HET-CAM), a partir da metodologia recomendada pelo Comitê Interinstitucional para Validação de Métodos Alternativos (ICCVAN, 2010) e aprovado pelo Comitê de Ética no

Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA nº 5428271020). Para o ensaio foram utilizados ovos de galinha fertilizados no 10º dia de incubação (37 °C e 65% de umidade), doados pela empresa Languiru (Teutonia, Brasil). Com auxílio de uma pinça foi retirada a casca na região da câmara de ar e a membrana externa, deixando exposta a membrana cório-alantóide (MCA), que foi umedecida com solução fisiológica (NaCl 0,9%). Foram aplicados 300 µL das suspensões de nanocápsulas contendo nifedipino (NC-NIFE) ($n=4$) na MCA durante 20 s e, em seguida, a membrana foi lavada com NaCl 0,9%. O aparecimento dos eventos de lise, coagulação e hemorragia foi observado durante 300 s. Além disso, foi analisado o nifedipino na forma livre (NIFE) solubilizado em uma solução aquosa com 10% de Tween 80® e 10% de DMSO (veículo). Fotografias foram realizadas em cada ponto do teste. Para a validação, utilizou-se soluções controle, e o grau de irritação foi previamente calculado conforme a equação 10. O controle negativo utilizado foi uma solução aquosa de NaCl 0,9% e para o controle positivo a solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M). Os resultados foram classificados na faixa de 0 - 0,9 (não irritantes), 1 - 4,9 (ligeiramente irritante), 5 - 8,9 (moderadamente irritante), 9 - 21 (irritante severo).

$$EI = 5x \frac{301-h}{300} + 7x \frac{301-l}{300} + 9x \frac{301-c}{300} \quad (10)$$

Onde: EI = escore de irritação; h = tempo de hemorragia; l = tempo de lise, e c = tempo de coagulação.

4.2.8 Perfil de liberação *in vitro* do nifedipino a partir das suspensões de nanocápsulas

O perfil de liberação *in vitro* do nifedipino ($n=3$) foi realizado colocando 1 mL das suspensões de nanocápsulas (NC-NIFE) em sacos de diálise (membrana de celulose 10,000 Da Spectra Por, Sigma Aldrich). Para avaliar o perfil de liberação do fármaco livre (NIFE), foi preparado uma solução de nifedipino (1 mg/mL) utilizando polietilenoglicol 400 (PEG 400). Posteriormente, os sacos de diálise foram imersos em um béquer contendo 200 mL de tampão fosfato pH 6,8, que foi mantido em agitação magnética à 37 °C. Em tempos pré-estabelecidos

(0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12 e 24 h) alíquotas de 1 mL foram coletadas e analisadas por CLAE (item 4.2.1). Após as coletas, 1 mL de meio foi repostado a fim de manter a condição *sink*.

4.2.9 Perfil de permeação *ex vivo* do nifedipino a partir das suspensões de nanocápsulas

A fim de avaliar o perfil de permeação *ex vivo* foi empregada mucosa sublingual suína, obtida de um matadouro local (Granja Jaguari, Jaguari, RS, Brasil). A mucosa foi cuidadosamente separada dos tecidos subjacentes e cortada em tamanho necessário para realização do experimento. Os fragmentos foram armazenados em freezer à -18° C até a realização do experimento (FRATTER; BIAGI; CICERO, 2019; CHAVES et al., 2017).

O perfil de permeação do nifedipino ($n=4$) foi realizado empregando células de *Franz* (área de difusão 3,14 cm²) e mucosa sublingual suína como membrana biológica. O meio receptor foi composto por tampão fosfato pH 6,8 contendo 0,2% de polissorbato 80, a fim de aumentar a solubilidade do fármaco e manter a condição *sink*. O meio permaneceu sob agitação magnética à 37 °C (6 mL). No compartimento doador foi adicionado 180 µL de NC-NIFE e NIFE (solução preparada em PEG 400), e nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h foram coletadas alíquotas de 0,2 mL do meio receptor e diluídas em 0,4 mL de acetonitrila, filtradas e injetadas no CLAE (item 4.2.1). O meio coletado foi repostado, em todos os tempos a fim de manter a condição *sink* durante o experimento.

Objetivando avaliar se o fármaco foi capaz de permear na mucosa, após às 6 h de experimento, o excesso de formulação sobre a mucosa foi removido. A mucosa foi cortada em pequenos pedaços e estes foram adicionados em tubos de ensaio contendo acetonitrila (5 mL). Após, as amostras foram levadas ao vórtex (2 min) e centrifuga (15 min) para extração do fármaco, filtradas e analisadas por CLAE.

4.2.10 Análises estatísticas

As formulações foram preparadas e analisadas em triplicata e os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média ou desvio padrão. A distribuição destes foi testada utilizando os testes de normalidade de D'Agostino-Pearson. Os dados foram

avaliados estatisticamente através de teste t ou de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido pelo teste Bonferroni. Os dados que não atendiam a distribuição normal foram tratados a fim de homogeneizar o perfil de análise para que se adequassem à aplicação de testes paramétricos visando a manutenção do poder de prova. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância estatística. As análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism[®] versão 7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DO NIFEDIPINO

Para determinar o teor de nifedipino nas formulações foi realizada a validação dos métodos analíticos, os quais mostraram-se específicos considerando que os cromatogramas das suspensões de nanocápsulas brancas não apresentaram interferência dos excipientes no pico cromatográfico do nifedipino. Na Figura 7-A está ilustrado o cromatograma da amostra placebo e na Figura 7-B o pico do nifedipino que apresentou grau de pureza de 0,9999. Da mesma forma, para o método de permeação, onde na Figura 8-A demonstra o cromatograma da amostra placebo e na Figura 8-B o nifedipino com pureza de 0,9999.

Figura 7 – Imagens demonstrativas dos cromatogramas do placebo (A) e do padrão contendo nifedipino (B) do método utilizado para teor, eficiência de encapsulação, experimento de fotoestabilidade e liberação *in vitro*

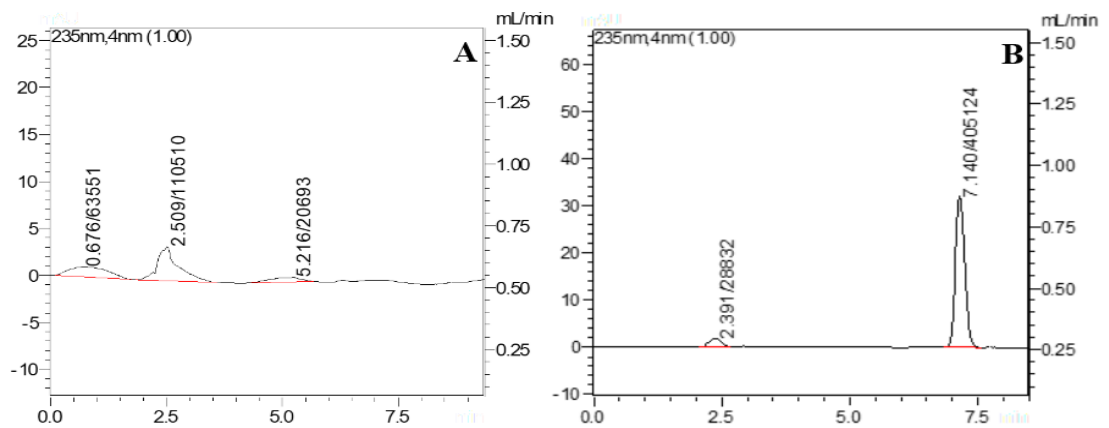
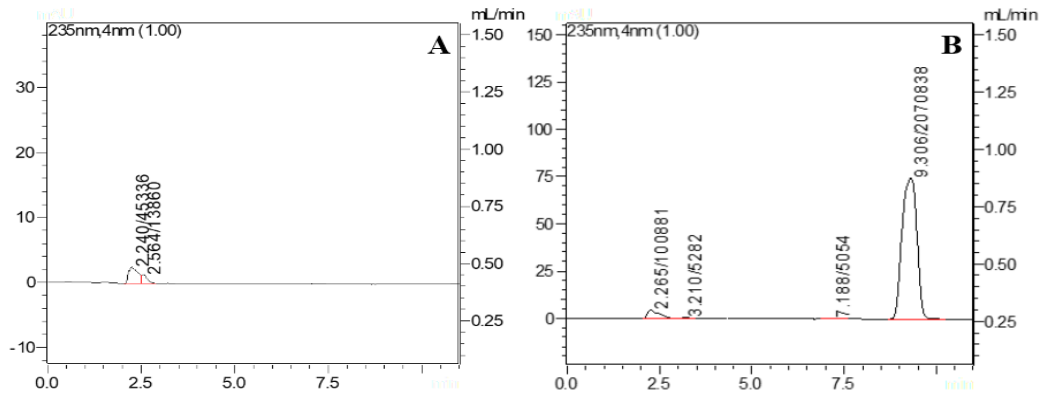


Figura 8 – Imagens demonstrativas dos cromatogramas do placebo (A) e do padrão contendo nifedipino (B) do método utilizado para o experimento de permeação *ex vivo*



Em relação à linearidade, ambos os métodos demonstraram ser lineares na faixa de 1-15 $\mu\text{g/mL}$ ($n=3$), apresentando coeficiente de correlação de $0,9995 \pm 0,00$ (método de determinação de teor, eficiência de encapsulação, experimento de fotoestabilidade e liberação *in vitro*) e $0,9994 \pm 0,00$ (método para o estudo de permeação *ex vivo*), estando de acordo com as diretrizes da ICH.

Os valores de LD e LQ obtidos foram de 0,15 $\mu\text{g/mL}$ e 0,46 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Do mesmo modo, para o método utilizado na permeação, os resultados de LD e LQ foram de 0,24 $\mu\text{g/mL}$ e 0,71 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Os valores de DPR para a precisão intradia e interdia de ambos os métodos foram $< 2\%$ em relação aos teores de nifedipino nas suspensões de nanocápsulas, descritos nas tabelas 2 e 3, respeitando os limites preconizados pela ICH, confirmando a precisão dos métodos.

