

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**



**Nathalie Ferreira Silva de Melo**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA CARREADOR PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA DO ANESTÉSICO LOCAL BENZOCAÍNA**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) NATHALIE FERREIRA SILVA DE MELO e aprovada pela Comissão Julgadora

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**M491d**

Melo, Nathalie Ferreira Silva de  
Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas como sistema carreador para liberação modificada do anestésico local benzocaína / Nathalie Ferreira Silva de Melo. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Nanocápsulas. 3. Anestésicos locais. 4. Benzocaína. I. Fraceto, Leonardo Fernandes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Development of polymeric nanocapsules as a carrier system for modified release of local anesthetic benzocaine.

**Palavras-chave em inglês:** Polymeric nanoparticles; Nanocapsules; Local anesthetic; Benzocaine.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Leonardo Fernandes Fraceto, Marcelo Henrique Napimoga, André Henrique Rosa.

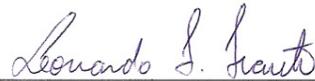
**Data da defesa:** 18/02/2011.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 18 de fevereiro de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto (Orientador)



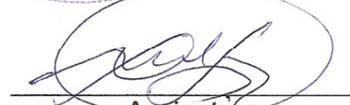
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga



Assinatura

Prof. Dr. André Henrique Rosa



Assinatura

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

---

Assinatura

Profa. Dra. Luciana de Matos Alves Pinto

---

Assinatura

Aos meus pais Valkíria e José Antonio

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pela força e pela fé que me inspira.

À Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica, pela oportunidade e experiência.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de mestrado e à Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto pela orientação dedicada nestes anos de convívio, profissionalismo e oportunidade os quais foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Eneida de Paula pela importante colaboração, sugestões e atenção no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero e Dra. Priscyla D. Marcato por disponibilizar o analisador de tamanho de partículas e potencial zeta durante os estudos preliminares deste trabalho.

À Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo pelos ensaios de atividade anestésica realizados com animais e pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao pessoal do Laboratório de Biomembranas (Bruna, Sheila, Allan, Vivi Queiroz, Vivi Guilherme, Vivi Vieira, Ana Laís, Michelle, Giovana, Cíntia, Dani, Cleyton, Maribel, Márcio, Raquel) pela convivência, troca de experiências e todos os momentos vividos ao longo desses anos.

À Maribel, pelo auxílio prestado nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Ao pessoal do Laboratório de Química Ambiental da Unesp Sorocaba (Prof. André, Grillo, Bruno, Pitombo, Patrícia, Mariana, Dani Cocenza, Susan, Cláudio, Milena, Thalita, Estefânia, Cássia, Laís, Ana) pela convivência, companheirismo, troca de experiências, além de agradáveis momentos de descontração.

Aos amigos Grillo e Bruno pela amizade sincera, incentivo, conversas, conselhos, almoços, churrascos, risadas, ajuda e aprendizado.

Aos meus pais Valkíria e José Antonio, alicerces da minha vida, pela formação, educação, amor incondicional, apoio irrestrito quanto ao caminho que eu escolhi e por nunca ter me deixado desistir.

Aos meus demais familiares pelo carinho e incentivo.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### Artigos completos publicados em periódicos relacionados ao projeto

MORAES, C. M. ; MATOS, A.P. ; GRILLO, R. ; **MELO, N. F. S.** ; PAULA, E. ; DIAS FILHO, N. L. ; ROSA, A.H. ; FRACETO, L. F. *Screening of formulation variables for the preparation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules containing the local anesthetic benzocaine.* Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 11, p. 2450-2457, 2011.

ALVES, C.F. ; **MELO, N. F. S.** ; FRACETO, L. F. ; ARAUJO, D. R. ; NAPIMOGA, M. H. *Effects of 15d-PGJ2-loaded Poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation.* British Journal of Pharmacology, v. 162, p. 623-632, 2011.

CHAVES, I.S. ; RODRIGUES, S.G. ; **MELO, N. F. S.** ; DE JESUS, M.B. ; FRACETO, L. F. ; PAULA, E. ; PINTO, L.M.A. . *Alternativas para Tratamento da Esquistossomose: Caracterização Físico-química do Complexo de Inclusão entre Praziquantel e Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina.* Latin American Journal of Pharmacy, v. 29, p. 1067-1074, 2010.

GRILLO, R. ; **MELO, N. F. S.** ; ARAUJO, D. R. ; PAULA, E. ; ROSA, A.H. ; FRACETO, L. F. *Polymeric Alginate Nanoparticles Containig the Local Anesthetic Bupivacaine.* Journal of Drug Targeting, v. 18, p. 688-699, 2010.

**MELO, N.F.S.**; GRILLO, R.; DE ARAÚJO, D.R.; DE PAULA, E.; DIAS FILHO, N.D.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. *Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína.* Química Nova, v. 33, p.65-69, 2010.

GRILLO, R.; **MELO, N.F.S.**; DE ARAÚJO, D.R.; DE PAULA, E.; DIAS FILHO, N.L.; ROSA, A.H., FRACETO, L.F. *Validation of an HPLC Method for quantitative Determination of Benzocaine in PHBV-Microparticles and PLA-Nanoparticles.* Latin American Journal of Pharmacy, v.28, p. 393-399, 2009.

GRILLO, R.; **MELO, N.F. S.**; ARAÚJO, D.R. ; TROSSINI, G.H. G. ; DA CUNHA, E.F. F.; CASTRO RAMALHO, T.; FRACETO, L. F. *Host guest complexation of a nitroheterocyclic compound with cyclodextrins: a spectrofluorimetric and molecular modeling study*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v. 66, p. 417-421, 2009.

**Artigos aceitos para publicação:**

RODRIGUES, S.G. ; CHAVES, I.S. ; **MELO, N. F. S.** ; DE JESUS, M.B. ; FRACETO, L. F. ; FERNANDES, S.A. ; PAULA, E. ; FREITAS, M.P. ; PINTO, L.M.A. . *Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl-beta-cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2011.

**MELO, N.F.S.**; GRILLO, R.; GUILHERME, V.A.; de ARAÚJO, D.R.; PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. *Poly(lactide-co-glycolide) nanocapsules containing benzocaine: influence of the composition of the oily nucleus on physico-chemical properties and anesthetic activity*. Pharmaceutical Research, 2011.

**Artigo submetido:**

**MELO, N.F.S.**; de ARAÚJO, D.R.; GRILLO, R.; MORAES, C.M.; de MATOS, A.P.; PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. *Benzocaine loaded polymeric nanocapsules: study of anesthetic activities*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2011.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Anestésicos locais.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. <i>Benzocaína .....</i>	<i>3</i>
<b>1.2. A nanotecnologia e os sistemas de liberação de fármacos.....</b>	<b>7</b>
1.2.1. <i>Nanopartículas poliméricas.....</i>	<i>9</i>
1.2.2. <i>Anestésicos locais e sistemas de liberação modificada.....</i>	<i>19</i>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Gerais .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Materiais .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Animais.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Metodologia.....</b>	<b>25</b>
3.3.1. <i>Desenvolvimento da metodologia de quantificação da benzocaína em nanocápsulas poliméricas .....</i>	<i>25</i>
3.3.2. <i>Validação da metodologia analítica de quantificação de benzocaína.....</i>	<i>26</i>
3.3.3. <i>Preparo das nanocápsulas poliméricas contendo benzocaína.....</i>	<i>29</i>
3.3.4. <i>Coeficiente de partição da benzocaína em diferentes óleos .....</i>	<i>30</i>
3.3.5. <i>Otimização do preparo da formulação: Planejamento fatorial 2<sup>4-1</sup> .....</i>	<i>32</i>
3.3.6. <i>Diâmetro médio e polidispersão .....</i>	<i>34</i>
3.3.7. <i>Potencial zeta.....</i>	<i>35</i>
3.3.8. <i>pH.....</i>	<i>36</i>
3.3.9. <i>Eficiência de associação de benzocaína nas nanocápsulas poliméricas .....</i>	<i>37</i>
3.3.10. <i>Estabilidade físico-química .....</i>	<i>38</i>
3.3.11. <i>Cinética de liberação in vitro da benzocaína em nanopartículas poliméricas.....</i>	<i>39</i>
3.3.12. <i>Modelagem matemática .....</i>	<i>40</i>
3.3.13. <i>Ensaio de citotoxicidade in vitro (viabilidade celular).....</i>	<i>41</i>
3.3.14. <i>Avaliação da atividade anestésica in vivo.....</i>	<i>44</i>
3.3.15. <i>Análise estatística.....</i>	<i>46</i>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>

<b>4.1. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para quantificação de benzocaína em nanocápsulas poliméricas.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2. Caracterização das formulações de nanocápsulas preparadas com três biopolímeros diferentes contendo benzocaína .....</b>	<b>53</b>
4.2.1. <i>Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.....</i>	<i>53</i>
4.2.2. <i>Eficiência de associação de benzocaína em nanocápsulas poliméricas.....</i>	<i>54</i>
4.2.3. <i>Cinética de liberação in vitro de benzocaína em nanocápsulas poliméricas .....</i>	<i>56</i>
4.2.4. <i>Atividade do anestésico local: bloqueio do nervo ciático.....</i>	<i>62</i>
4.2.5. <i>Ensaio de citotoxicidade in vitro.....</i>	<i>67</i>
<b>4.3. Caracterização das formulações de nanocápsulas de PLGA preparadas com óleos diferentes contendo benzocaína .....</b>	<b>71</b>
4.3.1. <i>Determinação do coeficiente de partição da benzocaína em diferentes óleos .....</i>	<i>71</i>
4.3.2. <i>Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.....</i>	<i>73</i>
4.3.3. <i>Estabilidade das suspensões de nanocápsulas de PLGA preparadas com diferentes óleos contendo benzocaína .....</i>	<i>75</i>
4.3.4. <i>Cinética de liberação in vitro de suspensões de nanocápsulas de PLGA contendo benzocaína.....</i>	<i>79</i>
<b>4.4. Otimização do preparo da formulação de nanocápsulas de PLGA contendo benzocaína: Planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup> .....</b>	<b>85</b>
4.4.1. <i>Efeito dos fatores sobre o tamanho, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação de benzocaína em nanocápsulas poliméricas.....</i>	<i>87</i>
4.4.2. <i>Estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas.....</i>	<i>96</i>
4.4.3. <i>Cinética de liberação in vitro de suspensões de nanocápsulas de PLGA contendo benzocaína.....</i>	<i>103</i>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>131</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da estrutura química da benzocaína.	4
<b>Figura 2:</b> Diferentes tipos de nanocarreadores. (a) nanotubos de carbono, (b) lipossomas de fosfolipídios, (c) nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) de lipídios sólidos, (d) nanopartículas poliméricas (i) nanoesferas e (ii) nanocápsulas, (e) micelas poliméricas, (f) dendrímero formado pela polimerização de várias unidades monoméricas, (g) nanopartícula funcionalizada (Adaptado de RAWAT <i>et al.</i> , 2006).	9
<b>Figura 3:</b> Tipos de nanopartículas poliméricas biodegradáveis: De acordo com a organização estrutural elas são classificadas como nanocápsulas e nanoesferas. As moléculas de fármaco podem estar encapsuladas ou adsorvidas na superfície. (Adaptado de KUMARI <i>et al.</i> , 2009)	10
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do polímero poli(lactídeo).	13
<b>Figura 5:</b> Estrutura química do polímero poli(lactídeo-co-glicolideo).	13
<b>Figura 6:</b> Estrutura química do polímero poli(caprolactona).	14
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática do método de deposição interfacial do polímero pré-formado.	30
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática do ensaio de liberação <i>in vitro</i> em membrana de celulose (Spectrapore, com poro para exclusão molecular de 1000 Da).	40
<b>Figura 9:</b> Representação da redução do MTT à formazan.	43
<b>Figura 10:</b> Ilustração do equipamento analgesímetro utilizado durante o teste PWTP (de ARAÚJO <i>et al.</i> , 2004).	46
<b>Figura 11:</b> Cromatograma da BZC na concentração 50 µg/mL obtido sob condições cromatográficas descritas no item 3.3.1.	49

<b>Figura 12:</b> a) Curva analítica da BZC (n=9). b) Parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.	50
<b>Figura 13:</b> Distribuição de diâmetro (nm) por intensidade (%) de nanocápsulas de PLGA, PLA e PCL contendo BZC.	54
<b>Figura 14:</b> Resultados dos ensaios de liberação <i>in vitro</i> : BVC livre, associada às nanocápsulas de PLGA (NC PLGA:BZC), de PCL (NC PCL:BZC) e de PLA (NC PLA:BZC), temperatura ambiente (n=3).	57
<b>Figura 15:</b> Resultados obtidos da análise do modelo matemático Korsmeyer-Peppas: a) nanocápsulas de PLGA: BZC (NC-PLGA:BZC), b)nanocápsulas de PCL:BZC (NC-PCL:BZC) e c) nanocápsulas de PLA:BZC (NC-PLA:BZC).	60
<b>Figura 16:</b> Curvas efeito x tempo no teste PWTP da avaliação da função sensorial do nervo ciático realizado em camundongos (n = 6-7/grupos). NANO = placebo; BZC = benzocaína; PLGA BZC = nanocápsulas de PLGA contendo benzocaina; PCL BZC = nanocápsulas de PCL contendo benzocaína. Dados expressos como média ± dp. Diferenças estatísticas referentes: PLGA BZC e BZC; PCL BZC e BZC. * $p < 0.05$ . (One-Way ANOVA com <i>Tukey-Kramer</i> post hoc test).	65
<b>Figura 17:</b> Curvas efeito x tempo no teste PWTP da avaliação da função sensorial do nervo ciático realizado em camundongos (n = 6-7/grupos). NANO = placebo; BZC = benzocaina; PLA BZC = nanocápsulas de PLA contendo benzocaína. Dados expressos como média ± dp. Diferenças estatísticas referentes: a – PLA BZC e BZC; b – PLA BZC e BZC; c – 0.06 % PLA BZC e 0.006 % PLA BZC. *** $p < 0.001$ . (One-Way ANOVA com <i>Tukey-Kramer</i> post hoc test).	66
<b>Figura 18:</b> Efeito citotóxico da BZC (1 a 5 mM), de NC de PLGA, PCL e PLA contendo BZC (1 a 5 mM) e de NC de PLGA, PCL e PLA sem BZC em células Balb-c 3T3 avaliados pela redução do corante MTT (n=18). Dados expressos em porcentagem de viabilidade celular. $p < 0,001$ (one-way ANOVA com <i>Tukey-Kramer</i> ).	68

<b>Figura 19:</b> Correlação entre os valores de log P e taxa de associação do anestésico local BZC com as nanocápsulas de PLGA.	72
<b>Figura 20:</b> Diâmetro médio (nm) de partículas em função do tempo (zero, 30 e 60 dias) para as quatro formulações de NC de PLGA com BZC.	76
<b>Figura 21:</b> Índice de polidispersão de partículas em função do tempo (zero, 30 e 60 dias) para as quatro formulações de NC de PLGA com BZC.	77
<b>Figura 22:</b> Potencial zeta (mV) de partículas em função do tempo (zero, 30 e 60 dias) para as quatro formulações de NC de PLGA com BZC.	78
<b>Figura 23:</b> Valores de pH das formulações de NC de PLGA com BZC em função do tempo (zero e 90 dias) de armazenamento em temperatura ambiente (n=3).	79
<b>Figura 24:</b> Liberação cumulativa da BZC (%) em solução e em suspensão de nanocápsulas de PLGA (n=3).	80
<b>Figura 25:</b> Resultados obtidos usando o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas a) Formulação com óleo mineral; b) Formulação com miristato de isopropila; c) Formulação com Cetiol® V; d) Formulação com Myritol ® 318.	83
<b>Figura 26:</b> Efeito dos fatores sobre o tamanho das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	87
<b>Figura 27:</b> Efeito dos fatores sobre a polidispersão das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	89
<b>Figura 28:</b> Efeito dos fatores sobre o potencial zeta das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	91
<b>Figura 29:</b> Efeito dos fatores sobre a eficiência de associação das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	93
<b>Figura 30:</b> Distribuição de tamanho de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 1 de PLGA com BZC nos tempos zero, 30, 60 e 120 dias.	97
<b>Figura 31:</b> Distribuição de tamanho de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 3 de PLGA com BZC nos tempos zero, 30, 60 e 120 dias.	97

<b>Figura 32:</b> Tamanho (nm) de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 1 e 3 de NC de PLGA com BZC.	98
<b>Figura 33:</b> Polidispersão de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 1 e 3 de NC de PLGA com BZC.	99
<b>Figura 34:</b> Potencial zeta (mV) de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 1 e 3 de NC de PLGA com BZC.	100
<b>Figura 35:</b> Taxa de associação (%) do fármaco nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.	101
<b>Figura 36:</b> Valores de pH nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 1 e 3 de NC de PLGA com BZC.	102
<b>Figura 37:</b> Liberação cumulativa da BZC (%) em solução e em suspensão de nanocápsulas de PLGA (formulação 1) (n=3) nos tempos zero e 120 dias de armazenamento.	103
<b>Figura 38:</b> Liberação cumulativa da BZC (%) em solução e em suspensão de nanocápsulas de PLGA (formulação 3) (n=3) nos tempos zero e 120 dias de armazenamento.	104
<b>Figura 39:</b> Resultados obtidos usando o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas a) Formulação 1 (tempo zero); b) Formulação 1 (120 dias); c) Formulação 3 (tempo zero) V; d) Formulação 3 (120 dias).	107

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Condições analíticas para determinação de teor de BZC em NC poliméricas.	26
<b>Tabela 2:</b> Matriz do planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$ aplicado ao preparo de NC poliméricas contendo BZC	33
<b>Tabela 3:</b> Fatores variados em 2 níveis no planejamento fatorial descrito na Tabela 2.	33
<b>Tabela 4:</b> Coeficientes de correlação (r) das curvas de calibração em três dias consecutivos.	50
<b>Tabela 5:</b> Valores de desvio padrão relativo (DPR) das concentrações de BZC determinados para avaliação da precisão.	51
<b>Tabela 6:</b> Valores de concentração de BZC determinados para avaliação da exatidão.	52
<b>Tabela 7:</b> Valores de diâmetro médio (diâmetro hidrodinâmico. nm), polidispersão, potencial zeta (mV) e pH das suspensões de NC poliméricas.	53
<b>Tabela 8:</b> Eficiência de associação de BZC em nanocápsulas poliméricas	55
<b>Tabela 9:</b> Valores dos parâmetros obtidos a partir da aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as curvas de liberação da BZC associada com nanocápsulas de PLGA, PCL e PLA.	61
<b>Tabela 10:</b> Latência, $T_{max}$ , tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (ASC) induzido pelas formulações de BZC livre e associada às NC poliméricas.	63
<b>Tabela 11:</b> Valores de coeficiente de partição $P_{o/a}$ da BZC nos diferentes óleos estudados	72
<b>Tabela 12:</b> Valores de diâmetro médio (nm), polidispersão, potencial zeta (mV) e taxa de associação das diferentes suspensões de NC PLGA contendo BZC.	73
<b>Tabela 13:</b> Valores dos parâmetros obtidos a partir da aplicação do	82

modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as curvas de liberação de BZC associada as NC de PLGA	
<b>Tabela 14:</b> Matriz do planejamento fatorial $2^{4-1}$ e resultados de tamanho, polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de associação, obtidos a partir do planejamento para suspensões de NC de PLGA com BZC	86
<b>Tabela 15:</b> Estimativa dos efeitos e valores de $p$ (ANOVA) para variação de tamanho de NC de PLGA com BZC	88
<b>Tabela 16:</b> Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a polidispersão e valores de $p$ (ANOVA) para variação de polidispersão em NC de PLGA com BZC.	90
<b>Tabela 17:</b> Estimativa dos efeitos dos fatores sobre o potencial zeta e valores de $p$ (ANOVA) para variação do potencial zeta em NC de PLGA com BZC	91
<b>Tabela 18:</b> Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a eficiência de associação e valores de $p$ (ANOVA) para variação taxa de associação em NC de PLGA com BZC.	93
<b>Tabela 19:</b> Valores dos parâmetros obtidos a partir da aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as curvas de liberação de BZC associada as NC de PLGA.	108

## LISTA DE ABREVIações

AL: Anestésico (s) local (s)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BZC: Benzocaína

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMEM: *Dubelcco's Modified Eagle Medium*

DP: Desvio padrão

DPR: Desvio padrão relativo

ICH: *International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio

NADH: nicotinamina adenina dinucleotídeo reduzida

NC: Nanocápsulas

NE: Nanoesferas

NP: Nanopartículas poliméricas

PCL: Poli(ε-caprolactona)

PDLLA: Poli (ácido DL-lático)

PEG: Polietilenoglicol

PGA: Poli (glicolídeo)

PHB: Poli(hidroxibutirato)

PHV: Poli(hidroxivalerato)

PLA: Poli (lactídeo)

PLGA: Poli (lactídeo-co-glicolídeo)

PWTP: *Pain Withdraw Threshold Pressure*

## RESUMO

Nanocarreadores são dispositivos nanométricos que podem ser compostos de diferentes materiais biodegradáveis naturais ou sintéticos e até mesmo compostos organometálicos. As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos e outras moléculas ativas que apresentam tamanho compreendido entre 10 e 1000 nm. O termo nanopartículas é amplo e refere-se principalmente a dois tipos de estruturas, nanoesferas (matriciais) e nanocápsulas (vesiculares). As principais características desejáveis para um anestésico local incluem longa duração de ação e diminuição da toxicidade sistêmica. Uma alternativa que tem se mostrado capaz de promover estes efeitos desejáveis é a liberação modificada de fármacos através da veiculação destes em sistemas carreadores. O desenvolvimento de novas formulações contendo nanopartículas poliméricas para liberação de fármacos envolve o preparo, caracterização físico-química, avaliação da estabilidade, determinação do perfil de liberação do fármaco carregado e avaliação da toxicidade, sendo esta a proposta desse trabalho.

Na primeira etapa foram desenvolvidas três formulações de nanocápsulas contendo benzocaína preparadas com polímeros diferentes, sendo estas caracterizadas e comparadas suas atividades anestésicas e citotoxicidade. Na segunda etapa foi avaliada a influência da composição do núcleo oleoso das nanocápsulas na estabilidade físico-química, eficiência de associação de benzocaína e perfil de liberação da mesma. Na terceira etapa deste trabalho, foi realizado um planejamento experimental para escolha de parâmetros de preparo de nanocápsulas contendo benzocaína. Neste planejamento experimental estudou-se a influência de alguns fatores como: a concentração de polímero, de óleo e de tensoativos da fase orgânica e aquosa nas propriedades das nanocápsulas. Foram obtidas nanocápsulas de diâmetro compreendido entre 100 e 300 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,2 e potencial zeta menor que -30 mV. Propriedades físico-químicas das nanocápsulas poliméricas foram avaliadas em função do tempo, a fim de determinar a estabilidade das formulações. Nenhuma das formulações estudadas apresentou grandes alterações nas propriedades em função do tempo, sendo consideradas estáveis em um período de até 120 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Os resultados obtidos mostraram que foi possível preparar sistemas carreadores para o anestésico local benzocaína sendo, desta forma, obtidos bons sistemas carreadores com modificação no perfil de liberação da

benzocaína, melhora da atividade anestésica local e diminuição da citotoxicidade, desta forma sendo uma alternativa para o tratamento da dor.

**Palavras-chave:** nanopartículas poliméricas, nanocápsulas, poli (lactídeo), poli (lactídeo-co-glicolídeo), poli( $\epsilon$ -caprolactona), anestésicos locais, benzocaína

## ABSTRACT

Nanocarriers are nanoscale devices that can be composed of different natural or synthetic biodegradable materials and even organometallics. Nanoparticles are polymeric carrier systems for drugs and other active molecules that have a size between 10 and 1000 nm. The term nanoparticle is broad and refers mainly to two types of structures, nanospheres (matrix) and nanocapsules (vesicular). The main characteristics for a local anesthetic include long duration of action and decreased systemic toxicity. One alternative that has been shown to promote these desirable effects is the modified release drug delivery through the placement of these systems in carriers.

The development of new formulations containing polymeric nanoparticles for drug delivery involves the preparation, physicochemical characterization, stability evaluation, determination of drug release profile of the drug carried and evaluation of toxicity, which is the purpose of this study.

In the first stage were developed three formulations of nanocapsules containing benzocaine prepared with different polymers which were characterized and compared its anesthetic activity and cytotoxicity. In the second stage we evaluated the influence of the composition of the oily core of nanocapsules in physical and chemical stability, efficiency of association of benzocaine and release profile of the same. In the third stage of this study was an experimental design to choice of parameters for the preparation of nanocapsules containing benzocaine. In this experimental design studied the influence of some factors such as a polymer concentration, oil and surfactant in organic and aqueous phase on properties of nanocapsules. They were obtained of diameter between 100 and 300 nm, polydispersity below 0.2 and zeta potential less than -30 mV. Physical-chemical properties of polymeric nanocapsules were evaluated in function of time in order to determine the stability of the formulations. None of the formulations showed significant changes in properties as a function of time and is considered stable in a period of 120 days of storage at room temperature. The results showed that it was possible to prepare carrier systems for the local anesthetic benzocaine is thus obtained with good carrier systems change in release profile of benzocaine, improvement of local anesthetic activity and decreased cytotoxicity, thus being an alternative to treatment of pain.

**Keywords:** polymeric nanoparticles, nanocapsules, poly(lactide), poly(lactide-co-glycolide), poly( $\epsilon$ - caprolactone), local anesthetic, benzocaine

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Anestésicos locais

Os anestésicos locais (AL) são fármacos com a capacidade de promover o bloqueio reversível da condução nervosa evitando ou aliviando o processo doloroso sem a perda da consciência (COVINO & VASSALO, 1985; COLLINS, 1993; CATTERAL & MACKIE, 1996). Essa propriedade é uma consequência da inibição do processo de excitação-condução em nervos periféricos, quando aplicados localmente em concentração adequada. O principal mecanismo envolve sua interação em um ou mais sítios específicos nos canais de sódio voltagem-dependentes presentes nas membranas neurais (RANG *et al.*, 2004; FRACETO *et al.*, 2006).

É possível também que os AL interfiram no processo de excitação da membrana neuronal de uma ou mais maneiras: (a) alterando o potencial de repouso básico da membrana, (b) alterando o potencial limiar (nível de ativação), (c) diminuição da velocidade de despolarização e (d) prolongando a velocidade de repolarização (MALAMED, 2001; FRACETO *et al.*, 2006).

Estudos recentes mostram que os AL interagem com os canais de sódio tanto na forma ionizada quanto na forma não-ionizada e, assim, estabilizam o potencial da membrana, bloqueando a condução nervosa (FRACETO *et al.*, 2006; FRACETO *et al.*, 2008).

A substância que inaugurou a história da anestesia local foi a cocaína, um alcalóide extraído de plantas andinas, a *Erythroxylon coca* (COVINO & VASSALO, 1985; SILVA, 2002). O primeiro relato que se tem sobre o uso clínico de cocaína foi em 1884 quando Carl Köller a utilizou como anestésico para cirurgia oftalmológica (de ARAÚJO *et al.*, 2008; WILES & NATHANSON, 2010).

O conhecimento do potencial da cocaína logo acompanhou sua aceitação como anestésico local, mas a ocorrência de efeitos tóxicos e de mortes atribuídas a “cocainização”

revelaram o baixo índice terapêutico da droga, descontinuando seu uso como anestésico local (YAGIELA, 2000; COLLINS, 1993; RANG *et al.*, 2004; WILES & NATHANSON, 2010)

A tentativa de diminuir o potencial tóxico da cocaína levou ao desenvolvimento de análogos sintéticos. Em 1890, Ritsert sintetizou o primeiro composto com propriedades anestésicas locais: a benzocaína, um éster do ácido benzóico, dando início a busca de novos compostos com propriedades anestésicas (SILVA, 2002; RANG *et al.*, 2004; de ARAÚJO *et al.*, 2008).

A estrutura química dos AL apresenta duas principais características: em sua maioria são moléculas anfifílicas contendo um grupamento aromático (região hidrofóbica), uma cadeia intermediária e grupamento amino (hidrofílica). Aqueles que possuem uma ligação éster entre o grupo aromático e a cadeia intermediária são classificados como amino-ésteres (procaína, oxibuprocaína, tetracaína, etc.), e os AL que possuem uma ligação amida entre tais grupos são classificados como amino-amidas (lidocaína, prilocaína, ropivacaína, etidocaína, etc.) (COVINO & VASSALO, 1985; de JONG, 1994, MALAMED, 2001).

O perfil clínico dos AL pode ser determinado por três características: potência, velocidade de início de ação e duração da atividade anestésica. A propriedade que está relacionada à atividade anestésica e à potência é a lipossolubilidade. Vários estudos mostraram que existe correlação entre o coeficiente de partição do AL e a concentração mínima necessária para o bloqueio da condução nervosa (COVINO, 1986; de JONG, 1994). Porém é preciso salientar que a solubilidade em água é essencial para o transporte do fármaco até as fibras nervosas, enquanto a solubilidade lipídica é necessária para a penetração na membrana sendo a existência de um balanço entre essas duas propriedades (caráter anfifílico) um fator essencial para a atividade dos AL (GUPTA, 1991; de PAULA & SCHREIER, 1995, 1996; de ARAÚJO, 2005).

Os amino-ésteres são mais potentes, no entanto sofrem rápida metabolização da ligação éster por enzimas esterases plasmáticas liberando metabólitos tóxicos limitando sua utilização e este fato impulsionou a busca por novos AL, levando à síntese das amino-amidas. Desde a década de 70, amino-amidas são os anestésicos de escolha para uso clínico, sendo a tendência mundial a de desenvolver amino-amidas mais potentes, pelo fato

de serem menos tóxicas e mais resistentes à hidrólise quando comparadas aos amino-ésteres (COVINO & VASSALO, 1985; de JONG, 1994, MALAMED, 2001; de ARAÚJO *et al.*, 2008)

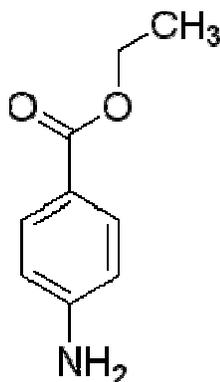
A hidrofobicidade aumenta a potência, duração de ação e a toxicidade dos AL, pois a associação destes com as bicamadas lipídicas aumenta sua distribuição para os locais de ação e reduz a metabolização por esterases plasmáticas. Além disso, acredita-se que os sítios de ação de AL nos canais de sódio voltagem-dependente sejam hidrofóbicos favorecendo, assim, a interação dos AL mais hidrofóbicos e das formas não ionizadas dos mesmos (GOODMAN & GILMAN, 1996; KNUDSEN *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2002; de ARAÚJO *et al.*, 2008).

Dentre os principais efeitos tóxicos dos AL destacam-se a neurotoxicidade e a cardiotoxicidade, que são decorrentes de sua absorção sistêmica após administração regional, como resultado do aumento da concentração plasmática que sobrevém quando a absorção na circulação excede a taxa de eliminação, por exemplo, injeção intravenosa acidental ou pela absorção de grandes quantidades por meio das membranas mucosas ou áreas muito vascularizadas (RANG *et al.*, 2004). A absorção sistêmica dos AL é afetada pela hidrofobicidade, pKa e taxa de ligação a proteínas plasmáticas (MCLURE & RUBIN, 2005).

