

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA DOSEAMENTO DE CLOZAPINA EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Validation of high performance Liquid Chromatographic Method for the
determination of Clozapine in Polymeric Nanoparticles

BIENIEK, D. D.
BESSEGATO, T. C.
SANSONE, P. E. S.
DALLA COSTA, T.
GUTERRES, S.S.
CONRADO, D. J.
HAAS, S. E.

Recebimento: 11/03/2010 - Aceite: 13/07/2010

RESUMO: A clozapina é o protótipo dos fármacos antipsicóticos atípicos e apresenta um perfil terapêutico melhorado em relação aos antipsicóticos convencionais, sendo eficaz no tratamento dos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia. Esse fármaco, todavia, pode induzir agranulocitose, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, que limitam sua utilização clínica. Nesse sentido, foram desenvolvidos sistemas poliméricos nanoparticulados contendo clozapina, visando a vetorização do fármaco para o sistema nervoso central, reduzindo os níveis de concentração do mesmo nos tecidos periféricos, e, conseqüentemente, a ocorrência desses efeitos adversos. Neste trabalho, um método analítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi validado para quantificar clozapina em nanopartículas poliméricas. As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema CLAE, com detector de arranjo de fotodiodos (comprimento de onda de 278 nm), mediante emprego de coluna C_8 , eluição isocrática com acetonitrila-tampão fosfato 50 mM pH 3,8 (60:40, v/v) e fluxo de 1,5 mL/min. A validação da metodologia analítica para quantificação da clozapina em nanopartículas poliméricas seguiu legislações

internacionais vigentes no país e mostrou-se específica, exata, precisa e linear na faixa de concentração da clozapina entre 1,0 – 32,0 µg/mL.

Palavras-chave: Clozapina. Nanopartículas poliméricas. Validação. CLAE.

ABSTRACT: The clozapine is the prototype of the atypical antipsychotic drugs, and shows an improved therapeutics profile comparing to the conventional antipsychotic drugs, being effective in the positive and negative schizophrenia symptoms. This drug, however, may induce agranulocytosis, hepatotoxicity and cardiotoxicity, which limits its clinical use. In this context, it was developed nanoparticles polymeric systems loaded with clozapine, with the aim of targeting the drug into the nervous central system, reducing its concentration levels in the peripheral tissues, and, consequently, the occurrence of these adverse effects. In this work, an analytical method using high performance liquid chromatography (HPLC) was validated for quantifying the clozapine in the polymeric nanoparticles. The chromatography analysis were made in a HPLC system, with an arrange of photodiode detectors (wavelength of 278 nm), using the C8 column, isocratic elution with acetonitrile-phosphate buffer 50 mM pH 3.8 (60:40,v/v) and flow of 1.5 mL/min. The validation of the analytical methodology for clozapine quantification in polymeric nanoparticles followed current national and international laws and has showed to be specific, exact, accurate and linear in the range of concentration of the clozapine between 1.0 – 32.0 µg/mL.

Keywords: Clozapine. Polymeric nanoparticles. Validation. HPLC.

Introdução

A clozapina (Figura 1) é o protótipo dos fármacos antipsicóticos atípicos e apresenta um perfil terapêutico melhorado em relação aos antipsicóticos convencionais, ou seja, eficaz sobre os sintomas positivos e negativos da esquizofrenia (GASZNER; MAKKOS, 2004). Além disso, é o primeiro fármaco a apresentar efeitos extrapiramidais insignificantes, bem como o agente mais efetivo no tratamento da esquizofrenia refratária (DASKALAKIS; GEORGE, 2009). No entanto, alguns efeitos adversos da clozapina, como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e a indução à agranulocitose, associado a sua baixa biodisponibilidade, tem limitado

seu uso clínico (MELTZER, 2004; HAAS et al., 2007)

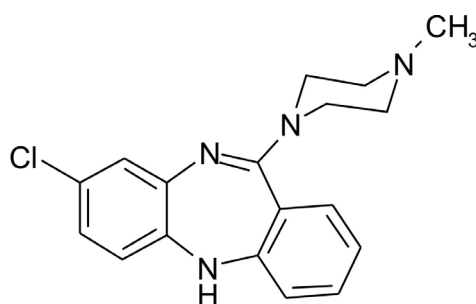


Figura 1 - Estrutura química da Clozapina
Fonte: Conrado (2006, p. 05)

O aumento da utilização clínica da clozapina pode beneficiar milhares de pacientes.