Tabela 2 - Precisão intradia e interdia das suspensões de nanocápsulas contendo nifedipino do método utilizado para teor, eficiência de encapsulação, experimento de fotoestabilidade e liberação *in vitro*

	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	5	100,91 ± 1,48	1,47
Dia 2 (n=6)	5	100,68 ± 2,31	2,29
Média ± DP (n=12)	5	100,80 ± 2,31	1,84

Tabela 3 - Precisão intradia e interdia das suspensões de nanocápsulas contendo nifedipino do método utilizado para o experimento de permeação *ex vivo*

	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	5	100,02 ± 1,16	1,16
Dia 2 (n=6)	5	101,31 ± 2,29	2,26
Média ± DP (n=12)	5	100,66 ± 1,86	1,84

Na avaliação da exatidão, as porcentagens de recuperação do nifedipino foram próximas de 100% e ambos os métodos demonstraram DPR menores que 2% para os três níveis de concentrações testados, caracterizando os métodos como exatos (tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Exatidão do método analítico por CLAE para avaliação de teor, eficiência de encapsulação, experimento de fotoestabilidade e liberação *in vitro* do nifedipino

Níveis de concentração	Recuperação (%)	DPR (%)
75 %	98,83 ± 1,15	1,16
100 %	102,03 ± 0,93	0,91
125 %	99,29 ± 1,10	1,11

Tabela 5 – Exatidão do método analítico por CLAE para avaliação de permeação *ex vivo* do nifedipino

Níveis de concentração	Recuperação (%)	DPR (%)
75 %	98,83 ± 1,15	1,16
100 %	102,03 ± 0,93	0,91
125 %	99,29 ± 1,10	1,11

Para a robustez, os resultados de teores obtidos de nifedipino das nanocápsulas poliméricas ficaram próximos de 100% após as mudanças estabelecidas no fluxo e na proporção de fase móvel, respeitando o DPR inferior a 2% e evidenciando a robustez dos métodos. Os resultados estão descritos nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Robustez do método analítico por CLAE para avaliação de teor, eficiência de encapsulação, experimento de fotoestabilidade e liberação *in vitro* do nifedipino

	Parâmetros	Recuperação (%)	DPR (%)
Proporção de fase móvel	ACN:H ₂ O (55:45)	98,27 ± 0,42	0,43
	ACN:H ₂ O (70:30)	98,14 ± 0,24	0,25
Fluxo	0,7 mL/min	96,86 ± 1,57	1,62
	1,0 mL/min	97,69 ± 0,40	0,41

Tabela 7 - Robustez do método analítico por CLAE para avaliação de permeação *ex vivo* do nifedipino

	Parâmetros	Recuperação (%)	DPR (%)
Proporção de fase móvel	ACN:H ₂ O (65:35)	100,41 ± 0,92	0,92
	ACN:H ₂ O (50:50)	99,90 ± 0,19	0,19
Fluxo	0,7 mL/min	99,92 ± 0,22	0,22
	1,0 mL/min	98,79 ± 1,38	1,40

5.2 TESTE DE SOLUBILIDADE DO NIFEDIPINO NO ÓLEO

Considerando a estrutura “*core-shell*” das nanocápsulas poliméricas, a escolha do óleo e do polímero é uma etapa importante a fim de garantir as características adequadas dos nanossistemas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Assim, é importante na escolha do óleo considerar a solubilidade do fármaco e a compatibilidade com o polímero (ROSA et al., 2019). Nesse contexto, foi avaliada a solubilidade do nifedipino no TCM e o resultado obtido foi de $3,87 \pm 0,04$ mg/ml. Esse resultado é promissor, pois uma elevada solubilidade no óleo favorece a encapsulação do fármaco no núcleo oleoso da nanocápsula. Além disso, cabe comentar que a compatibilidade entre Eudragit[®] RS100 e TCM já foi relatada em trabalhos prévios (ROSA et al., 2019; SANTOS et al., 2013).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

Após o preparo, as suspensões contendo nifedipino (NC-NIFE) apresentaram aspecto leitoso levemente amarelado e as nanocápsulas brancas (NC-BR) mostraram aspecto branco leitoso. Ambas as formulações apresentaram reflexo opalescente branco/azulado (efeito *Tyndall*) resultante do movimento browniano das estruturas coloidais. Os resultados obtidos da caracterização das suspensões de nanocápsulas estão representados na tabela 8.

As suspensões de nanocápsulas apresentaram pH ácido e esse resultado já foi demonstrado em outros trabalhos que utilizaram Eudragit[®] RS100 e TCM no preparo desses

nanossistemas (DE LIMA et al., 2017; PRADO et al., 2021; SANTOS et al., 2013). Além disso, o potencial zeta positivo das nanocápsulas (Figura 9) confirmou a característica catiônica do polímero Eudragit® RS100. A superfície catiônica desses nanossistemas desempenha uma função importante na interação eletrostática das nanocápsulas com a superfície da mucosa, que apresenta característica aniônica devido a presença de moléculas de mucina carregadas negativamente. Esta característica favorece a interação dos nanossistemas com a superfície da mucosa, aumenta o tempo de residência da formulação no local de aplicação (CHAVES et al., 2018; SOSNIK; NEVES; SARMENTO, 2014).

Tabela 8- Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas desenvolvidas

Parâmetro	Formulações	
	NC-NIFE	NC-BR
pH	4,7 ± 0,1	4,8 ± 0,2
Diâmetro de partícula (nm)	176 ± 6	175 ± 4
Índice de polidispersão	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,03
D [4;3] (nm)	360 ± 0	479 ± 0***
Dv (90) (nm)	576 ± 0	796 ± 0***
SPAN	1,47 ± 0,31	2,02 ± 0,22
Potencial zeta (mV)	+10,3 ± 0,1	+8,0 ± 1,3*
Teor de Nifedipino (mg/mL)	0,98 ± 0,03	-

Dados expressos como média ± desvio padrão ($n=3$). Teste t, onde: (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$: Diferença entre NC-NIFE e NC-BR.

As nanocápsulas apresentaram características que confirmam o tamanho nanométrico. Através da técnica de espalhamento de luz dinâmico foi possível observar tamanho de partícula em torno de 175 nm e IPD reduzido ($< 0,2$), indicando a homogeneidade dos sistemas. As Figuras 10 e 11 ilustram os gráficos da análise de tamanho por volume e por intensidade, respectivamente. Além disso, a análise de difração a laser demonstrou distribuição de tamanho na região nanométrica e os valores de SPAN confirmaram a homogeneidade de tamanho das

partículas, pois foram ≤ 2 . A Figura 12 representa a distribuição granulométrica por volume das suspensões de nanocápsulas, e é possível observar uma pequena população entre 1 e 10 μm . Apesar disso, os valores de $D_v(90)$ indicam que 90% das partículas são menores que 796 nm. Além disso, na Figura 13 está ilustrada a distribuição de tamanho por número que representa a população de menor tamanho da amostra, ou seja, quando os resultados são analisados por número a população maior é insignificante.

Figura 9- Gráficos de potencial zeta das suspensões de nanocápsulas

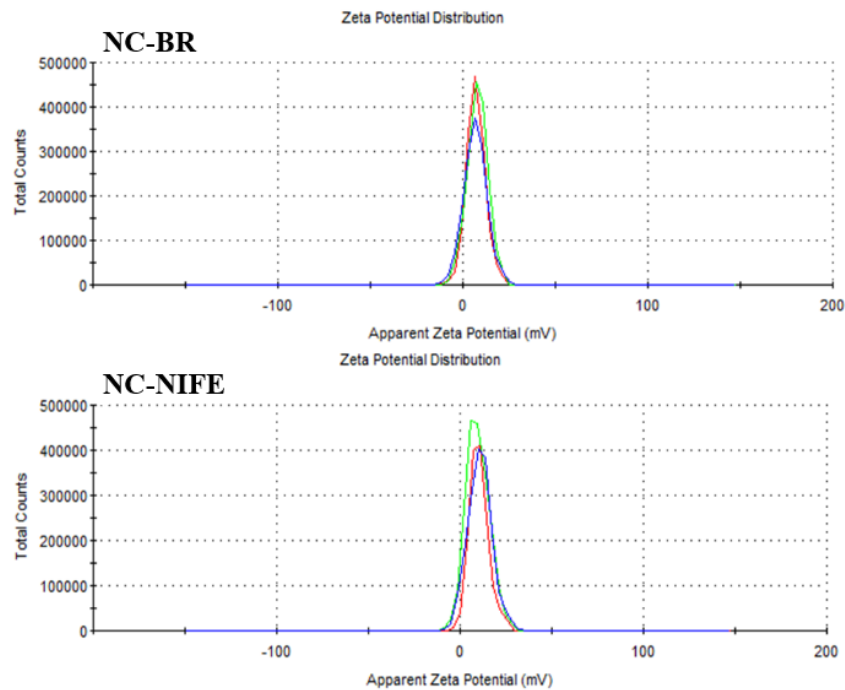


Figura 10 – Gráficos da análise de tamanho por volume das suspensões de nanocápsulas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons

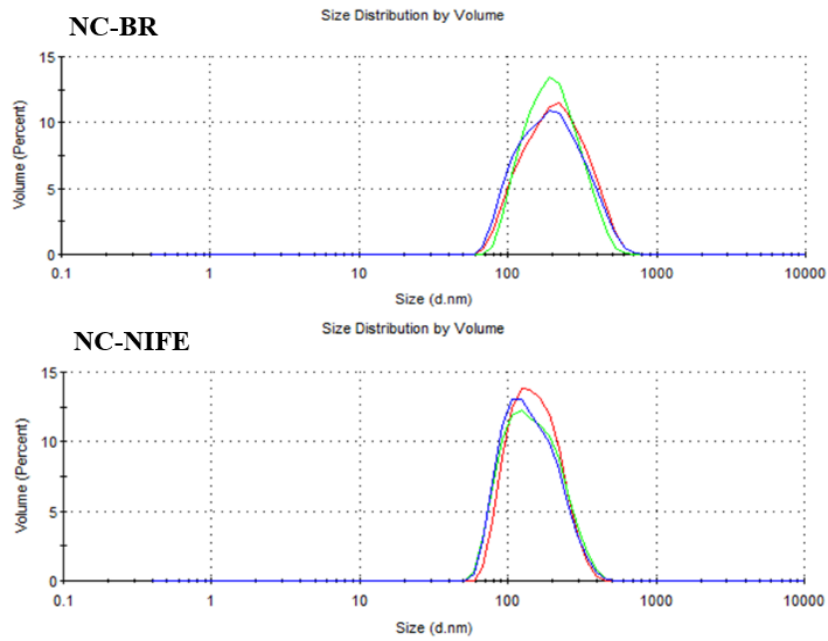


Figura 11 – Gráficos das análises de tamanho por intensidade das suspensões de nanocápsulas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons

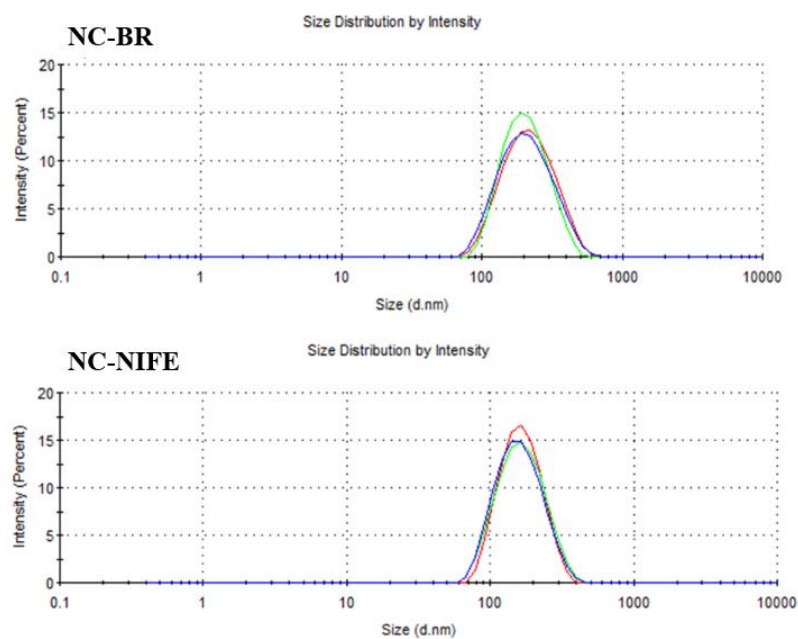


Figura 12 – Imagem representativa do perfil de distribuição granulométrica por volume das suspensões de nanocápsulas pela técnica de difração a laser

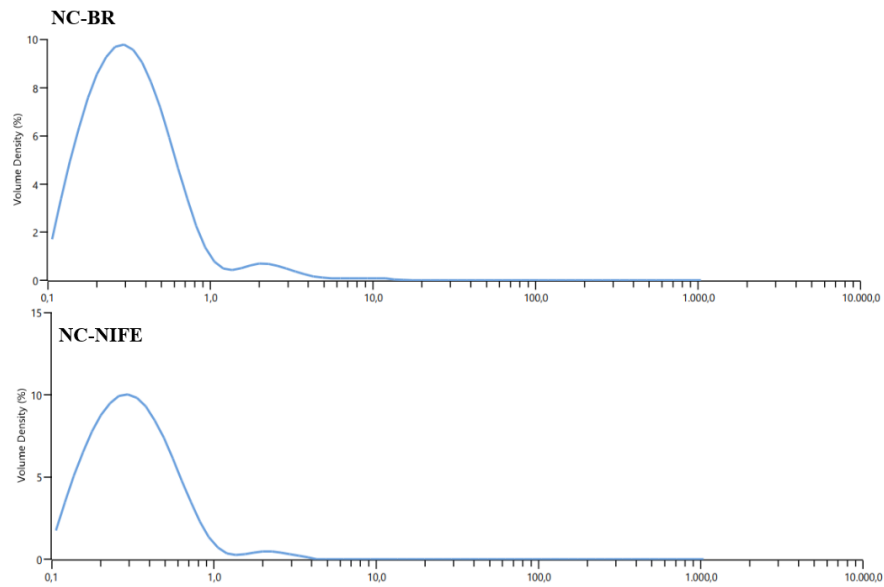
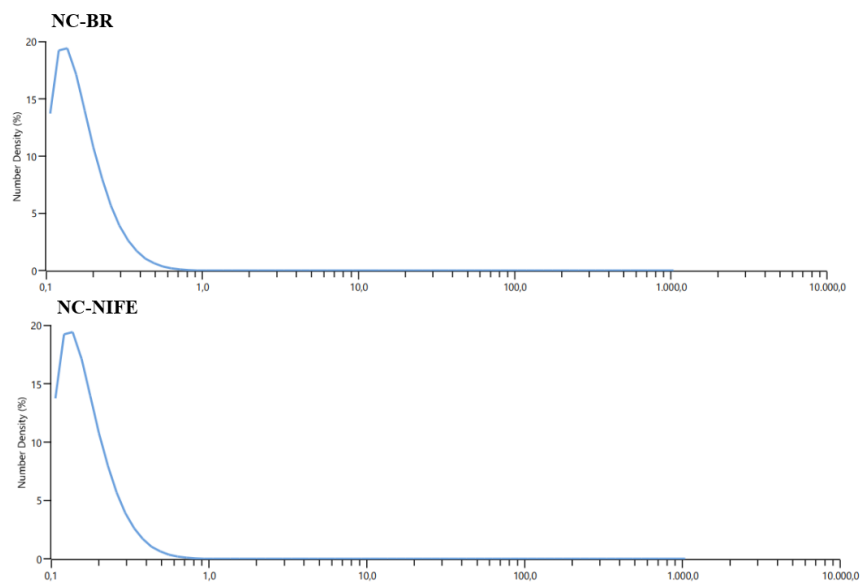


Figura 13 – Imagem representativa do perfil de distribuição granulométrica por número das suspensões de nanocápsulas pela técnica de difração a laser



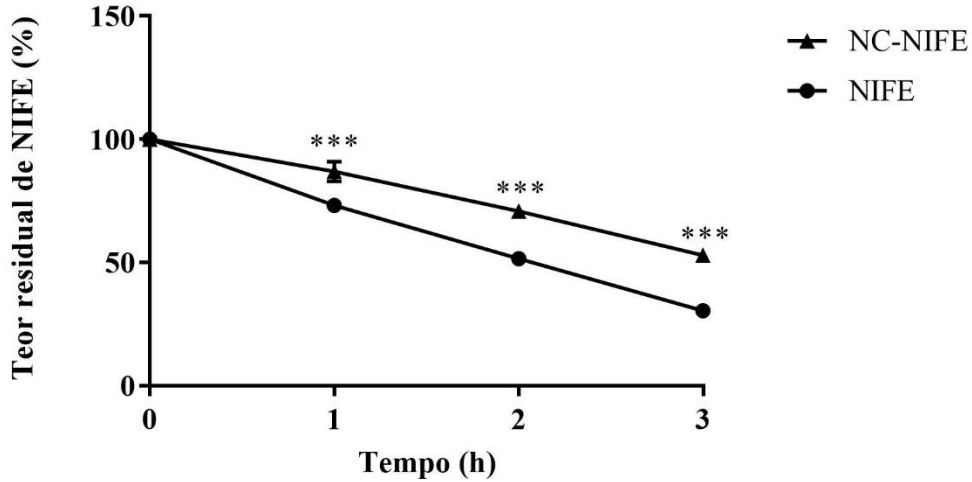
Vale ressaltar que no início do desenvolvimento desse trabalho foram preparadas nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona (PCL) e não foi possível dar continuidade aos estudos, pois os sistemas apresentaram índice de polidispersão elevado ($> 0,2$).

O teor obtido de nifedipino para NC-NIFE foi próximo ao teórico (1 mg/mL), indicando que não houve perda de fármaco durante o preparo e que o processo foi adequado para o desenvolvimento das formulações contendo nifedipino. Além disso, as nanocápsulas apresentaram elevada EE% (99,9%), o que pode ser explicado pela lipofilicidade do fármaco e a sua adequada solubilidade no TCM, que tende a se concentrar no núcleo oleoso das nanocápsulas poliméricas. Santos e colaboradores (2013) relataram elevada EE% do clotrimazol e mencionaram que a alta lipofilia do fármaco impede a sua partição na fase aquosa.

5.4 AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE

O nifedipino é utilizado como um fármaco modelo em estudos de fotodegradação, devido a sua fotoinstabilidade ser amplamente conhecida (AMAN; THOMA, 2002; MOFFAT et al., 2013). A fim de avaliar o efeito fotoprotetor das nanocápsulas poliméricas, o nifedipino foi veiculado a estes nanossistemas e exposto à radiação da luz do dia. Os resultados obtidos da exposição do nifedipino livre (NIFE) e associado ao nanossistema (NC-NIFE) estão representados na Figura 14. Após 3 h de experimento o teor residual de nifedipino nas formulações de NC-NIFE foi de $52,88 \pm 1,55\%$. Por sua vez, o teor remanescente para o fármaco não-nanoencapsulado foi de $30,45 \pm 1,03\%$. Em todos os tempos de exposição experimental a degradação do NIFE livre foi maior ($p < 0,001$) do que associado nas formulações nanoestruturadas (NC-NIFE). Esse resultado mostra que a nanoencapsulação proporcionou um aumento ($p < 0,01$) na fotoestabilidade do nifedipino quando comparado ao fármaco livre. Comportamentos semelhantes foram encontrados na literatura para nanocápsulas contendo nifedipino (TAGLIARI et al., 2015). O efeito fotoprotetor das nanocápsulas poliméricas é atribuído às características dos sistemas coloidais que podem absorver ou dispersar a luz, desempenhando uma função de proteção ao fármaco em relação ao ambiente externo (GEHRCKE et al., 2017; MATTIAZZI et al., 2019; WEBER et al., 2016). Vale ressaltar, que ao final do experimento não foram observados efeitos de degradação do nifedipino nos controles escuros, evidenciando que a degradação do fármaco ocorreu apenas por efeito de exposição a luz.

Figura 14 – Quantidade remanescente de nifedipino livre (NIFE) ou nanoencapsulado (NC-NIFE) após exposição à luz do dia por 3 horas



Dados expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$). ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde: (***) $p < 0,001$: diferença entre NC-NIFE e NIFE.

Após determinar a quantidade de fármaco fotodegradado, é importante avaliar a cinética de degradação, que permite elucidar o perfil de degradação da substância (MURAKAMI et al., 2009). A tabela 9 mostra os resultados do ajuste dos dados experimentais às equações cinéticas (equações 4 e 5). Considerando o maior coeficiente de correlação (r) obtido, observou-se que a degradação do nifedipino livre e nanoencapsulado segue cinética de ordem zero, ou seja, a velocidade da reação é independente da concentração de fármaco remanescente. Para avaliar a cinética de degradação é interessante atingir 50% de degradação do fármaco a fim de obter um comportamento verdadeiro para determinar a ordem cinética de degradação (MOORE, 2004). Apesar da formulação NC-NIFE ter concentração remanescente de 52% de nifedipino, não foi difícil estabelecer a cinética de degradação. Além disso, esse fato não influencia na relevância do resultado da capacidade das suspensões de nanocápsulas proteger o nifedipino da fotodegradação.