### **1.1.1. Benzocaína**

A benzocaína (etil 4-aminobenzoato), BZC, (Figura 1), derivado do ácido para-aminobenzóico, é o mais antigo dos agentes anestésicos atualmente disponíveis do tipo éster e diferentemente da maioria dos AL, não apresenta na sua extremidade terminal um grupo amino ionizável e não causa inibição concentração-dependente dos canais de sódio (de PAULA & SCHREIER, 1995, YAGIELA *et al.*, 2000; FRACETO *et al.*, 2006; de ARAÚJO *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2010).

Por apresentar baixa solubilidade em água (0,66 mg/mL), sua utilização é limitada para administração injetável. Sua ação é rápida, porém de curta duração. A BZC é eficaz e amplamente utilizada como anestésico tópico para anestesia de superfície das membranas mucosas, onde é absorvida e sofre metabolização por esterases plasmáticas e hepáticas, sendo em seguida eliminada pelos rins (COVINO & VASSALO, 1985; de JONG, 1994; PINTO *et al.*, 2000; SO & FARRINGTON, 2008; MORAES *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2010).



**Figura 1:** Representação esquemática da estrutura química da benzocaína.

A BZC é recomendada para tratamento de irritações e dores orofaríngeas provenientes de processos infecciosos como amidalite, faringite, laringite, gengivite e afta, e também em procedimentos cirúrgicos menores, como pré anestésico em odontologia e para diminuir a sensação de irritação das gengivas durante o nascimento dos dentes em bebês (SO & FARRINGTON, 2008).

Existem várias formas farmacêuticas para anestesia tópica contendo BZC, mas sua concentração varia conforme o local de administração e finalidade (COVINO & VASSALO, 1985). Geralmente é comercializada em diversas formas farmacêuticas como pastilhas, solução oral spray e géis para uso odontológico (SO & FARRINGTON, 2008).

O principal efeito tóxico proveniente do uso de BZC é a metahemoglobinemia (GOODMAN & GILMAN, 1996; PINTO *et al.*, 2000; BALICER & KITAI, 2004; SO & FARRINGTON, 2008).

A hemoglobina, heteroproteína de massa molecular 64.500 Da, contém uma porção não-proteica, o heme, e uma fração de proteína, a globina. Trata-se de um tetrâmero composto de quatro cadeias de globina e quatro grupamentos heme, que possuem um átomo de ferro na forma reduzida ( $Fe^{2+}$ ) cada um. A hemoglobina é uma proteína bastante abundante nas hemácias e é responsável pelo transporte de oxigênio para o nível celular (KAMOUN *et al.*, 2006). A metahemoglobinemia é conseqüente da oxidação do átomo de ferro presente na estrutura da hemoglobina ( $Fe^{2+}$  para  $Fe^{3+}$ ) e, desta forma, perde a capacidade de ligar ao oxigênio de maneira reversível (SO & FARRINGTON, 2008).

Em condições normais, a metahemoglobina é convertida em hemoglobina pela ação da enzima metahemoglobina redutase dependente de NADH. Desta forma, os pacientes que apresentam deficiência desta enzima ou deste co-fator apresentam um risco maior de desenvolver metahemoglobinemia principalmente se ocorrer uma exposição aos fármacos que são capazes de produzir este quadro clínico, como a BZC (SO & FARRINGTON, 2008).

Raramente este quadro ocorre em adultos, é mais comum em crianças, pois estas, principalmente até os seis meses de idade, apresentam menor concentração das enzimas capazes de converter a metahemoglobina em hemoglobina no organismo. O quadro clínico da metahemoglobinemia é caracterizado por cianose, fadiga, taquicardia e em casos mais graves pode produzir anemia (SO & FARRINGTON, 2008; CHUNG *et al.*, 2010).

Ainda não está bem elucidado o mecanismo de indução de formação de metahemoglobina pela BZC, mas alguns estudos propuseram que a BZC provoca a oxidação da hemoglobina levando à formação de metahemoglobina mais rapidamente que a redução de metahemoglobina em hemoglobina (NGUYEN *et al.*, 2000). Outros estudos afirmaram que a BZC é um oxidante indireto, de forma que em sua metabolização há produção de um radical livre que é capaz de oxidar a hemoglobina levando à formação de metahemoglobina (WRIGHT *et al.*, 1999).

## 1.2. A nanobiotecnologia e os sistemas de liberação de fármacos

Os sistemas de liberação de fármacos representam um desenvolvimento relativamente novo, com o objetivo de prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos. Muitos estudos estão sendo realizados neste setor com a finalidade de desenvolver novas formulações com vantagens frente às formulações convencionais. As estratégias para veiculação de fármacos em sistemas de liberação incluem aplicações importantes da nanotecnologia (RAWAT *et al.*, 2006; ANTON *et al.*, 2008; MISHRA *et al.*, 2010).

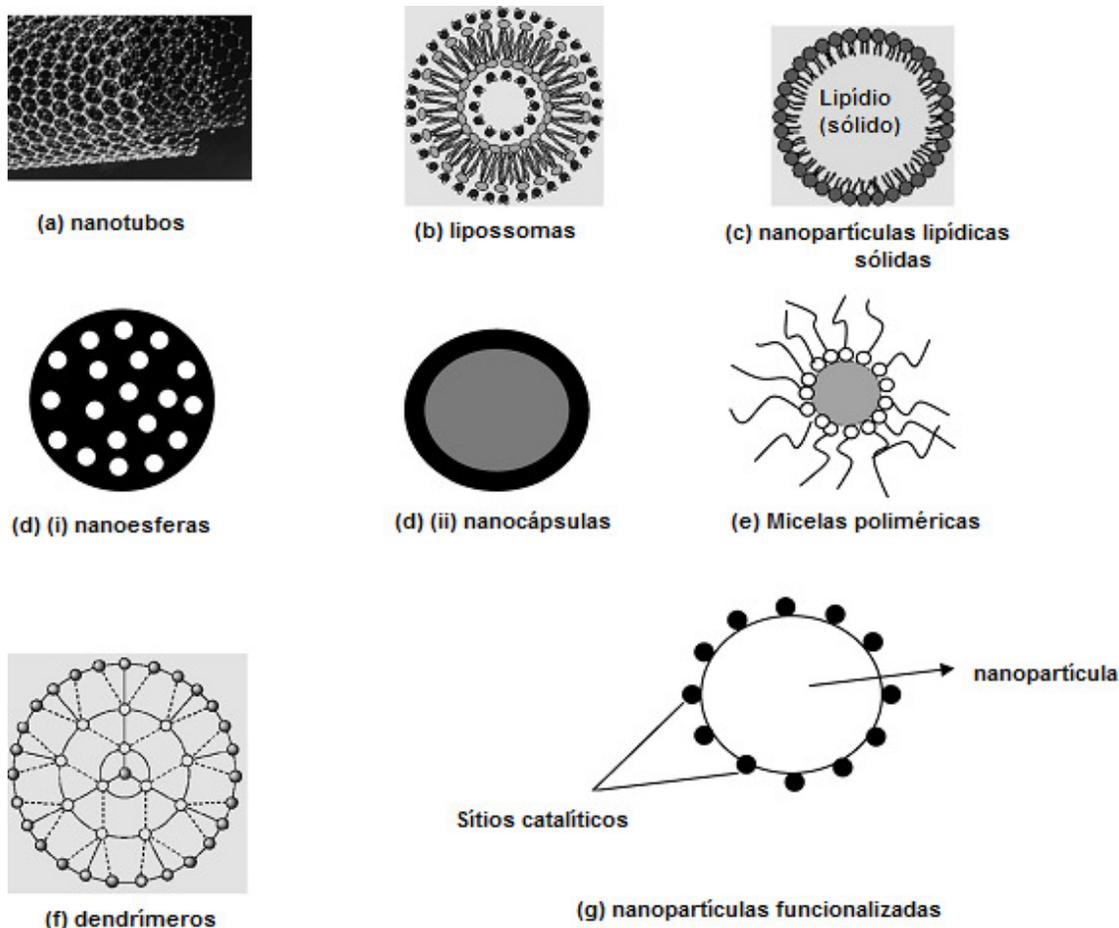
A nanobiotecnologia, conforme definido pelo *National Nanotechnology Initiative* (NNI), é o estudo e utilização de estruturas na faixa de tamanho de 1 a 1000 nm. O objetivo geral da nanobiotecnologia é diagnosticar com precisão e mais cedo possível e tratar tão eficaz quanto possível, sem qualquer efeito colateral (ASIYANBOLA & SOBOYEJO, 2008; MISHRA *et al.*, 2010)

Atualmente, a nanobiotecnologia emerge rapidamente como um setor de pesquisa com potencial aplicação em diagnóstico e em terapia, em que a vetorização de moléculas em nanocarreadores pode levar a inúmeras vantagens frente aos sistemas convencionais, como capacidade em atravessar barreiras biológicas, modulação da distribuição do fármaco e diminuição da toxicidade, aumento do tempo de circulação de substâncias lábeis ou rapidamente eliminadas veiculação de fármacos hidrofóbicos promovendo sua solubilização, entre outras (KREUTER, 2007; MORALES, 2007; MISHRA *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de nanocarreadores modernos é atualmente um dos principais tópicos na pesquisa farmacêutica para superar problemas comuns de fármacos pouco solúveis em água. Entre as diferentes abordagens, a nanoencapsulação tem atraído maior atenção (PREETZ *et al.*, 2008).

Nanocarreadores são dispositivos nanométricos compostos de diferentes materiais biodegradáveis naturais ou sintéticos e até mesmo compostos organometálicos. Nanocarreadores, nas suas diversas formas (Figura 2), têm a possibilidade de fornecer

infinitas oportunidades na área de liberação de fármacos e, portanto, estão cada vez mais sendo investigados para aproveitar o seu potencial. Nanocarreadores, devido à sua maior área superficial, mostram melhoria da farmacocinética e biodistribuição de agentes terapêuticos e, assim, são capazes de minimizar a toxicidade pelo seu acúmulo preferencial no sítio alvo (ALEXIS *et al.*, 2008; MISHRA *et al.*, 2010) Estes são capazes de melhorar a solubilidade de compostos hidrofóbicos e torná-las adequadas para administração parenteral. Além disso, aumentam a estabilidade de uma variedade de agentes terapêuticos, como peptídeos, oligonucleotídeos (KOO *et al.*, 2005; MISHRA *et al.*, 2010). A utilização de materiais biodegradáveis minimiza as possibilidades de reações de hipersensibilidade dos tecidos e proporciona boa biocompatibilidade (LOBENBERG, 2003; RAWAT *et al.*, 2006; MISHRA *et al.*, 2010).

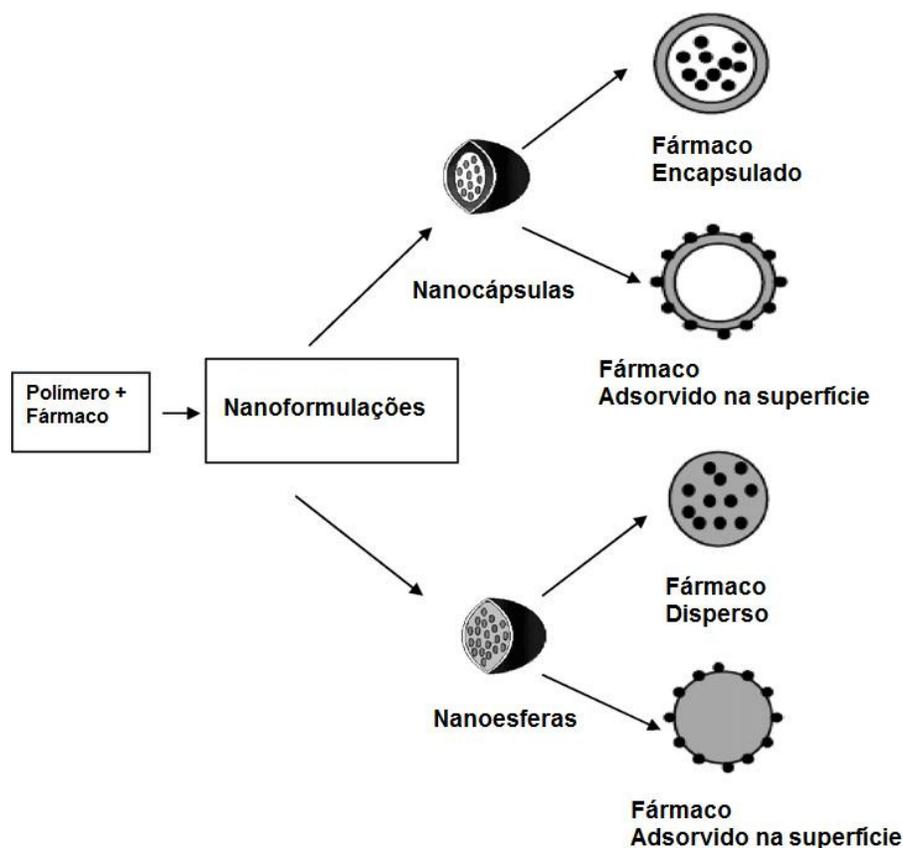


**Figura 2:** Diferentes tipos de nanocarreadores. (a) nanotubos de carbono, (b) lipossomas de fosfolipídios, (c) nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) de lipídios sólidos, (d) nanopartículas poliméricas (i) nanoesferas e (ii) nanocápsulas, (e) micelas poliméricas, (f) dendrímero formado pela polimerização de várias unidades monoméricas, (g) nanopartícula funcionalizada (adaptado de RAWAT *et al.*, 2006).

### 1.2.1. Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas (NP) são carreadoras de fármacos ou outras moléculas ativas que apresentam tamanho compreendido entre 10 e 1000 nm. O termo nanopartículas

aplicado à liberação controlada de fármacos é amplo e refere-se principalmente a dois tipos de estruturas, nanoesferas (NE) e nanocápsulas (NC). Denominam-se NE aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homoganeamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Desta forma obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. As NC, ao contrário, constituem os sistemas do tipo reservatórios, onde é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Neste caso, o fármaco encontra-se envolvido por uma membrana polimérica, isolando o núcleo do meio externo (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MOHANRAJ & CHEN, 2006; REIS *et al.*, 2006; ANTON *et al.*, 2008; MISHRA *et al.*, 2010).



**Figura 3:** Tipos de nanopartículas poliméricas biodegradáveis: De acordo com a organização estrutural elas são classificadas como nanocápsulas e nanoesferas. As moléculas de fármaco podem estar encapsuladas ou adsorvidas na superfície. (adaptado de KUMARI *et al.*, 2009)

O desempenho *in vivo* das NP é influenciado por características morfológicas, superfície e peso molecular. A modificação da superfície das NP pode conferir propriedades anti-adesivas que atuam como barreira estérica reduzindo o *clearance* por macrófagos do fígado promovendo a possibilidade de permeação (SHENOY & AMIJI, 2005; KUMARI *et al.*, 2009).

Os fármacos são liberados das NP a partir de mecanismos que envolvem a desorção do fármaco da superfície, difusão através da matriz ou parede polimérica, desintegração, dissolução e erosão da matriz polimérica. (GÖPFERICH, 1996; POLAKOVIC *et al.*, 1999; SONAJE *et al.*, 2007).

O mecanismo de liberação pode ser modulado pela massa molecular do polímero utilizado. Quanto maior for a massa molecular, mais lento será o processo de liberação dos fármacos (ZAMBAUX *et al.*, 1999; KUMARI *et al.*, 2009)

As vantagens da aplicação de NP como carreadores de fármacos incluem: a) o tamanho e as características podem ser facilmente manipulados e, por possuírem tamanho pequeno, permitem a administração intravenosa, ao contrário de muitos outros sistemas coloidais; b) controle e sustentação da liberação do fármaco no sítio de ação específico, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo os efeitos colaterais; c) controle da degradação e conseqüente liberação do fármaco podem ser modulados com a escolha dos constituintes da matriz polimérica; d) os sítios específicos podem ser alcançados através da modificação da superfície de NP; e) administração por diversas vias, incluindo oral, nasal, parenteral, intra-ocular e tópica; f) boa estabilidade física, química e biológica, fácil preparo e boa reprodutibilidade (GÖPFERICH, 1996; SINHA *et al.*, 2004; MOHANRAJ & CHEN, 2006; TORCHILIN, 2006; NAIR & LAURENCIN, 2007; KUMARI *et al.*, 2009; MISHRA *et al.*, 2010).

#### **1.2.1.1. *Materiais utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas***

Basicamente as NP são constituídas de polímero, tensoativo, fármaco e o solvente orgânico que é eliminado posteriormente. Dependendo da formulação, o óleo pode ser

incluído no processo de preparação (nanocápsulas) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; KUMARI *et al.*, 2009; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

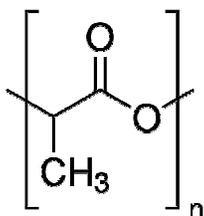
A preparação de NP como carreadores de fármacos leva em consideração algumas restrições físico-químicas e biológicas quanto aos polímeros utilizados. Polímeros biocompatíveis são materiais que podem ser administrados no organismo e quando em contato com os tecidos não provocam qualquer reação adversa. Os materiais biocompatíveis bem como seus produtos de degradação não devem provocar resposta inflamatória ou tóxica (NAIR & LAURENCIN, 2007). Já polímeros biodegradáveis são materiais que em contato com elementos do sistema biológico, sofrem degradação total ou parcial (DURÁN *et al.*, 2006).

Vários polímeros podem ser utilizados no preparo de NP, porém, os poliésteres alifáticos são os mais indicados para sistemas injetáveis, devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, ausência de toxicidade e pela facilidade em incorporar uma ampla variedade de fármacos (PICOS *et al.*, 2000; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010).

Dentre os poliésteres alifáticos existentes, os polímeros mais utilizados são o poli (lactídeo) (PLA), poli (lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli (hidroxivalerato) (PHV) e poli (hidroxibutirato) (PHB) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MORALES, 2007). Existem os polímeros naturais, como quitosana e alginato, que também podem ser empregados no preparo de nanopartículas (REIS *et al.*, 2006). O ácido láctico (ácido 2-hidroxipropiônico) é um intermediário natural do metabolismo de carboidratos. Possui uma versatilidade de aplicação da indústria alimentícia, farmacêutica, química e têxtil (VICKROY, 1985; KUMARI *et al.*, 2009). Por ser uma molécula quiral apresenta dois isômeros ativos, L e D.

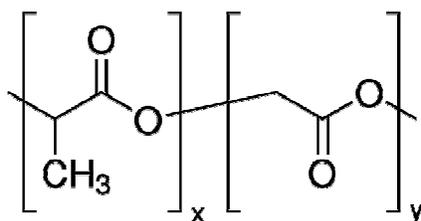
A polimerização desses monômeros leva a formação de um polímero semicristalino, porém a polimerização da mistura racêmica leva a formação de um polímero amorfo. O poli(L-lactídeo) (PLLA) é um polímero cristalino, com temperatura de transição cristalina entre 50 e 80° C, temperatura de fusão de 173-178° C, é mais resistente a hidrólise e apresenta biodegradação mais lenta. Por sua vez, o poli(D,L-lactídeo) (PDLLA) (Figura 4) é um polímero amorfo com temperatura de transição vítrea entre 55 e 60° C e apresenta

biodegradação rápida se comparado ao PLLA, sendo o mais indicado para utilização em sistemas de liberação prolongada (NAIR & LAURENCIN, 2007; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010).



**Figura 4:** Estrutura química do polímero poli(lactídeo) (PLA).

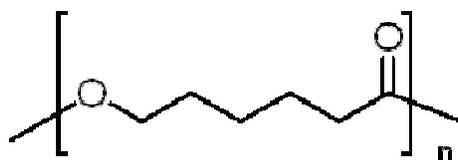
Para melhorar a qualidade e reduzir os custos de produção, o ácido láctico pode ser polimerizado com outros monômeros. A associação do PLA ao poli (glicolídeo) PGA forma o copolímero poli-lactídeo-co-glicolídeo (PLGA) (Figura 5). O PLGA tem aprovação do FDA para uso clínico. Esta associação aumenta a hidrofobicidade e diminui a velocidade de biodegradação do polímero, além de seus produtos de degradação não afetarem as funções celulares normais (KILIC *et al.*, 2005; DURÁN *et al.*, 2006; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010). A estabilidade do copolímero é influenciada com a variação nas proporções de PLA e PGA, onde o poli(DL-lactídeo-co-glicolídeo) 50/50 apresenta estabilidade compreendida entre 1-2 meses, 75/25 entre 4 e 5 meses e 85/15 entre 5 e 6 meses (NAIR & LAURENCIN, 2007).



**Figura 5:** Estrutura química do polímero poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA).

O PCL (poli- $\epsilon$ -caprolactona) (Figura 6) é um polímero semicristalino, solúvel em vários solventes orgânicos com temperatura de fusão baixa (entre 59 e 64° C) e temperatura de transição vítrea em -60° C. A sua cristalinidade tende a diminuir com o aumento do peso molecular. PCL é degradado pela hidrólise das ligações éster em condições fisiológicas e por isso surgiu interesse para sua utilização em sistemas de liberação de fármacos (KUMARI *et al.*, 2009; WOODRUFF & HUTMACHER, 2010). Apresenta degradação mais lenta se comparado ao PLA, PGA e PLGA (SINHA *et al.*, 2004; WOODRUFF & HUTMACHER, 2010).

O PCL pode ser misturado com outros polímeros para melhorar a resistência e modular a taxa de liberação de fármacos a partir de sistemas micro e nanoestruturados (WOODRUFF & HUTMACHER, 2010).



**Figura 6:** Estrutura química do poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL).

Poliésteres alifáticos apresentam boa aplicabilidade, porém, eles podem ser reconhecidos pelo organismo como corpos estranhos quando utilizados por via intravenosa e podem ser rapidamente assimilados por ação de macrófagos do sistema reticuloendotelial. Para ser mantida na circulação, a superfície hidrofóbica deve ser modificada, a fim de impedir a fagocitose (AVGOUSTAKIS *et al.*, 2003; DUAN *et al.*, 2006; BREUNIG *et al.*, 2007; ESMAEILI *et al.* 2008; KUMARI *et al.*, 2009). Para aumentar o tempo de circulação, as NP podem ser revestidas com moléculas que forneçam uma camada hidrofílica de proteção tais como polietilenoglicol (PEG) ou polivinilpirrolidona (PVP). Trata-se de polímeros hidrofílicos, não-iônicos que têm sido demonstrados que apresentam excelente biocompatibilidade. Esses revestimentos fornecem uma nuvem dinâmica de cadeias hidrofílicas e neutras na superfície das NP, que repelem as proteínas plasmáticas (STORMA *et al.*, 1995; TOBIO *et al.*, 2000; KUMARI *et al.*, 2009).

A escolha do óleo constituinte das NC considera alguns fatores tais como ausência de toxicidade, estabilidade físico-química, incapacidade de solubilizar o polímero e alta afinidade pelo fármaco. Os óleos mais utilizados são triacilgliceróis de ácido cáprico/caprílico (Miglyol<sup>®</sup>, Myritol<sup>®</sup>) devido à ampla gama de solubilidade de substâncias ativas. Outros óleos têm sido utilizados com frequência como benzoato de benzila, oleato de etila, ácido oléico, óleo de argan, óleo de soja, etc. e têm fornecido bons resultados. Algumas propriedades do óleo utilizado no preparo, tais como densidade e viscosidade podem interferir em alguns parâmetros físico-químicos das partículas (LIMAYEM *et al.*, 2006; MORALES, 2007; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Os tensoativos são fundamentais para evitar agregação das NP após o preparo e durante o armazenamento por promoverem estabilização física e/ou química das NP. Segundo o equilíbrio hidrofílico-lipofílico, os tensoativos podem ser classificados em tensoativos de alta hidrofília (hidrofílicos) ou de baixa hidrofília (lipofílicos), sendo que para o preparo de NP os tensoativos mais utilizados são os de alta hidrofília não-iônicos como os polissorbatos, os poloxamers e os fosfolipídios. (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

A escolha do solvente orgânico deve considerar, além da menor toxicidade, a capacidade de solubilizar o fármaco e o polímero, já que alguns métodos exigem utilização de solventes orgânicos miscíveis em água e outros não (REIS *et al.*, 2006). Na maioria dos casos a acetona é o solvente de escolha. Outros solventes como o etanol pode ser escolhido para dissolução do óleo ou do fármaco (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

### **1.2.1.2. Métodos utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas**

Existem vários métodos utilizados para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2006; MORALES, 2007; MISHRA *et al.*, 2010).

Os métodos de polimerização *in situ* envolvem formação do polímero no momento da preparação das NP e são obtidos por polimerização em emulsão ou polimerização interfacial, porém apresenta muitas limitações como solventes orgânicos tóxicos e a dificuldade de purificação, levando a presença de moléculas residuais tóxicas (monômeros) decorrentes da polimerização deficiente. Devido a estas limitações foram propostos o uso de polímeros pré-formados para o preparo de NP e estes são os mais utilizados atualmente (REIS *et al.*, 2006).

Os métodos baseados em polímeros pré-formados mais utilizados são: nanoprecipitação, deposição interfacial de polímero pré-formado, emulsificação/ difusão do solvente, emulsificação/ coacervação, dupla emulsificação, *salting-out* e revestimento do polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2006; MISHRA *et al.*, 2010; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

O método de nanoprecipitação, relatado por Fessi e colaboradores (1988), descreve que a fase orgânica constituída de solvente orgânico miscível em água ou uma mistura destes, contendo o fármaco e o polímero é adicionada, sob agitação moderada, à fase aquosa contendo o tensoativo e finalmente o solvente orgânico é removido por evaporação (FESSI *et al.*, 1988). As nanocápsulas são obtidas por modificação do método de nanoprecipitação, chamado de deposição interfacial de polímero pré-formado, adicionando-se um óleo e um tensoativo de baixa hidrofília na fase orgânica (FESSI *et al.*, 1989).

As NP são obtidas como uma suspensão coloidal formada quando a fase orgânica é adicionada lentamente à fase aquosa. Com base na teoria de Sugimoto, há indicações que o processo de formação das NP compreende três etapas: nucleação, crescimento e agregação. A eficiência de cada etapa determina o tamanho da partícula e a força motriz desses fenômenos é a supersaturação, que é definida como a relação entre a concentração do polímero sobre a solubilidade deste no solvente (SUGIMOTO, 1987; LINCE *et al.*, 2008; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Por outro lado, Quintanar-Guerrero e colaboradores (1996) explicaram a formação de NP através do efeito Gibbs-Marangoni, onde há diferenças na tensão superficial. Um líquido com alta tensão superficial (fase aquosa) movimentada mais fortemente o líquido ao redor do

que outro com baixa tensão superficial (fase orgânica). Essa diferença entre as tensões superficiais faz com que haja turbulência levando a formação contínua de redemoinhos de solvente na interface. O solvente orgânico se dispersa através da fase aquosa transportando as cadeias poliméricas formando gotículas que se agregam espontaneamente como NP devido a difusão contínua do solvente na fase aquosa (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1996; GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004; DERAKHSHANDEH *et al.*, 2007; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

As NC são obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, mas durante a difusão da fase orgânica (contendo polímero e óleo) através da fase aquosa, uma emulsificação ocorre espontaneamente quando nanogotículas de óleo são formadas e em volta há deposição do polímero, gerando uma estrutura vesicular (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1996; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Esses métodos (nanoprecipitação e deposição interfacial de polímero pré-formado) são vantajosos, pois não requerem homogeneização de alta energia, são relativamente fáceis, rápidos e facilmente escalonáveis (BUDHIAN *et al.*, 2007).

O método de emulsificação/ difusão do solvente requer três fases: orgânica, aquosa e diluição. Este método se baseia na formação inicial de uma emulsão óleo em água preparada a partir de uma fase orgânica contendo o polímero, o fármaco e o tensoativo em um solvente parcialmente miscível em água, e de uma solução aquosa contendo agente estabilizante. O solvente orgânico deve ser saturado com água para garantir o equilíbrio termodinâmico. A fase orgânica é emulsionada sob agitação vigorosa na fase aquosa. Após formação de emulsão primária o solvente orgânico é difundido para a fase aquosa externa pela adição de excesso de água (diluição), conduzindo a precipitação do polímero, formado NP (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; MORALES, 2007; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

O mecanismo de formação das NP é baseado na teoria de que cada gota de emulsão produz partículas e que estas são formadas pela combinação da precipitação do polímero e fenômenos interfaciais durante a difusão do solvente. Em consequência o solvente transporta moléculas para a fase aquosa formando regiões supersaturadas a partir do qual novos agregados poliméricos (não dissolvidos totalmente) são formados e estabilizados por meio

do agente estabilizante que impede a coalescência e formação de aglomerados maiores (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; MOINARD-CHÉCOT *et al.*, 2008; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Este método exige uma homogeneização de alta energia (sonicador de ponta ou ultraturrax<sup>®</sup>) sendo que o tamanho da partícula pode ser controlado pela velocidade e tempo de agitação ou sonicação (REIS *et al.*, 2006; BUDHIAN *et al.*, 2007).

O método de salting-out é baseado no fenômeno no qual a solubilidade de um não-eletrólito em água é diminuída com a adição de um eletrólito. É uma modificação do método de emulsificação/ difusão do solvente, onde a fase aquosa apresenta adicionalmente cloreto de sódio ou mágnesio. Neste método o agente estabilizante é dissolvido em uma solução aquosa contendo o eletrólito formando um gel viscoso. Posteriormente o polímero e o fármaco são dissolvidos em um solvente orgânico. A adição deste gel viscoso na fase orgânica sob agitação contínua provoca separação do solvente orgânico levando a formação das NP. Esse método leva a alta eficiência de incorporação de fármacos, pois a adição de sal favorece a saturação da fase aquosa e o fármaco tende a associar com a NP (ALLÉMANN *et al.*, 1992; GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004; MISHRA *et al.*, 2010).

O método de dupla emulsificação consiste na formação de duas emulsões que são geralmente preparadas em um processo de emulsificação em duas etapas usando dois tensoativos: um hidrofóbico destinado a estabilizar a interface da água /óleo da emulsão interna e um hidrofílico para estabilizar a interface externa das gotas de óleo para emulsões água/óleo/água. A emulsão primária é formada com a utilização de ultra-som e o tensoativo hidrofóbico estabiliza a interface água/óleo da fase interna. A emulsão secundária também é formada com ultra-som e a dispersão de NP é estabilizada pela adição de outro tensoativo (hidrofílico). Finalmente o solvente é removido por evaporação (ALLÉMANN *et al.*, 1992; MCCARRON *et al.*, 2006; GRIGORIÈV & MILLER, 2009; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

O método de emulsificação/ coacervação é apresentado como estratégia para preparo de NP a partir de polímeros naturais hidrofílicos como o alginato e a gelatina. O processo envolve a formação de uma emulsão óleo/água onde a fase orgânica é composta de fármaco e solvente e a fase aquosa é composta por polímero, agente estabilizante e água. A emulsão pode ser formada através da utilização de ultra-som ou agitação mecânica. Em seguida o

processo de coacervação é realizado pela adição de eletrólitos (LERTSUTTIWONG *et al.*, 2008), adição de um solvente não miscível em água ou agente desidratante (KRAUSE & ROHDEWALD, 1985) ou alteração de temperatura (LUTTER *et al.*, 2008). Finalmente, o processo de coacervação é complementado com medidas adicionais para formação de retículos que torna possível a obtenção das NP (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

A formação das NP se dá durante a fase coacervação, onde há precipitação do polímero da fase de emulsão contínua para formação de uma película que se aglomera em NP e são estabilizadas ligações covalentes, que podem ser alcançadas por alteração de pH ou temperatura ou adição de um agente capaz de realizar ligações cruzadas (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

O método de revestimento polimérico é utilizado para deposição de uma fina camada polimérica na superfície de NP previamente formadas. Isto pode ser conseguido por adsorção do polímero em NP não revestidas quando incubadas com uma solução polimérica sob agitação. Da mesma forma, essa camada polimérica pode ser adicionada durante a fase final dos métodos citados anteriormente (CALVO *et al.*, 1997; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Conforme as características físico-químicas do fármaco é possível a escolha do método de preparo que levará a uma associação eficiente e estabilidade satisfatória. O método escolhido deve minimizar a perda de fármaco e garantir sua atividade farmacológica. Além disso, passos pós-preparação como a avaliação da estabilidade deve ser sempre investigada (MORAES *et al.*, 2009).