Uma forma de alcançar esse objetivo pode ser por meio da redução dos efeitos adversos limitantes da clozapina. Para tanto, o desenvolvimento de uma forma farmacêutica capaz de vetorizar a clozapina para o sistema nervoso central, reduzindo seus efeitos periféricos indesejáveis, faz dos sistemas nanoparticulados promissores candidatos a essa finalidade. Esses sistemas são úteis não apenas para a proteção de fármacos contra a degradação, mas também na redução da toxicidade e ocorrência de efeitos adversos (SOPPIMATH et al., 2001; BERNARDI et al., 2009). Especificamente, pode-se ainda enfatizar que os sistemas nanoparticulados de longa circulação, que possuem a sua superfície modificada com PEG, por exemplo, são capazes de diminuir a captação de fármacos por órgãos e tecidos pertencentes ao sistema retículo endotelial, como a medula óssea e o fígado (MOSQUEIRA et al., 2001), potencialmente relacionados com a toxicidade da clozapina.

A quantificação de fármacos em nanopartículas é preferencialmente realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), devido à sensibilidade e precisão deste método, o que justifica a necessidade de uma metodologia validada para a análise pretendida. Todos os métodos para a determinação quantitativa de fármacos devem ser validados para garantir a segurança e confiabilidade dos resultados obtidos. Dessa forma, a validação é definida como o ato documentado que atesta que determinado procedimento, processo, material, atividade ou sistema, estejam realmente conduzindo aos resultados esperados. Para tanto, deve apresentar: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e limite inferior de quantificação, conforme aplicação analítica do método em questão (ICH, 1997; BRASIL, 2003).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer e validar uma

metodologia analítica para o doseamento da clozapina em nanopartículas poliméricas.

Materiais e Métodos

Substâncias químicas e reagentes

Clozapina 99,6 % de pureza (marca Cristália).

- Fosfato de sódio monobásico.
- Ácido ortofosfórico 10%.
- Metanol grau CLAE.
- Acetonitrila grau CLAE.
- Água purificada através de sistema Milli-Q para uso em CLAE.

Materiais e equipamentos

- Membrana de filtração Millipore 0,45 µm.
- Pré-coluna CLC G-C8, Shim-pack.
- Coluna Shim-pack CLC – C8 (M) 15 cm.
- Balança analítica Swiss Quality modelo 205 AM – FRSCS.
- Agitador de tubos tipo vórtex.
- Bomba de vácuo modelo TE-058.
- Centrífuga refrigerada para eppendorf modelo 5403.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Agilent constituído de: autoinjeter (G1313A ALS/ DE43627042), índice de refração (G1362A RID/ CN43801513), detector por arranjo de fotodiodos (G1315B DAD/ DE43623397), bomba (G1311A Quatpump/ DE43628965), degaseificador (G1379A Degasser/ JP40718537) e software chamstations.

As vidrarias utilizadas foram selecionadas de um único fabricante.

Condições Cromatográficas

Com o objetivo de quantificar clozapina em nanopartículas poliméricas, utilizaram-se as condições iniciais descritas por TITIER e colaboradores (2003).

A fase móvel estabelecida foi constituída de tampão fosfato e acetonitrila (60:40, v/v), utilizando um fluxo de 1,5 mL/min. O tampão fosfato (50 mM, pH 3,8) foi preparado pela dissolução de 6 gramas de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) em 1000 mL de água Milli-Q ajustando o pH a 3,8 com ácido ortofosfórico 10% (H₃PO₄). O tampão foi filtrado através de uma membrana de filtração Millipore 0,45 µm com auxílio de bomba de vácuo.

A análise cromatográfica das amostras e soluções padrões foi realizada em temperatura ambiente mediante emprego de pré-coluna e coluna C8. Após a realização de uma varredura espectrofotométrica, estabeleceu-se o comprimento da onda de detecção de 278 nm, utilizando detector com arranjo de fotodiodos. A programação do auto-injetor foi realizada de modo que o volume de amostra processada a ser injetada correspondesse a 20 µL.