As inclinações das retas fornecem os valores de constante de degradação (k) (tabela 9), a partir dos dados obtidos observamos que o nifedipino livre apresentou maior ($p < 0,001$) valor de k quando comparado ao nifedipino nanoencapsulado, ou seja, a velocidade de degradação do nifedipino foi maior quando ele está na forma livre. Os valores obtidos para as constantes de velocidade de degradação permitiram o cálculo do tempo de meia-vida, o qual demonstrou que a nanoencapsulação aumentou ($p < 0,001$) em 1 h o tempo necessário para que a

concentração de nifedipino se reduza à metade da inicial. Esses resultados confirmam o que foi observado na Figura 14: a nanoencapsulação foi capaz de aumentar a fotoestabilidade do nifedipino.

Tabela 9 – Coeficiente de correlação (r), constante de velocidade de degradação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos após regressão linear dos dados de fotodegradação do nifedipino

	NC-NIFE		NIFE	
	Ordem zero	Primeira ordem	Ordem zero	Primeira ordem
Coeficiente de correlação (r)	0,9931 ± 0,01	0,9836 ± 0,01	0,9979 ± 0,00	0,9912 ± 0,00
Constante de degradação (k)	157,57 ± 2,95 μg/mL/h ***	-	230,89 ± 5,30 μg/mL/h	-
Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$)	3,17 ± 0,06 h ***	-	2,17 ± 0,05 h	-

Dados expressos como média ± desvio padrão ($n=3$). Teste t, onde: (***) $p < 0,001$: Diferença entre NC-NIFE e NIFE.

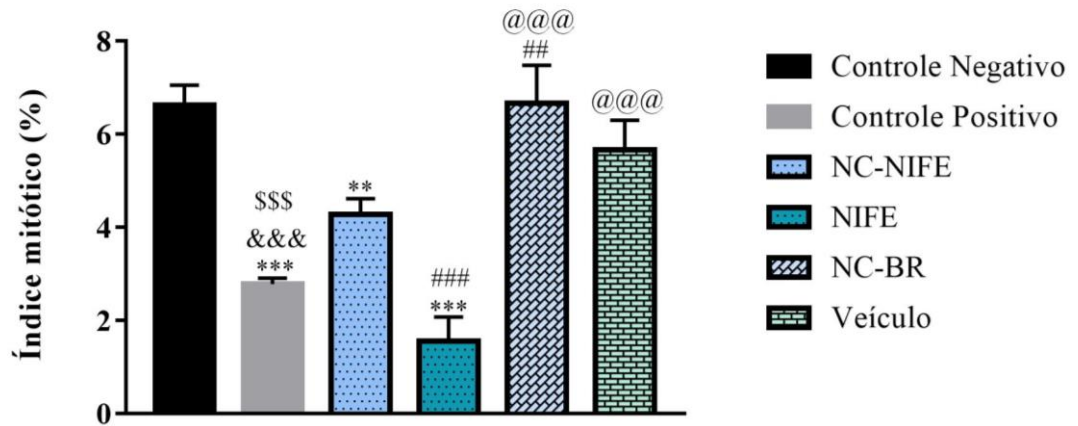
5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM MODELO DE *ALLIUM CEPA*

Partículas nanométricas são providas de características exclusivas e possuem a capacidade de atravessar a barreira biológica e interagir com as estruturas intracelulares, podendo levar à toxicidade (RAJESHWARI et al., 2016). O modelo de *Allium cepa* tem sido amplamente utilizado para avaliar a toxicidade de nanopartículas e dentre as suas vantagens estão a capacidade das raízes permanecerem em contato direto com a formulação, a manifestação rápida da resposta às substâncias genotóxicas e a ocorrência de poucas alterações naturais cromossômicas (TEDESCO; LAUGHINGHOUSE, 2012). O índice mitótico é uma indicação de presença de divisão celular e é aplicado em avaliações de fenômenos citotóxicos. A capacidade de agentes em causar redução de eventos mitóticos pode estar associada à

citotoxicidade, visto que substâncias destinadas a alterar o ciclo celular normal causam redução na divisão celular. Por outro lado, a genotoxicidade está associada a substâncias capazes de romperem o material genético, ocasionando alterações anormais na estrutura dos genes ou cromossomos (ISLAM et al., 2017).

Nesse contexto, objetivando avaliar a citotoxicidade foi observado o índice mitótico (IM%) das células após o tratamento com as formulações desenvolvidas nesse trabalho, os resultados estão ilustrados na Figura 15. O IM% do tratamento com água (controle negativo) foi de $6,63 \pm 0,43\%$, semelhante ($p > 0,05$) ao veículo ($5,22 \pm 0,24\%$) e a NC-BR ($5,55 \pm 1,13\%$). Por outro lado, o grupo tratado com glifosato (controle positivo) apresentou IM% de $2,78 \pm 0,13\%$, menor em comparação com o controle negativo ($p < 0,001$), veículo ($p < 0,001$) e NC-BR ($p < 0,001$). Entretanto, o IM% do tratamento com glifosato foi semelhante ($p > 0,05$) ao NIFE ($1,56 \pm 0,45\%$) a NC-NIFE ($4,28 \pm 0,33\%$). Apesar disso, a nanoencapsulação do nifedipino foi capaz de reduzir ($p < 0,001$) a citotoxicidade quando comparada ao NIFE livre. Além disso, ao comparar com o IM% do controle negativo, a NC-NIFE apresentou menor diferença ($p < 0,01$) que o NIFE livre ($p < 0,001$). O melhor resultado para NC-NIFE em relação ao NIFE livre pode ser explicado através do perfil de liberação controlada das nanocápsulas, que promove uma liberação gradativa do fármaco ao invés deste ser liberado de forma imediata. Além disso, a estrutura das nanocápsulas atua como uma barreira protetora, evitando o contato direto do fármaco com as células meristemáticas. As diferentes fases de mitose estão representadas na Figura 17-A.

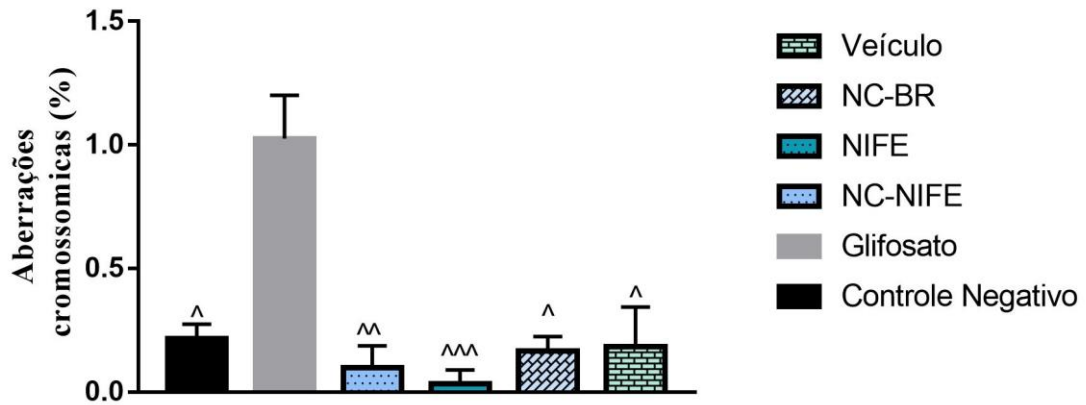
Figura 15 – Índice mitótico (IM%) observado através do ensaio de *Allium cepa*



Dados expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$). ANOVA de uma via seguido por pós teste Bonferroni, onde:

- * significa diferença estatística entre controle negativo e demais grupos (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$;
- # significa diferença estatística entre NC-NIFE e demais grupos (#) $p < 0,5$; (##) $p < 0,01$; (###) $p < 0,001$;
- @ significa diferença estatística entre NIFE e demais grupos (@@@) $p < 0,001$;
- & significa diferença estatística entre NC-BR e demais grupos (&&&) $p < 0,001$;
- \$ significa diferença estatística entre veículo e demais grupos (\$\$\$) $p < 0,001$.

A genotoxicidade foi avaliada através da observação de aberrações cromossômicas (AC%) (Figura 16). O controle positivo apresentou maior potencial genotóxico em relação aos demais grupos, com AC% de $1,03 \pm 0,17\%$. O grupo tratado com água (controle negativo) apresentou AC% de $0,22 \pm 0,06\%$, sendo semelhante ($p > 0,05$) a NC-NIFE ($0,1 \pm 0,08\%$), NIFE ($0,03 \pm 0,06\%$), NC-BR ($0,17 \pm 0,12\%$) e veículo ($0,17 \pm 0,15\%$). Nesse contexto, não foi observado potencial genotóxico das formulações em estudo e já foi relatado na literatura a ausência de genotoxicidade de nanocápsulas poliméricas contendo fármaco nanoencapsulado (MARCHIORI et al., 2010). O índice e a classificação das anormalidades cromossômicas estão descritos na tabela 10, e na Figura 17-B está ilustrada as imagens de aberrações cromossômicas encontradas nesse trabalho.

Figura 16 – Aberrações cromossômicas (AC%) observado através do ensaio de *Allium cepa*

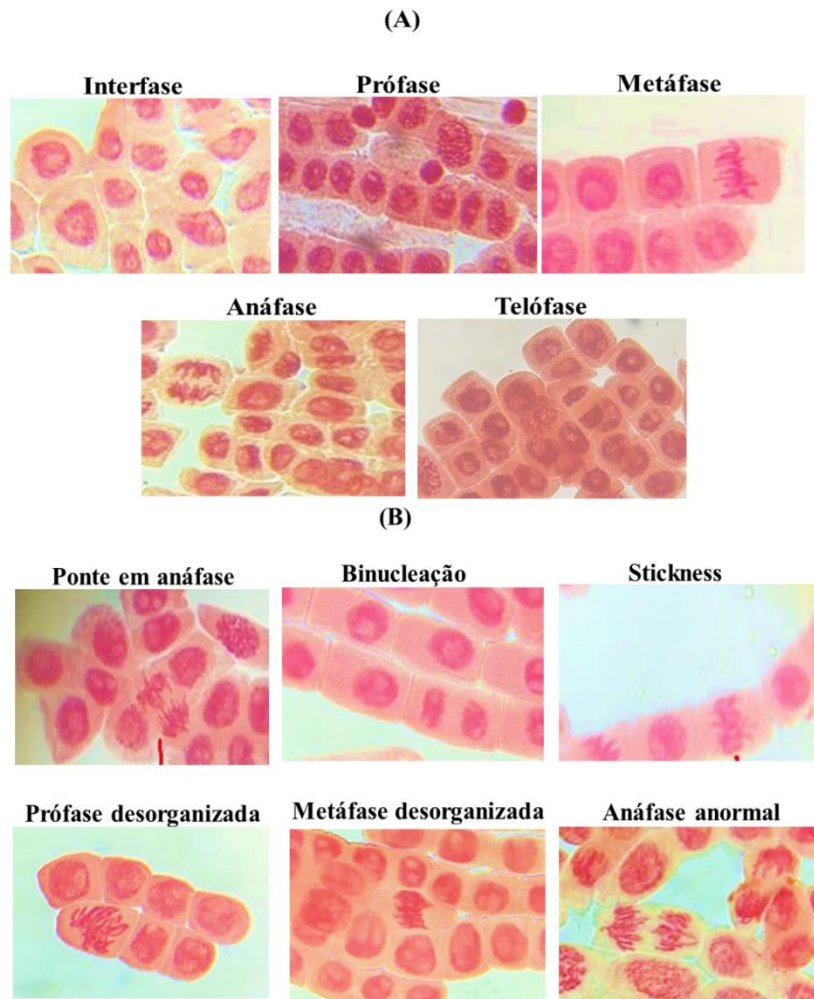
Dados expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$). ANOVA de uma via seguido por pós teste Bonferroni, onde: ^ significa diferença estatística entre controle positivo e demais grupos (\wedge) $p < 0,05$; ($\wedge\wedge$) $p < 0,01$; ($\wedge\wedge\wedge$) $p < 0,001$.