### **1.2.2. Anestésicos locais e sistemas de liberação modificada**

As características desejáveis para um AL incluem longa duração de ação, seletividade para o bloqueio sensorial e diminuição da toxicidade sistêmica (KUZMA *et al.*, 1997; de ARAÚJO *et al.*, 2003; FRACETO *et al.*, 2006). Uma alternativa que tem se mostrado capaz de promover estes efeitos desejáveis é a liberação modificada destes fármacos através da veiculação em sistemas de liberação. Estes sistemas têm como objetivo promover uma liberação lenta e continuada, diminuindo a toxicidade proveniente de uma absorção sistêmica

após administração regional (SIMONETTI & ANDRADE, 1996; KUZMA *et al.*, 1997; de ARAÚJO *et al.*, 2003). De fato os sistemas de liberação de fármacos são capazes de compartimentalizar a substância ativa e direcioná-la a sítios ativos específicos, além de poder controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A liberação modificada de anestésicos locais tem sido muito estudada na literatura, onde são utilizados vários tipos de sistemas carreadores, dentre eles destacam-se as ciclodextrinas (DOLLO *et al.*, 1996; IRIE & UEKAMA, 1997; KUZMA *et al.*, 1997; LOFTOSSON & MASSON, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2005; de ARAÚJO *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007a; MORAES *et al.*, 2007b; MORAES *et al.*, 2007c; de ARAÚJO *et al.*, 2008), os lipossomas (LEGUÉVELLO *et al.*, 1993; GRANT *et al.*, 2001, 2002; de ARAÚJO *et al.*, 2004, 2008; CEREDA *et al.*, 2004, 2006, 2008; COLOMBO *et al.*, 2005; ROSE *et al.*, KRANZ *et al.*, 2008; HOLGADO *et al.*, 2008) e associação com sistemas poliméricos micro e nanoestruturados (GORNER *et al.*, 1999; GOVENDER *et al.*, 1999, 2000; POLAKOVIC *et al.*, 1999; GRILLO *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2009, 2010; MELO *et al.*, 2010).

As NP têm sido estudadas como carreadores de AL, uma vez que muitos fármacos pertencentes a esta classe possuem baixa solubilidade aquosa (dentre outras características) e desta forma podem ser favorecidas pelo encapsulamento em NP, principalmente as nanocápsulas.

Desta forma, o desenvolvimento de formulações de NP para veiculação de AL como a BZC tem se mostrado promissor uma vez que é de grande interesse para a Indústria Farmacêutica. Sendo assim, é evidente que existe aplicabilidade para inovação neste setor.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver (preparar e caracterizar) sistemas de liberação modificada para o anestésico local benzocaína, utilizando para isso nanocápsulas poliméricas com a finalidade de melhorar as propriedades farmacológicas deste anestésico local, objetivando uma futura aplicação clínica, por via infiltrativa.

### 2.2. Específicos

- Desenvolvimento e validação da metodologia analítica de quantificação de BZC por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência);
- Avaliação da influência da composição do núcleo oleoso nas propriedades físico-químicas das NC contendo BZC;
- Otimização das melhores condições de preparo das NC poliméricas contendo anestésico local BZC;
- Caracterização e avaliação da estabilidade físico-química (pH, distribuição de tamanho, potencial zeta) das NC contendo BZC em função do tempo;
- Determinação da eficiência de incorporação da BZC nas NC poliméricas;
- Avaliação do perfil cinético de liberação da BZC em presença e ausência das NC poliméricas;
- Efeito das NC poliméricas contendo BZC na viabilidade de fibroblastos Balb-c 3T3;

- Avaliação da atividade anestésica *in vivo* das formulações de NC poliméricas contendo BZC através de comparação dos bloqueios sensorial e motor do nervo ciático induzido pelo AL em camundongos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

- Benzocaína (grau de pureza 98%) - Sigma<sup>®</sup>
- Poli-(DL-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) 50:50, 45.000 – 75.000 Da – Sigma<sup>®</sup>
- Poli-(L-lactideo) (PLA) 50.000 – 67.000 Da - Sigma<sup>®</sup>
- Poli-(ε-caprolactona) (PCL) 65.000 Da - Sigma<sup>®</sup>
- Polissorbato 80 (Tween<sup>®</sup> 80) - Sigma<sup>®</sup>
- Monoestearato de sorbitano (Span<sup>®</sup> 60) - Sigma<sup>®</sup>
- Triglicerídios de ácidos cáprico e caprílico (Myritol<sup>®</sup> 318) - Cognis<sup>®</sup>
- Oleato de decila (Cetiol<sup>®</sup> V) - (Cognis<sup>®</sup>)
- Miristato de isopropila (Cognis<sup>®</sup>)
- Óleo mineral USP (Cognis<sup>®</sup>)
- Acetona (grau espectroscópico analítico) - Merck<sup>®</sup>
- Etanol (grau espectroscópico analítico) - Merck<sup>®</sup>
- Metanol (grau HPLC) – JT Baker<sup>®</sup>
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT) - Sigma<sup>®</sup>
- Meio de cultura DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) - Nutricell<sup>®</sup>
- Dispositivos de ultrafiltração de celulose regenerada de 30 kDa - Millipore<sup>®</sup>
- Agitador magnético - Tecnal<sup>®</sup>
- Microcentrífuga - MiniStar<sup>®</sup>
- Evaporador rotativo AL 390 - American Lab<sup>®</sup>
- Bomba à vácuo A12 - Symbol<sup>®</sup>
- Potenciômetro - Tecnal<sup>®</sup>
- Analisador de partículas Zetasizer Nano ZS 90 – Malvern<sup>®</sup>
- Agitador orbital de placas Kline 151 - Cientec<sup>®</sup>

- Incubadora de CO<sub>2</sub> - Laboven<sup>®</sup>
- Fluxo laminar
- Leitor de placas MS - Labsystems Multiskan<sup>®</sup>
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Varian<sup>®</sup> Pro Star
  - Bomba PS 210 solvent delivery module - Varian<sup>®</sup>
  - Detector UV-Vis PS 210 - Varian<sup>®</sup>
  - Coluna cromatográfica Varian<sup>®</sup> C<sub>18</sub> fase reversa, 5μ 110A, 250 x 4,60mm
  - Injetor manual
  - Software Galaxie Workstation

### 3.2. Animais

Durante a realização deste trabalho foram utilizados camundongos albinos *Swiss* adultos, machos e com peso variando entre 30-35g. Os animais, provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da Unicamp), foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada a  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , alojados coletivamente (5 animais por gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos 7 dias.

Todos os experimentos encontravam-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEA)-IB Unicamp (protocolo nº 1785-1).

### 3.3. Metodologia

#### **3.3.1. Desenvolvimento da metodologia analítica de quantificação da benzocaína em nanocápsulas poliméricas**

A quantificação da BZC presente nas nanocápsulas poliméricas foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando-se um equipamento de Varian® Pro Star.

A CLAE é um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas empacotadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. A separação dos componentes ocorre de acordo com a natureza da fase estacionária e fase móvel (CIOLA, 1998; JARDIM *et al.*, 2007).

A fase móvel sai da coluna e passa por um sistema detector, onde são registradas alterações de alguma propriedade física específica, que é convertida num sinal elétrico que é registrado e através de uma interface com computador é convertido em um cromatograma (CIOLA, 1998).

Quando se varia a natureza dos grupos funcionais da fase estacionária, diferentes tipos de seletividade podem ser obtidos. Estes grupos podem ser de natureza polar, chamados de fase normal, ou de natureza apolar, que representam as fases reversas. O princípio da técnica de CLAE de fase reversa consiste na separação dos compostos com base em interações hidrofóbicas entre o composto a ser analisado, a fase estacionária (apolar) e a fase móvel (menos apolar), sendo a partição, o principal mecanismo envolvido (JARDIM *et al.*, 2007).

No início do desenvolvimento da metodologia analítica por CLAE para quantificação da BZC, ajustou-se as condições cromatográficas para obtenção de um pico simétrico correspondente a BZC (GRILLO *et al.*, 2009). As condições cromatográficas utilizadas durante todo processo de desenvolvimento e validação do método estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Condições analíticas para determinação de teor de BZC em NC poliméricas.

<b>Amostra</b>	Benzocaína em água Milli-Q
<b>Fase móvel</b>	Metanol / Água Milli-Q (60:40, v/v)
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Fluxo</b>	0,8 mL/min
<b>Temperatura</b>	Ambiente (25°C)
<b>Detector (λ)</b>	Ultravioleta (UV), λ = 285nm
<b>Coluna cromatográfica</b>	Varian Microsorb, C <sub>18</sub> fase reversa, 5µ 110A, 250 x 4,60mm

### 3.3.2. Validação da metodologia analítica de quantificação de BZC

A metodologia analítica para quantificação de BZC foi validada segundo parâmetros estabelecidos pela *International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 1996) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

A validação tem como objetivo a diminuição e controle dos fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. A validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade dos resultados. Os parâmetros envolvidos na validação de metodologia analítica são especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e detecção e exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003).

### **3.3.2.1. Especificidade**

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

A especificidade do método analítico para quantificação de BZC foi avaliada a partir de injeções do veículo utilizado para o preparo das NC sem adição do anestésico BZC.

### **3.3.2.2. 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. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes e o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser  $= 0,99$  (ICH, 1996; BRASIL, 2003). A linearidade do método foi determinada a partir de três curvas analíticas realizadas em três dias diferentes, sendo um total de nove curvas com seis concentrações compreendidas entre 5 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de BZC diluída em água.

### **3.3.2.3. Intervalo**

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequada quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

### **3.3.2.4. Precisão**

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade (precisão

intra-corrída) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária (precisão inter-corrídas) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes (BRASIL, 2003).

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A precisão foi avaliada a partir do cálculo de desvio padrão relativo (DPR) (Equação 1).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (1)$$

onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

### **3.3.2.5. Limites de detecção e quantificação**

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. A estimativa do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizadas a partir de dados obtidos com as regressões lineares das curvas analíticas aplicados às Equações 2 e 3, respectivamente (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (3)$$

onde, DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação da curva analítica média.

### **3.3.2.6. Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, segundo a Equação 4 (BRASIL, 2003).

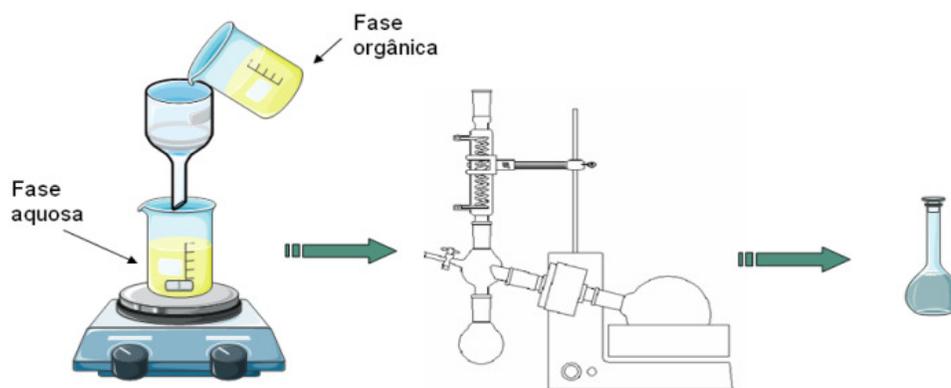
$$Exatidão = \frac{CMD}{CT} \times 100 \quad (4)$$

onde, CT é a concentração teórica.

### **3.3.3. Preparo das nanocápsulas poliméricas contendo benzocaína**

A preparação das NC foi realizada segundo o método de deposição interfacial do polímero pré-formado, descrito inicialmente por Fessi *et al.* (1989), (Figura 7). Este método envolve a mistura de uma fase orgânica em outra aquosa. A fase orgânica constituiu-se do polímero, solvente orgânico (acetona), monoestearato de sorbitano, óleo e BZC. A fase aquosa foi composta de polissorbatato 80 e de água deionizada. Após dissolução dos

componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi inserida, lentamente, sob a fase aquosa com o auxílio de um funil. A suspensão resultante foi mantida sob agitação por 10 minutos e em seguida o solvente orgânico foi eliminado e a suspensão foi concentrada até o volume final de 10 mL, com o auxílio de um evaporador rotativo (FESSI *et al.*, 1989).



**Figura 7:** Representação esquemática do método de deposição interfacial do polímero pré-formado.

### 3.3.4. Coeficiente de partição da benzocaína em diferentes óleos

#### 3.3.4.1. Princípio do método

A propriedade física mais importante que afeta a atividade biológica de substâncias é a sua lipofilicidade ou hidrofobicidade. Hansch & Fujita (1964) desenvolveram uma medida da lipofilicidade expressa como o logaritmo da relação de partição octanol-água ( $\log P$ ) e, em seguida, correlacionou o  $\log P_{oa}$  com a atividade biológica (HANSCH & FUJITA, 1964). Desde aquela época muitos sistemas foram desenvolvidos para estimar a lipofilicidade. A lipofilicidade, expressa pelo logaritmo do coeficiente de partição  $P$ , é um parâmetro molecular descrevendo o equilíbrio da distribuição das moléculas de solutos entre água e vários solventes orgânicos. A medida mais comum de  $\log P$  é o  $\log P_{oa}$ , o logaritmo da razão de

partição do composto entre octanol e água. Os valores de  $\log P_{oa}$  são de grande importância no estudo dos fenômenos farmacológicos (HANSCH & LEO, 1995; DONOVAN & PESCATORE, 2002).

O núcleo das NC poliméricas é composto por óleos escolhidos tendo como critério a maior possibilidade de solubilização do fármaco, ausência de toxicidade e de degradação do polímero (LIMAYEN *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos na literatura relatam que a porcentagem de encapsulamento está relacionada com a solubilidade do fármaco no núcleo oleoso (LOSA, *et al.* 1993; FRESTA, *et al.* 1996; BLOUZA, *et al.* 2006, MORA-HUERTAS, *et al.* 2010). Neste contexto, com a finalidade de verificar em qual dos óleos utilizados neste estudo a BZC apresentava a melhor interação, foram determinados os coeficientes de partição óleo/água.

#### **3.3.4.2. Determinação do coeficiente de partição da benzocaína em diferentes óleos**

O coeficiente de partição (P) da BZC em diferentes óleos foi determinado utilizando um sistema composto de duas fases, uma aquosa (contendo inicialmente quantidade conhecida de BZC) e outra fase orgânica (contendo cada um dos óleos utilizado nas formulações). A BZC foi dissolvida em 1 mL de água deionizada e foi adicionado a este 1 mL de óleo (óleo mineral USP, miristato de isopropila, Cetiol<sup>®</sup> V ou Myritol<sup>®</sup> 318) seguido de agitação vigorosa por 10 minutos em temperatura ambiente. Após esta etapa o sistema foi mantido durante 24 horas em repouso para que a distribuição do fármaco entre as diferentes fases fosse atingida. Após este período as amostras foram centrifugadas e a BZC presente na fase aquosa foi quantificada por espectroscopia UV-Vis (DEARDEN & BRESNEN, 1988). O valor do coeficiente de partição ( $P_{\text{óleo/água}}$ ) foi determinado a partir da razão na concentração da BZC na fase oleosa sobre a fase aquosa (PINTO, *et al.* 2000). As determinações foram feitas em triplicatas.

### 3.3.5. Otimização do preparo da formulação: Planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$

A influência da quantidade utilizada de alguns dos componentes no preparo das suspensões de NC poliméricas foi avaliada a partir de um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .

Planejamentos fatoriais são comumente adotados na pesquisa relacionada a área farmacêutica pois é possível verificar os efeitos das variáveis na formulação e isto fornece muitas informações com a realização de poucos experimentos (VANDERVOORT & LUDWIG, 2002).

Em um planejamento fatorial, determina-se a influência de fatores sobre as respostas de interesse. Para estudar o efeito de qualquer fator ( $k$ ) sobre uma dada resposta, precisa-se variar o nível do fator e observar o resultado que essa variação produz sobre a resposta. O número de ensaios necessários para se fazer um planejamento fatorial  $2^k$  completo aumenta rapidamente com  $k$ , o número de fatores investigados. Muitas vezes, a informação desejada pode ser obtida a partir de um número bem menor de ensaios, correspondente a uma fração do número de ensaios do planejamento completo. Isso é possível, pois o número de interações de ordem alta aumenta com o número de fatores, mas na maioria dos casos, essas interações têm valores pequenos e são destituídas de qualquer importância prática. Além disso, quando o número de fatores aumenta, crescem as chances de que um ou mais deles não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, seja por meio de efeitos de interação. Por essas razões são feitos planejamentos fatoriais fracionários (BARROS NETO *et al.*, 2007).

O planejamento fatorial fracionário tem grande valor nos estágios iniciais de desenvolvimento quando é utilizado em experimentos preliminares para observar um grande número de fatores em um pequeno número de possibilidades (JIM & LEE, 2008).

No planejamento fatorial  $2^{4-1}$ , seus contrastes não misturam os efeitos principais com interações de dois fatores e sim com interações de três fatores, que em princípio devem ser menos significativas. Os contrastes fornecem ótimas aproximações dos efeitos principais calculados no fatorial completo (BARROS NETO *et al.*, 2007).

As proporções ideais dos componentes das fases orgânica e aquosa da formulação de NC poliméricas contendo BZC foram determinadas a partir de um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , conforme descrito na Tabela 2 (BARROS NETO *et al.*, 2007).

**Tabela 2:** Matriz do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  aplicado ao preparo de NC poliméricas contendo BZC.

Formulação	Polímero	Myritol® 318	Span® 60	Tween® 80
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

Foram variadas proporções de quatro fatores (Polímero, Myritol® 318, Span® 60 e Tween® 80) em 2 níveis, segundo a Tabela 3. Os volumes de fase aquosa e fase orgânica permaneceram constantes, sendo estes 30 mL cada, sempre mantendo a concentração de BZC constante (0,5%) em todas formulações.

**Tabela 3:** Fatores variados em 2 níveis no planejamento fatorial descrito na Tabela 2.

	Polímero	Myritol® 318	Span® 60	Tween® 80
-	100 mg	200 mg	40 mg	60 mg
+	150 mg	300 mg	60 mg	90 mg

Foi avaliada a influência da variação de cada fator sob o tamanho, polidispersão, potencial zeta e a eficiência de associação do fármaco nas NC poliméricas. As formulações referentes a cada ensaio foram preparadas em duplicata.

Os cálculos realizados para determinar a influência da variação dos fatores sob as propriedades das NC foram realizados, utilizando o software *Statgraphics 5.1*.

### **3.3.6. Diâmetro médio e polidispersão**

#### **3.3.6.1. Princípio do método**

A técnica de espectroscopia de correlação de fótons foi utilizada para determinação do diâmetro médio e da distribuição de tamanho das nanocápsulas (polidispersão). Esta técnica oferece algumas vantagens como rapidez de execução, não interfere no sistema e promove uma análise representativa uma vez que há grande número de partículas em suspensão. O princípio da técnica considera que quando um feixe de luz é direcionado a uma suspensão coloidal, parte desta luz pode ser absorvida, parte é dispersa e a restante é transmitida através da amostra. A luz dispersa resulta de um campo elétrico associado à luz incidente, que oscila a um ritmo conforme o tamanho das partículas. Essas oscilações ocorrem, em consequência do movimento Browniano, que ocorre em partículas quando suspensas em algum líquido, e são detectadas pelo equipamento ao longo de um intervalo de tempo. O cálculo do raio hidrodinâmico e, conseqüentemente o diâmetro da partícula, é obtido através do coeficiente de difusão translacional utilizando a equação de Stokes-Einstein (Equação 5) (SHAW, 1992; PATTY & FRISKEN, 2006).

$$R_h = \frac{KT}{3\pi\eta D} \quad (5)$$

onde,  $R_h$  é o raio hidrodinâmico,  $K$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta,  $\eta$  é a viscosidade da amostra e  $D$  o coeficiente de difusão translacional das partículas.

### **3.3.6.2. Determinação do diâmetro médio e polidispersão**

A avaliação do diâmetro médio e polidispersão foi realizada diluindo-se as suspensões de NC em água (Milli-Q) 100 vezes e, utilizando-se um analisador de partículas ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25°C. A distribuição de tamanho foi dada pelo índice de polidispersão. Cada resultado foi expresso como média de três determinações (GOVENDER *et al.*, 1999; GOVENDER *et al.*, 2000; VENKATRAMAN *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2009).

### **3.3.7. Potencial zeta**

#### **3.3.7.1. Princípio do Método**

O potencial zeta é um termo utilizado para o potencial eletrocinético de sistemas coloidais. Reflete o potencial de superfície das partículas, que pode ser influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

De maneira geral, partículas em suspensão possuem carga na superfície, criando uma camada ao redor da partícula que difere do meio dispersante. Com o movimento Browniano das partículas, essa camada se move com elas até o eletrodo de carga oposta à carga da camada que recobre as partículas (SHAW, 1992; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanopartículas devem apresentar valor de potencial zeta relativamente alto para garantir a estabilidade físico-química do sistema coloidal, uma vez que grandes forças repulsivas tendem a evitar agregação em função de colisões ocasionais entre NP adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Essas colisões podem ser minimizadas através de repulsão estérica ou eletrostática. Desta forma, quanto maior o valor do potencial zeta, independente da carga, maior as chances das partículas não se agregarem. Nanopartículas com valores de

potencial zeta de aproximadamente ( $\pm$ ) 30 mV são mais estáveis em suspensão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MOHANRAJ & CHEN, 2006).

O potencial zeta é determinado utilizando-se uma combinação do espalhamento de luz acoplada com microeletroforese e pode ser obtido em um equipamento de espalhamento dinâmico de luz, onde a variação na frequência da luz espalhada é proporcional à mobilidade eletroforética (SHAW, 1992; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O potencial zeta pode ainda ser utilizado para determinar se moléculas que possuem carga estão encapsuladas ou adsorvidas na superfície da partícula (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

O cálculo do potencial zeta pode ser feito através da equação de Smoluchowski (Equação 6).

$$U_E = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \cdot f(Ka) \quad (6)$$

onde  $U_E$  é a mobilidade eletroforética,  $\epsilon$  é o campo elétrico,  $\zeta$  é o potencial zeta,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $f(Ka)$  é a concentração de eletrólitos.

### **3.3.7.2. Determinação do potencial zeta**

O valor de potencial zeta, dado em mV foi determinado através de um analisador de potencial zeta, Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern). As análises foram realizadas diluindo-se as suspensões de NC em água (Milli-Q) 100 vezes e os resultados foram expressos como médias de três determinações.

### **3.3.8. pH**

Informações relevantes podem ser obtidas através do monitoramento do pH das suspensões de NC poliméricas em função do tempo. É importante avaliar possíveis

alterações de pH para assegurar a estabilidade das suspensões de NC, pois isto pode indicar degradação do polímero. Este fato se deve à hidrólise do polímero, liberando alguns de seus componentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A fim de verificar a estabilidade química do polímero, foi realizado o monitoramento do pH das suspensões de NC contendo BZC em função do tempo, utilizando-se um potenciômetro calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0.

### **3.3.9. Eficiência de associação de benzocaína nas nanocápsulas poliméricas**

Determinar a quantidade de fármaco que está associado às NC poliméricas é complexo, uma vez que o tamanho reduzido dessas partículas dificulta a separação da fração livre de fármaco (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Desta forma, uma técnica que é bastante utilizada na determinação da eficiência de associação de fármacos em NC poliméricas é a ultrafiltração-centrifugação, na qual uma membrana de celulose é empregada para separar parte da fase aquosa da suspensão coloidal. A concentração não-associada do fármaco é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada também pela subtração das concentrações total e livre (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002; 2003).

A totalidade de BZC presente na suspensão NC poliméricas foi determinada diluindo-se a suspensão em metanol, que é capaz de solubilizar o polímero, desestabilizando o sistema e liberando totalmente a BZC para a solução. Esta solução foi filtrada em membrana Millipore® de 0,22µm e quantificada em CLAE segundo metodologia descrita no item 3.4.1.

A quantidade de BZC associada as NC foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, que consiste em submeter a suspensão de NC à centrifugação a 280 g por 20 minutos em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 30 kDa (Microcon – Millipore®) e quantificar o ultrafiltrado em CLAE. Só consegue atravessar a membrana de 30 kDa o fármaco livre, sendo assim, por diferença do 100% de BZC e concentração de BZC não associado, determina-se a quantidade de fármaco associado as nanopartículas, utilizando-se a equação da reta da curva de calibração validada

(GAMISANS *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; KILIC *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2009; 2010).

Todas as análises para determinação da eficiência de associação da BZC em NC poliméricas foram realizadas em triplicata.

### **3.3.10. Estabilidade físico-química**

Embora as suspensões de NC poliméricas sejam descritas como sistemas estáveis devido ao movimento Browniano, que minimiza o processo de aglomeração e sedimentação, estão sujeitas a fenômenos de instabilidade entre eles a degradação do polímero, migração da substância ativa para o meio externo e contaminação microbiológica da fase aquosa. Desta forma, um fator limitante para a produção industrial de suspensões de NC poliméricas como sistema de liberação de fármacos é a manutenção da estabilidade físico-química (POHLMANN *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010)

O tamanho de partícula, o potencial zeta, a distribuição da massa molar do polímero, o teor de fármaco e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A estabilidade das suspensões de NC poliméricas contendo BZC foi avaliada a partir de medidas de tamanho, polidispersão, potencial zeta, eficiência de associação e pH, em função do tempo (zero, 30, 60, 90 e 120 dias), sendo as suspensões armazenadas em frascos âmbar, à temperatura ambiente.

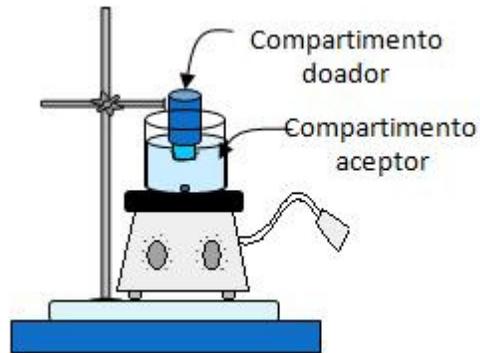
### **3.3.11. Cinética de liberação *in vitro* da benzocaína em nanopartículas poliméricas**

A liberação dos fármacos a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos depende de alguns fatores como: a) da desorção do fármaco da superfície das partículas; b) da difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas; c) da difusão através da parede polimérica das nanocápsulas; d) da erosão da matriz polimérica ou e) da combinação dos processos de difusão e erosão (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SIEPMANN & SIEPMANN, 2008).

Nos ensaios de cinética de liberação *in vitro*, são utilizados sistemas de dois compartimentos para observar a liberação dos fármacos livres e quando associados a sistemas carreadores (Figura 8). Nestes sistemas, utiliza-se uma membrana de celulose (Spectrapore, com poro para exclusão molecular de 1000 Da.) separados da amostra do compartimento acceptor contendo o solvente sob agitação leve (PAAVOLA *et al.*, 1995). O tamanho dos poros dessa membrana permite que passe através dela para o compartimento acceptor, somente fármacos livres, enquanto os fármacos complexados ficam retidos no compartimento doador até que o equilíbrio seja deslocado, pois o tamanho das NC não permite que elas atravessem os poros da membrana.

A liberação da BZC livre e associada às NC poliméricas foi realizada através de um sistema composto por dois compartimentos, sendo um compartimento doador (2 mL) e outro acceptor (200 mL, água MilliQ) separados por uma membrana de celulose com poros de exclusão molecular de 1000 Da, mantidos sob agitação leve constante e condições *sink*, onde o volume do meio de dissolução é grande o suficiente para que a concentração de fármaco presente não chegue a exceder 10% (m/v) do valor de sua concentração de saturação (PAAVOLA, *et al.* 1995, AULTON, 2002).

Alíquotas foram retiradas do compartimento acceptor em intervalos de 15, 30 e 60 min., durante 1440 minutos e quantificados CLAE segundo metodologia descrita no item 3.4.1. As medidas foram realizadas em triplicata.



**Figura 8:** Representação esquemática do ensaio de liberação *in vitro* em membrana de celulose (Spectrapore, com poro para exclusão molecular de 1000 Da).

### 3.3.12. Modelagem matemática

A modelagem matemática dos perfis de liberação de fármacos a partir de sistemas carreadores é de grande importância no meio acadêmico e industrial, com enorme potencial futuro. Métodos de modelagem matemática avaliam aproximações de pontos experimentais a um modelo descrito pela comparação estatística de parâmetros calculados. A avaliação quantitativa dos fenômenos envolvidos pode auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos na liberação do fármaco (SIEPMANN & SIEPMANN, 2008).

Os métodos de correlações empíricas e semi-empíricas para descrever a liberação de fármacos são direcionados por observações experimentais em detrimento de considerações teóricas (WASHINGTON, 1990). Os modelos empíricos/semi-empíricos podem ser utilizados para comparar diferentes perfis de liberação de fármacos (SIEPMANN & SIEPMANN, 2008).

Um modelo bastante utilizado para descrever a liberação de fármacos e fácil de aplicar é o modelo de Korsmeyer-Peppas, também conhecido como equação da lei da potência. Este modelo leva em consideração que o mecanismo de liberação do fármaco não segue a lei de Fick e sim um comportamento anômalo descrito na Equação 7.

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (7)$$

onde  $M_t$  é a quantidade de fármaco liberada em um determinado tempo  $t$ ,  $M_\infty$  é a quantidade de fármaco liberada em um tempo infinito,  $k$  é a constante cinética de liberação e  $n$  é o expoente de liberação. O valor de  $n$  é relacionado com a forma geométrica do sistema de liberação e determina o mecanismo de liberação;  $n$  é igual a 0,45 para processos controlados por difusão, enquanto valores de  $n$  entre 0,45 e 1,0 indicam um transporte anômalo não Fickniano e valores de  $n$  acima de 1,0 indicam intumescimento do polímero. (KORSMEYER *et al.*, 1983; PEPPAS, 1985; PEPPAS & SAHLIN, 1989) O modelo de Korsmeyer-Peppas é geralmente usado para analisar a liberação de um fármaco de uma matriz polimérica quando este não é bem conhecido ou quando um ou mais tipos de fenômenos estão envolvidos. A linearização da Equação 7 através da construção do gráfico de  $\ln M_t/M_\infty$  em função de  $\ln t$ , fornece o expoente de liberação ( $n$ ) e a constante de liberação ( $k$ , tempo<sup>-n</sup>) (KORSMEYER *et al.*, 1983; PEPPAS, 1985).

Para análise do comportamento de liberação da BZC a partir das NC poliméricas, foi utilizado o modelo teórico descrito por Korsmeyer-Peppas para liberação de fármacos de sistemas poliméricos (HARIHARAM, *et al.* 1994; FERRERO, *et al.* 2000; COSTA & LOBO, 2001; COLOMBO, *et al.* 2005; SIEPMANN & SIEPMANN, 2008; GRILLO, *et al.* 2010, MELO *et al.* 2010).