Solução padrão

Uma solução metanólica foi preparada pela adição de 12,5 mg de clozapina em balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se uma solução padrão de 500 µg/mL.

Curva de Calibração

As amostras da curva de calibração foram preparadas a partir da solução padrão de clozapina de 500 µg/mL. Aliquotas de 20, 40, 160, 320 e 640 µl foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, previamente identificados. Os volumes finais foram completos com acetonitrila obtendo-se as

concentrações finais da curva padrão: 1,0; 2,0; 8,0; 16,0 e 32,0 µg/mL.

Controles de Qualidade

Os controles de qualidade foram preparados a partir da solução padrão de clozapina 500 µg/mL. Dessa solução, alíquotas de 60, 180 e 540 µl foram retiradas e transferidas para balões volumétricos de 10 mL, previamente identificados. Em seguida, foi adicionado, em cada balão, 100 µL de suspensão de nanopartículas poliméricas brancas, completando cada balão com acetonitrila, obtendo-se concentrações finais de 3,0; 9,0 e 27,0 µg/mL. As soluções foram homogeneizadas para dissolução completa das nanocápsulas e filtradas utilizando membrana de 0,45 µm, para a retirada de possíveis interferentes. As nanopartículas poliméricas brancas contendo o fármaco foram desenvolvidas e caracterizadas previamente (SANSONE, 2009).

Processamento das amostras

Para a determinação do teor, as amostras foram preparadas de forma semelhante aos controles de qualidade, sendo que nas amostras foram adicionados 100 µl de suspensão de nanopartículas poliméricas contendo clozapina diferentemente dos controles de qualidade onde foram adicionadas nanopartículas brancas (sem o fármaco). As suspensões foram tratadas com acetonitrila com a finalidade de promover a dissolução do polímero. Após a solubilização, as soluções foram filtradas utilizando membrana de 0,45 µm, para a retirada de possíveis interferentes. A medida da quantidade total de clozapina foi realizada através de CLAE.

Procedimento de Validação

A metodologia analítica foi validada em termos de linearidade, exatidão, precisão, especificidade e limite inferior de quantifica-

ção. Todos esses parâmetros foram avaliados por meio de curvas padrão e controles de qualidade, de acordo com os critérios estabelecidos pela Resolução 899/2003 da ANVISA e ICH, 1997.

A análise da linearidade do método foi avaliada através da determinação de cinco níveis de concentrações de clozapina da curva padrão (1,0; 2,0; 8,0; 16,0 e 32,0 µg/mL). Por meio da análise de regressão simples, foram obtidas equações de reta que representaram todas as curvas padrão. Inclinações, interceptos e coeficientes de correlação foram determinados. A análise estatística para avaliação da linearidade e desvio da linearidade foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA).

A exatidão e a precisão do método puderam ser demonstradas por meio da preparação, em triplicata, de três níveis de concentração de clozapina: baixo, médio e alto (3,0; 9,0 e 27,0 µg/mL), correspondentes aos controles de qualidade. A precisão foi avaliada ao nível de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia), enquanto que a exatidão do método foi calculada a partir da recuperação do fármaco e expressa em termos de percentagem de recuperação. Este procedimento foi realizado a cada dia, por três dias consecutivos.

A especificidade foi estabelecida através da recuperação de uma concentração de fármaco adicionada a uma suspensão de nanocápsulas brancas. Esta foi avaliada através da comparação entre os cromatogramas obtidos, investigando a existência de picos interferentes nos tempos de retenção da clozapina. Os cromatogramas referentes à curva padrão foram comparados àqueles referentes às amostras, a fim de avaliar a presença de substâncias interferentes.

O limite inferior de quantificação (LD), ou seja, o menor nível de concentração determinado com exatidão e precisão aceitáveis, foi estabelecido por meio da seguinte equação:

$LD = DP \times 10 / IC$, onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y e IC é a inclinação da curva analítica.

Resultados e Discussão

Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A linearidade pode ser avaliada pela inspeção visual dos sinais plotados em função da concentração do analito. Existindo uma relação linear, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos adequados, como por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrado, e a determinação do coeficiente de correlação (ICH, 1997).

A faixa de concentração utilizada para a validação da curva padrão foi de 1,0 a 32,0 µg/mL de clozapina, intervalo este no qual foi observada a linearidade do método analítico. A média das três curvas padrão em acetoneitrila, utilizadas na validação da metodologia analítica por CLAE-PDA, está representada na Figura 2, com respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (R^2).