Tabela 10 – Aberrações cromossômicas observadas em células de *Allium cepa*

	PA	BN	SK	MD	PD	AA	AC%
Controle (-)	2	9	2	0	0	0	0,22 \pm 0,06
Controle (+)	16	17	4	16	16	2	1,03 \pm 0,17
NC-NIFE	2	3	1	0	0	0	0,10 \pm 0,08
NIFE	0	1	0	0	1	0	0,03 \pm 0,06
NC-BR	3	4	0	1	2	0	0,17 \pm 0,12
Veículo	1	4	0	1	5	0	0,18 \pm 0,16

Média \pm desvio padrão ($n=3$, totalizando 6000 células por grupo). Onde: PA é ponte em anáfase, BN é binucleação, SK é stikness, MD é metáfase desorganizada, PD é prófase desorganizada, AA é anáfase anormal. AC% é o índice total de aberrações cromossômicas.

Figura 17 – Imagem ilustrativa das células em diferentes fases de mitose (A) e aberrações cromossômicas (B)

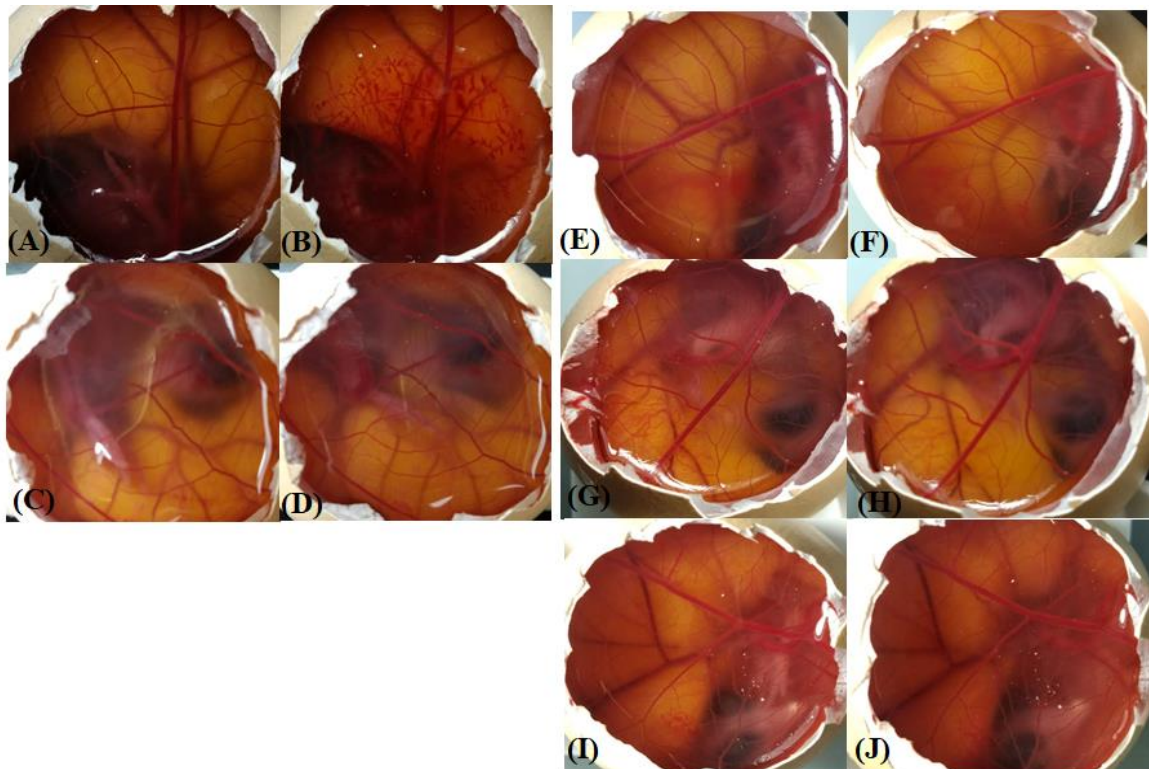


5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO EM MEMBRANA CÓRIO-ALANTÓIDE (HET-CAM)

Para avaliação do potencial de irritação de formulações nanoestruturadas tem sido amplamente aplicado o teste da membrana cório-alantóide (HET-CAM) (KRAMBECK et al., 2020; MOTA et al., 2013; ROSA et al., 2019). A Figura 18 representa os resultados obtidos após o contato da MCA com a formulação desenvolvida e o fármaco livre. A partir das imagens, é possível observar que as nanocápsulas poliméricas contendo nifedipino não apresentaram potencial de irritação, sendo semelhante ao controle negativo (NaCl 0,9%) e classificadas como não irritantes. Do mesmo modo, o nifedipino livre e o veículo não demonstraram nenhuma

alteração na MCA. Por sua vez, o controle positivo apresentou sinais de coagulação, como já esperado e descrito na literatura (GEHRCKE et al., 2020). Em trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (PRADO et al., 2019), nanocápsulas de Eudragit® RS100 e TCM sem princípio ativo foram avaliadas no mesmo modelo e não foram observados eventos irritantes na MCA. Assim, pode-se afirmar que a formulação de nanocápsulas contendo nifedipino não é irritante.

Figura 18- Imagens da membrana cório-alantóide (MCA) antes e após o contato com as formulações

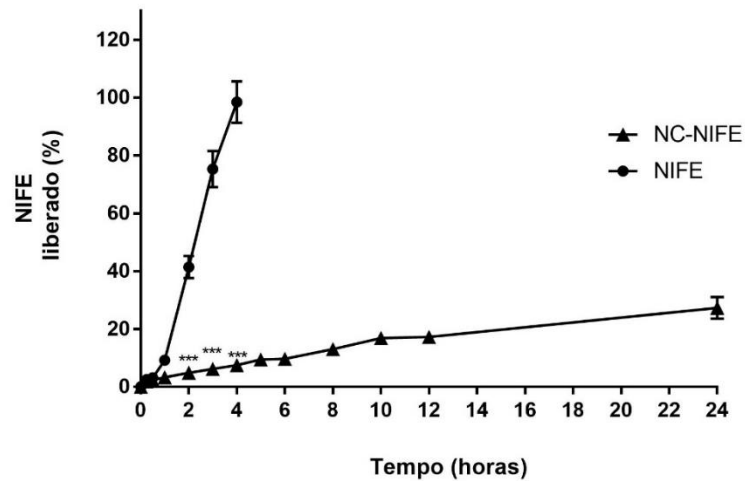


Onde: MCA exposta no tempo 0 e ao final de 300 s respectivamente ($n=4$), (A) e (B) NaOH 0,1 M; (C) e (D) NaCl 0,9%; (E) e (F) NIFE; (G) e (H) NC-NIFE; (I) e (J) Veículo (solução aquosa com 10% de Tween® e DMSO).

5.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO NIFEDIPINO A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

O perfil de liberação *in vitro* do nifedipino (livre e nanoencapsulado) está representado na Figura 19. Em 4 h de experimento o NIFE livre ($98,45 \pm 7,17\%$) foi totalmente liberado. Por outro lado, em 24 h de experimento $27,34 \pm 3,78\%$ do nifedipino foi liberado das nanocápsulas, o que evidencia um elevado controle da liberação do fármaco. Assim, nosso resultado evidencia que além da nanocápsula promover liberação controlada do nifedipino, o fármaco consegue ser liberado da formulação. A capacidade de nanossistemas controlarem a liberação de substâncias, além de ser amplamente descrito na literatura, é relatada como uma das principais vantagens de sistemas nanoestruturados (ARAÚJO et al., 2019; CHASSOT et al., 2016; CHAUHAN et al., 2017). Tal propriedade pode ser atribuída ao invólucro polimérico das nanocápsulas que funciona como uma barreira de proteção ao núcleo oleoso e promove liberação controlada a fármacos lipofílicos (OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, a elevada solubilidade do nifedipino no óleo está ligada a partição favorável do fármaco disperso no óleo, formando um sistema reservatório (FORMARIZ et al., 2005). A liberação prolongada reduz a incidência de efeitos adversos oriundos de picos de concentração plasmática elevados, prolongando o efeito terapêutico do fármaco e reduz sua frequência de administração.

Esse resultado está de acordo com o estudo de Santos e colaboradores (2013), que desenvolveram nanocápsulas de Eudragit® RS100 e TCM contendo clotrimazol e avaliaram o perfil de liberação *in vitro* em sacos de diálise. Os resultados obtidos evidenciaram que as nanocápsulas foram capazes de prolongar a liberação do fármaco.

Figura 19 – Perfil de liberação *in vitro* do nifedipino

Dados expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$). ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde: (***) $p < 0,001$: diferença entre NC-NIFE e NIFE.