### **3.3.13. Ensaios de citotoxicidade in vitro (viabilidade celular)**

A cultura de célula é uma técnica que permite cultivar ou manter células isoladas fora do organismo onde existem, mantendo suas características próprias. Podem ser feitas culturas a partir de tecido humano, animal e vegetal (SPIER & GRIFFIHS, 1985).

Normalmente culturas de células são realizadas para investigar a fisiologia ou a bioquímica de algumas células e também para testar compostos, como fármacos e hormônios, medindo sua toxicidade. Assim como em outras técnicas já estudadas, a cultura de célula apresenta vantagens e desvantagens. A principal vantagem é a capacidade em que

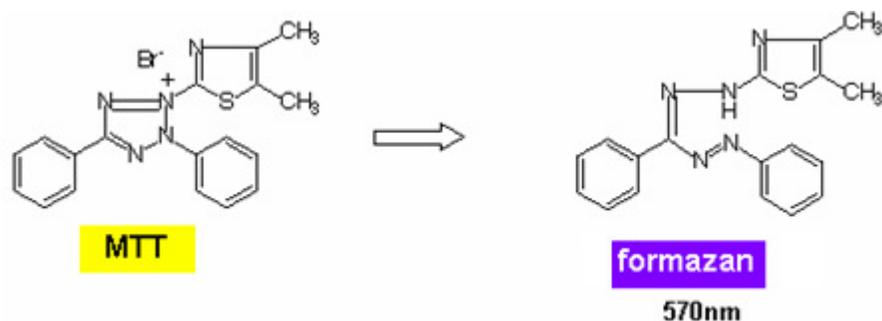
as células possuem de consistência, comparando-se com um tecido original. Já a principal desvantagem é que as células, após um período contínuo de crescimento, podem sofrer mudanças, tornando-se diferentes daquelas inicialmente utilizadas, isto acontece devido a adaptação das células a diferentes nutrientes, conferindo mudanças na atividade intracelular enzimática (BUTLER, 2004).

O termo fibroblasto é empregado para identificar o membro da família de células de origem mesenquimal que sintetiza os componentes fibrilares (colágeno e elastina), e não fibrilares (glicoproteínas e proteoglicanos) da matriz extracelular do tecido conjuntivo e tem como função produzir complexos de diferentes naturezas com macromoléculas (colágeno, laminina, tenascina), regulando assim suas deposições e orientações na matriz (CARVALHO *et al.*, 2005).

Os fibroblastos apresentam variações funcionais que permitem a caracterização de subpopulações celulares capazes de desempenhar vários papéis na histologia de diversos tecidos e órgãos e também em determinadas doenças. O cultivo de fibroblastos *in vitro* tem demonstrado que eles são capazes de se diferenciar em diversos subtipos celulares com características morfológicas e bioquímicas distintas, que podem corresponder à variedade celular observada *in vivo* (BAYREUTHER *et al.*, 1988).

Os fenótipos dos fibroblastos *in vitro* podem ser influenciados por fatores ambientais como: método de cultivo, suplemento nutricional, densidade populacional e natureza do substrato (CARVALHO *et al.*, 2005). Muitos testes *in vitro* são realizados utilizando fibroblastos, possibilitando análises de viabilidade celular entre compostos.

A viabilidade celular foi determinada através do teste de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT). O princípio do teste consiste na captação do MTT pelas células e sua redução a formazan (composto púrpura) pelas enzimas desidrogenases, resultando em acúmulo desse composto nas células viáveis. A solubilização das membranas celulares com etanol possibilita a liberação do formazan, que pode ser facilmente detectado por espectrofotometria na região visível, em 570nm (DENIZOT & LANG, 1986; WELDER, 1992).



**Figura 9:** Representação da redução do MTT à formazan.

Os ensaios foram realizados em células da linhagem 3T3 (fibroblastos de camundongos Balb-c 3T3), mantidas em cultura contínua em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100UI/mL de penicilina e 100µL de sulfato de estreptomicina, pH 7,4, 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. O plaqueamento foi realizado inoculando-se 1 x 10<sup>4</sup> células viáveis em placas de 96 cavidades, incubadas por 48 horas, até atingirem a semiconfluência. As células crescem em monocamadas e ficam aderidas ao fundo da placa (FRESHNEY, 2000).

Após incubação de 48 horas, na fase exponencial de crescimento das células, o DMEM foi cuidadosamente removido e, em seguida, as células foram expostas às seguintes formulações:

- BZC nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 mM;
- NC poliméricas com BZC nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 mM;
- NC poliméricas sem BZC nas mesmas diluições das NC com BZC;
- DMEM (controle negativo);
- DMEM + MTT (controle de 100% de células viáveis).

A concentração máxima testada de BZC foi de 5 mM (0.66 mg/mL) pois trata-se de seu limite de solubilidade em água (PINTO *et al.*, 2000).

Foram utilizadas 3 placas de 96 cavidades e cada amostra foi adicionada à 6 cavidades de cada placa, totalizando 18 determinações.

As células foram incubadas com as amostras à 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em seguida, as amostras foram retiradas, eliminou-se o resíduo destas

com PBS, adicionou-se MTT (0,5mg/mL) e incubou-se à 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas.

Ao final desse período, o meio contendo MTT não reduzido foi removido cuidadosamente e, adicionou-se a placa 0,1mL de etanol, a fim de dissolver os cristais de formazan produzidos pela redução do corante. As placas foram agitadas vigorosamente em agitador orbital de placas Cientec, modelo Kline 151, por cerca de 20 minutos para garantir a solubilização do formazan. A absorvância (A) da solução em cada cavidade foi medida em leitor de placas (Labsystems Multiskan MS) em 570nm e, calculou-se as porcentagens de células viáveis a partir da Equação 8.

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{DMEM}}}{A_{\text{DMEM/MTT}} - A_{\text{DMEM}}} \times 100 \quad (8)$$

### **3.3.14. Avaliação da atividade anestésica in vivo**

#### **3.3.14.1. Bloqueio do nervo ciático em camundongos**

A técnica do bloqueio do nervo ciático em camundongos foi realizada de acordo com o método descrito por Leszczynska & Kau (1992). Inicialmente, mediu-se a habilidade de cada camundongo em caminhar normalmente, com os quatro membros, por uma tela metálica (de 5 mm de diâmetro) na posição normal e invertida. Somente os animais que preencheram tal requisito, foram submetidos à experimentação.

Os camundongos foram divididos em grupos de 6-7 animais, selecionados randomicamente para o ensaio farmacológico e administrou por infiltração intramuscular (0,1mL) na pata posterior direita, na região próxima ao nervo ciático formulações de NC poliméricas sem o fármaco, solução aquosa de BZC (0.06, 0.6 ou 4 mg.mL<sup>-1</sup>), BZC<sub>PLA</sub> (0.06 ou 0.66 mg.mL<sup>-1</sup>), BZC<sub>PLGA</sub> ou BZC<sub>PCL</sub> (0.6 ou 4 mg.mL<sup>-1</sup>).

### **3.3.14.2. Avaliação do bloqueio do nervo ciático – bloqueio motor**

A presença da anestesia foi definida como a perda do controle motor da pata injetada sendo evidenciada pelo atraso do membro posterior e/ou fechamento dos dedos (FELDMAN & COVINO, 1988). A intensidade do bloqueio motor foi avaliada de acordo com valores de *escore*: 0 (uso normal da pata injetada), 1 (incapacidade de flexionar completamente o membro injetado) e 2 (impossibilidade do uso da pata injetada) (GANTENBEIN *et al.*, 1996, 1997).

A avaliação foi feita a cada minuto durante os 5 primeiros min. após a administração e, posteriormente, em intervalos de 5-10 min. até que fosse verificada a total recuperação dos movimentos do animal (pelo menos 1 h de observação). A latência (tempo entre a injeção e a perda da função motora), tempo para alcançar o *escore* máximo (Tmax), tempo de recuperação da função motora (tempo de recuperação) e o efeito total do anestésico local (área sobre a curva efeito versus tempo - ASC) foram avaliados (LESZCZYNSKA & KAU 1992; GANTENBEIN *et al* 1997).

### **3.3.14.3. Avaliação do bloqueio do nervo ciático–bloqueio sensorial**

O bloqueio sensorial foi medido pelo limiar de remoção da pata dos animais frente a um estímulo mecânico, como descrito por Randall & Sellito (1957). Para a execução do teste utilizou-se um equipamento apropriado, chamado analgesímetro, que gera um aumento gradual da força (em gramas) exercida por uma extremidade plástica sobre a superfície dorsal da pata do animal (FLETCHER *et al.*, 1997) (Figura 10). Quinze minutos após a injeção das formulações, a pata do animal tratada foi colocada sob a extremidade plástica do aparelho onde a pressão foi sendo aplicada e aumentada a um ritmo constante até que o animal retirasse a pata como sinal indicativo de nocicepção (*Pain Withdrawal Threshold to Pressure* – PWTP).



**Figura 10:** Ilustração do equipamento analgesímetro utilizado durante o teste PWTP (de ARAÚJO *et al.*, 2004).

A analgesia foi definida como um aumento no limiar de pressão dos animais, pelo menos 50% maior que o observado nos grupos controle. O ponto final da analgesia foi estabelecido quando não houvesse diferença estatística entre os grupos teste e controles. Estabeleceu-se um valor máximo de pressão (*cut-off*) de 150 g para evitar lesões nas patas e estimulação excessiva dos nociceptores (de ARAÚJO *et al.*, 2004; 2008). As medidas foram realizadas durante 5 h., com intervalos de 15 min. durante a primeira hora, 30 min. durante a segunda e terceira horas e, finalmente, 60 min. nas últimas duas horas de teste. As medidas de pressão exercida para cada grupo experimental foram relacionadas graficamente em função do tempo.

### **3.3.15. Análise estatística**

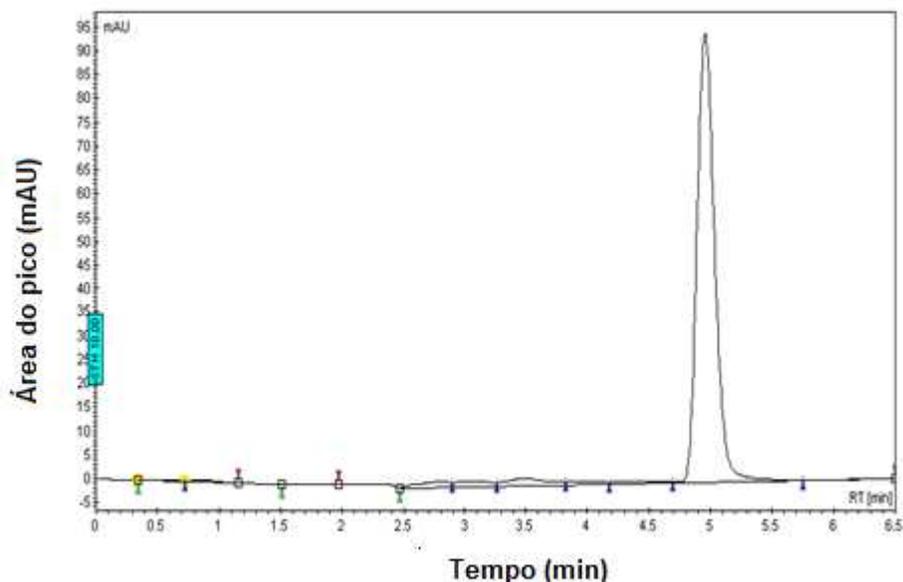
Os dados da avaliação do bloqueio motor (latência, T<sub>máx</sub>, tempo de recuperação, ASC) foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis e os valores foram expressos em mediana (limite mínimo e máximo). A avaliação dos dados de função sensorial e o ensaio de citotoxicidade foram analisados por variância de uma via (*One-way ANOVA*) com teste posterior de Tukey-Kramer (ZAR, 1996). Significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ .

Os dados foram analisados utilizando os programas Origin 7.0 (Microcal TM Software Inc., USA) e Graph Pad Instat (Graph Pad Software Inc., USA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de benzocaína em nanocápsulas poliméricas

As condições cromatográficas utilizadas para quantificação do anestésico local benzocaína foram consideradas adequadas, pois foi obtido um pico cromatográfico simétrico da BZC (Figura 11) e viável, pois a corrida cromatográfica ocorreu em um tempo de aproximadamente 5 minutos.

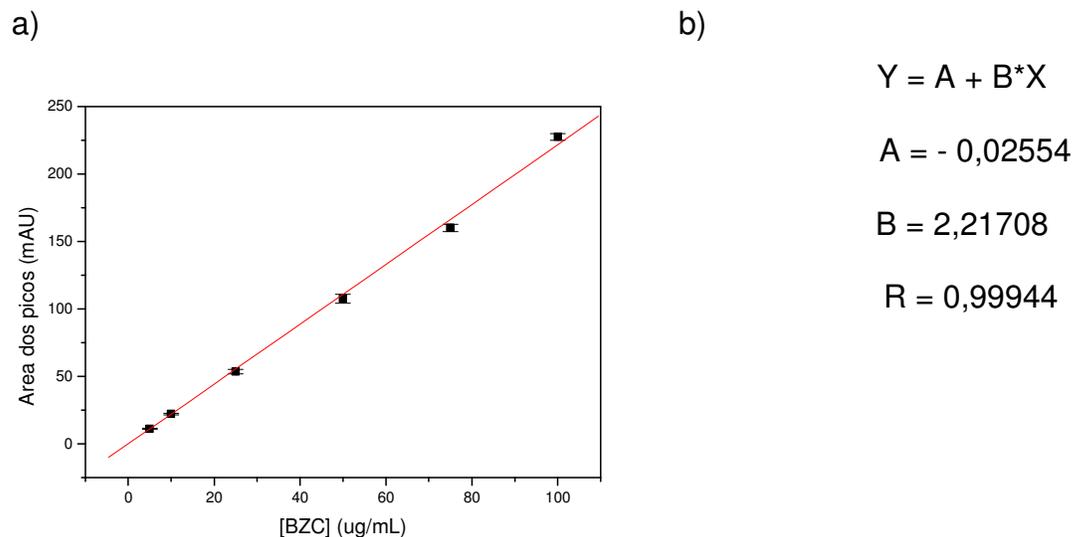


**Figura 11:** Cromatograma da BZC na concentração 50 µg/mL obtido sob condições cromatográficas descritas no item 3.3.1.

O método de quantificação da BZC foi considerado específico uma vez que nenhum pico de componentes da fase móvel, diluente ou do placebo co-eluíram com o pico correspondente ao fármaco (cromatogramas não mostrados).

A linearidade do método foi avaliada a partir de regressões lineares de nove curvas analíticas (Figura 12). O coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva analítica média ( $n=9$ ) foi de

0,99944 e na Tabela 4, tem-se os coeficientes de correlação ( $r$ ) das curvas de calibração realizadas a cada dia, durante três dias consecutivos, sendo cada curva em triplicata. O coeficiente de correlação é um parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e todos nossos valores de correlação linear estão acima deste valor preconizado pela ANVISA, sendo o método, portanto, considerado linear (BRASIL, 2003).



**Figura 12:** a) Curva analítica da BZC (n=9). b) Parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.

**Tabela 4:** Coeficientes de correlação ( $r$ ) das curvas de calibração em três dias consecutivos.

	Dia 1 (n=3)	Dia 2 (n=3)	Dia 3 (n=3)
$r$	0,99875	0,99932	0,99987

A reprodutibilidade ou precisão intra-dia foi encontrada a partir da determinação do desvio padrão relativo (DPR) intra-dia e a precisão intermediária ou precisão inter-dias foi

determinada a partir da determinação do DPR inter-dias. Estes valores de DPR estão expressos na Tabela 5.

**Tabela 5:** Valores de desvio padrão relativo (DPR) das concentrações de BZC determinados para avaliação da precisão.

[BZC] ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR dia 1 (%)	DPR dia 2 (%)	DPR inter-dias (%)
15	3,81	4,50	4,15
30	4,31	3,76	4,03
90	2,53	0,49	1,51

Os valores de DPR determinados intra-dia e inter-dias foram todos abaixo do valor preconizado pela ANVISA e ICH, que é de no máximo 5%, portando o método pode ser considerado preciso (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

A exatidão foi determinada através de valores de concentração determinados experimentalmente, comparados à concentração teórica, como se pode observar na Tabela 6.

**Tabela 6:** Valores de concentração de BZC determinados para avaliação da exatidão.

<b>[BZC] teórica (µg/mL)</b>	<b>[BZC] obtida (µg/mL)</b>	<b>% de Recuperação</b>	<b>[BZC] obtida (µg/mL)</b>	<b>% de Recuperação</b>
15,00	15,19	101,27	14,51	96,73
15,00	14,83	98,87	14,29	95,27
15,00	14,69	97,93	14,87	99,13
30,00	28,63	95,43	30,43	101,43
30,00	29,08	96,93	29,44	98,13
30,00	29,75	99,17	29,75	99,17
90,00	92,95	103,27	92,72	103,02
90,00	91,14	101,27	92,99	103,32
90,00	92,99	103,32	93,13	103,47
<b>Média</b>	—	<b>99,72</b>	—	<b>99,96</b>
<b>DP</b>	—	<b>2,75</b>	—	<b>3,00</b>
<b>DPR</b>	—	<b>2,76</b>	—	<b>3,01</b>
<b>Média (n=18)</b>	<b>99,84</b>			
<b>DPR (n=18)</b>	<b>2,89</b>			

Todos os resultados obtidos encontram-se dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para as concentrações analisadas (de 95,0 a 105%), o que torna o método exato. A exatidão é a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. A porcentagem de recuperação variou de 95,43 à 103,47 %, estando dentro das especificações estabelecidas (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

A partir dos dados obtidos com as regressões lineares aplicados às equações 3 e 4 determinou-se o limite de detecção, sendo de 2,37 µg/mL e o limite de quantificação, sendo de 5,93 µg/mL.

Todos os parâmetros de validação obtidos para o método analítico proposto foram considerados satisfatórios por atenderem as especificações estabelecidas pela ANVISA (2003) e ICH (1996). O método, portanto, pode ser considerado específico, linear, preciso e

exato, dentro do intervalo de concentração entre 5 e 100 µg/mL de BZC, sendo aplicável a ensaios de determinação de teor de BZC em NC poliméricas.

## 4.2. Caracterização das formulações de nanocápsulas preparadas com três biopolímeros diferentes contendo benzocaína

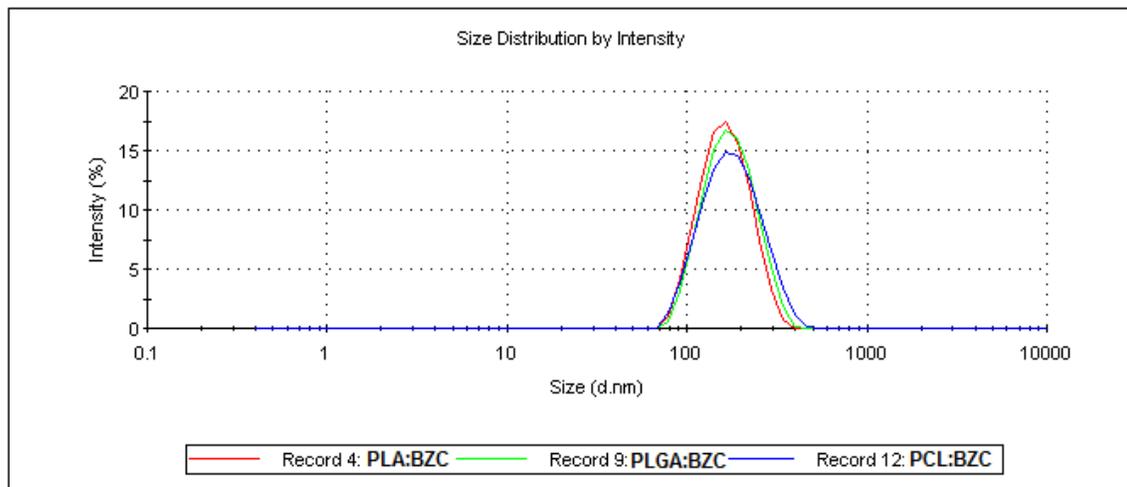
### 4.2.1. Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH

Inicialmente foram preparadas formulações distintas de NC com os polímeros PLGA, PLA e PCL conforme descrito no item 3.3.3.

As medidas de diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta e pH das partículas são parâmetros que indicam estabilidade das NC em suspensão. A Tabela 7 lista os valores medidos desses parâmetros para as NC preparadas com os polímeros PLGA, PLA e PCL contendo BZC. A Figura 13 mostra a distribuição de tamanho das nanocápsulas.

**Tabela 7:** Valores de diâmetro médio (diâmetro hidrodinâmico. nm), polidispersão, potencial zeta (mV) e pH das suspensões de NC poliméricas.

Parâmetro	PGLA-NC: BZC	PLA-NC:BZC	PCL-NC:BZC
Diâmetro médio(nm)	123,0	190,1	183,6
Polidispersão	0,12	0,135	0,071
pH	3,86	3,74	4,0
Potencial zeta (mV)	-33,6	-38,5	-32,7



**Figura 13:** Distribuição de diâmetro (nm) por intensidade (%) de nanocápsulas de PLGA, PLA e PCL contendo BZC.

Os resultados apresentados na Tabela 7 e na Figura 13 indicam que as suspensões de NC poliméricas contendo BZC apresentaram diâmetro e índice de polidispersão compatíveis com suspensões coloidais (GUTERRES *et al.*, 1995). Os valores de potencial zeta destas formulações indicaram boa estabilidade em suspensão, uma vez que os valores foram menores que -30 mV (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

#### **4.2.2. Eficiência de associação de benzocaína em nanocápsulas poliméricas**

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada (SOPPIMATH, *et al.*, 2001; MAGENHEIM & BENITA, 1991). Além disto, outros fatores influenciam na associação, como por exemplo, as características físico-químicas do fármaco (CALVO *et al.*, 1997; GUTERRES *et al.*, 1995), o pH do meio (GOVENDER *et al.*, 1999), as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero (VILA *et al.*, 2002), a quantidade de fármaco adicionada à formulação

(BRASSEUR *et al* 1991), a ordem de adição do fármaco na formulação e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Conhecendo todas estas interferências foram preparadas nanocápsulas poliméricas contendo BZC utilizando-se três biopolímeros com estrutura química diferente. A eficiência de associação do fármaco foi dada de acordo com o item 3.3.9, descrito na metodologia. Os cromatogramas foram analisados e as áreas calculadas e transformadas em percentagem de acordo com a Tabela 8.

**Tabela 8:** Eficiência de associação de BZC em nanocápsulas poliméricas

Formulação	Eficiência de associação (%)
PLGA-NC: BZC	70
PLA-NC:BZC	73
PCL-NC:BZC	74

A eficiência de associação de BZC em NC poliméricas foi em torno de 70%, que é um valor bastante alto quando comparado com outros estudos descritos na literatura para anestésicos locais (GORNER *et al.*, 1999; POLAKOVIC *et al.*, 1999; GOVENDER *et al.*, 2000; MORAES *et al.*, 2007; 2009). O valor de associação das moléculas de BZC em NC poliméricas é devido à baixa solubilidade em água da BZC, que faz com que a interação com a matriz polimérica e com o núcleo oleoso seja grande. Nestas formulações a quantidade de BZC utilizada foi de 4 mg/mL, bem acima da sua solubilidade aquosa (0,66 mg/mL) (PINTO *et al.*, 2000; MELO *et al.*, 2010).

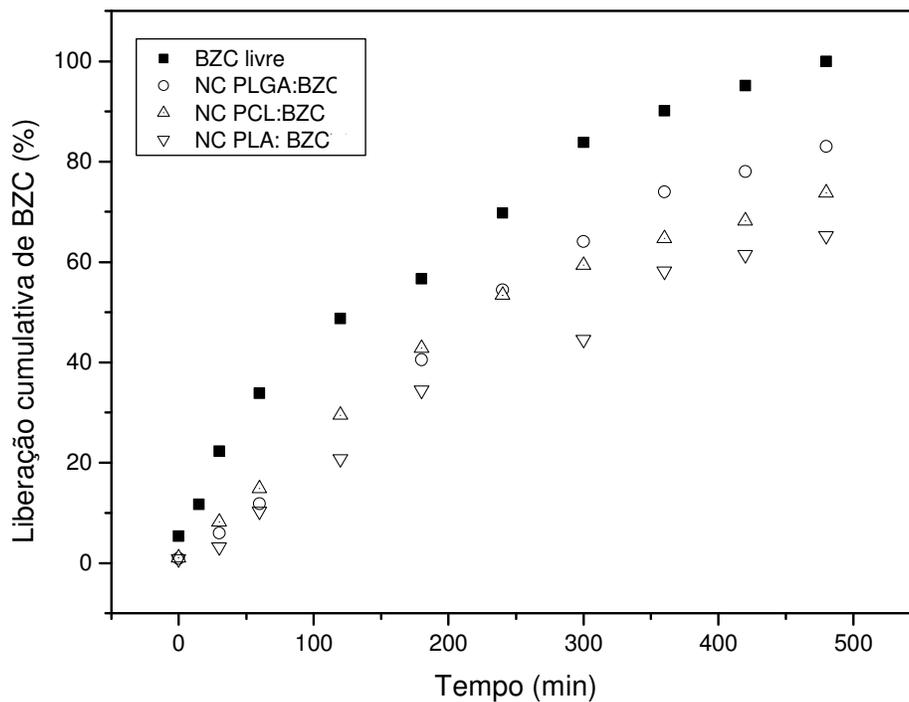
A associação da BZC com NC poliméricas mostrou um aumento na solubilidade de seis vezes, um fato que é suficiente para melhorar o efeito anestésico já que este fármaco não é usado em anestesia infiltrativa, devido a baixa solubilidade em água (PINTO *et al.*, 2000; MELO *et al.*, 2010).

#### **4.2.3. Cinética de liberação *in vitro* da benzocaina em nanopartículas poliméricas**

O perfil de liberação de fármacos a partir de sistemas nanoestruturados constitui um aspecto extremamente relevante no que concerne à eficiência terapêutica. Dessa maneira, sua determinação é fundamental para a caracterização das nanopartículas. Neste sentido este ensaio pode fornecer informações importantes quanto à interação fármaco-carreador e o mecanismo envolvido no processo de liberação (POLAKOVIC *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Os sistemas de liberação de fármacos do tipo reservatório, como as nanocápsulas, são governados de preferência por difusão através da parede polimérica (SOPPIMATH *et al.*, 2001). O método de difusão do fármaco através de uma membrana de diálise descrito neste trabalho pode ser utilizado para determinar perfil de liberação do fármaco em nanocápsulas. Vários estudos utilizam esse método para essa finalidade (VERGER *et al.*, 1998; YONCHEVA *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2005; VENKATRAMAN *et al.*, 2005; DILLEN *et al.*, 2006; SONAJE *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2009; GRILLO *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2010).

A partir dos ensaios de liberação foi possível observar a liberação da BZC quando associada ou não às NC poliméricas em função do tempo (Figura 14). Neste ensaio, o fármaco possui a capacidade de atravessar os poros da membrana, porém as NC poliméricas não a atravessam e, desta forma, é possível observar o efeito da associação do fármaco na velocidade de liberação deste da parede polimérica da nanocápsula. Durante o ensaio foram coletadas alíquotas em tempos definidos e o fármaco quantificado por CLAE, sendo que após a quantificação deste, o resultado foi expresso em função de percentagem de liberação.



**Figura 14:** Resultados dos ensaios de liberação *in vitro*: BZC livre, associada às nanocápsulas de PLGA (NC PLGA:BZC), de PCL (NC PCL:BZC) e de PLA (NC PLA:BZC), temperatura ambiente (n=3).

Os resultados apresentados na Figura 14 mostraram que a liberação da BZC associada às NC poliméricas ocorre mais lentamente comparada à liberação da BZC livre. Essa diferença no perfil de liberação pode ser atribuída aos mecanismos de liberação de nanocápsulas, que inicialmente provavelmente está ocorrendo na dessorção de drogas a partir da superfície de nanopartículas poliméricas e é então mantida pela difusão da droga através da parede polimérica (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A liberação de benzocaína de nanocápsulas de PLGA e PCL apresentou um perfil semelhante, mas a liberação de benzocaína a partir de nanocápsulas de PLA foi mais lento quando comparado com as outras duas formulações. Isso ocorreu porque a natureza do polímero pode influenciar a liberação do fármaco.

O ácido láctico é uma molécula quiral e por isso, tem dois isômeros ativos, L e D. A polimerização destes monômeros leva a formação de um polímero semicristalino (NAIR & LAURENCIN, 2007). Já a polimerização da mistura racêmica leva à formação de um polímero amorfo. Poli (L-lactídeo) (PLA) é um polímero cristalino, é mais resistente à hidrólise e possui degradação mais lenta em comparação com o PCL e PLGA, este pode ser um importante fator responsável por um perfil de liberação do fármaco mais lento (SONAJE *et al.*, 2007; LUDERER *et al.*, 2010).

#### **4.2.3.1. Modelo matemático para avaliação do mecanismo de liberação da benzocaína a partir das nanocápsulas poliméricas**

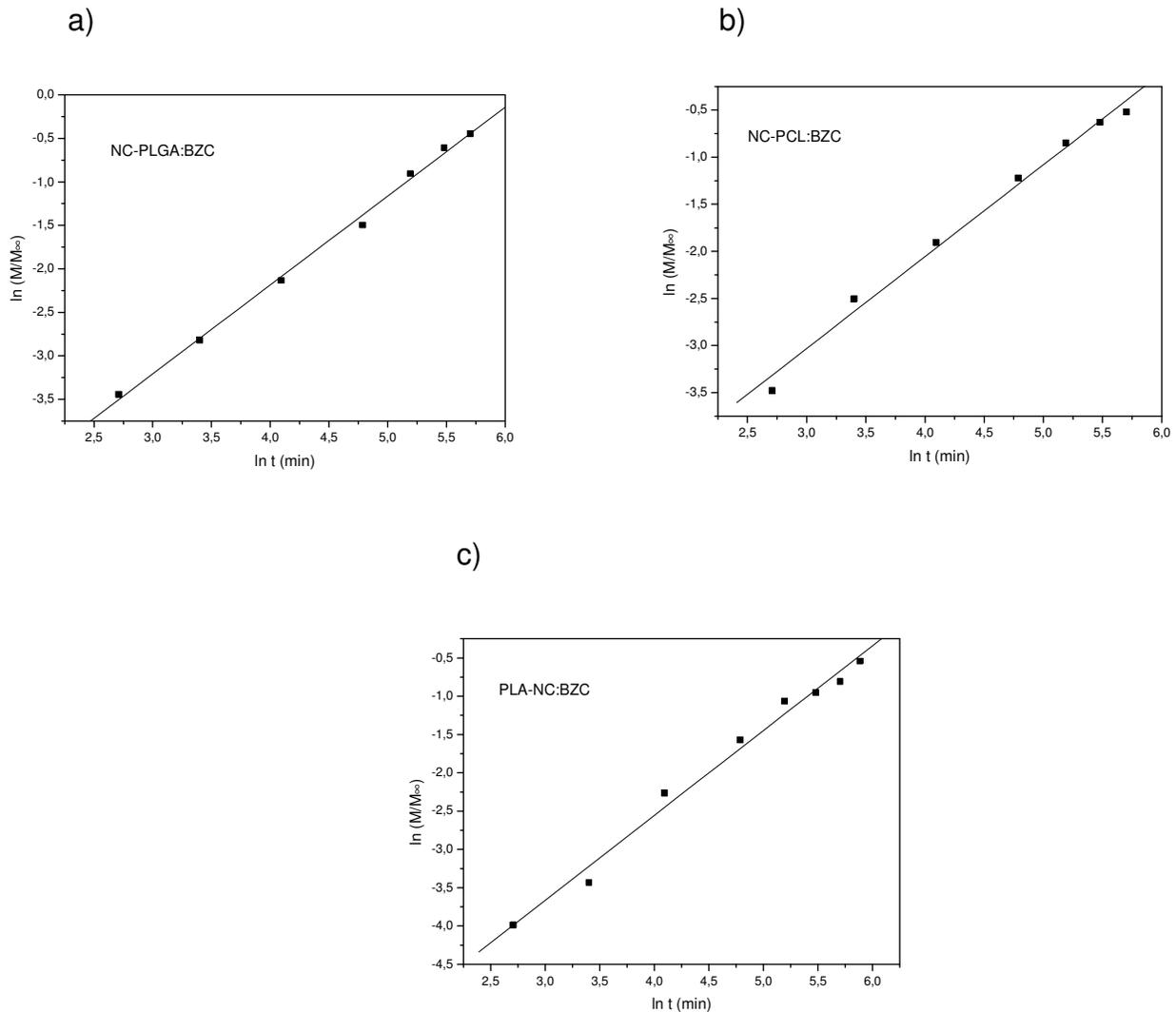
Desta forma, sabe-se que o mecanismo de liberação do fármaco a partir de nanopartículas (como nanocápsulas) é determinado por diferentes fenômenos físico-químicos (COSTA & LOBO, 2001). Alguns modelos matemáticos são utilizados extensivamente para analisar as características de liberação da substância ativa a partir de sistemas poliméricos (COSTA & LOBO, 2001). Um modelo que tem sido utilizado para verificar o tipo de liberação de fármacos de sistemas nanoestruturados tem sido o de Korsmeyer-Peppas, dentre vários modelos descritos na literatura (FORTUNATO *et al.*, 2007; SRIAMORNSAK & SUNGTHONGJEEN, 2007; DOMINGUES *et al.*, 2008; GRILLO *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2010 ).