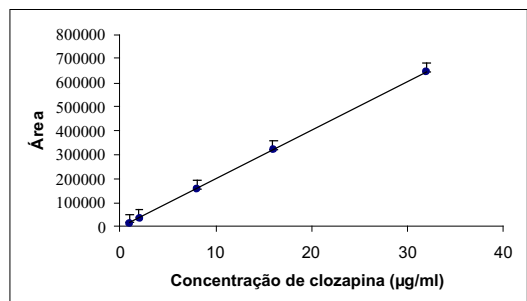


Figura 2 - Representação gráfica da média das três curvas padrão no intervalo de concentração de 1,0 a 32,0 µg/mL, quantificada por CLAE (n = 3), para cada ponto da curva.

Da mesma forma, foram calculados individualmente os coeficientes de correlação para todas as curvas padrão empregadas na validação, assim como suas respectivas inclinações e interceptos (Tabela 1). Os coeficientes de correlação obtidos, iguais ou superiores a 0,9998, indicam a linearidade entre a área do analito e a concentração teórica deste analito, tendo em vista o menor valor aceitável de 0,99 (BRASIL, 2003). A linearidade da curva padrão foi também avaliada através de análise de variância (ANOVA), sendo que houve regressão linear significativa para a curva padrão, sem desvio da linearidade ($\alpha = 0,05$).

Tabela 1 - Resultados do tratamento estatístico das curvas de linearidade para quantificação da clozapina em nanopartículas poliméricas.

Curva	Inclinação	Intersecção com o eixo y	Coefficiente de Correlação
Dia 1	20144	-2738,7	0,9998
Dia 2	19157	-2197,7	1,0000
Dia 3	21451	-4213,8	0,9999
Média (n = 3)	20250,67		
D.P. ¹	1150,71		
D.P.R. (%) ²	5,68		

¹ D.P., desvio padrão; ² D.P.R., desvio padrão relativo

Exatidão

Para determinar a exatidão, deve-se aplicar a metodologia proposta na análise de uma substância de pureza conhecida e, desta forma, é possível analisar a proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

Os resultados da análise da exatidão e a faixa de concentração determinada experimentalmente para as amostras de controle de qualidade estão demonstrados na Tabela

2. De acordo com a Resolução 899/2003 da ANVISA, a variação entre o valor real e o valor teórico das amostras deve ser inferior ou igual a 5%. Nesse sentido, é possível observar que a exatidão calculada para as amostras não apresentou variação superior a 5%, o que indica que o método é exato para a faixa de concentração empregada.

Tabela 2 - Avaliação da exatidão do método analítico para quantificação de clozapina em suspensão de nanopartículas poliméricas.

Concentração nominal ($\mu\text{g/ml}$)	Faixa ($\mu\text{g/ml}$)	Exatidão (%) [*]
3,0	2,9-3,1	96,6-103,3
9,0	8,8-9,3	97,8-103,3
27,0	26,8-28,4	99,3-105,2

* n = 9 observações.

Precisão

A precisão é o parâmetro que avalia o grau de concordância entre resultados de análises individuais, quando o método é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea. A avaliação desse parâmetro é realizada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-dia), que significa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, e a precisão intermediária (inter-dia), a qual representa a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes de análise (BRASIL, 2003).

Os valores de desvio padrão relativo intra-dia e inter-dia obtidos para as três amostras de controles de qualidade podem ser visualizados na Tabela 3. Segundo a Resolução 899/2003 da ANVISA, os desvios padrão relativos para a precisão não devem exceder 5%. Assim, pode-se observar que os valores encontrados (menores que 4%) estão de acordo com o preconizado para este parâmetro nos dois níveis avaliados.

Tabela 3 - Avaliação da precisão do método analítico para quantificação de clozapina em nanopartículas poliméricas através da análise da variação intra e inter-dia.