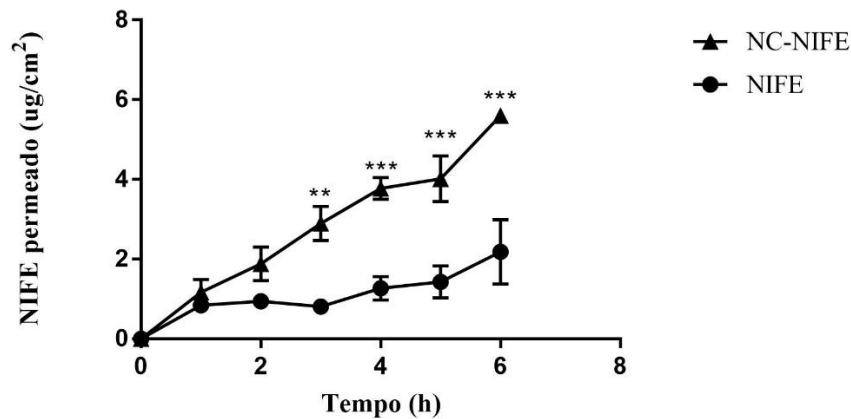
5.8 PERFIL DE PERMEACÃO *EX VIVO* DO NIFEDIPINO A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

O estudo de permeação para produtos nanotecnológicos destinados a diferentes vias de administração é amplamente descrito na literatura (FRANK et al., 2017; RATA et al., 2021; REBIBO et al., 2021). Em nosso estudo, foi utilizado células de *Franz* e mucosa sublingual suína como membrana, a fim de melhor simular a condição fisiológica auxiliando na interpretação dos dados obtidos. Tampão fosfato pH 6,8 contendo 0,2% de polissorbato 80 foi escolhido para compor o meio receptor no sentido de mimetizar as condições da via sublingual. Outro estudo também relata a utilização de tensoativo para melhorar a solubilidade do nifedipino no meio do estudo de permeação (SANTIS et al., 2013). Até onde sabemos, esta é a primeira vez que mucosa sublingual é empregada para avaliação de permeação *ex vivo* do nifedipino.

Visando aplicação sublingual é importante que o fármaco em estudo seja capaz de permear com facilidade através da mucosa para atingir a corrente sanguínea a fim de obter o efeito desejado (BREDENBERG et al., 2003). Apesar do PEG 400 ser conhecido como um promotor de permeação, a partir de 3 h de experimento a quantidade permeada para o meio receptor de nifedipino nanoencapsulado foi maior ($p < 0,01$) que a solução de nifedipino em PEG 400 (NIFE), resultando em $5,60 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $2,19 \pm 1,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para NC-NIFE e

NIFE, respectivamente. Esse resultado pode ser explicado através das propriedades das nanocápsulas, o tamanho nanométrico permite a passagem por capilaridade que auxilia na permeação de substâncias através de membranas biológicas. Além disso, a maior área superficial dos nanossistemas favorece o contato com o local de aplicação (MOHANRAJ; CHEN, 2006; ROBERTS et al., 2017). A quantidade de nifedipino livre e nanoencapsulado no meio receptor está ilustrada na Figura 20.

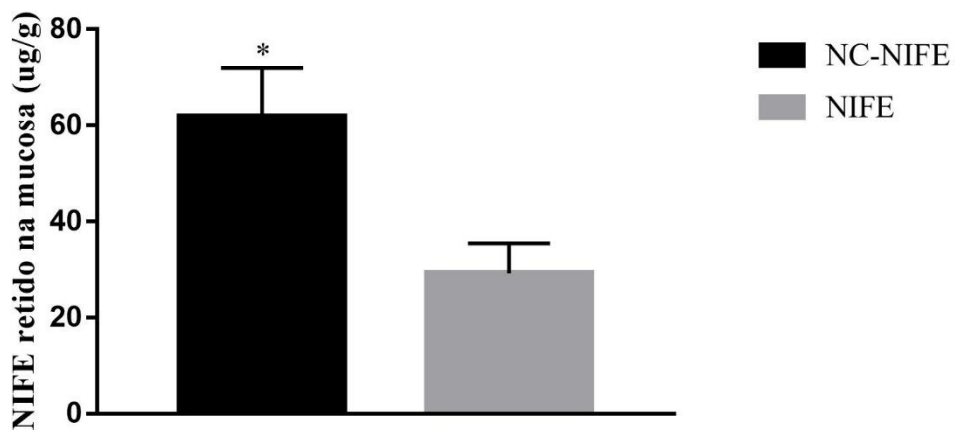
Figura 20 – Perfil de permeação do nifedipino em mucosa sublingual suína



Dados expressos como média \pm erro padrão da média ($n=4$). ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Bonferroni, onde: (***) $p < 0,001$; (***) $p < 0,001$: Diferença entre NC-NIFE e NIFE permeado para o meio receptor.

Ao final do experimento o nifedipino retido na mucosa sublingual foi quantificado. Os resultados demonstraram uma maior quantidade de fármaco ($p < 0,05$) presente na mucosa quando nanoencapsulado quando comparado ao NIFE livre (Figura 21). Esse resultado pode estar relacionado à característica catiônica do polímero Eudragit[®] RS100, que favorece a adesão da formulação no local de aplicação através de interação eletrostática com a mucosa sublingual (CHAVES et al., 2017; OSMARI et al., 2020). Assim, neste estudo foi possível mostrar de forma inédita que a nanoencapsulação promove maior permeação do nifedipino para o meio receptor e favorece a permanência da formulação no local de aplicação, aumentando a retenção do fármaco na mucosa sublingual.

Figura 21 – Quantidade de nifedipino retido na mucosa sublingual suína



Dados expressos como média \pm erro padrão da média ($n=4$). Teste t, onde: (*) $p < 0,05$: Diferença entre NC-NIFE e NIFE retido na mucosa.

6 CONCLUSÕES

- Neste trabalho foram preparadas nanocápsulas poliméricas contendo nifedipino utilizando Eudragit® RS100 como polímero e caracterizadas quanto a teor, eficiência de encapsulação, tamanho de partículas e potencial zeta;
- As suspensões de nanocápsulas desenvolvidas conferiram o dobro de proteção ao nifedipino frente à luz do dia quando comparadas ao fármaco livre;
- Embora a NC-NIFE tenha sido considerada citotóxica, ela reduziu a citotoxicidade do nifedipino e não apresentou efeitos de genotoxicidade em modelo de *Allium cepa*;
- As formulações demonstraram ser não-irritantes pelo ensaio do HET-CAM;
- A nanoencapsulação do nifedipino proporcionou liberação prolongada do fármaco;
- A nanoencapsulação promoveu maior permeação do nifedipino através da mucosa sublingual suína em comparação com o nifedipino em solução. Além disso, as suspensões de nanocápsulas proporcionaram maior retenção do fármaco na mucosa.

Assim, o desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo nifedipino mostrou-se promissor, visando aplicação por via sublingual, considerando que as nanocápsulas foram essenciais para promover a permeação do nifedipino através da mucosa.

7 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados promissores obtidos nesta dissertação, tem-se como perspectivas:

- (1) Avaliar a propriedade mucoadesiva das suspensões de nanocápsulas através da capacidade de interação com moléculas de mucina e pela adesão da formulação em mucosa sublingual suína utilizando fluxo salivar simulado;
- (2) Analisar a capacidade antioxidante *in vitro* das formulações;
- (3) Desenvolver uma forma farmacêutica sólida contendo as nanocápsulas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. et al. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 81–92, 2015.
- ADIBKIA, K. et al. Naproxen-eudragit® RS100 nanoparticles: Preparation and physicochemical characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 155–159, 2011.
- AHMED, M. G; KUMAR, K; KUMAR, S. Formulation and Evaluation of Nifedipine Transdermal Patches. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 8, p. 1785-1787, 2010.
- ALBERTS, D. S. et al. Fentanyl sublingual spray for breakthrough cancer pain in patients receiving transdermal fentanyl. **Pain management**, v. 6, n. 5, p. 427–434, 2016.
- ALI, S. L. Nifedipine. In: Florey, K. **Analytical profiles of drug substances**. San Diego: Academic Press, v.18, p.221, 1989.
- AL-NEMRAWI, N. K.; ABUALSAMEN, M. M.; ALZOUBI, K. H. Awareness about nanotechnology and its applications in drug industry among pharmacy students. **Currents in Pharmacy Teaching and Learning**, v. 12, n. 3, p. 274–280, 2020.
- AMAN, W.; THOMA, K. The influence of formulation and manufacturing process on the photostability of tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 243, n. 1-2, p. 33-41, 2002.
- AODAH, A.; BAFAIL, R. S.; RAWAS-QALAJI, M. Formulation and Evaluation of Fast-Disintegrating Sublingual Tablets of Atropine Sulfate: the Effect of Tablet Dimensions and Drug Load on Tablet Characteristics. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 5, p. 1624–1633, 2017.
- APOLINÁRIO, A. C. et al. ABRINDO A CAIXA DE PANDORA DOS NANOMEDICAMENTOS: HÁ REALMENTE MUITO MAIS “ESPAÇO LÁ EMBAIXO.” **Química Nova**, v. 43, n. 2, p. 212–225, 2020.
- ARAÚJO, R. S. et al. Cloxacillin benzathine-loaded polymeric nanocapsules: Physicochemical characterization, cell uptake, and intramammary antimicrobial effect. **Materials Science and Engineering C**, v. 104, 2019.
- BAGHEL, S.; CATHCART, H.; O'REILLY, N. J. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, 2016.
- BALTAZAR, L. O. **Caracterização do estado sólido de dispersões sólidas de nifedipino obtidas por secagem por aspersão**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba, PB, 2013.

BARANDA, A. B. et al. Instability of calcium channel antagonists during sample preparation for LC-MS-MS analysis of serum samples. **Forensic Science International**, v. 156, n. 1, p. 23–34, 2006.

Bayer Pharmaceuticals Corporation, 2016. The Package Insert of Adalat® Oros®Nifedipine extended Release Tablet. Bayer Standard.

BI, Y. et al. A liposomal formulation for improving solubility and oral bioavailability of nifedipine. **Molecules**, v. 25, n. 2, 2020.

BORDALLO, E.; TORNEIRO, M.; LAZZARI, M. Dissolution of amorphous nifedipine from micelle-forming carboxymethylcellulose derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 247, 2020.

BREDENBERG, S. et al. In vitro and in vivo evaluation of a new sublingual tablet system for rapid oromucosal absorption using fentanyl citrate as the active substance. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 3, p. 327–334, 2003.

BREM, R.; GUVEN, M.; KARRAN, P. Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p. 101–109, 2017.

CARDOSO, V. S. et al. Collagen-based silver nanoparticles: Study on cell viability, skin permeation, and swelling inhibition. **Materials Science and Engineering C**, v. 74, p. 382–388, 2017.

CASILLAS-FIGUEROA, F. et al. Argovit™ silver nanoparticles effects on allium cepa: Plant growth promotion without cyto genotoxic damage. **Nanomaterials**, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2020.

CERVI, V. F. et al. Pullulan film incorporated with nanocapsules improves pomegranate seed oil anti-inflammatory and antioxidant effects in the treatment of atopic dermatitis in mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 609, 2021.

CHANDRA, A. et al. Rapidly dissolving lacidipine nanoparticle strips for transbuccal administration. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 47, p. 259–267, 2018.

CHASSOT, J. M. et al. Pullulan as a stabilizer agent of polymeric nanocapsules for drug delivery. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 4, p. 735–740, 2016.

CHAUHAN, N. et al. Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 616–624, 2017.