O modelo Korsmeyer-Peppas é um modelo semi-empírico que correlaciona a liberação do fármaco versus tempo por uma única equação exponencial e tem sido utilizado para avaliar a liberação do fármaco a partir de dispositivos poliméricos para liberação controlada, especialmente quando o mecanismo de liberação do fármaco não é conhecido, ou quando houver mais de um mecanismo envolvido (KORSMEYER *et al.*, 1983; PEPPAS, 1985; COSTA & LOBO, 2001).

Para determinar o mecanismo de liberação de benzocaína a partir de nanocápsulas de PLGA, PLA e PCL é controlado por difusão de Fick, o resultado da curva de liberação foi tratado pelo modelo Korsmeyer-Peppas. Quando a equação do modelo Korsmeyer-Peppas é

convertida em logaritmo, a equação se torna  $\ln Mt / M_{\infty} = \ln k + n \ln t$  e a inclinação  $n$  pode ser determinada pelo gráfico do logaritmo da taxa de liberação em função do logaritmo do tempo. Neste contexto, a partir das curvas de liberação, e em função deste modelo foram realizadas regressões lineares a fim de se determinar os valores da constante cinética de liberação ( $k$ ), bem como o coeficiente de correlação linear ( $r$ ).

Os resultados obtidos das análises do modelo aplicado às curvas de liberação da BZC das NC poliméricas, bem como os gráficos dos tratamentos estão apresentados na Figura 15 e Tabela 9.



**Figura 15:** Resultados obtidos da análise do modelo matemático Korsmeyer-Peppas: a) nanocápsulas de PLGA: BZC (NC-PLGA:BZC), b) nanocápsulas de PCL:BZC (NC-PCL:BZC) e c) nanocápsulas de PLA:BZC (NC-PLA:BZC).

**Tabela 9:** Valores dos parâmetros obtidos a partir da aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as curvas de liberação da BZC associada com nanocápsulas de PLGA, PCL e PLA.

Parâmetro	PLGA-NC:BZC	PLA-NC:BZC	PCL-NC:BZC
	$n = 1,02$	$n = 0,95$	$n = 0,97$
<b>Constante cinética (k)</b>	0,0018 min <sup>-1</sup>	0,0016 min <sup>-1</sup>	0,0025 min <sup>-1</sup>
<b>Coefficiente de correlação (r)</b>	0,998	0,989	0,995

O modelo Korsmeyer-Peppas é utilizado para descrever a liberação de um soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e/ou do transporte Caso II (não-Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) (KORSMEYER & PEPPAS, 1991; SIEPMANN & SIEPMANN, 2008). Neste modelo leva-se em conta não só processos difusivos, mas também um componente que avalia o relaxamento da matriz polimérica como processos determinantes na liberação do fármaco.

Korsmeyer-Peppas (1983) determinou que valores de expoente de liberação  $n$  para caracterizar os diferentes mecanismos de liberação (transporte Fickiano, transporte anômalo (caso II), etc), onde para valores de  $n$  ( $0,45 < n < 1,0$ ) indicam cinética de transporte anômalo, ou seja, uma combinação dos dois mecanismos de difusão e de transporte de Caso II. Valores de  $n$  acima de 1,0 indicam intumescimento do polímero. Nos sistemas de liberação controlada, a extensão e a velocidade de liberação do fármaco resulta da combinação da difusão com o transporte de Caso II das moléculas de fármaco através das cadeias poliméricas (RITGER e PEPPAS, 1987; SIEPMANN & SIEPMANN, 2008). Nestes casos, a difusão obedece às leis de Fick, enquanto o transporte de Caso II reflete a influência do relaxamento do polímero no movimento das moléculas na matriz.

A análise dos dados mostra que os valores de expoente de liberação  $n$  determinado para NC-PLGA, NC-PCL e NC-PLA foram 1,02, 0,97 e 0,95 respectivamente, indicando assim uma combinação de dois mecanismos (difusão e relaxamento).

O valor da constante de liberação (k) das formulações apresentaram valores aproximados, sendo 0,0018 min<sup>-1</sup> para a formulação NC-PLGA:BZC, 0,0016 min<sup>-1</sup> para NC-

PLA:BZC e  $0,0025 \text{ min}^{-1}$  para NC-PCL:BZC. Observando a tabela 9, nota-se que a formulação de NC-PLA: BZC possui o menor valor de  $k$ , e desta forma apresenta o perfil de liberação mais lento.

#### **4.2.4. Atividade do anestésico local: bloqueio do nervo ciático**

##### **4.2.4.1. Bloqueio motor**

A Tabela 10 mostra os dados da avaliação do bloqueio motor para BZC livre, BZC:PLA, BZC:PLGA e BZC:PCL, em relação aos parâmetros como latência, tempo de pontuação máxima do bloqueio motor o tempo, para a recuperação, o efeito total do anestésico local (expresso em AUC) em diferentes concentrações. A injeção das NC poliméricas sem BZC não induziu nenhum efeito de bloqueio motor nos camundongos.

**Tabela 10:** Latência,  $T_{max}$ , tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (ASC) induzido pelas formulações de BZC livre e associada às NC poliméricas.

Grupos	Concentração (%)	Latência (seg)	$T_{max}$ (min)	Tempo de recuperação (min)	ASC (escore/h)
BZC	0,06	58,0 (45,0-80,0)	1 (1-2)	10,0 (10,0-15,0)	13,5 (13,5-14,0)
	0,4	20,0 (25,0-35,0)	1 (1-2)	25,0 (15,0-30,0)	43,0 (33,5-44,0)
BZC <sub>PLA</sub>	0,006	68,0 (42,0-90,0)	1 (1-2)	20,0 (15,0-25,0)	23,5 (23,5-24,0)
	0,06	30,0 (38,0-50,0)	1 (1-2)	40,0 (35,0-45,0) <sup>a***</sup>	47,5 (37,5-57,5) <sup>a***</sup>
BZC <sub>PLGA</sub>	0,06	50,0 (40,0-70,0)	1 (1-2)	10,0 (10,0-15,0)	23,5 (13,5-24,0)
	0,4	30,0 (25,0-40,0)	1 (1-2)	20,0 (15,0-30,0)	43,5 (33,5-55,5)
BZC <sub>PCL</sub>	0,06	48,0 (40,0-60,0)	1 (1-2)	10,0 (10,0-15,0)	27,5 (17,5-27,5)
	0,4	35,0 (25,0-50,0)	1 (1-2)	20,0 (15,0-25,0)	45,5 (35,5-55,5)

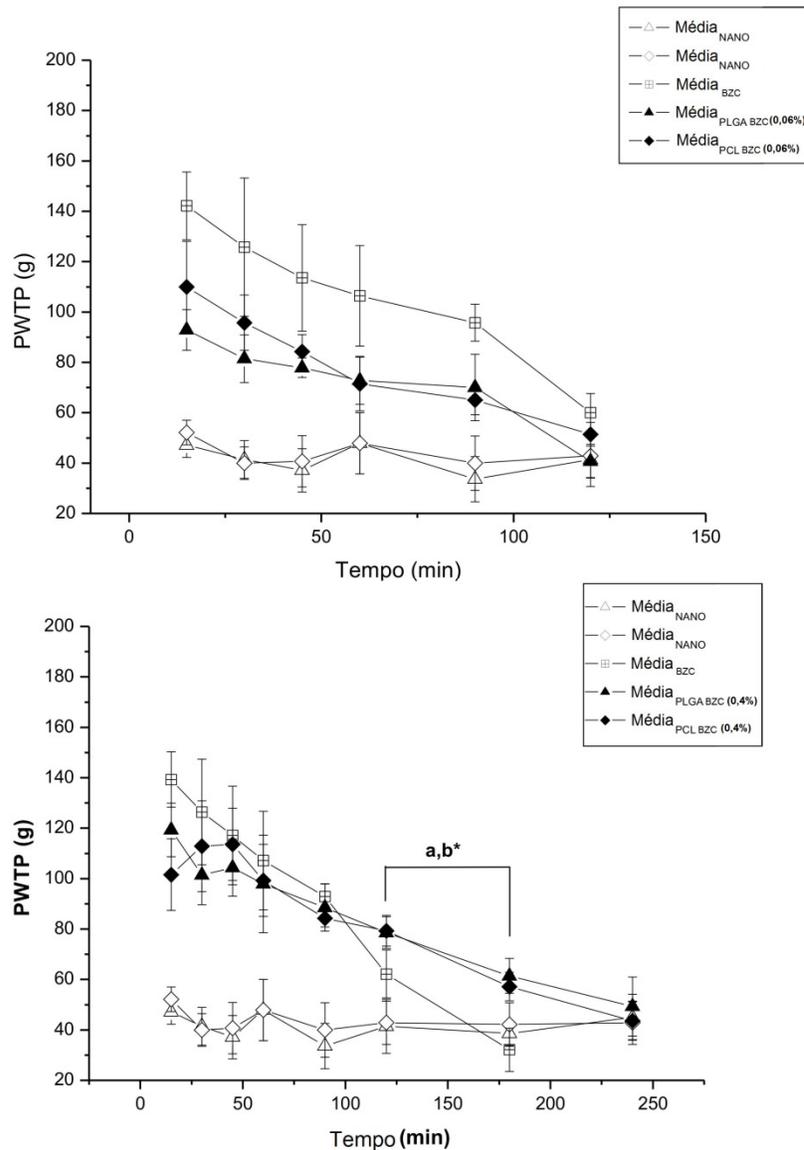
Dados expressos em mediana (mínimo – máximo) (n = 6-7). <sup>a</sup>BZC<sub>PLA</sub> e BZC, BZC<sub>PLGA</sub> ou BZC<sub>PCL</sub> 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>.

\*\*\* $p < 0.001$  (Teste de Kruskal-Wallis). BZC = benzocaína;  $T_{max}$  = tempo para atingir o escore máximo; ASC = área sobre a curva; BZC<sub>PLA</sub> = nanocápsulas de PLA contendo benzocaina; BZC<sub>PLGA</sub> = nanocápsulas de PLGA contendo benzocaina; BZC<sub>PCL</sub> = nanocápsulas de PCL contendo benzocaína.

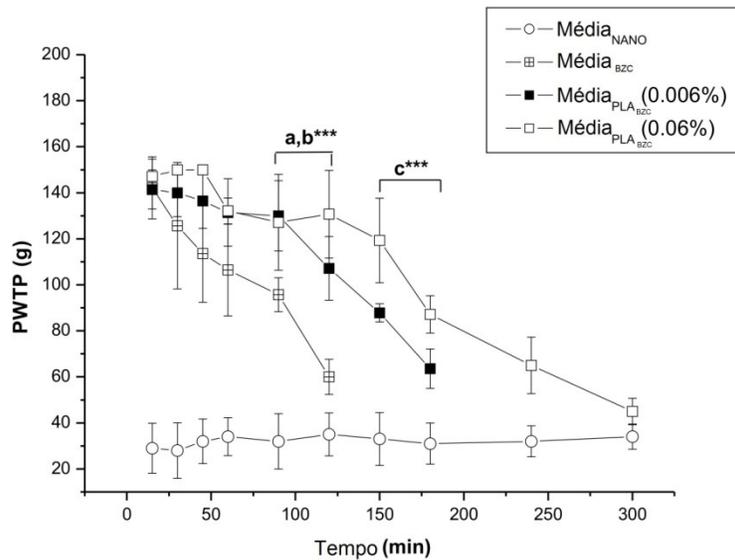
A partir dos resultados, nenhum sinal de bloqueio motor foi observado após a injeção de uma solução de BZC livre. No entanto, a função motora global foi reduzida, de forma dependente da concentração, pelo tratamento com BZC livre, BZC:PLA, BZC:PLGA e BZC:PCL. As comparações intergrupos mostraram diferença estatística entre BZC:PLA vs BZC livre, e BZC:PLGA vs BZC:PCL em relação ao tempo de recuperação e efeito total do anestésico local (ASC) ( $p < 0,001$ ), indicando que a encapsulação da BZC em nanocápsulas de PLA prolongou o tempo de recuperação e aumentou o efeito total do anestésico local.

#### **4.2.4.2. Bloqueio sensorial**

A avaliação do bloqueio sensorial (Figura 16) mostrou que PLGA:BZC e PCL:BZC apresentaram efeitos analgésicos similares. O tratamento com 0,06 e 0,4% de PLGA:BZC e PCL:BZC não aumentaram a intensidade ou a duração da analgesia em relação a BZC livre. Por outro lado, as comparações entre 0,006 e 0,06% PLA:BZC (Figura 17) e BZC livre mostrou diferenças estatisticamente significantes no intervalo de 90 até 300 min após a injeção, prolongando a duração da analgesia de até 180 min e 300 min (de 0,006 e 0,06% PLA:BZC, respectivamente ) e aumentando a intensidade da analgesia (cerca de 2 vezes com  $p < 0,001$ ), quando comparado a 0,06% BZC livre (Figuras 16 e 17).



**Figura 16:** Curvas efeito x tempo no teste PWTP da avaliação da função sensorial do nervo ciático realizado em camundongos (n = 6-7/grupos). NANO = placebo; BZC = benzocaína; PLGA:BZC = nanocápsulas de PLGA contendo benzocaína; PCL:BZC = nanocápsulas de PCL contendo benzocaína. Dados expressos como média ± dp. Diferenças estatísticas referentes: PLGA:BZC e BZC; PCL:BZC e BZC. \* $p < 0.05$ . (One-Way ANOVA com *Tukey-Kramer*).



**Figura 17:** Curvas efeito x tempo no teste PWTP da avaliação da função sensorial do nervo ciático realizado em camundongos ( $n = 6-7/\text{grupos}$ ). NANO = placebo; BZC = benzocaina; PLA:BZC = nanocápsulas de PLA contendo benzocaína. Dados expressos como média  $\pm$  dp. Diferenças estatísticas referentes: a – PLA BZC e BZC; b – PLA BZC e BZC; c – 0,06 % PLA: BZC e 0,006 % PLA:BZC. \*\*\* $p < 0,001$ . (One-Way ANOVA com *Tukey-Kramer*).

Apesar da BZC não ser clinicamente utilizada por via parenteral, o bloqueio do nervo ciático foi utilizado como modelo experimental, fornecendo informações sobre a intensidade e duração do bloqueio motor e sensorial para todas as formulações em comparação com a solução de BZC livre. Além disso, as concentrações de BZC (0,006; 0,06 e 0,4%) utilizadas neste estudo, foram baseados naqueles utilizados experimentalmente e clinicamente para parenteral bem descrita anestésicos locais, como a bupivacaína (0,0625 e 0,5%) (SINNOT & STRICHARTZ, 2003; GINOSAR *et al.*, 2010).

A encapsulação de BZC em NC de PLA prolongou a duração e aumentou a intensidade do efeito anestésico. Por outro lado, as NC de PLGA e PCL contendo BZC não apresentaram o mesmo efeito, mesmo quando usada concentração mais alta (0,4%). Considerando isso, é possível fornecer uma avaliação inicial da distribuição do fármaco e os efeitos farmacológicos de NC poliméricas contendo BZC. Os resultados mostraram uma

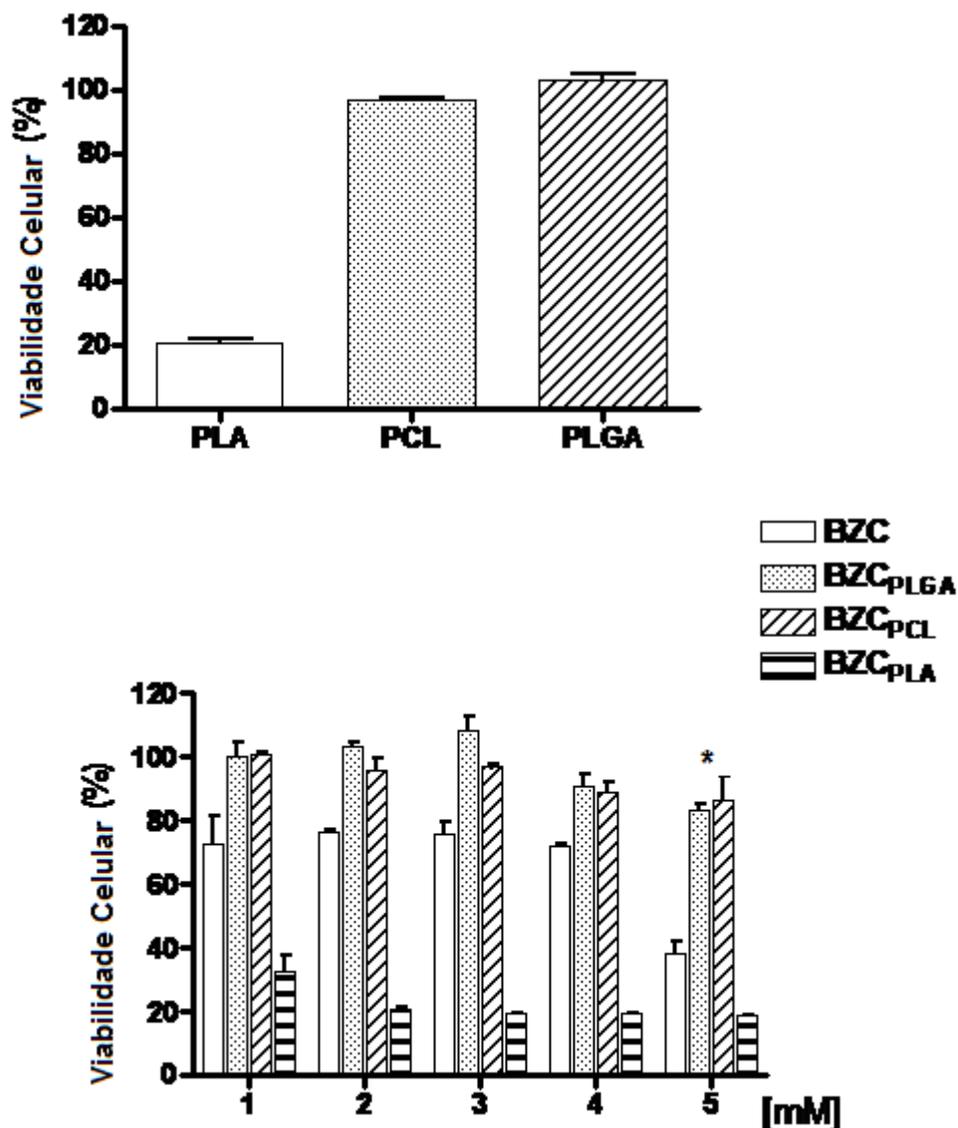
diminuição na taxa de liberação da BZC ( $k = 0,0016 \text{ min}^{-n}$ ) evocando um processo lento na liberação *in situ* causada pelo encapsulamento em nanocápsulas de PLA.

#### **4.2.5. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* (viabilidade celular)**

Cada fármaco possui uma faixa de ação acima da qual é tóxica e abaixo da qual é ineficaz. Os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Os sistemas de liberação modificada procuram manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, diminuindo a frequência de administrações e reduzindo a toxicidade (KUZMA *et al.*, 1997).

Os ensaios foram realizados de acordo com o método descrito no item 3.3.13. A viabilidade celular foi determinada através do teste de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT). O princípio do teste consiste na captação do MTT pelas células e sua redução a formazan (composto púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais, resultando em acúmulo desse composto nas células viáveis. A solubilização das células possibilita a liberação do formazan, que pode ser facilmente detectado por espectrofotometria na região visível, em 570nm (DENIZOT & LANG, 1986; WELDER, 1992).

Na Figura 18 são apresentados os dados de viabilidade celular de células de fibroblastos de camundongo, linhagem de células 3T3 incubadas com BZC, NC de PLGA, PCL e PLA contendo BZC nas concentrações de 1 até 5 mM e NC de PLGA, PCL e PLA sem BZC. Para realização dos ensaios foram utilizadas 3 placas de 96 cavidades, sendo que cada amostra foi adicionada à 6 cavidades de cada placa, totalizando 18 determinações.



**Figura 18:** Efeito citotóxico a) nanocápsulas de PCL, PLA e PLGA (sem BZC) e b) da BZC (1 a 5 mM), de NC de PLGA, PCL e PLA contendo BZC (1 a 5 mM) em células Balb-c 3T3 avaliados pela redução do corante MTT (n=18). Dados expressos em porcentagem de viabilidade celular. \* $p < 0,001$  (one-way ANOVA com *Tukey-Kramer*)

O grau de toxicidade de NP é fortemente influenciado pelas condições biológicas do ambiente local, que regula a taxa de degradação ou de liberação dessas partículas. Alguns polímeros com carga podem apresentar certo grau de toxicidade devido interações com

membrana plasmática e outros componentes celulares (FISCHER *et al.*, 2003; LV *et al.*, 2006; NAFEE *et al.*, 2009).

A Figura 18 mostra que a exposição das células a nanocápsulas de PLGA e PCL não afetaram a viabilidade celular, no entanto, a exposição às NC de PLA reduziu a viabilidade celular para 20% aproximadamente.

A alta cristalinidade do PLA interfere com a biodegradação, reduzindo a compatibilidade com tecidos moles, podendo ser um obstáculo para aplicação em algumas situações como sistemas carreadores (TSUJI & IKADA, 1992; MARTIN & AVEROUS, 2001; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010).

Nafee e colaboradores (2009) encontraram que a exposição da membrana celular a certos grupos ionizáveis presentes em polímeros pode levar a perda da integridade da mesma (NAFEE *et al.*, 2009).

Desta forma o PLA, pela sua alta cristalinidade associada a uma possível interação com componentes de membrana, levou a uma diminuição da viabilidade celular pela exposição às NC de PLA. Esta mesma redução ocorreu com a exposição das NC de PLA contendo BZC em todas as concentrações testadas (1 a 5 mM).

Muitas abordagens para superar este problema estão sendo feitas, por exemplo, a copolimerização com outros poliésteres e variação composição enantiomérica para controlar a taxa de degradação e cristalinidade (TSUJI & IKADA, 1992; MARTIN & AVEROUS, 2001; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010).

A redução da viabilidade celular pela exposição à BZC livre foi dose-dependente (abaixo de 50%) enquanto que as NC de PLGA e PCL contendo BZC afetaram muito pouco a viabilidade celular ( $p < 0,001$ ) quando comparados à BZC livre. Um dos pontos essenciais sobre o modelo de citotoxicidade *in vitro* é que, os efeitos citotóxicos da BZC são dose-dependente e os efeitos protetores celulares observados no tratamento com a BZC associada às NC de PLGA e PCL podem ser explicados pela liberação modificada da BZC das nanocápsulas.

Os resultados obtidos pelos ensaios de citotoxicidade mostram que as formulações de BZC associada à NC de PLGA e PCL se apresentam menos tóxicas quando comparadas ao fármaco BZC. Estes resultados são bastante promissores uma vez que as características desejáveis para um AL incluem a diminuição da toxicidade sistêmica. Resultados

semelhantes foram descritos na literatura para nanoesferas de PLGA contendo ropivacaína (MORAES *et al.*, 2007) e nanopartículas de alginato contendo bupivacaína (GRILLO *et al.*, 2010) uma vez que a veiculação destas moléculas em nanocarreadores fez com que sua toxicidade fosse diminuída.

De acordo com os resultados de citotoxicidade encontrados, a utilização do polímero PLA foi descartada devido a toxicidade apresentada nas formulações, mesmo com os dados de atividade anestésica obtidos.

Na literatura também podem ser encontrados resultados onde foram descritos baixa citotoxicidade para o PLGA (PANYAM & LABHASETWAR, 2003; NAFEE *et al.*, 2009; SEMETE *et al.*, 2010). Desta forma, o polímero escolhido para os experimentos seguintes foi o PLGA por apresentar baixa toxicidade celular e um perfil de liberação mais lento ( $k = 0,0018 \text{ min}^{-1}$ ) quando comparado com o PCL.

### **4.3. Caracterização das formulações de nanocápsulas de PLGA preparadas com óleos diferentes contendo benzocaína**

Nesta parte do trabalho, preparou-se quatro formulações de nanocápsulas utilizando o polímero biodegradável poli (D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA 50:50) com diferentes óleos (óleo mineral USP, miristato de isopropila), oleato de decila (Cetiol<sup>®</sup>V), triglicerídeo de ácido caprílico/cáprico (Myritol 318<sup>®</sup>) com o intuito de avaliar a influência da composição do núcleo oleoso na eficiência de associação do anestésico local benzocaína, na estabilidade da suspensão coloidal (avaliação de tamanho, polidispersão e potencial zeta) e estabilidade físico-química do polímero (análise de pH), bem como o perfil de liberação das formulações e seus respectivos mecanismos. As formulações foram preparadas conforme metodologia descrita no item 3.3.3.

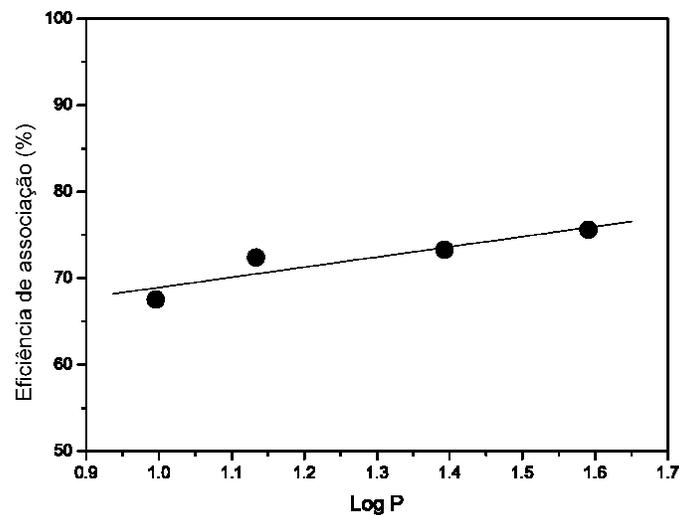
#### ***4.3.1. Determinação do coeficiente de partição da benzocaína em diferentes óleos***

Foram preparadas diferentes formulações de NC de PLGA utilizando quatro diferentes óleos comerciais: óleo mineral USP, miristato de isopropila, Cetiol<sup>®</sup> V e Myritol<sup>®</sup> 318, com o intuito de obter formulações alternativas às já descritas na literatura, para o carreamento deste fármaco. Estes óleos foram escolhidos devido a serem muito utilizados em diversas formulações farmacêuticas como adjuvantes de solubilização e ausência de toxicidade. Com a finalidade de verificar em qual dos óleos utilizados neste estudo a BZC apresentava a melhor interação, foram determinados os coeficientes de partição óleo/água (Tabela 11).

**Tabela 11:** Valores de coeficiente de partição  $P_{o/a}$  da BZC nos diferentes óleos estudados

Sistema	$\log P$
(A) Óleo mineral USP/água	1,133
(B) Miristato de isopropila/água	1,392
(C) Cetiol <sup>®</sup> V/água	0,995
(D) Myritol 318 <sup>®</sup> /água	1,591

A análise dos coeficientes de partição mostrou que a BZC apresenta a seguinte seqüência de afinidade: Myritol<sup>®</sup> 318 > miristato de isopropila > óleo mineral USP > Cetiol<sup>®</sup> V indicando assim uma boa correlação entre a taxa de associação do fármaco nos diferentes óleos como mostra a Figura 19.



**Figura 19:** Correlação entre os valores de  $\log P$  e taxa de associação do anestésico local BZC com as nanocápsulas de PLGA.

A análise da Figura 19 indica uma correlação entre o  $\log P$  e a eficiência de associação deste fármaco  $r^2 > 0,99$ , indicando assim que a interação fármaco:óleo é

determinante para a maior associação deste fármaco no interior hidrofóbico das nanocápsulas (MORA-HUERTAS, *et al.* 2010).

#### 4.3.2. Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH

Desta forma, após o preparo das formulações (Tabela 12), foram determinados os valores de diâmetro médio, índice de polidispersão (indica a distribuição de tamanho das nanocápsulas e normalmente valores menores que 0,2 para suspensões coloidais são bons (MOHANRAJ & CHEN, 2006), potencial zeta (que reflete a carga de superfície das nanocápsulas), pH (que indica a estabilidade físico-química do polímero) e eficiência de associação (que indica a afinidade do fármaco com o sistema), sendo estes apresentados na Tabela 11. Estes parâmetros são importantes uma vez que a partir destes se pode obter informações sobre as características de cada um dos sistemas coloidais preparados.

**Tabela 12:** Valores de diâmetro médio (nm), polidispersão, potencial zeta (mV) e taxa de associação das diferentes suspensões de NC PLGA contendo BZC.

Parâmetro	Formulação A	Formulação B	Formulação C	Formulação D
Diâmetro médio (nm)	138,1 ± 0,3	149,4 ± 2,6	169,4 ± 1,4	149,9 ± 5,1
Polidispersão	0,108 ± 0,008	0,260 ± 0,014	0,161 ± 0,002	0,087 ± 0,006
Taxa de associação (%)	72,4 ± 1,2	73,3 ± 0,8	67,5 ± 0,9	75,6 ± 0,9
Potencial zeta (mV)	-21,8 ± 4,1	-21,2 ± 0,2	-17,9 ± 1,7	-26,9 ± 1,4
pH	3,76	3,75	3,73	3,69
t <sub>50</sub> (min)	130	99	88	218

Os resultados apresentados na Tabela 12 indicam que as diferentes suspensões de NC PLGA contendo o anestésico local benzocaína apresentaram parâmetros compatíveis com suspensões coloidais descritas na literatura (GUTERRES, *et al.* 1995).

Em relação ao tamanho, a formulação B apresentou valores iniciais de polidispersão acima de 0,2, que indica que esta formulação não apresenta uma boa distribuição de tamanho. A formulação D foi a que apresentou potencial zeta mais negativo, valores estes que indicam uma boa estabilidade coloidal devido a uma repulsão eletrostática entre as nanopartículas (MOHANRAJ & CHEN, 2006; MORA-HUERTAS, *et al.* 2010).