Concentração nominal	Dia	Concentração experimental ¹ Média (µg/ml)	D.P.	D.P.R. %
Variação intra-dia 3,0 µg/ml	1	3,10	0,02	0,80
	2	2,97	0,04	1,39
	3	2,98	0,07	2,22
9,0 µg/ml	1	8,98	0,27	2,97
	2	9,19	0,21	2,33
	3	9,22	0,20	2,16
27,0 µg/ml	1	27,73	0,23	0,82
	2	27,89	0,93	3,35
	3	27,30	0,43	1,69
Variação inter-dia				
	3,0 µg/ml	3,02	0,07	2,25
	9,0 µg/ml	9,13	0,13	1,44
	27,0 µg/ml	27,64	0,30	1,10

¹Valores (média e D.P.) representam a média de 3 observações.

Especificidade

A especificidade é a capacidade que o método possui de determinar o analito inequivocadamente, na presença de outros componentes, que podem ser impurezas, produtos de degradação ou excipientes (BRASIL, 2003). Este parâmetro pode ser comprovado através da comparação entre os resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes. Neste caso, as amostras foram contaminadas com alíquotas de suspensões

de nanopartículas brancas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado pelos materiais que foram utilizados na preparação.

Pode-se observar, a partir da análise dos cromatogramas sem o fármaco (2A), com o fármaco (2B) e com a uma amostra de nanopartículas brancas contaminadas com clozapina (2C), que não há interferentes saindo no mesmo tempo de retenção do fármaco (em torno de 2 minutos). A Figura 2D apresenta o resultado da quantificação de uma amostra de nanopartículas poliméricas contendo clozapina, apresentando o pico único referente ao fármaco.

O cromatograma 2D apresenta o analito eluindo no tempo de retenção de 1,2 min diferentemente do tempo de retenção obtido para a clozapina (2,3 min) nos cromatogramas 2B e 2C, referentes a curva padrão e controles de qualidade durante a validação, respectivamente. Isto pode ter ocorrido devido a variações nas condições analíticas. Alguns fatores que podem alterar a eluição são: as variações no pH da fase móvel, na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel (BRASIL, 2003). A coluna e a pré-coluna utilizadas nas análises foram as mesmas, do início ao final do trabalho, bem como o fluxo utilizado (1,5 mL/min). Desta forma, não são considerados fatores interferentes na variação identificada. Neste caso, o fator mais provável estaria relacionado à temperatura. Isto porque a fase móvel sempre foi preparada seguindo um protocolo específico, mesmo analista e pH ajustado no dia da análise. Entretanto, o CLAE não possui forno, deixando a coluna suscetível às variações de temperatura da sala de análise, além de variações durante dias diferentes, o que pode, portanto, ter ocasionado as alterações de tempo de retenção observadas no cromatograma 2D.