CHAVES, P. D. S. et al. Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 88–95, 2017.

CHAVES, P. D. S. et al. Mucoadhesive Properties of Eudragit®RS100, Eudragit®S100, and Poly(ε-caprolactone) Nanocapsules: Influence of the Vehicle and the Mucosal Surface. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1637–1646, 2018.

CHAVES, P.D.S et al. SCC4 cell monolayers as an alternative sublingual barrier model: influence of nanoencapsulation on carvedilol transport. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 45, n. 1, p. 63–66, 2019.

CHAVES, P. D. S. et al. Sublingual tablets containing spray-dried carvedilol-loaded nanocapsules: development of an innovative nanomedicine. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 25, n. 9, p. 1053–1062, 2020.

CHINH, N. T. et al. Polylactic Acid/Chitosan Nanoparticles Loading Nifedipine: Characterization Findings and In Vivo Investigation in Animal. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 4, p. 2294–2303, 2018.

CHITTASUPHO, C. et al. Stability, permeation, and cytotoxicity reduction of capsicum extract nanoparticles loaded hydrogel containing wax gourd extract. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 12, p. 1538–1547, 2020.

CONTRI, R. V. et al. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: Influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 8, n. 7–8, p. 913–924, 2013.

CORRADO, M. C. **Uso do método het-cam como modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial tóxico de dentifrícios**. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, RJ, 2007.

CRECENTE-CAMPO, J. et al. The size and composition of polymeric nanocapsules dictate their interaction with macrophages and biodistribution in zebrafish. **Journal of Controlled Release**, v. 308, p. 98–108, 2019.

DAUDT, R. M. et al. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, 2013.

DE ANDRADE, D. F. et al. Assessing the In Vitro Drug Release from Lipid-Core Nanocapsules: a New Strategy Combining Dialysis Sac and a Continuous-Flow System. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 6, p. 1409–1417, 2015.

DE LIMA, J. A. et al. Novel Pemulen/Pullulan blended hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapsules: Evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 886–893, 2017.

DENG, S. et al. Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: Current status, challenges and opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, 2020.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.

D'SOUZA, S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances in Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

- DURAN, T. H. et al. Evaluation of different light conditions in the working environment for handling photosensitive and thermolabile compounds. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 6, p. 1491–1495, 2015.
- EL-MASRY, S. M.; EL-KHODARY, N. M. Pharmacokinetic and Tolerability Comparison of Sustained and Immediate Release Oral Formulations of Nifedipine Tablet Formulations: A Single-Dose, Randomized, Open-Label, Two-Period, Two-Way Crossover Study in Healthy, Fasting Egyptian Male Volunteers. **Drug research**, v. 70, n. 2–3, p. 91–96, 2020.
- ENGLERT, A. V. et al. Diphenyl Diselenide and Clotrimazole Co-loaded into Eudragit® RS 100 Nanocapsules Formulation Has Superior Antioxidant Potential and Promising Anti-candida Activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, p. 1–12, 2020.
- ESTEVEZ, N. L. S. et al. Development of carvedilol-loaded lipid nanoparticles with compatible lipids and enhanced skin permeation in different skin models. **Journal of Microencapsulation**, v. 38, n. 2, p. 124–133, 2021.
- FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.
- FILGUEIRA, G. C. DE O. et al. Effect of type 2 diabetes mellitus on the pharmacokinetics and transplacental transfer of nifedipine in hypertensive pregnant women. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 83, n. 7, p. 1571–1579, 2017.
- FILON, F. L. et al. Palladium nanoparticles exposure: Evaluation of permeation through damaged and intact human skin. **Environmental Pollution**, v. 214, p. 497–503, 2016.
- FRANK, L. A. et al. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 5, p. 623–639, 2015.
- FRANK, L. A. et al. The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: Increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 202–212, 2017.
- FRATTER, A.; BIAGI, D.; CICERO, A. F. G. Sublingual delivery of astaxanthin through a novel ascorbyl palmitate-based nanoemulsion: Preliminary data. **Marine Drugs**, v. 17, n. 9, 2019.
- FISKESJÖ, Geirid. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.
- FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.
- FUJIMOTO, Y. et al. Photostable Solid Dispersion of Nifedipine by Porous Calcium Silicate. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 64, n. 8, p. 1218-1221, 2016.

GAO, Z. et al. Effects of Dissolution Medium pH and Simulated Gastrointestinal Contraction on Drug Release From Nifedipine Extended-Release Tablets*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 3, p. 1189–1194, 2019.

GAO, Z. et al. Enhanced curcumin solubility and antibacterial activity by encapsulation in PLGA oily core nanocapsules. **Food & Function**, v. 11, n. 1, p. 448-455, 2020.

GEHRCKE, M. et al. Enhanced photostability, radical scavenging and antitumor activity of indole-3-carbinol-loaded rose hip oil nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 74, p. 279–286, 2017.

GEHRCKE, M. et al. Nanocapsules improve indole-3-carbinol photostability and prolong its antinociceptive action in acute pain animal models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 133–141, 2018.

GEHRCKE, M. et al. Incorporation of nanocapsules into gellan gum films: A strategy to improve the stability and prolong the cutaneous release of silibinin. **Materials Science and Engineering C**, v. 119, 2021.

GHOSH, M. et al. Effects of ZnO nanoparticles in plants: Cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 807, p. 25–32, 2016.

GOSWAMI, T., JASTI, B. R., Li, X. Sublingual drug delivery. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v.25, n.5, p. 449-484, 2008.

GRANADA, A. et al. Nifedipine-loaded polymeric nanocapsules: Validation of a stability-indicating HPLC method to evaluate the drug entrapment efficiency and in vitro release profiles. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 2, p. 276–281, 2013.

GRILLO, R. et al. Poly(ϵ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231–232, p. 1–9, 2012.

GROOFF, D. et al. Photostability of crystalline versus amorphous nifedipine and nimodipine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 6, p. 1883–1894, 2013.

GUIDELINE. **ICH Harmonized Tripartite. Validation of analytical procedures: Text and Methodology**. Q2 (R1), v. 1, 2005.

HABIB, B. A. et al. Formulation, characterization, optimization, and *in vivo* performance of febuxostat self-nano-emulsifying system loaded sublingual films. **Drug Delivery**, v. 28, n. 1, p. 1321-1333, 2021.

HAYASE, N. et al. Newly Discovered Photodegradation Products of Nifedipine in Hospital Prescriptions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 4, p. 532-538, 1994.

HAZNAR-GARBACZ, D. et al. Melts of Octaacetyl Sucrose as Oral-Modified Release Dosage Forms for Delivery of Poorly Soluble Compound in Stable Amorphous Form. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 951–960, 2018.

HOLPUCH, A. S. et al. Nanoparticles for local drug delivery to the oral mucosa: Proof of principle studies. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 7, p. 1224–1236, 2010.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.

HUA, S. Advances in nanoparticulate drug delivery approaches for sublingual and buccal administration. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

HUANG, J. et al. Nifedipine solid dispersion in microparticles of ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend for controlled drug delivery. Effect of drug loading on release kinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 319, n. 1–2, p. 44–54, 2006.

ILLANGAKOON, U. E. et al. Fast dissolving paracetamol/caffeine nanofibers prepared by electrospinning. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 369–379, 2014.

ISLAM, M. T. et al. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, v. 177, p. 93–101, 2017.

JAHANGIRI, A.; BARGHI, L. Polymeric nanoparticles: review of synthesis methods and applications in drug delivery. **Journal of Advanced Chemical and Pharmaceutical Materials**, v. 1, n. 2, p. 38–47, 2018.

JANA, U. et al. Preparation and characterization of nebivolol nanoparticles using Eudragit® RS100. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 269–275, 2014.

JANNIN, V. et al. Development of self emulsifying lipid formulations of BCS class II drugs with low to medium lipophilicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, n. 1, p. 385–392, 2015.

DALCIN, A. J. F.; OURIQUE, A. F.; GOMES, P. Cationic nanocapsules containing Eudragit RS100® and its potential for application in nanomedicine. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 18, n. 3, p. 545–566, 2017.

KATARA, R.; SACHDEVA, S.; MAJUMDAR, D. K. Design, characterization, and evaluation of aceclofenac-loaded Eudragit RS 100 nanoparticulate system for ocular delivery. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 24, n. 3, p. 368–379, 2019.

KATZER, T. et al. Prednisolone-loaded nanocapsules as ocular drug delivery system: Development, in vitro drug release and eye toxicity. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 6, p. 519–528, 2014.

KHATTAB, W. M.; ZEIN EL-DEIN, E. E.; EL-GIZAWY, S. A. Formulation of lyophilized oily-core poly- ϵ -caprolactone nanocapsules to improve oral bioavailability of Olmesartan Medoxomil. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 5, p. 795–805, 2020.

KIRIYAMA, A. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses of antihypertensive drugs, nifedipine and propranolol, in spontaneously hypertensive rats to investigate characteristics of effect and side effects. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 76, p. 21–29, 2016.

KOTAK, D. J.; DEVARAJAN, P. V. Bone targeted delivery of salmon calcitonin hydroxyapatite nanoparticles for sublingual osteoporosis therapy (SLOT). **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 24, 2020.

KRAMBECK, K. et al. Lipid nanocarriers containing Passiflora edulis seeds oil intended for skin application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, 2020.

LAI, K. L. et al. Orally-dissolving film for sublingual and buccal delivery of ropinirole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 9–18, 2018.

LA'PORTE, S. J.; JUTTILA, J. K.; LINGAM, R. K. Imaging the floor of the mouth and the sublingual space. **Radiographics**, v. 31, n. 5, p. 1215–1230, 2011.

LEAL-JÚNIOR, C. C. et al. Effectiveness of an oral versus sublingual loading dose of nifedipine for tocolysis. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 148, n. 3, p. 310–315, 2020.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, p. 287-291, 1985.

MAAFI, W.; MAAFI, M. Modelling nifedipine photodegradation, photostability and actinometric properties. **International journal of pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 153–164, 2013.

MANCIA, G. et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **Journal of Hypertension**, v. 25, n. 6, p. 1105-1187, 2007.

MANGALAMPALLI, B.; DUMALA, N.; GROVER, P. Allium cepa root tip assay in assessment of toxicity of magnesium oxide nanoparticles and microparticles. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 66, p. 125–137, 2018.

MANTAS, A.; MIHRANYAN, A. Immediate-release nifedipine binary dry powder mixtures with nanocellulose featuring enhanced solubility and dissolution rate. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 1, 2019.

MARCHIORI, M. L. et al. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: Preparation, characterization, and in vitro drug release study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 8, p. 962–971, 2010.