Uma vez feita a caracterização inicial destas suspensões de NC de PLGA com diferentes óleos, a eficiência de associação de BZC foi avaliada utilizando uma curva analítica previamente validada para BZC.

Alguns trabalhos na literatura relatam a associação de BZC em NC de PLGA com núcleo oleoso composto com Miglyol<sup>®</sup> 810 e o valor de BZC associada foi por volta de 73% (MORAES, *et al.* 2009; MELO, *et al.* 2010).

Vários fatores podem influenciar na eficiência de encapsulamento de fármacos em nanocápsulas produzidas pelo método de nanoprecipitação, particularmente a polaridade do fármaco em questão. Geralmente fármacos mais apolares apresentam uma eficiência de encapsulamento maior que 70% (MA, *et al.* 2001; STELLA, *et al.* 2007)

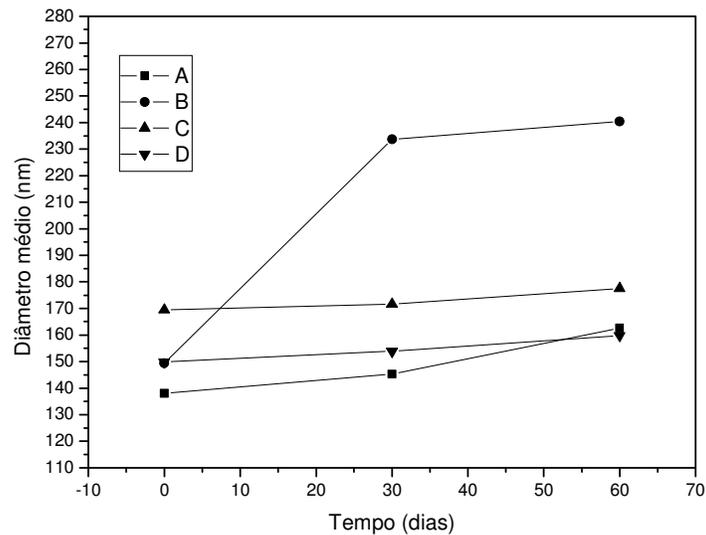
Neste trabalho, o maior valor de associação encontrado foi de 75,6% para a formulação D. Este resultado é compatível com o valor de *P* encontrado. Acredita-se que a alta eficiência de encapsulamento de BZC na formulação D é devido a maior solubilidade em Myritol<sup>®</sup> 318. Alguns trabalhos na literatura relatam que a porcentagem de encapsulamento está relacionada com a solubilidade do fármaco no núcleo oleoso (LOSA, *et al.* 1993; FRESTA, *et al.* 1996; BLOUZA, *et al.* 2006, MORA-HUERTAS, *et al.* 2010).

#### **4.3.3. Estabilidade das suspensões de nanocápsulas de PLGA preparadas com diferentes óleos contendo benzocaína**

Para avaliação da estabilidade das formulações A, B, C e D, determinou-se os parâmetros de diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta e pH nos tempos zero (dia de preparo), 30 e 60 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

A partir da Figura 20, observa-se que o diâmetro médio de partícula para as formulações A, C e D analisadas mantiveram-se praticamente constantes no período de zero a 60 dias, indicando que estas formulações são estáveis quanto ao tamanho por pelo menos 60 dias, não havendo formação de agregados que seriam evidenciados pelo aumento do tamanho de partícula. Com a formulação B observamos um grande aumento no diâmetro médio da partícula principalmente no intervalo entre o tempo zero e 30 dias. Este aumento no tamanho pode estar associado a possível formação de agregados indicando que o miristato de isopropila utilizado nesta formulação não proporcionou uma estabilidade adequada para diâmetro médio.

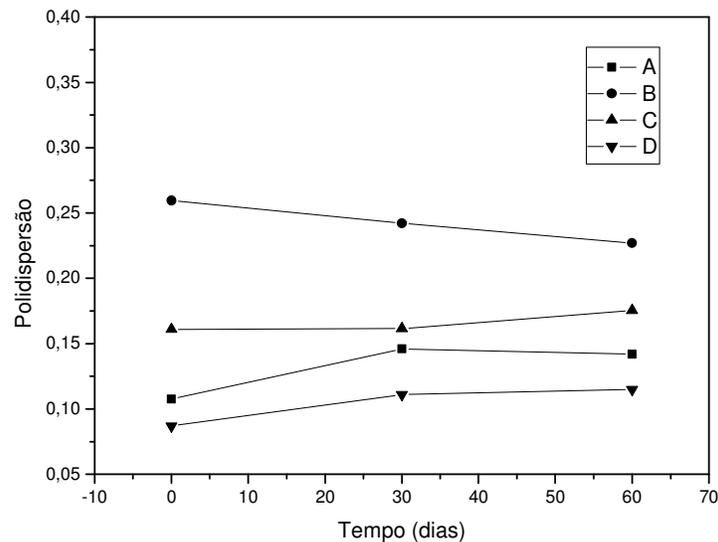
Além das medidas de diâmetro foram acompanhados também a polidispersão. A Figura 21 apresenta a variação da polidispersão em função do tempo para as formulações A, B, C e D.



**Figura 20:** Diâmetro médio (nm) de partículas em função do tempo (zero, 30 e 60 dias) para as quatro formulações de NC de PLGA com BZC.

A partir da Figura 20, é possível observar que o diâmetro médio de partícula para as formulações A, C e D analisadas mantiveram-se praticamente constantes no período de zero a 60 dias, indicando que estas formulações são estáveis quanto ao tamanho por pelo menos 60 dias, não havendo formação de agregados que seriam evidenciados pelo aumento do tamanho de partícula. Com a formulação B observamos um grande aumento no diâmetro médio da partícula principalmente no intervalo entre o tempo zero e 30 dias. Este aumento no tamanho pode estar associado a possível formação de agregados indicando que o miristato de isopropila utilizado nesta formulação não proporcionou uma estabilidade adequada para diâmetro médio.

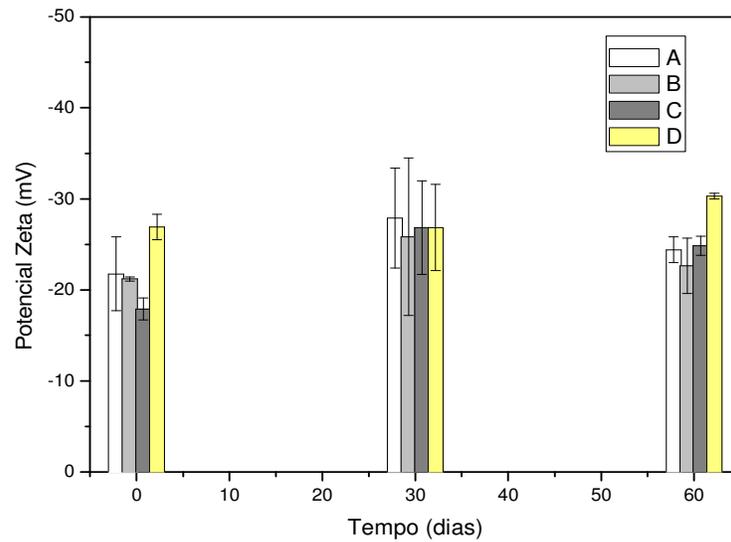
Além das medidas de diâmetro foram acompanhados também a polidispersão. A Figura 21 apresenta a variação da polidispersão em função do tempo para as formulações A, B, C e D.



**Figura 21:** Índice de polidispersão de partículas em função do tempo (zero, 30 e 60 dias) para as quatro formulações de NC de PLGA com BZC.

A polidispersão indica a distribuição de tamanho das nanopartículas e este valor deve ser de no máximo 0,2, pois representam que a distribuição se encontra em uma estreita faixa de tamanhos. Grandes variações do valor de polidispersão em função do tempo podem indicar formação de agregados, que aumentaram a faixa de distribuição das nanopartículas (MOHANRAJ & CHEN, 2006). De acordo com a Figura 21, observa-se que houve pequenas variações de polidispersão para todas formulações em função do tempo, entretanto a formulação B apresentou polidispersão maiores que 0,2 desde o início e ao longo do tempo de análise realizado. Esses valores altos de polidispersão indicam heterogeneidade do tamanho das NC. Esses resultados mostram mais uma vez que a formulação B não apresentou estabilidade adequada.

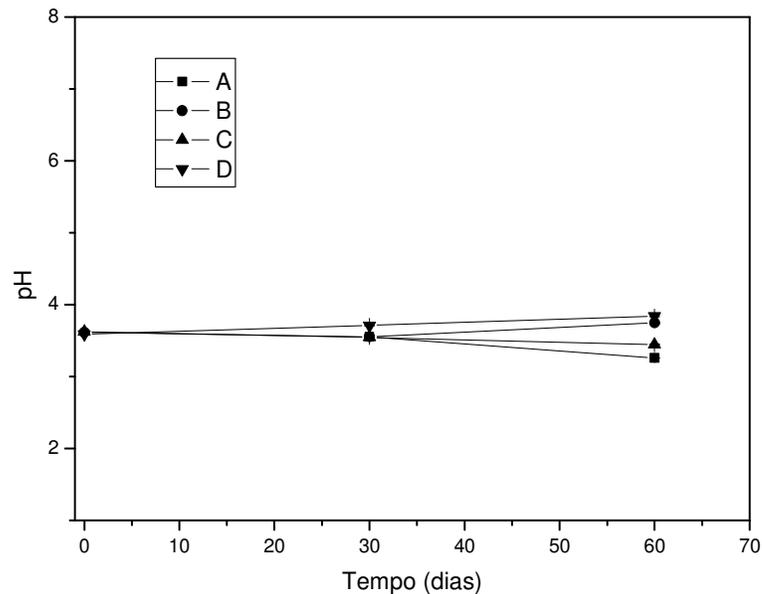
Outro parâmetro investigado foi o potencial zeta, uma vez que é um importante parâmetro indicativo de estabilidade das NC em solução. A Figura 22 apresenta o valor de potencial zeta para as quatro formulações estudadas em função do tempo para o período entre zero e 60 dias.



**Figura 22:** Potencial zeta (mV) de partículas em função do tempo (zero, 30 e 60 dias) para as quatro formulações de NC de PLGA com BZC.

O potencial zeta reflete a carga de superfície das NC. Esse parâmetro pode ser influenciado pela composição da partícula, meio dispersante, pH e força iônica do meio. A Figura 22 mostra que todas as formulações sofreram variações em função do tempo. Em módulo, quanto maior o valor numérico de potencial zeta, mais estável é a suspensão de NC. Com isso, a formulação que apresentou melhores valores de potencial zeta desde o início e em função do tempo foi a formulação D, indicando uma maior estabilidade desta formulação.

O último parâmetro de estabilidade investigado das NC foi o pH. A Figura 23 apresenta o comportamento do pH das quatro formulações de NC de PLGA contendo BZC em função do tempo. A análise do pH em função do tempo é importante para assegurar a estabilidade das suspensões de NC, pois a alteração de pH pode indicar degradação do polímero. Este fato se deve à hidrólise do polímero, liberando alguns de seus componentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).



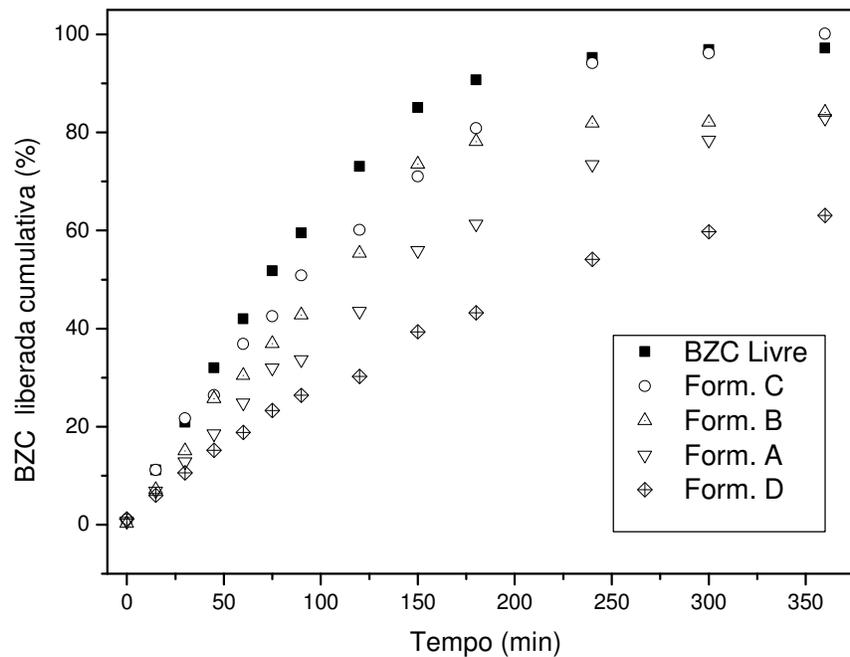
**Figura 23:** Valores de pH das formulações de NC de PLGA com BZC em função do tempo (zero e 60 dias) de armazenamento em temperatura ambiente (n=3).

Em todas as formulações observou-se variações nos valores de pH em função do tempo tendendo a estabilização, mas uma queda mais acentuada para as formulações A e C. Essas variações podem estar associadas à degradação do polímero produzindo ácido lático livre causando diminuição de pH (GUTERRES, *et al.* 1995).

#### **4.3.4. Cinética de liberação *in vitro* da benzocaína em suspensões de nanocápsulas de PLGA**

O perfil de liberação de formulações BZC e NC também foi avaliado, uma vez que este parâmetro é bastante relevante quando se considera a eficiência terapêutica de um fármaco. Desta forma, é fundamental para a caracterização deste tipo de sistema obter informações sobre o comportamento e mecanismo de liberação (SCHAFFAZICK, *et al.* 2003).

A liberação da BZC foi determinada na ausência e presença de NC de PLGA preparadas com diferentes tipos de óleo em função do tempo (Figura 24) utilizando as mesmas condições já descritas no item 4.2.3.



**Figura 24:** Liberação cumulativa da BZC (%) em solução e em suspensão de nanocápsulas de PLGA (n=3). Formulação A (óleo mineral), formulação B (miristato de isopropila), formulação C (Cetiol® V) e formulação D (Myritol® 318).

A Figura 24 mostra os perfis de liberação da BZC livre e associada às quatro formulações de NC de PLGA preparadas com diferentes óleos em função do tempo e em temperatura ambiente. A partir das curvas foi possível observar que a liberação total (100%) de BZC livre em solução ocorreu após 250 minutos e um tempo para liberação de 50% ( $t_{50\%}$ ) de 70 min. As quatro formulações testadas demonstraram modificação do perfil de liberação de benzocaína em relação ao fármaco sozinho. Os valores de  $t_{50\%}$  são apresentados na Tabela 7, onde se pôde observar que a maior modificação no perfil de liberação foi obtido para as nanocápsulas da formulação D (isto é, contendo Myritol® 318), indicando assim que a maior associação deste fármaco fez com que a liberação fosse mais lenta (ROMERO-

CANO, *et al.* 2002). No entanto, não foi observada uma boa correlação entre os valores de taxa de associação (Formulação D>B>A>C) e o  $t_{50\%}$  (Formulação D>A>B>C), isto pode ser devido a possíveis diferenças de interações entre os componentes da formulação, fármaco/tensoativo/polímero/óleo, o que pode fazer com que este perfil de liberação seja diferente.

Desta forma, pode-se observar que um dos fatores que estão influenciando o mecanismo de liberação do fármaco das nanocápsulas é a interação fármaco:óleo (coeficiente de partição) e fármaco:nanocápsulas (taxa de associação), além de outros fenômenos físico-químicos (COSTA & LOBO, 2001). A partir dos perfis de liberação foi possível aplicar diversos modelos a fim de verificar os possíveis mecanismos de liberação dos fármacos das nanocápsulas (POLAKOVICK, *et al.*, 1999), uma vez que pode estar associado a estes processos que incluem a dessorção do fármaco da superfície da partícula, difusão através dos poros da matriz ou parede polimérica, desintegração ou erosão da partícula (POLAKOVICK *et al.*, 1999; COSTA & LOBO, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Alguns estudos prévios demonstram que a associação da BZC com NC de PLGA e PLA (contendo Miglyol® como núcleo oleoso) modificam o perfil de liberação do fármaco das nanopartículas (MORAES *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2010).

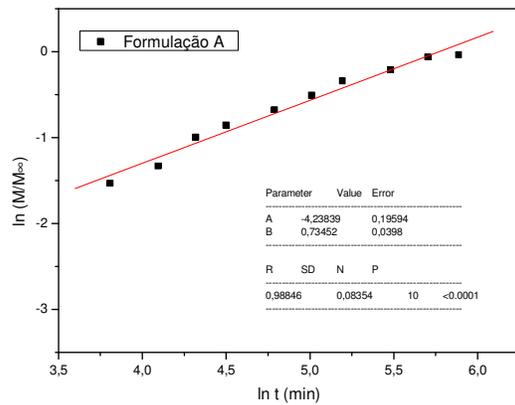
#### **4.3.4.1. Modelo matemático para avaliação do mecanismo de liberação da benzocaína a partir das nanocápsulas de PLGA preparadas com diferentes óleos**

Com o objetivo de investigar o mecanismo de liberação da BZC a partir das NC de PLGA, foi aplicado o modelo teórico de Korsmeyer-Peppas conforme já descrito anteriormente no item 3.4.12. (COSTA & LOBO, 2001). A partir das curvas de liberação foram feitas as regressões lineares para determinação dos coeficientes de correlação ( $r$ ) e constante de liberação ( $k$ ). Os resultados obtidos a partir da Figura 25 encontram-se na Tabela 13.

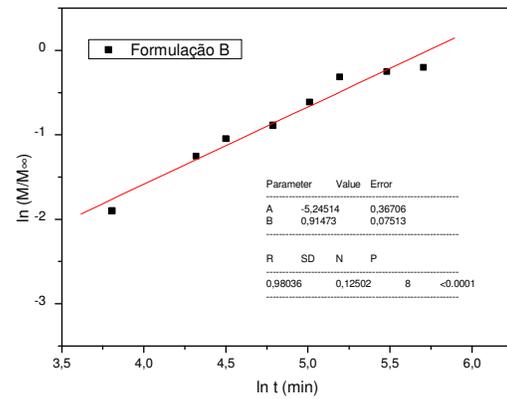
**Tabela 13:** Valores dos parâmetros obtidos a partir da aplicação dos modelos matemáticos para as curvas de liberação de BZC associada as NC de PLGA.

Parâmetro	A	B	C	D
	$n = 0,73$	$n = 0,91$	$n = 0,85$	$n = 0,79$
<b>Constante cinética (k)</b>	0,0059 min <sup>-n</sup>	0,0057 min <sup>-n</sup>	0,0144 min <sup>-n</sup>	0,0052 min <sup>-n</sup>
<b>Coefficiente de correlação (r)</b>	0,988	0,980	0,985	0,992

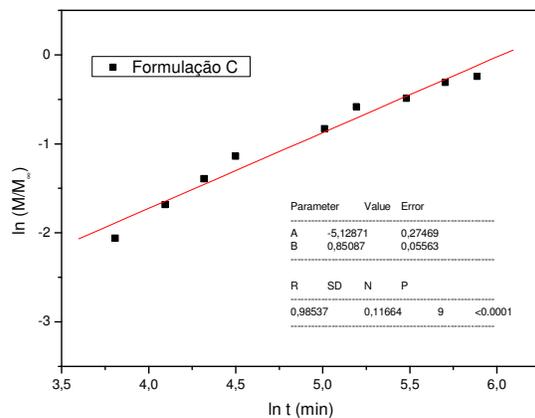
Formulação com: A (óleo mineral); B (miristato de isopropila); C (Cetiol®V) e D (Myritol® 318)



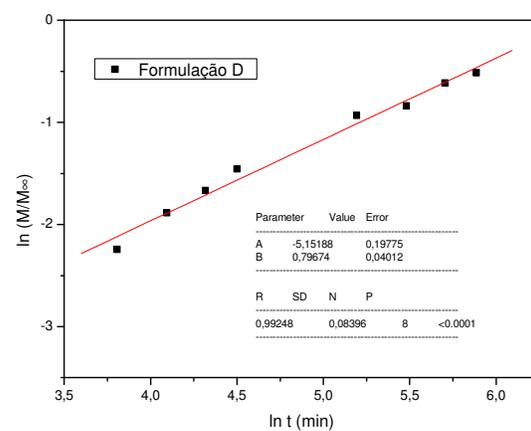
a)



b)



c)



d)

**Figura 25:** Resultados obtidos usando o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas a) Formulação com óleo mineral; b) Formulação com miristato de isopropila; c) Formulação com Cetiol® V; d) Formulação com Myritol® 318.

O modelo Korsmeyer-Peppas é utilizado para descrever a liberação de um soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e/ou do transporte Caso II (não-Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER & PEPPAS, 1987; KORSMEYER & PEPPAS, 1991). Neste modelo leva-se em conta não só processos difusivos, mas também um componente que avalia o

relaxamento da matriz polimérica como processos determinantes na liberação do fármaco. (COSTA & LOBO, 2001)

Korsmeyer e colaboradores (1983) determinaram que valores de expoente de liberação  $n$  para caracterizar os diferentes mecanismos de liberação (transporte Fickiano, transporte tipo caso II, etc), onde para valores de  $n$  ( $0.45 < n < 1.00$ ) indicam cinética de transporte anômalo, ou seja, uma combinação dos dois mecanismos de difusão e de transporte Caso II. Nos sistemas de liberação controlada, a extensão e a velocidade de liberação do fármaco resultam da combinação da difusão com o transporte de Caso II das moléculas de fármaco através das cadeias poliméricas (RITGER e PEPPAS, 1987). Nestes casos, a difusão obedece às leis de Fick, enquanto o transporte de Caso II reflete a influência do relaxamento do polímero no movimento das moléculas na matriz.

A análise das curvas de liberação após o tratamento matemático de Korsmeyer-Peppas forneceu valores de constante de taxa de liberação,  $k$ , ( $\text{min}^{-1}$ ) para as formulações A (óleo mineral), B (miristato de isopropila), C (Cetiol<sup>®</sup> V) e D (Myritol<sup>®</sup> 318) de 0,0059, 0,0057, 0,0144 e 0,0052  $\text{min}^{-1}$  respectivamente, indicando que a formulação D teve uma liberação mais lenta quando comparada as outras formulações. Os valores de expoente de liberação foram 0.73 (formulação A), 0.91 (formulação B), 0.85 (formulação C) e 0.79 (formulação D). Estes valores indicam que para todas as formulações testadas há uma combinação de dois mecanismos (difusão e relaxamento) envolvidos no processo de liberação.

As características obtidas pela associação da BZC foram melhores nas formulações contendo o óleo Myritol 318<sup>®</sup> em vez dos demais óleos testados (óleo mineral, miristato de isopropila, Cetiol<sup>®</sup> V), uma vez que esta formulação apresentou maior eficiência de associação (75,6%) e melhores parâmetros de estabilidade em um período de 60 dias quando comparada com as outras formulações preparadas com outros óleos, bem como a maior alteração no perfil de liberação deste fármaco.

Sendo assim, a formulação D foi escolhida para realização de um processo de otimização do preparo através de um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .

#### 4.4. Otimização do preparo da formulação de nanocápsulas de PLGA com benzocaína: Planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$

As NC de PLGA foram preparadas segundo o método de deposição interfacial de polímeros pré-formados, como descrito no item 3.3.3. Durante o preparo de NP, diversos fatores são importantes para determinar as propriedades das partículas, tais como concentração, composição e massa molar do polímero; tipo e volume do solvente orgânico; tipo e concentração do tensoativo/ estabilizante; volume de fase aquosa; temperatura; velocidade, tempo e tipo de agitação (em métodos que envolvem emulsificação) (DUAN *et al.*, 2006).

A composição quali e quantitativa de formulações com nano ou micropartículas poliméricas são fatores determinantes para garantir propriedades adequadas e estabilidade das formulações. Por isso, planejar o preparo de formulações contendo nano ou micropartículas através de planejamentos fatoriais tem sido uma estratégia muito utilizada atualmente a fim de estimar os contrastes dos parâmetros envolvidos no preparo dessas formulações sobre determinadas propriedades, como tamanho, eficiência de associação do fármaco, entre outras (VANDERVOORT & LUDWIG, 2002; DERAKHSHANDEH *et al.*, 2007; MONDAL *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2009).

A fim de definir condições quantitativas ideais para a obtenção de NC satisfatórias, um planejamento fatorial  $2^{4-1}$  foi aplicado ao preparo de NC de PLGA contendo BZC.

Segundo a matriz do planejamento fatorial  $2^{4-1}$  foram preparadas, através do método de deposição interfacial de polímeros pré-formados, 8 formulações em duplicata de maneira aleatória. Os fatores variados em 2 níveis foram concentrações de PLGA, Myritol<sup>®</sup> 318, Tween<sup>®</sup> 80 e Span<sup>®</sup> 60. A escolha da variação dos níveis foi baseada em testes preliminares e pesquisa em literatura. Os efeitos dos fatores foram avaliados sobre quatro respostas: tamanho de partículas, polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de associação.

Os resultados absolutos obtidos com o planejamento aplicado ao preparo de suspensões de NC de PLGA com BZC estão descritos nas Tabelas 14.

**Tabela 14:** Matriz do planejamento fatorial  $2^{4-1}$  e resultados de tamanho, polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de associação, obtidos a partir do planejamento para suspensões de NC de PLGA com BZC

Formulação	A	B	C	D	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Eficiência de associação (%)
1.1	-	-	-	-	250,1	0,073	-34,3	86,6
1.2	-	-	-	-	188,5	0,034	-27,5	84,8
2.1	+	-	-	+	180,6	0,114	-27,9	80,8
2.2	+	-	-	+	199,2	0,091	-27,2	79,4
3.1	-	+	-	+	321,3	0,139	-41,3	90,8
3.2	-	+	-	+	243,9	0,082	-31,5	88,5
4.1	+	+	-	-	254,4	0,058	-24,3	81,8
4.2	+	+	-	-	205,9	0,133	-30,5	82,1
5.1	-	-	+	+	186,8	0,069	-27,7	85,6
5.2	-	-	+	+	192,3	0,087	-23,4	77,7
6.1	+	-	+	-	189,9	0,102	-31,0	77,9
6.2	+	-	+	-	186,3	0,096	-31,6	78,7
7.1	-	+	+	-	237,9	0,109	-33,4	81,4
7.2	-	+	+	-	232,8	0,092	-33,6	78,0
8.1	+	+	+	+	275,1	0,114	-29,6	81,7
8.2	+	+	+	+	218,7	0,141	-31,4	79,6

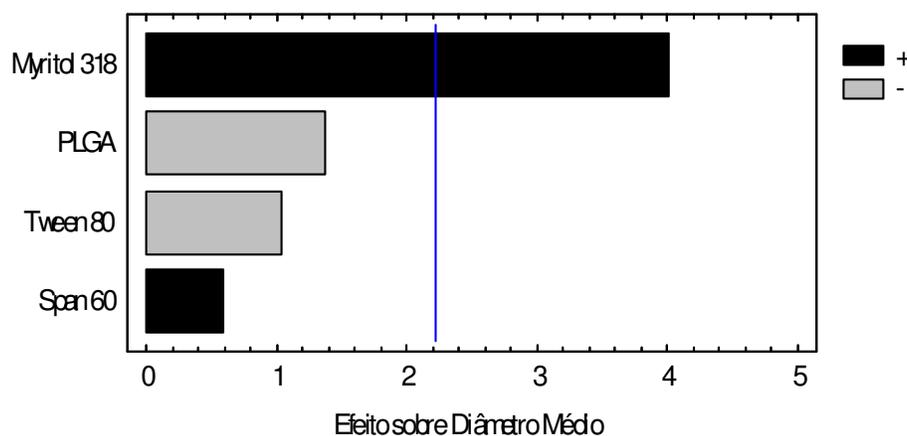
A: PLGA; B: Myritol 318; C: Span 60; D: Tween 80

As partículas apresentaram tamanho na faixa de 180 a 275 nm polidispersão menor que 0.2 e potencial zeta em boa faixa de estabilidade coloidal e associação.

#### 4.4.1. Efeito dos fatores sobre o tamanho, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação de benzocaína em nanocápsulas poliméricas

Os tamanhos das NC de PLGA contendo BZC foram determinados pela técnica de espectroscopia de correlação de fóton, como descrito no item 3.4.7. De forma a avaliar a influência da variação dos fatores em 2 níveis sobre o tamanho de partícula de NC de PLGA contendo BZC, foram construídos gráficos de Pareto, a partir dos resultados de tamanho obtidos com o planejamento fatorial  $2^{4-1}$ , descritos nas tabelas 19 e 20, respectivamente.

A Figura 26 apresenta os contrastes dos fatores concentração sobre o diâmetro das NC de PLGA.



**Figura 26:** Efeito dos fatores sobre o tamanho das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

Na Tabela 15 estão descritos os valores estimados dos efeitos sobre o tamanho das NC de PLGA. Para testar a significância estatística dos efeitos causados pelas variações nos fatores estudados, realizou-se análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos, estes resultados estão descritos na Tabela 15.

**Tabela 15:** Estimativa dos efeitos e valores de  $p$  (ANOVA) para variação de tamanho de NC de PLGA com BZC.

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	$p$ *
PLGA	- 18,23	0,1988
Myritol <sup>®</sup> 318	+ 53,05	0,0025*
Span <sup>®</sup> 60	+ 7,84	0,5670
Tween <sup>®</sup> 80	-13,64	0,3274

\* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Segundo os resultados observados na Figura 26 e Tabela 15, somente o efeito causado pela variação de Myritol<sup>®</sup> 318 obteve  $p < 0,05$ , indicando que este efeito é significativamente diferente de zero, com nível de confiança de 95,0%. O valor numérico estimado de efeito do Myritol<sup>®</sup> 318 sobre o tamanho das NC (+53,05) apresenta sinal positivo, o que representa que quanto maior a concentração de Myritol<sup>®</sup> 318, maior o tamanho de partícula. As variações na concentração de PLGA, Span<sup>®</sup> 60 e Tween<sup>®</sup> 80 não causaram alterações estatisticamente significativas sobre o tamanho de partícula.

Bouchemal e colaboradores (2004) avaliaram o tamanho de partículas em nanoemulsões em função de diferentes tipos de óleos, tensoativos e solventes. A viscosidade do óleo é determinante para o tamanho de nanopartículas. Os resultados demonstraram que quanto mais viscoso o óleo, menor o tamanho de partícula, assim, partículas menores foram obtidas com  $\alpha$ -tocoferol e hexil-laurato se comparadas às partículas preparadas com Myritol<sup>®</sup> e Miglyol<sup>®</sup>.

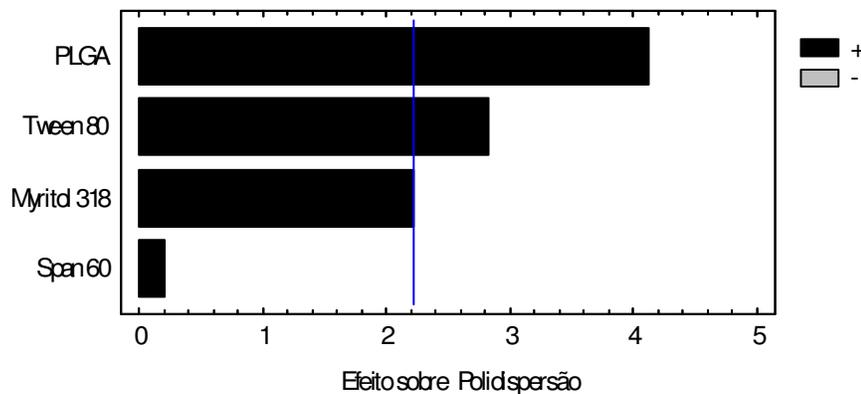
O aumento da concentração de Myritol<sup>®</sup> 318 favoreceu aumento do tamanho das partículas, mas não aumento de polidispersidade em NC de PLGA. O Myritol<sup>®</sup> 318 em concentrações maiores pode agir dificultando a difusão da acetona para a água, gerando nanopartículas maiores.