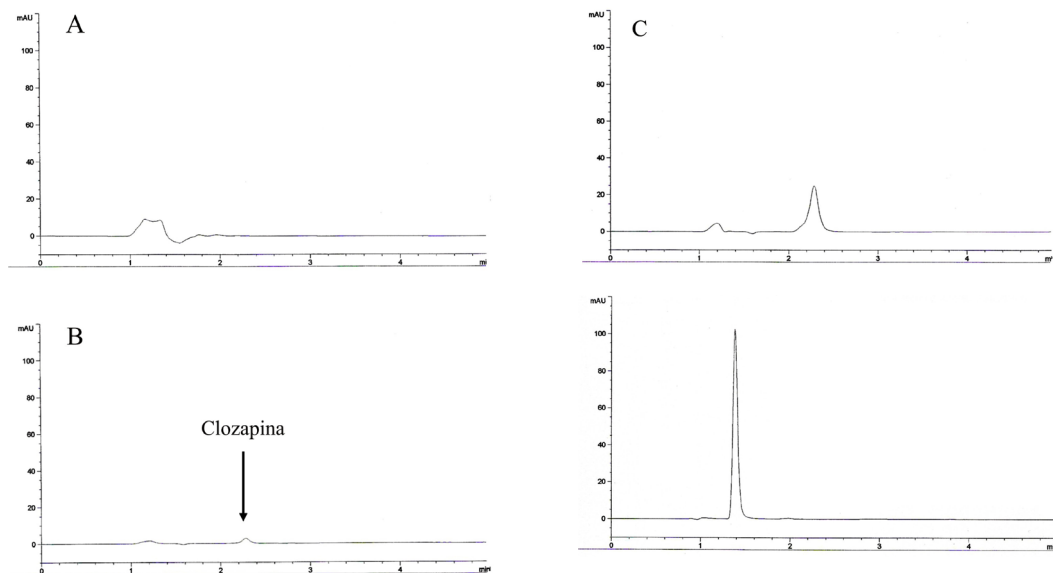


Figura 2 - Cromatogramas obtidos por CLAE-PDA para clozapina. (A) amostra sem o fármaco; (B) amostra da curva padrão com clozapina na concentração de 1,0 µg/mL; (C) amostra do controle de qualidade com clozapina (9,0 µg/mL) contaminadas com suspensão de nanopartículas brancas; (D) amostra de suspensão de nanopartículas contendo clozapina.

Limite Inferior de Quantificação

O menor nível de concentração de clozapina determinado com exatidão e precisão aceitáveis, correspondeu ao valor de 0,5 µg/mL. Esse limite inferior de quantificação confirma a sensibilidade da técnica de CLAE-PDA.

Conclusão

A metodologia analítica proposta para detecção e quantificação de clozapina por CLAE-PDA mostrou-se específica, sensível, precisa e linear na faixa de concentração entre 1,0 a 32,0 µg/mL, sendo adequada para avaliação do fármaco em formas farmacêuticas como nanopartículas poliméricas. Os ensaios de validação apresentados estão de acordo com as recomendações internacionais e vigentes no país.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda pelo fornecimento da clozapina, a URI pelo apoio financeiro e a UFRGS pelo fornecimento da coluna e pré-coluna necessárias para as análises cromatográficas.

AUTORES

Daila Deisi Bieniek - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI – Campus de Erechim, RS – Acadêmica do Curso de Farmácia Generalista. E-mail: daila_bieniek@yahoo.com.br

Ticiania Carla Bessegato – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI – Campus de Erechim, RS – Acadêmica do Curso de Farmácia Generalista.

Pedro Ernesto da Silva Sansone – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI – Campus de Erechim, RS – Acadêmico do Curso de Farmácia Generalista.

Teresa Dalla Costa - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS – Professora do Curso de Farmácia da UFRGS.

Silvia Staniçuaski Guterres - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS – Professora do Curso de Farmácia da UFRGS.

Daniela Joice Conrado – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI – Campus de Erechim, RS – Professora do Curso de Graduação em Farmácia.

Sandra Elisa Haas - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI – Campus de Erechim, RS – Professora do Curso de Graduação e Pós-Graduação em Farmácia

REFERÊNCIAS

BERNARDI, A.; ZILBERSTEIN, A. C.; JÄGER, E.; CAMPOS, M. M.; MORRONE, F. B.; CALIXTO, J. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, n. 158, p. 1104-11, 2009.

BRASIL, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diretoria Colegiada da Agência Nacional da Vigilância Sanitária**, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

CONRADO, Daniela Joice. Avaliação pré-clínica em ratos do perfil farmacocinético da substância LASSBio-579. 2006. 179 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, 2006.

DASKALAKIS, Z. J.; GEORGE, T. P. Clozapine, GABA(B), and the treatment of resistant schizophrenia. *Clinical Pharmacology Therapeutics*, n. 86, p. 442-446, 2009.

GASZNER, P.; MAKKOS, Z. Clozapine Maintenance Therapy in Schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, p. 465-469, 2004.

HAAS, S. J.; HILL, R.; KRUM, H.; LIEW, D.; TONKIN, A.; DEMOS, L.; STEPHAN, K.; MCNEIL, J. Clozapine-associated myocarditis: a review of 116 cases of suspected myocarditis associated with the use of clozapine in Australia during 1993 –2003. **Drug Safety**, n. 30, p. 47–57. 2007.

ICH- International Conference on harmonization. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. FDA Federal Register, v. 62, p. 27463, 1997.

MELTZER, H. Y. What's Atypical About Atypical Antipsychotic Drugs? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 53-57, 2004.

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

SANSONE, Pedro Ernesto da Silva. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados contendo clozapina**. 2009. 49f. Monografia de conclusão de curso de graduação em farmácia, URI-Erechim, 2009.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

TITIER, K.; BOUCHET, S.; PÉHOURCQ, F.; MOORE, N.; MOLIMARD, M.; High-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. **Journal of Chromatography B**, n. 788, p. 179-185, 2003.