MAŠEK, J. et al. Multi-layered nanofibrous mucoadhesive films for buccal and sublingual administration of drug-delivery and vaccination nanoparticles - important step towards effective mucosal vaccines. **Journal of Controlled Release**, v. 249, p. 183–195, 2017.

MATTIAZZI, J. et al. Incorporation of 3,3'-Diindolylmethane into Nanocapsules Improves Its Photostability, Radical Scavenging Capacity, and Cytotoxicity Against Glioma Cells. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 2, 2019.

MAZZARINO, L.; BORSALI, R.; LEMOS-SENNA, E. Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: A new strategy for buccal curcumin release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 11, p. 3764–3771, 2014.

MEANS, L.; BENKEN, S. T.; TESORO, E. P. Safety of Immediate-Release Nifedipine. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 395-399, 2016.

MICHELS, L. R. et al. Effects of surface characteristics of polymeric nanocapsules on the pharmacokinetics and efficacy of antimalarial quinine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 10165–10178, 2019.

MINKOWITZ, H. S. et al. Sufentanil Sublingual Tablet 30 mcg for the Management of Pain Following Abdominal Surgery: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase-3 Study. **Pain Practice**, v. 17, n. 7, p. 848–858, 2017.

MOFFAT, J. G. et al. Analysis of single particle photodegradation using photothermal infrared microspectroscopy. **Analyst**, v. 138, n. 8, p. 2315–2322, 2013.

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

MOORE, D. E. Standardization of Kinetic Studies of Photodegradation Reactions. In: TØNNESEN, H.H. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2 ed. Flórida: CRC, Cap. 3, p. 41, 2004.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

MORSI, N. M. et al. Engineering of a novel optimized platform for sublingual delivery with novel characterization tools: In vitro evaluation and in vivo pharmacokinetics study in human. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 918–931, 2017.

MOTA, A. C. V. et al. In vivo and in vitro evaluation of octyl methoxycinnamate liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4689–4700, 2013.

MURAKAMI, F. S. et al. Estudo de Estabilidade de Comprimidos Gastro-Resistentes contendo 20 mg de Omeprazol. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 5, p. 645-652, 2009.

NAWALAGE, S. K.; PATHIRATNE, A. Application of cytogenetic model *Allium cepa* for screening potential cytogenotoxicity of herbal-based hair dyes. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 55, n. 11, p. 1366–1372, 2020.

ODANI, N. et al. Determining the effect of photodegradation on film coated nifedipine tablets with terahertz based coating thickness measurements. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 145, p. 35–41, 2019.

OLIVEIRA, L. T. et al. Impact of dose and surface features on plasmatic and liver concentrations of biodegradable polymeric nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 19–32, 2017.

ONG, S. G. M. et al. Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of griseofulvin-loaded liposomes. **Pharmaceutics**, v. 8, n. 3, 2016.

OSMARI, B. F. et al. Gellan gum-based hydrogel containing nanocapsules for vaginal indole-3-carbinol delivery in trichomoniasis treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 151, 2020.

PARODI, B. et al. Development and characterization of a mucoadhesive sublingual formulation for pain control: extemporaneous oxycodone films in personalized therapy. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 6, p. 917–924, 2017.

PATEL, V. F.; LIU, F.; BROWN, M. B. Advances in oral transmucosal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 2, p. 106–116, 2011.

PATIL, N. H.; DEVARAJAN, P. V. Insulin-loaded alginic acid nanoparticles for sublingual delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 2, p. 429–436, 2016.

PAWAR, A. P. et al. Development of photostable gastro retentive formulation for nifedipine using low-density polypropylene microporous particles. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, n. 5, p. 409–416, 2012.

PEGORARO, N. S. et al. Improved photostability and cytotoxic effect of coenzyme Q10 by its association with vitamin E acetate in polymeric nanocapsules. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 4, p. 400–406, 2018.

POHLMANN, A. R. et al. Polymeric nanocapsules for topical delivery In: **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers**, p. 201–221, 2016.

PONTREMOLI, R.; LEONCINI, G.; PARODI, A. Use of nifedipine in the treatment of hypertension. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 3, n. 1, p. 43–50, 2005.

PRADO, V. C. et al. Development of a nanotechnological-based hydrogel containing a novel benzofuroazepine compound in association with vitamin E: An in vitro biological safety and photoprotective hydrogel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 199, 2021.

RAJESHWARI, A. et al. Toxicity evaluation of gold nanoparticles using an *Allium cepa* bioassay†. **RSC Advances**, v. 6, p. 24000–24009, 2016.

RATA, D. M. et al. Topical formulations containing aptamer-functionalized nanocapsules loaded with 5-fluorouracil - An innovative concept for the skin cancer therapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 119, 2021.

RAUCK, R. L. et al. Pharmacokinetics of Fentanyl Sublingual Spray in Opioid-Naïve Participants: Results of a Phase 1, Multiple Ascending Dose Study. **Clinical Drug Investigation**, v. 38, n. 8, p. 715–726, 2018.

REBIBO, L. et al. Topical tacrolimus nanocapsules eye drops for therapeutic effect enhancement in both anterior and posterior ocular inflammation models. **Journal of Controlled Release**, v. 333, p. 283–297, 2021.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. **Mechanisms of Development**, v. 141, p. 70-77, 2016.

RIVERO, M. N. et al. Comparison between HET-CAM protocols and a product use clinical study for eye irritation evaluation of personal care products including cosmetics according to their surfactant composition. **Food and Chemical Toxicology**, v. 153, p. 112229, 2021.

ROBERTS, M. S. et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 86-105, 2017.

ROBLEGG, E. et al. Evaluation of a physiological in vitro system to study the transport of nanoparticles through the buccal mucosa. **Nanotoxicology**, v. 6, n. 4, p. 399–413, 2012.

ROSA, P. et al. Desonide nanoencapsulation with açai oil as oil core: Physicochemical characterization, photostability study and in vitro phototoxicity evaluation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 199, 2019.

SADEGHI, M. et al. DC-targeted gold nanoparticles as an efficient and biocompatible carrier for modulating allergic responses in sublingual immunotherapy. **International Immunopharmacology**, v. 86, 2020.

SÁNCHEZ, A.; MEJÍA, S. P.; OROZCO, J. Recent advances in polymeric nanoparticle-encapsulated drugs against intracellular infections. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3760, 2020.

SANTIS, A. K. et al. Nifedipine in semi-solid formulations for topical use in peripheral vascular disease: Preparation, characterization, and permeation assay. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 7, p. 1098–1106, 2013.

SANTOS, S. S. et al. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1389–1394, 2013.

SARI, M. H. M. et al. p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide-loaded polymeric nanocapsules as a novel approach to inflammatory pain treatment: Behavioral, biochemistry and molecular evidence. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 38–45, 2018.

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

SCHERER, M. D. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence. **Science of the Total Environment**, v. 660, p. 459-467, 2019.

SEREMETA, K. P.; CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly(ϵ -caprolactone), Eudragit® RS 100 and poly(ϵ -caprolactone)/Eudragit® RS 100 blend submicron particles for the sustained release of the antiretroviral efavirenz. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 441–449, 2013.

SHAHGORDI, S. et al. Immune responses modulation by curcumin and allergen encapsulated into PLGA nanoparticles in mice model of rhinitis allergic through sublingual immunotherapy. **International Immunopharmacology**, v. 84, 2020.

SHETTY, S; GOKUL, S. Keratinization and its Disorders. **Oman Medical Journal**, v. 27, n. 5, p. 348-357, 2012.

SINGH, J. et al. The Role of a Single Dose of Sublingual Nifedipine in Managing Hypertensive Emergencies in the Patients who Undergo Haemodialysis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 6, n. 10, p. 1740-1743, 2012.

SOLANKI, P.; KITAWAT, S.; DASHORA, A. Nanocapsules Used in Drug Delivery System. **International Journal of Pharmaceutical Erudition**, v. 6, n. 4, p. 1-10, 2017.

SOLARI, S. et al. Sublingual tacrolimus administration provides similar drug exposure to per-oral route employing lower doses in liver transplantation: a pilot study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 45, n. 9, p. 1225–1231, 2017.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

SOSNIK, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 12, p. 2030-2075, 2014.

SOUZA, R. P.; JUNIOR, A. J. O. P.; VOLPATO, R. O espaço sublingual. **Radiologia Brasileira**, v. 36, n. 1, 35-40, 2003.

SUZUKI, S. et al. Sublingual administration of liposomes enclosing alpha-galactosylceramide as an effective adjuvant of allergen immunotherapy in a murine model of allergic rhinitis. **Allergology International**, v. 68, n. 3, p. 352–362, 2019.

TAGLIARI, M. P. et al. Development of oral nifedipine-loaded polymeric nanocapsules: Physicochemical characterisation, photostability studies, in vitro and in vivo evaluation. **Quimica Nova**, v. 38, n. 6, p. 781–786, 2015.

TEDESCO, S. B.; DAIL, H.; IV, L. **Bioindicator of Genotoxicity: The Allium cepa Test**. Environmental Contamination, p. 137-156, 2012.

TEUBL, B. J. et al. In-vitro permeability of neutral polystyrene particles via buccal mucosa. **Small**, v. 9, n. 3, p. 457–466, 2013.

TOAL, C. B. Formulation Dependent Pharmacokinetics-Does the Dosage Form Matter for Nifedipine?. **Journal Cardiovasc Pharmacol**, v. 44, n. 1, p. 82-86, 2004.

TOAL, C. B.; MEREDITH, P. A.; ELLIOTT, H. L. Long-acting dihydropyridine calcium-channel blockers and sympathetic nervous system activity in hypertension: A literature review comparing amlodipine and nifedipine GITS. **Blood Pressure**, v. 21, n. SUPPL. 1, p. 3–10, 2012.

WANG, Z.; CHOW, M. S. S. Overview and appraisal of the current concept and technologies for improvement of sublingual drug delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 5, n. 7, p. 807-816, 2014.

WASAN, E. K. et al. Development of a UV-stabilized topical formulation of nifedipine for the treatment of Raynaud phenomenon and Chilblains. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, 2019.

WEBER, J. et al. Association of borage oil and betamethasone dipropionate in lipid-core nanocapsules: characterization, photostability and in vitro irritation test. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 2, p. 1354–1362, 2016.

WEERAPOL, Y. et al. Spontaneous Emulsification of Nifedipine-Loaded Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 2, p. 435–443, 2014.

World Health Organization Model List of Essential Medicines – 22nd List, 2021.

YU, M. et al. Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags. **Journal of Controlled Release**, v. 315, p. 23–30, 2019.

ZIELINSKA, A. et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3731, 2020.