Moraes e colaboradores (2009) também avaliaram tamanho, polidispersão, potencial zeta, pH e eficiência de associação de NC de PLGA contendo BZC em função da variação da concentração de polímero, óleo e tensoativos em concentrações diferentes das estudadas neste trabalho. Os resultados demonstraram que o aumento da quantidade de óleo

favoreceu o aumento do tamanho de partícula e aumento do índice polidispersão. A variação na concentração dos demais componentes não causou alterações significativas para o parâmetro tamanho.

A fim de avaliar a influência da variação dos fatores em 2 níveis sobre a polidispersão de NC de PLGA contendo BZC, foram construídos gráficos de Pareto a partir dos resultados de polidispersão descritos nas Tabela 17, respectivamente.

Na Figura 27, têm-se os efeitos das variações dos fatores estudados sobre a polidispersão das NC de PLGA contendo BZC. A estimativa dos efeitos e ANOVA para os resultados de polidispersão obtidos estão descritas na Tabela 16.



**Figura 27:** Efeito dos fatores sobre a polidispersão das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

**Tabela 16:** Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a polidispersão e valores de  $p$  (ANOVA) para variação de polidispersão em NC de PLGA com BZC

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	$p^*$
PLGA	+ 0,092	0,0021*
Myritol® 318	+ 0,032	0,0506*
Span 60	+ 0,002	0,8462
Tween 80	+ 0,022	0,0180

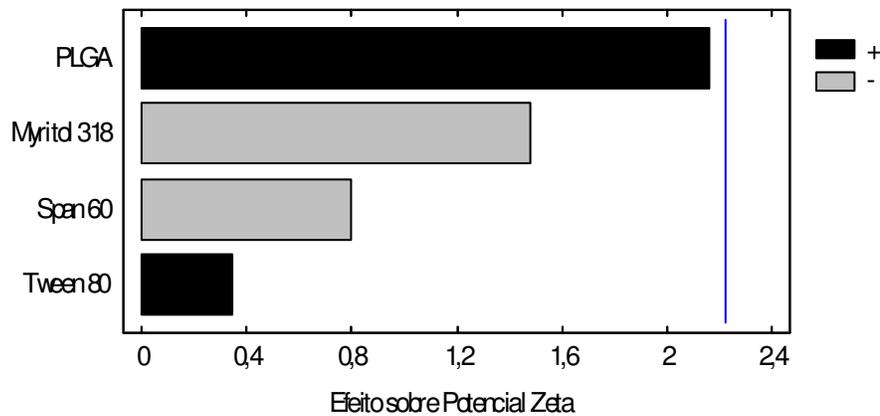
\* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Segundo os resultados observados na Figura 27 e Tabela 16, a variação de PLGA e Tween 80 obtiveram  $p < 0,05$  sobre a polidispersão, indicado que variações na concentração desses componentes são capazes de causar alterações estatisticamente significativas na polidispersão. As variações na concentração de Myritol 318 e Span 60 não causaram alterações estatisticamente significativas sobre a polidispersão das NC.

Moraes e colaboradores (2009) observaram que o aumento da concentração do óleo favoreceu o aumento do índice de polidispersão, diferentemente do que foi observado neste trabalho. Observando o gráfico de Pareto, existe uma tendência do aumento da concentração de óleo em favorecer o aumento do índice de polidispersão, porém nas concentrações utilizadas nas variações não foram consideradas significativas.

Para avaliar a influência da variação dos fatores em 2 níveis sobre o potencial zeta de NC de PLGA contendo BZC, foram construídos gráficos de Pareto a partir dos resultados de potencial zeta descritos na Tabela 17, respectivamente.

Na Figura 28 estão demonstrados os efeitos das variações nos fatores estudados sobre o potencial zeta das NC de PLGA contendo BZC. A estimativa dos efeitos dos fatores sobre o potencial zeta e ANOVA para estes resultados estão descritos na Tabela 17.



**Figura 28:** Efeito dos fatores sobre o potencial zeta das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

**Tabela 17:** Estimativa dos efeitos dos fatores sobre o potencial zeta e valores de  $p$  (ANOVA) para variação do potencial zeta em NC de PLGA com BZC

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	$p^*$
PLGA	+ 4,03	0,0559
Myritol® 318	- 2,76	0,1699
Span 60	- 1,48	0,4442
Tween 80	+ 0,63	0,7399

\* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

A partir dos resultados demonstrados na Figura 28 e Tabela 17 é possível afirmar que a variação de nenhum dos fatores é capaz de causar alterações significativas no potencial zeta das NC de PLGA com BZC.

Poucos trabalhos relatam a influência dos componentes de formulações de nanopartículas sobre o potencial zeta, pois é uma propriedade pouco afetada. Os resultados mostram que para NC de PLGA a alteração de nenhum dos fatores foi capaz de produzir variações significativas sobre o valor de potencial zeta. Resultados semelhantes também

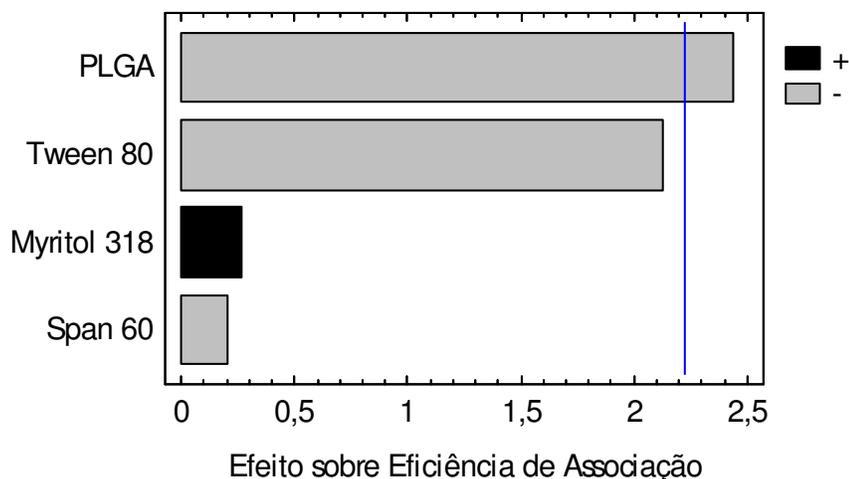
podem ser encontrados na literatura para avaliação de potencial zeta em formulações de NC de PLGA contendo BZC (MORAES *et al.*, 2009)

Quintanar-Guerrero e colaboradores (1998) avaliaram a influência de diferentes concentrações de polímero sobre o tamanho e potencial zeta de nanocápsulas de PLA preparadas pelo método de emulsificação-difusão do solvente. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de polímero leva ao aumento do tamanho das NC, já o potencial zeta não sofreu nenhuma alteração significativa com as variações na concentração de polímero.

Além dos demais parâmetros descritos acima, a eficiência de associação de BZC em NC de PLGA foi avaliada através do método de ultrafiltração/centrifugação, descrito no item 3.3.9, utilizando metodologia analítica descrita no item 3.3.1.

Para avaliar a influência da variação dos fatores em 2 níveis sobre a eficiência de associação de BZC em NC de PLGA, foram construídos gráficos de Pareto a partir dos resultados de taxa de associação descritos nas tabelas 19 e 20, respectivamente.

Na Figura 29 estão demonstrados os efeitos das variações nos fatores estudados sobre a eficiência de associação de BZC em NC de PLGA. A estimativa dos efeitos dos fatores sobre o potencial zeta e ANOVA para os resultados de eficiência de associação obtidos estão descritos na Tabela 18.



**Figura 29:** Efeito dos fatores sobre a eficiência de associação das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

**Tabela 18:** Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a eficiência de associação e valores de  $p$  (ANOVA) para variação taxa de associação em NC de PLGA com BZC

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	$p^*$
PLGA	- 4,54	0,0347*
Miglyol	+ 0,49	0,7974
Span 60	- 0,38	0,8421
Tween 80	-3,95	0,0595

\* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Segundo os resultados obtidos com a ANOVA (Tabela 18) e visualizados na Figura 29, somente variações na concentração de PLGA são capazes de causar alterações estatisticamente significativas sobre a eficiência de associação, sendo que a diminuição da concentração de PLGA aumenta a eficiência de associação de BZC em NC de PLGA.

O aumento da concentração de Tween<sup>®</sup> 80 não favoreceu aumento da eficiência de associação da BZC nas nanopartículas significativamente. Os tensoativos estabilizam as

nanopartículas, evitando formação de agregados através de impedimento estérico ou estabilização por carga. Essas moléculas ficam localizadas na interface entre a fase orgânica e aquosa e, com isso, podem dificultar a difusão do fármaco da fase orgânica para fase aquosa e o fármaco tende a ficar associado na nanopartícula. Devido a esse efeito interfacial, quanto maior a concentração de tensoativo, maior a eficiência de associação do fármaco na nanopartícula polimérica (SAHOO *et al.*, 2002).

Os resultados encontrados neste estudo contrastam com os encontrados na literatura, uma vez que é descrito um aumento na eficiência de associação com aumento da concentração de polímero e tensoativos (BUDHIAN *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2009).

O aumento da eficiência de associação do fármaco nas nanopartículas causado pelo aumento da concentração de polímero se deve ao aumento da viscosidade da fase orgânica que aumenta a resistência de difusão das moléculas do fármaco da fase orgânica para a fase aquosa, permitindo maior associação do fármaco nas nanopartículas (BUDHIAN *et al.*, 2007). Neste estudo isso não foi observado uma vez que as formulações que tiveram uma maior eficiência de associação foram aquelas que apresentavam uma menor concentração de polímero, indicando que a eficiência de associação pode estar relacionada com outros parâmetros, como interação do AL com outros componentes da formulação.

A partir dos resultados obtidos com o planejamento fatorial fracionário, observou-se que a composição quantitativa das NC poliméricas é importante para determinar propriedades de nanopartículas, como tamanho, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação.

Diversos trabalhos usam planejamentos fatoriais a fim de estimar os contrastes dos parâmetros envolvidos no preparo de formulações de nanopartículas sobre determinadas propriedades, como tamanho, eficiência de associação do fármaco, entre outras (VANDERVOORT & LUDWIG, 2002; DERAKHSHANDEH *et al.*, 2007; MONDAL *et al.*, 2008; MORAES *et al.*, 2009).

Mondal e colaboradores (2008) avaliaram o efeito de variações na concentração de polímero, tensoativo (Span® 20) e proporção de fase orgânica e aquosa sobre o diâmetro de nanopartículas de PLGA. Tal estudo foi realizado a partir de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Os

resultados demonstraram que há diminuição significativa no tamanho das nanopartículas em 3 casos: quando há aumento simultâneo da concentração de tensoativo e volume da fase orgânica ou diminuição da concentração de polímero associada ao aumento de volume de fase orgânica, ou ainda, quando há diminuição da concentração de polímero associada ao aumento da concentração de tensoativo.

Derakhshandeh e colaboradores (2007) estudaram a influência da concentração de polímero (PLGA), estabilizante (PVA) e volumes de fase orgânica e aquosa a partir de planejamento fatorial  $2^4$ , sobre a eficiência de associação do fármaco (anticancerígeno) em nanopartículas poliméricas obtidas pelo método de nanoprecipitação. Os resultados indicaram que concentração de polímero, bem como os volumes de fase orgânica e aquosa exercem influência significativa sobre a eficiência de associação do fármaco nas nanopartículas, sendo que quanto maior a concentração de polímero e menor os volumes de fase orgânica e aquosa, maior a eficiência de associação.

A indústria farmacêutica visa produzir formulações de baixo custo, a etapa de desenvolvimento de formulação é importante para garantir a obtenção de formulações com propriedades adequadas, sem que haja gasto excessivo de material. Formulações contendo nanopartículas poliméricas apresentam custo relativamente elevado se comparado a formulações farmacêuticas convencionais, o parâmetro escolhido como determinante para a escolha das formulações adequadas neste estudo foi a eficiência de associação. Com isso, foram escolhidas como formulações adequadas as correspondentes aos números 1 e 3 do planejamento fatorial pois estas apresentaram maior eficiência de associação de BZC nas nanopartículas e tamanho adequado para a via de administração.

Outra etapa bastante importante do desenvolvimento de formulações é a avaliação da estabilidade físico-química para assegurar sua segurança e eficácia.

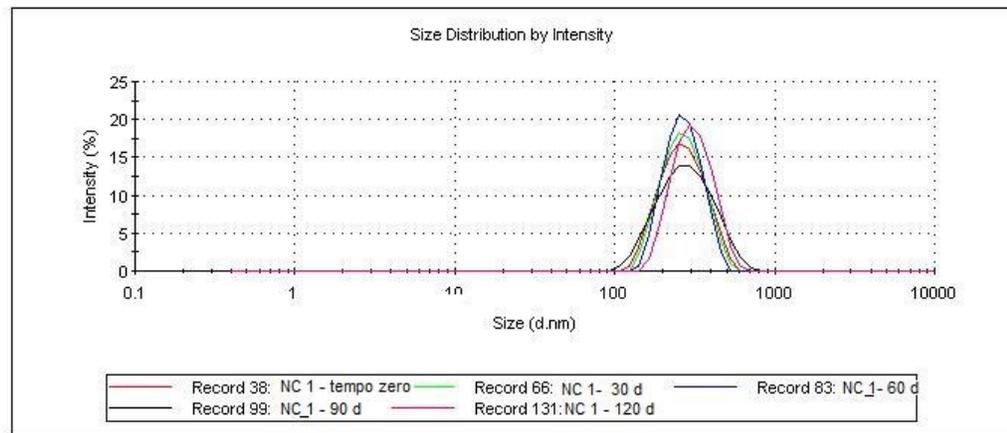
#### **4.4.2. Estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas**

Para avaliação da estabilidade das suspensões de NC de PLGA foram mensuradas algumas propriedades físico-químicas como tamanho, polidispersão, potencial zeta, pH e eficiência de associação em função do tempo (zero, 30, 60 e 120 dias), sendo todas amostras armazenadas à temperatura ambiente.

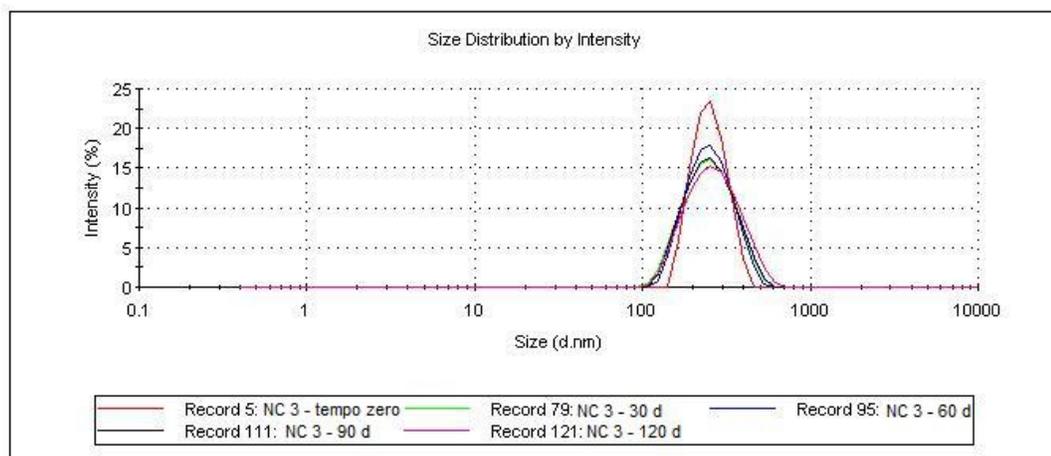
Foram preparadas suspensões de NC de PLGA contendo BZC empregando-se os níveis de concentração de matérias-primas descritas no planejamento fatorial para as formulações identificadas como 1 e 3 para NC de PLGA com BZC. Assim, nas formulações identificadas como 1 foram empregados 100 mg de polímero PLGA, 50 mg de BZC, 200 mg de Myritol® 318 e 40 mg de Span® 60 dissolvidos em 30 mL de acetona, e 60 mg de Tween® 80 dissolvidos em 30 mL de água. Já nas formulações identificadas como 3 foram empregados 100 mg de polímero PLGA ou PCL, 50 mg de BZC, 300 mg de Myritol® 318 e 60 mg de Span® 60 dissolvidos em 30 mL de acetona e 60 mg de Tween® 80 dissolvidos em 30 mL de água. Todas as formulações tiveram como etapa final do processo a redução do volume até 10 mL.

Nas Figuras 30 e 31 são observados gráficos de distribuição de tamanho de partículas por intensidade obtidos pelo *software ZetaSizer Nano* a partir de medidas de espalhamento de luz para NC de PLGA contendo BZC (formulações 1 e 3).

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 30 e 31 observou-se que para todas as formulações a distribuição de tamanho manteve-se constante e unimodal no período de até 120 dias, indicando boa estabilidade das suspensões de NC.

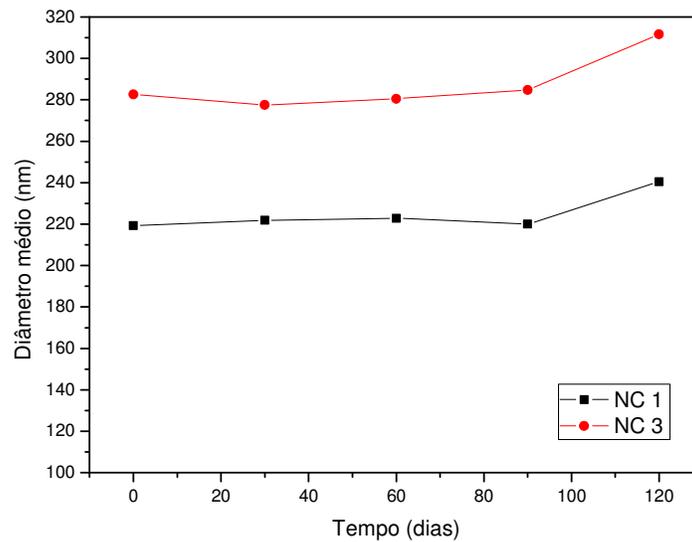


**Figura 30:** Distribuição de tamanho de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 1 de PLGA com BZC nos tempos zero, 30, 60 e 120 dias.



**Figura 31:** Distribuição de tamanho de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 3 de PLGA com BZC nos tempos zero, 30, 60 e 120 dias.

A partir dos dados acima, foram construídos gráficos de diâmetro de partícula em função do tempo, sendo estes apresentados na Figura 32.



**Figura 32:** Tamanho (nm) de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 1 e 3 de NC de PLGA com BZC.

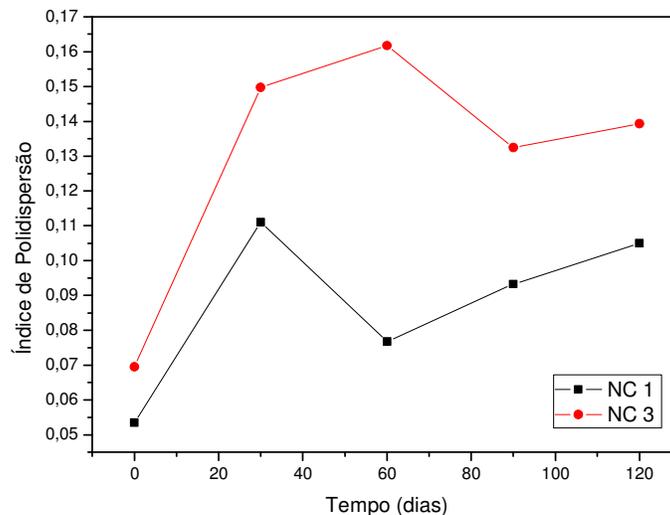
Segundo a Figura 32, observou-se que o tamanho das partículas das duas formulações permaneceu constante até 90 dias e em 120 dias, um aumento no tamanho das partículas foi observado. O aumento do tamanho de partícula pode estar associado à possível formação de agregados indicando, assim, que quanto ao tamanho, essa formulação só é estável em um período de até 90 dias.

A diferença na composição dessas duas formulações é que na formulação 3 observa-se uma maior quantidade de óleo e de Span<sup>®</sup> 60. Neste sentido, observa-se que a formulação 3 em função da maior quantidade de óleo apresentou uma distribuição de tamanho maior. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura para tamanho de nanopartículas poliméricas (GUTERRES *et al.*, 1995; POHLMANN *et al.*, 2002; MÜLLER *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2009)

Outro parâmetro investigado foi o índice de polidispersão, que pode ser indicativo de estabilidade uma vez que representa a faixa de distribuição de tamanho de partícula. Valores altos de índice de polidispersão indicam heterogeneidade do tamanho de partículas em suspensão, variações nos valores de polidispersão em função do tempo indicam formação

de populações de partículas com tamanhos que não existiam inicialmente, podendo ser decorrente de agregação ou quebra/ degradação de partículas. Índices de polidispersão menores que 0,2 são ideais por representarem que a distribuição do tamanho de partículas se encontra em uma estreita faixa de tamanhos.

A variação da polidispersão em função do tempo pode ser observada na Figura 33.

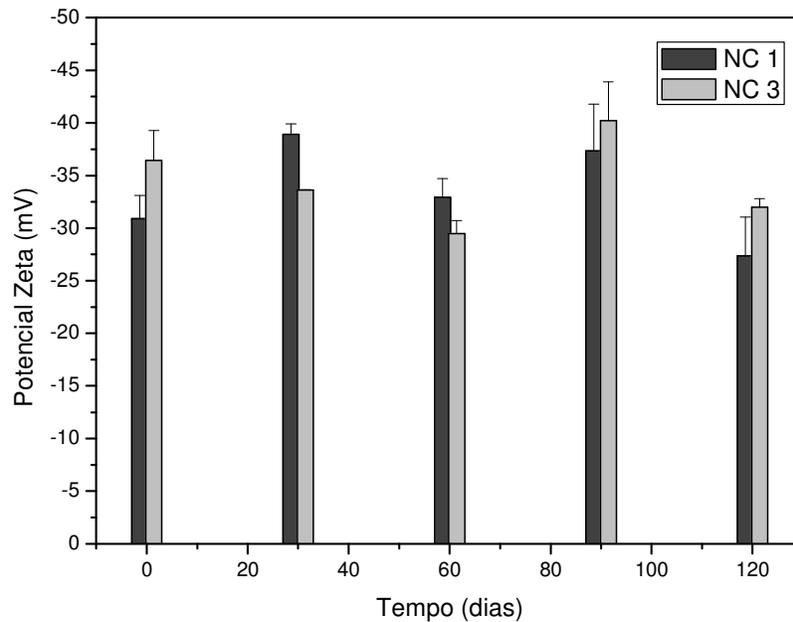


**Figura 33:** Polidispersão de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 1 e 3 de NC de PLGA com BZC.

Como demonstrado na Figura 33, todos os resultados demonstrados indicaram bons índices de polidispersão, estando todos abaixo de 0,2.

A estabilidade das formulações também foi avaliada em função do potencial zeta, parâmetro este que reflete a carga na superfície das partículas. Na ausência de mecanismos estéricos, a estabilidade de nanopartículas é determinada pelo balanço de forças repulsivas e atrativas que as partículas apresentam. Assim, grandes forças repulsivas tendem a evitar agregação. Nanopartículas com potencial zeta de aproximadamente (+/-) 30 mV são mais estáveis em suspensão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MOHANRAJ & CHEN, 2006).

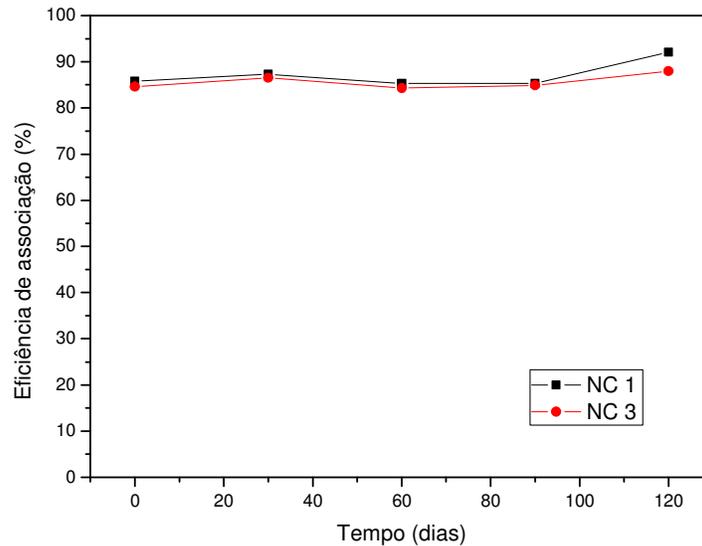
A variação do potencial zeta em função do tempo pode ser observada na Figura 34.



**Figura 34:** Potencial zeta (mV) de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 1 e 3 de NC de PLGA com BZC.

A Figura 34 indica que os valores de potencial zeta em função do tempo não apresentaram grandes alterações uma vez que estes ficaram entre -30 e -40 mV. Resultados semelhantes para valores de potencial zeta em função do tempo são encontrados na literatura (GRILLO *et al.*, 2010).

A eficiência de associação de fármaco nas nanopartículas foi avaliada em função do tempo, sendo os resultados apresentado na Figura 35.



**Figura 35:** Taxa de associação (%) do fármaco nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.

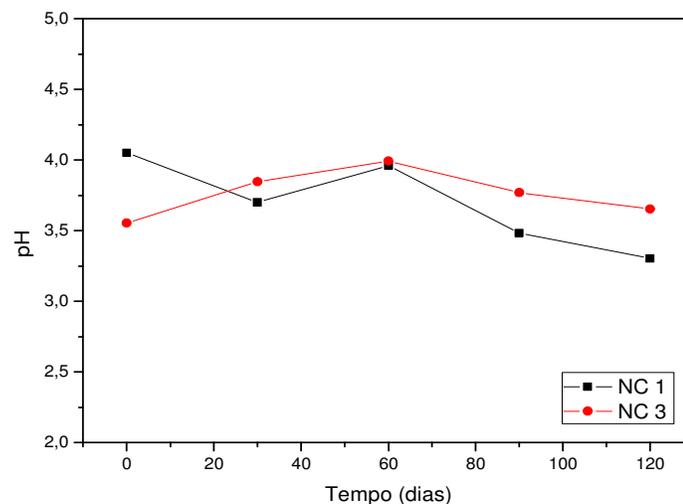
Segundo a Figura 35, as formulações 1 e 3 de NC de PLGA com BZC apresentaram pouca diferença na eficiência de associação de BZC nas NC, entretanto até 120 dias houve um pequeno aumento na taxa de associação do fármaco nas formulações. As variações na taxa de associação do fármaco na formulação 1 foram de 84% iniciais para 90% em 120 dias, enquanto para formulação 3 foram de 82% iniciais para 88% em 120 dias. Essa diferença pode ser por possível formação de cristais de fármaco que não foram associados inicialmente na formação das nanocápsulas ou que foram liberados e precipitaram em solução e quando da determinação da eficiência de associação foram quantificados (POHLMANN *et al.*, 2008).

O preparo de nanopartículas com fármacos lipofílicos pelo método de nanoprecipitação pode formar concomitantemente nanopartículas e nanocristais. (POHLMANN *et al.*, 2008). Como a concentração de BZC utilizada foi acima do seu limite de solubilidade, o que não foi associado às NC de PLGA pode, em função do tempo, aglomerar-se e formar nanocristais que podem ficar retidos nos dispositivos de ultrafiltração utilizados

para determinação da eficiência de associação alterando os valores de eficiência de associação em função do tempo.

O último parâmetro de estabilidade investigado para as formulações foi a medida de pH das suspensões em função do tempo. A medida de pH indica a presença de possíveis degradações nas cadeias poliméricas, gerando assim monômeros (ácidos orgânicos) em solução, fazendo com que o pH da suspensão de nanopartículas seja alterado (GUTERRES *et al.*, 1995).

A variação de pH em função do tempo pode ser observada na Figura 36.

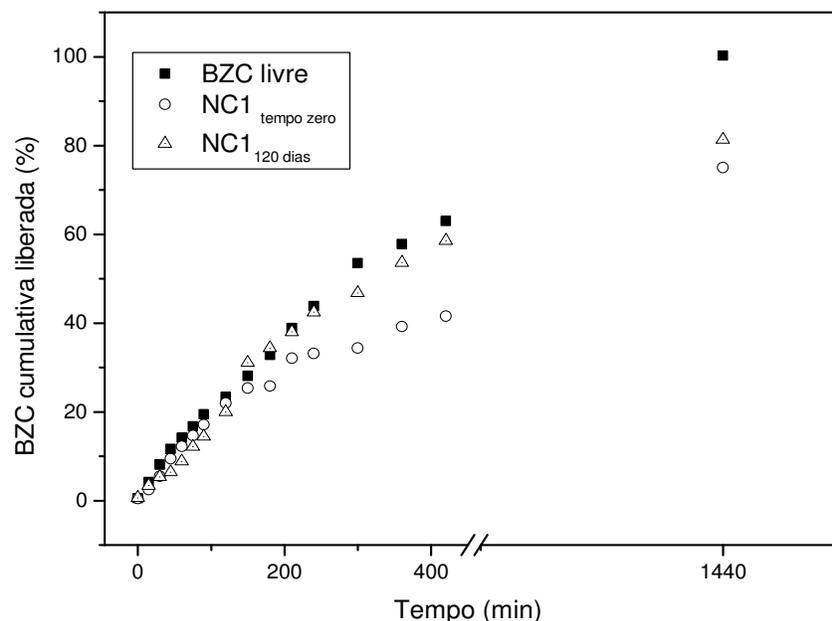


**Figura 36:** Valores de pH nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 1 e 3 de NC de PLGA com BZC.

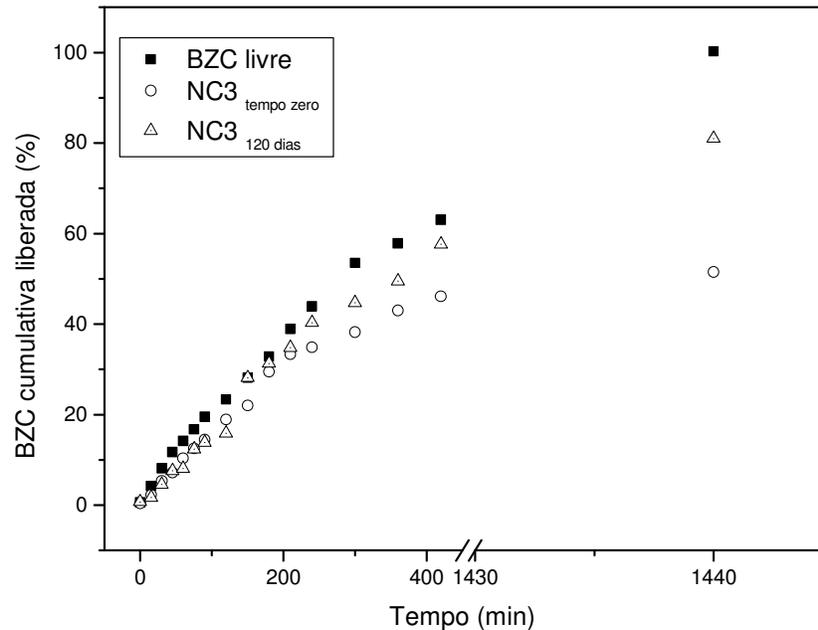
Nas duas formulações observou-se declínio nos valores de pH das suspensões de NC em função do tempo. A diminuição no valor do pH pode estar associada à degradação do polímero. No caso de NC de PLGA, por exemplo, a degradação do polímero produz ácido lático livre, causando diminuição do pH (GUTERRES *et al.*, 1995). Resultados semelhantes também foram encontrados na literatura para NC de PCL, demonstrando que a hidrólise de PCL em função do tempo aumenta a concentração de grupos carboxílicos, diminuindo o pH (POHLMANN *et al.*, 2002).

#### 4.4.3. Cinética de liberação *in vitro* da benzocaína em suspensões de nanocápsulas de PLGA

O perfil de liberação de fármacos a partir de sistemas nanoestruturados constitui um aspecto extremamente relevante no que concerne à eficiência terapêutica. Dessa maneira, sua determinação é fundamental para a caracterização das nanopartículas. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A partir dos ensaios de liberação foi possível observar a liberação da BZC quando associada ou não às NC de PLGA função do tempo (Figuras 37 e 38). Os ensaios foram realizadas com as formulações 1 e 3 escolhidas do planejamento fatorial nos períodos de zero e 120 dias com a finalidade de observar se haveriam mudanças no perfil de liberação conforme tempo de armazenamento. Durante o ensaio foram coletadas alíquotas em tempos definidos e o fármaco quantificado por CLAE, sendo que após a quantificação deste, o resultado foi expresso em função de porcentagem de liberação, conforme descrito anteriormente no item 3.4.11.



**Figura 37:** Liberação cumulativa da BZC (%) em solução e em suspensão de nanocápsulas de PLGA (formulação 1) (n=3) nos tempos zero e 120 dias de armazenamento.



**Figura 38:** Liberação cumulativa da BZC (%) em solução e em suspensão de nanocápsulas de PLGA (formulação 3) (n=3) nos tempos zero e 120 dias de armazenamento.

O perfil de liberação de fármacos a partir de NC poliméricas depende de uma grande variedade de fatores como a concentração e as propriedades físico-químicas do fármaco; natureza, degradabilidade e concentração do polímero; natureza do óleo, diâmetro das partículas e condições experimentais (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Alguns estudos relatam que o processo de liberação de fármacos a partir de NC poliméricas obtidas pelo método de nanoprecipitação se dá em duas fases (CAUCHETIER *et al.*, 2003) A primeira fase é caracterizada por uma liberação mais rápida devido à dessorção do fármaco presente na superfície das NC ou degradação da parede polimérica (FERRANTI *et al.*, 1999; PEREZ *et al.*, 2001; CRUZ *et al.*, 2006). Esse efeito é chamado de *burst effect*. A segunda fase apresenta uma liberação mais lenta e corresponde a uma difusão do fármaco do reservatório interno para o meio externo. Esse processo é determinado pelo coeficiente de partição do fármaco entre o núcleo oleoso e a fase aquosa externa, existência de

interação entre o fármaco e o polímero e a concentração de tensoativos (CALVO *et al.*, 1997; ZILLI *et al.*, 2005; LIMAYEN *et al.*, 2006).

Nas Figuras 37 e 38 pode-se observar o perfil de liberação da BZC associada ou não as NC de PLGA em função do tempo (aproximadamente 1440 minutos, em temperatura ambiente).

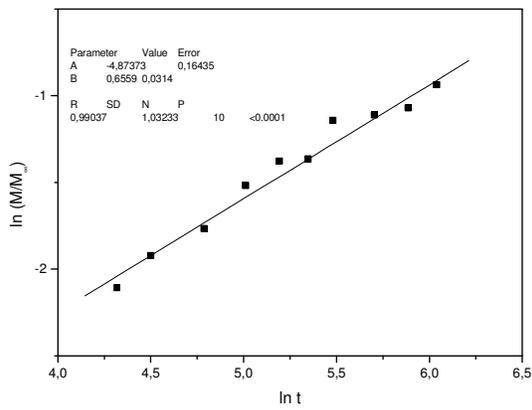
Pela análise das curvas foi possível observar que o perfil de liberação da BZC associada às NC de PLGA foi mais lento quando comparado à BZC livre. Essa mudança no perfil de liberação ocorreu tanto para a formulação 1 quanto a formulação 3. Estes resultados eram esperados conforme resultados anteriores de cinética de liberação apresentados nos itens 4.2.3 e 4.3.4, porém foi observada diferenças no perfil de liberação da BZC das formulações com período de armazenamento diferente (zero e 120 dias). Tanto a formulação 1 quanto a formulação 3 apresentaram um perfil de liberação mais lento no tempo zero do que os perfis de liberação das formulações com 120 dias. Essa diferença pode ser atribuída à diminuição da estabilidade das suspensões de NC de PLGA com o armazenamento. Conforme citado no item 4.4.2., após 120 dias de armazenamento há diminuição do valor de pH das suspensões de NC de PLGA (formulação 1 e 3). Isto ocorre devido a possível degradação do polímero, liberando monômeros ácidos para o meio e, desta forma, reduzindo o pH (GUTERRES *et al.*, 1995).

O perfil de liberação de fármacos a partir de NC poliméricas depende de uma grande variedade de fatores como a concentração e as propriedades físico-químicas do fármaco; natureza, degradabilidade e concentração do polímero; natureza do óleo, diâmetro das partículas e condições experimentais (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). A diminuição da quantidade de polímero aumenta a velocidade de liberação do fármaco e nesse caso a possibilidade de erosão polimérica pode facilitar a liberação (ROMERO-CANO & VINCENT, 2002; POLETTO *et al.*, 2008).

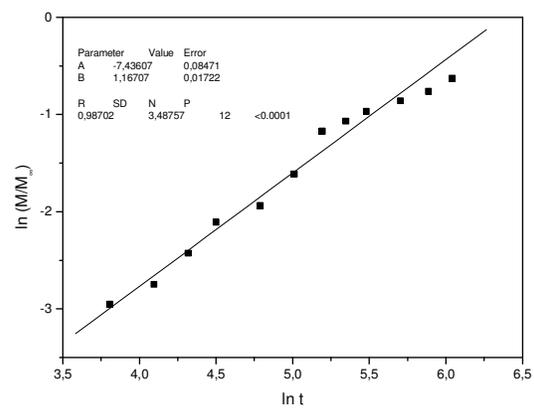
Com o tempo de armazenamento há uma degradação polimérica evidenciada pela diminuição do pH e conseqüentemente uma diminuição da concentração do polímero fazendo com que aumente a velocidade da liberação da BZC e o perfil não seja tão lento quando comparado com o perfil de liberação das formulações no tempo zero.

#### **4.4.3.1. Modelo matemático para avaliação do mecanismo de liberação da benzocaína a partir das nanocápsulas poliméricas**

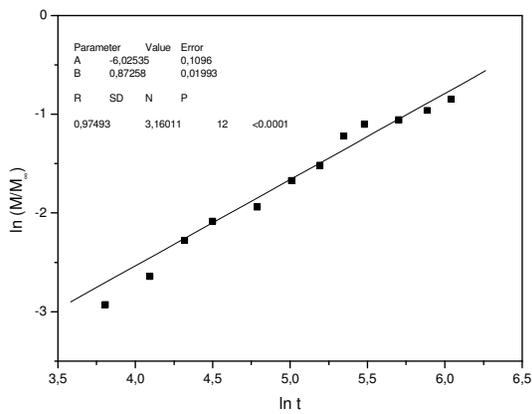
Com o objetivo de investigar o mecanismo de liberação da BZC a partir das NC de PLGA nos tempos zero e 120 dias, foi aplicado o modelo teórico de Korsmeyer-Peppas conforme já descrito anteriormente no item 3.4.12. (COSTA & LOBO, 2001). A partir das curvas de liberação foram feitas as regressões lineares para determinação dos coeficientes de correlação ( $r$ ) e constante de liberação ( $k$ ). Os resultados obtidos a partir da Figura 39 encontram-se na Tabela 19.



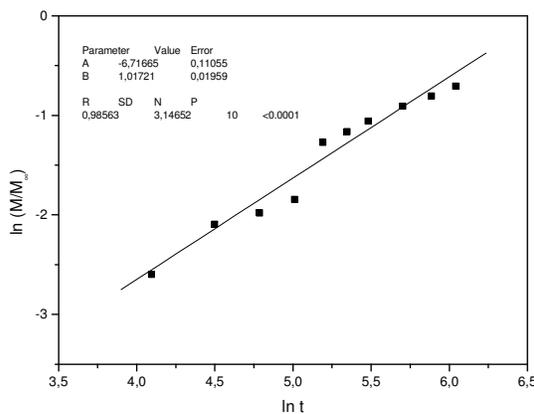
a)



b)



c)



d)

**Figura 39:** Resultados obtidos usando o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas a) Formulação 1 (tempo zero); b) Formulação 1 (120 dias); c) Formulação 3 (tempo zero) V; d) Formulação 3 (120 dias).

**Tabela 19:** Valores dos parâmetros obtidos a partir da aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas para as curvas de liberação de BZC associada as NC de PLGA.

Parâmetro	F1 (tempo zero)	F1 (120 dias)	F3 (tempo zero)	F3 (120 dias)
<b>Expoente</b>	$n = 0,65$	$n = 1,16$	$n = 0,87$	$n = 1,01$
<b>Constante cinética (k)</b>	$0,0005 \text{ min}^{-1}$	$0,0076 \text{ min}^{-1}$	$0,0012 \text{ min}^{-1}$	$0,0024 \text{ min}^{-1}$
<b>Coefficiente de correlação (r)</b>	0,990	0,987	0,974	0,985

A análise das curvas de liberação após o tratamento matemático de Korsmeyer-Peppas forneceu valores de constante de taxa de liberação,  $k$ , ( $\text{min}^{-n}$ ) para as formulações 1 de 0,0005 e 0,0076 para os tempos zero e 120 dias respectivamente e para formulação 3 de 0,0012 e 0,0024 para os tempos zero e 120 dias indicando que ambas formulações obtiveram uma liberação mais lenta com tempo zero de armazenamento quando comparada as mesmas formulações, porém armazenadas durante 120 dias. Os valores de expoente de liberação foram 0,65 (tempo zero) e 1,16 (120 dias) para a formulação 1; 0,87 (tempo zero) e 1,01 (120 dias) para a formulação 3. De acordo com Korsmeyer e colaboradores (1983), valores de expoente de liberação entre 0,45 e 1 indicam que o mecanismo de liberação está ocorrendo pela combinação de dois processos, difusão e relaxamento. Valores acima de 1 indicam intumescimento do polímero (KORSMEYER *et al.*, 1983; PEPPAS, 1985). Estes valores indicam que para as duas formulações testadas há uma combinação de dois mecanismos (difusão e relaxamento) envolvidos no processo de liberação para o tempo zero de armazenamento e para estas mesmas formulações com 120 dias o processo envolvido do mecanismo de liberação é o intumescimento do polímero.

Desta forma foi possível verificar que o tempo de armazenamento muda o perfil de liberação do fármaco e este deve ser afetado pelas alterações nas características descritas e discutidas acima para as características coloidais das NC contendo BZC.

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho forneceu informações importantes referentes ao preparo, caracterização e avaliação farmacológica de formulações contendo NC poliméricas com o anestésico local BZC a partir do método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Foram preparadas NC de PLGA, PCL e PLA contendo BZC com a finalidade de avaliar o perfil de liberação *in vitro*, citotoxicidade e atividade anestésica *in vivo*. A caracterização demonstrou bons parâmetros coloidais referentes a diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta e o perfil de liberação foi mais lento quando comparado à BZC livre para as três formulações de NC poliméricas. Os ensaios farmacológicos revelaram que a formulação de NC de PLA contendo BZC aumentou o efeito anestésico quando comparada com as outras formulações de NC poliméricas e com a BZC livre, porém foi a que apresentou uma redução de 80% da viabilidade celular. Desta forma, o polímero escolhido para os experimentos seguintes foi o PLGA por apresentar baixa toxicidade celular e um perfil de liberação mais lento ( $k=0,0018 \text{ min}^{-1}$ ) quando comparado com o PCL.

A caracterização de formulações de NC de PLGA contendo BZC preparada com diferentes tipos de óleo também demonstrou bons parâmetros coloidais. As características físico-químicas obtidas foram melhores na formulação contendo o óleo Myritol 318®, uma vez que esta formulação apresentou maior eficiência de associação de BZC e melhores parâmetros de estabilidade quando comparada com as outras formulações preparadas com outros óleos, bem como a maior modificação do perfil de liberação deste fármaco.

A partir da definição do polímero e do óleo, a partir do planejamento fatorial  $2^{4-1}$  foi possível fazer uma triagem das condições de preparo das NC de PLGA contendo BZC, estimando as concentrações ideais de polímero, óleo e tensoativo para obtenção de NC com propriedades adequadas de tamanho, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação, bem como avaliar a influência de cada um desses fatores sobre as propriedades das NC. As suspensões de NC de PLGA contendo BZC apresentaram boa estabilidade físico-química em função do tempo quanto ao diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta, pH e eficiência de associação. A cinética de liberação de BZC a partir de NC de PLGA se mostrou mais lenta e sustentada se comparada à cinética de liberação da BZC livre. A

aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas mostrou que o processo de liberação é governado pelo transporte de Caso II (combinação de difusão e relaxamento), porém o período de armazenamento foi capaz de afetar o perfil de liberação da BZC a partir das NC de PLGA.

Os resultados apresentados neste trabalho são referentes a etapas iniciais do desenvolvimento de novas formulações nanotecnológicas e fornecem perspectivas para escolha de matérias primas para a composição das suspensões de NC poliméricas para veiculação do AL BZC com futura aplicação no tratamento da dor. Os resultados abrem perspectivas para outros estudos de pré-formulação e até pré-clínicos, uma vez que se mostraram bastante promissores.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. **Int. J. Pharm.**, v. 87, p. 247-253, 1992.

ALEXIS, F.; RHEE, J.W.; RICHIE, J.P.; RADOVIC-MORENO, A.F.; ROBERT LANGER, R.; FAROKHZAD, O.C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. **Urol. Oncol.**, v. 26, p. 74 - 85, 2008.

ANTON, N.; BENOIT, J-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **J. Control. Release**, v. 128, p. 185 – 199, 2008.

ASIYANBOLA. B. & SOBOYEJO, W. For the surgeon: an introduction to nanotechnology. **J. Surg. Educ.**, v. 65, p. 155-161, 2008.

AULTON, M. **Dissolution and Solubility**. Pharmaceutics: the science of dosage from design. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002.

AVACHAT, A.; KOTWAL, V. Design and Evaluation of Matrix-Based Controlled Release Tablets of Diclofenac Sodium and Chondroitin Sulphate. **AAPS PharmSciTech.**, v. 8, p. 1-6, 2007.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; LIVANIOU, E.; EVANGELATOS, G.; ITHAKISSIOS, D. S. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA–mPEG nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 259, p. 115–127, 2003.

BALICER, R.D. & KITAI, E. Methemoglobinemia Caused by Topical Teething Preparation: A Case Report. **The Scientific World Journal**, p. 517-520, 2004.

BAYREUTHER, K. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. **Proc. Natl Acad Sci**, v. 85, p. 5112-16, 1988.

- BLOUZA, I.L.; CHARCOSSET, C.; SFARB, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **Int. J. Pharm.**, v. 325, p. 124-131, 2006
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Editora da Unicamp, Campinas, 2007.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **Int. J. Pharm.**, v. 280, p. 241-25, 2004.
- BRASIL, Anvisa, Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003.
- BRASSEUR, N.; BRAULT, D.; COUVREUR, P. Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release. **Int. J. Pharm.**, v. 70, 129-135, 1991.
- BREUNIG, M.; BAUER, S.; GOEPFERICH, A. Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting? **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 68, p. 112-128, 2008.
- BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. **Int. J. Pharm.**, v. 336, p. 367-375, 2007.
- BUTLER, M. **Animal Cell Culture & Technology**. Scientific Publishers, New York, USA, 2004.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 153, p. 41–50, 1997.
- CARVALHO, H.; COLLARES-BUZATO, C.M. **Célula – Uma abordagem multidisciplinar**. Ed. Manole, Barueri, S/P, 2005.
- CATTERAL, W.; MACKIE K. **Anestésicos locais** in: GOODMAN, L.S. & GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 9. ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996.

CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. **Int. J. Pharm.**, 250, 273–281, 2003.

CEREDA, C. M. S.; de ARAÚJO, D. R.; BRUNETTO, G. B.; de PAULA, E. Liposomal prilocaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation. **J. Pharm. Pharmacol. Sci.**, v. 7, p. 235-240, 2004.

CEREDA, C. M. S.; BRUSCHINI, G.; DE ARAÚJO, D. R.; de PAULA, E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. **Reg. Anesth. Pain.** v.53, p. 1092 - 1097, 2006.

CEREDA, C.M.S., TÓFOLI, G.R., DE ARAUJO, D.R., ARANA, S., DE PAULA, E. Local Neurotoxicity Evaluation of Bupivacaine-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex In the rat sciatic Nerve. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v.33, p.62-62, 2008.

CHUNG, N.Y.; BATRA, R.; ITZKEVITCH, M.; BORUCHOV, D.; BALDAUF, M. Severe methemoglobinemia linked to gel-type topical benzocaine use: a case report. **J. Emerg. Med.**, v. 38, n. 5, p. 601-606, 2010.

CIOLA, R. **Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC**, São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 1998.

COLOMBO, G.; PADERA, R.; LANGER, R.; KOHANE, D. S. Prolonged duration anesthesia with lipid-protein-sugar particles containing bupivacaine and dexamethasone. **Prolong. Duration Local Anesth.**, v. 75, p. 458-464, 2005.

COSTA, C. & LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 13, p. 123–133, 2001.

COVINO, B. G.; VASSALO, H. G. **Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico**, Rio de Janeiro: Colina, 1985.

COLLINS, V. J. **Principles of Anesthesiology: general and regional**. 3.ed. U.S.A. Lea & Febiger, v.2., 1993.

CRUZ, L.; SOARES, L.U.; COSTA, T.D.; MEZZALIRA, G.; da SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **Int. J. Pharm.**, v. 313, p.198–205, 2006.

de ARAÚJO, D. R.; PINTO, L. M. A.; BRAGA, A. F. A.; de PAULA, E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 53, p. 663-671, 2003.

de ARAÚJO, D. R.; FRACETO, L. F.; BRAGA, A. F. A.; DE PAULA, E. Sistemas de liberação controlada com bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25): efeitos da complexação com ciclodextrinas no bloqueio do nervo ciático em camundongos. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 55, n. 3, p. 316-328, 2005.

de ARAÚJO, D. R.; BRAGA, A. F. A.; MORAES, C. M.; FRACETO, L. F.; de PAULA, E. Mistura com excesso enantiomérico de 50% (s75-r25) de bupivacaina complexada com ciclodextrinas e anestesia por via subaracnoidea em ratos. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 56, p. 495-506, 2006

de ARAÚJO, D. R.; TSUNEDA, S. S.; CEREDA, C. M. S.; CARVALHO, F. G. F; PRETÉ, P. S. C; FERNANDES, S. A.; YOKAICHIYA, F.; FRANCO, M. K. K. D.; MAZZARO, I.; FRACETO, L. F.; BRAGA, A. F. A.; DE PAULA, E. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 33, p. 60-71, 2008.

de JONG R. H. **Local Anesthetics**. Springfield, Illinois: C.C. Thomas, 1994.

de PAULA, E. & SCHREIER, S. Use a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetic on membrane structure. **Biochim. Biophys.**, v. 1240, p. 25-33, 1995.

DEARDEN, J.C., BRESNEN, G.M. The measure of partition coefficients. **Quant. Struct.-Activity Relat.**, v. 7, p. 133-144, 1988.

DENIZOT, F. E LANG, R. Rapid colorimetric assay for the cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Meth.**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DERAKHSHANDEH, K.; ERFAN, M.; DADASHZADEH, S. Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 66, p. 34-41, 2007.

DILLEN, K.; VANDERVOORT, J.; MOOTER, G. V.; VERHEYDEN, L.; LUDWIG, A. Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 275, p. 171-187, 2006.

DOLLO, G.; LE CORRE, P.; CHEVANNE, F.; LE VERGE, R. Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with  $\beta$ -cyclodextrin and derivatives. II. Evaluation of affinity constants and in vitro transfer rate constants. **Int. J. Pharm.**, v. 136, p.165-174, 1996.

DOMINGUES, G. S; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Quím. Nova**, v. 31, p. 1966-1972, 2008.

DONOVAN, S.F. & PESCATORE, M.C. Method for measuring the logarithm of the octanol-water partition coefficient by using short octadecyl-poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns. **J.Chrom. A.**, v. 952, p. 47-61, 2002.

DUAN, Y.; SUN, X.; GONG, T.; WANG, Q.; ZHANG, Z. Preparation of DHAQ-loaded mPEG-PLGA-mPEG nanoparticles and evaluation of drug release behaviors *in vitro/in vivo*. **J. Mater. Sci.** v. 17, p. 509-516, 2006.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia**, São Paulo: Artliber, 2006.

ESMAEILI, F.; GHAREMANI, M. H.; ESMAEILI, B.; KHOSHAYAND, M. R.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. PLGA nanoparticles of different surface properties: Preparation and evaluation of their body distribution. **Int. J. Pharm.**, v. 349, p. 249-255, 2008.

FELDMAN, H. S. & COVINO, B. G. Comparative motor-blocking effects of bupivacaine and ropivacaine, a new amino amide local anesthetic, in the rat and dog. **Anesth. Analg.**, v. 67, p. 1047-1052, 1988.

FERRANTI, V.; MARCHAIS, H.; CHABENAT, C.; ORECCHIONI, A.M.; LAFONT, O. Primidone loaded poly-e-caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and *in vitro* release profiles. **Int. J. Pharm.**, v. 193, p. 107–111, 1999.

FERRERO, C.; MUÑOZ-RUIZ, A.; JIMÉNEZ CASTELLANOS, M.R. Fronts movement as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation. **Int. J. Pharm.**, v. 202, p. 21-28, 2000.

FESSI, H.; PUISEIUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. Procédé de preparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

FESSI, H., PUISEIUX, F.; DEVISSAGUET, J-P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm.**, v. 55, R1-R4, 1989.

FLETCHER, D.; LECORRE, P.; GUILBAUD, G.; LE VERGE, R. Antinociceptive effect of bupivacaine encapsulated in poly (D,L)-lactide-co-glycolide microspheres in the acute inflammatory pain model of carrageenin-injected rats. **Anesth. Analg.**, v. 84, p. 90- 94, 1997.

FISCHER, D.; LI, Y.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J.; KISSEL, T. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. **Biomaterials**, v. 24, p.1121–1131, 2003.

FORTUNATO, K.A.; DOILE, M.M., SCHMUCKER, I.C.; SCHUCKO, S.K.; SILVA, M.A.S.; RODRIGUES, P.O. Influência da Complexação com ciclodextrina sobre a Liberação do Acetato de Dexametasona a partir de Matrizes Hidrofílicas de Hidroxipropilmetilcelulose

(HPMC) e Polioxetileno (PEO). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 513-521, 2007.

FRACETO, L. F.; OYAMA, S. JR.; NAKAIE, C. R.; SPISNI, A.; de PAULA, E., PERTINHEZ, T.A. Interaction of local anesthetics with a peptide encompassing the IV/S4-S5 linker of the Na<sup>+</sup> channel. **Biophys. Chem.**, v. 20, p. 29-39, 2006.

FRACETO, L. F.; de ARAÚJO, D. R.; de PAULA, E. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Quím. Nova**, v. 31, p. 1775-1783, 2008.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**, 4.ed., Canadá: Wiley-liss, 2000.  
FRESTA, M., CAVALLARO, G., GIAMMONA, G., WEHRLI, E., PUGLISI, G. Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. **Biomaterials**, v. 17, p. 751-758, 1996.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharm. Res.**, v. 21, p. 1428-1439, 2004.

GAMISANS, F.; LACOUOLONCHE, F.; CHAUVET, A.; ESPINA, M.; GARCIA, M. L.; EGEA, M. A. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. **Int. J. Pharm.**, v. 179, p. 37-48, 1999.

GANTENBEIN, M.; ATTOLINI, L.; BRUGUEROLLE, B. Potassium channel agonists modify the local anesthetic activity of bupivacaine in mice. **Can. J. Anaesth.**, v. 43, p. 871-876, 1996.

GINOSAR, Y.; DAVIDSON, E.M.; FIRMAN, N.; MEROZ, Y.; LEMMENS, H.; WEINIGER, C.F. A randomized controlled trial using patient-controlled epidural analgesia with 0.25% versus 0.0625% bupivacaine in nulliparous labor: effect on analgesia requirement and maternal satisfaction. **Int. J. Obstet. Anesth.**, v. 19, p. 171-178, 2010.

GÖPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**, v. 17, p. 103-114, 1996.

- GOODMAN, A. G.; GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9.ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996.
- GRANT, G. J.; BANSINATH, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Reg. Anesth. Pain Med.**, v. 26, p. 61-63, 2001.
- GRANT, S. A. The Holy Grail: long-acting local anaesthetics and liposomes. **Best Pract. Res. Clin. Anaesth.**, v. 16, p. 345-352, 2002.
- GRIGORIEV, D. & MILLER, R. Mono- and multilayer covered drops as carriers. **Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.** 14, 48–59, 2009.
- GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; LIMA, R.; LOURENÇO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO L.F. Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly(hydroxybutyrate-cohydroxyvalerate) microspheres. **J. Polym. Environm.**, v. 18, p. 26-32, 2010.
- GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; DE ARAÚJO, D.R.; DE PAULA, E.; DIAS FILHO, N.L.; ROSA, A.H., FRACETO, L.F. Validation of an HPLC Method for quantitative Determination of Benzocaine in PHBV-Microparticles and PLA-Nanoparticles. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.28, p. 393-399, 2009.
- GUPTA, S. P. Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. **Chem. Rev.**, v. 91, p. 1109-1119, 1991.
- GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac : I. Formulation and stability study. **Int. J. Pharm.**, v. 113, p. 57-63, 1995.
- HANSCH, C. & FUJITA, T.  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 86, p. 1616-1626, 1964.
- HANSCH, C. & LEO, A.J. **Exploring QSAR: fundamentals and applications in chemistry and biology**. Washington: ACS, 1995.

HARIHARAM, D.; PEPPAS, N. A.; BETTINI, R.; COLOMBO, P. Mathematical analysis of drug delivery from swellable systems with partial physical restrictions or impermeable coatings. **Int. J. Pharm.**, v.112, p. 47-54, 1994.

HOLGADO, M. A.; ARIAS, J. L.; CÓZAR, M. J.; ALVAREZ-FUENTES, J.; GAÑAN-CALVO, A. M.; FERNÁNDEZ-ARÉVALO, M. Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing effects on drug loading and release properties. **Int. J. Pharm.**, v. 358, p. 27-35, 2008.

ICH. **Internacional Conference on Harmonization**; Guidance for Industry – Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology; Londres, 1996.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Pharm. Sci.**, v. 86, p. 147-162, 1997

JARDIM, I.C.S.F; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, In: **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2007.

JIM, J.H. & LEE, J.S. A statistical design and analysis illustrating the interactions between key experimental factors for the synthesis of silver nanoparticles. **Colloid. Surf. A.**, v. 322, p. 155-163, 2008.

KAMOUN, P.; LAVOINNE, A.; de VERNEUIL, H. **Bioquímica e Biologia Molecular**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2006.

KILIC, A. C.; CAPAN, Y.; VURAL, I.; GURSOY, R. N.; DALKARA, T.; CUINE, A.; HINCAL, A. A. Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. **J. Microencap**, v. 22, p. 633–641, 2005.

KNUDSEN, K.; SUURKULA, M. B.; BLOMBERG. S.; SJOVALL, J.; EDVARDSSON, N. Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. **Br. J. Anesth.**, v. 78, p. 507-514, 1997.

KOO, O.M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine**, v. 1, p. 193 - 212, 2005.

KORSMEYER, R.W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 15, p. 25-35, 1983.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. **Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems**. In: Roseman TJ, Mansdorf SZ (Eds.). Controlled release delivery systems. New York, USA: Marcel Dekker Inc, 1991.

KRANZ, H.; BODMEIER, R. Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: In situ implants versus in situ microparticles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 34, p. 164-172, 2008.

KRAUSE, H.J. & ROHDEWALD, P. Preparation of gelatin nanocapsules and their pharmaceutical characterization. **Pharm. Res.**, v. 5, p. 239–243, 1985.

KREUTER, J. Nanoparticles—a historical perspective. **Int. J. Pharm.** v. 331, p. 1-10, 2007.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids Surf. B.**, v. 75, p. 1-18, 2009.

KUZMA, P. J.; KLINE, M. D.; CALKINS, M. D.; STAATS, P. S. Progress in the development of ultra-long-acting local anesthetics. **Reg. Anesth.**, v. 22, p. 543-551, 1997.

LE GUÉVELLO, P.; LE CORRE, P.; CHEVANNE, F.; LE VERGE, R. High-performance liquid chromatographic determination of bupivacaine in plasma samples for biopharmaceutical studies and application to seven other local anaesthetics. **J. Chromatography**, v. 622, p. 284-290, 1993.

LESZCZYNSKA, K. & KAU, S. T. A sciatic blockade method to differentiate drug-induced local anesthesia from neuromuscular blockade in mice. **J. Pharmacol. Meth.**, v. 27, p. 85-93, 1992.

LERTSUTTHIWONG, P.; NOOMUN, K.; JONGAROONNGAMSANG, N.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydr. Polym.**, v. 74, p. 209–214, 2008.

LI, H-L; HADID, D.; RAGSDALE, D. S. The batrachotoxin receptor on the voltage-gated sodium channel is guarded by the channel activation gate. **Mol. Pharmacol.**, v. 61, p. 905–912, 2002.

LIMAYEM, I.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **Int. J. Pharm.**, v. 325, p. 124–131, 2006.

LINCE, F.; MARCHISIO, D. L.; BARRESI, A. A. Strategies to control the particle size distribution of poly-ε-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. **J. Colloid Interf. Sci.**, v. 322, p. 505–515, 2008.

LOBENBERG, R. **Smart Materials: Applications of nanotechnology in drug delivery and drug targeting**. Proceedings of the international conference on MEMS. NANO and Smart Systems (ICMENS'03), 2003.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int. J. Pharm.**, v. 225, p. 15-30, 2001.

LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Design of New Formulations for Topical Ocular Administration: Polymeric Nanocapsules Containing Metipranolol **Pharm. Res.**, v. 10, p. 80-87, 1993.

LUDERER, F.; LOBER, M.; ROHM, H.W.; GOCKE, C.; KUNNA, K.; KOCK, K.; KROEMER, H.K.; WEITSCHIES, W.; SCHIMITZ, K.P.; STERNBERG, K. Biodegradable sirolimus-loaded poly(lactide) nanoparticles as drug delivery system for the prevention of in-stent restenosis in coronary stent application. **J Biomater Appl.**, 2010, doi: 10.1177/0885328209360696.

LUTTER, S.; KOETZ, J.; TIERSCH, B.; BOSCHETTI DE FIERRO, A.; ABETZ, V. Formation of gold nanoparticles in triblock terpolymer-modified inverse microemulsions **Colloid Surf. A** , v. 329, p. 160–176, 2008.

LV, H.; ZHANG, S.; WANG, B.; CUI, S.; YAN, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **J. Control. Release**, v. 114, p. 100–109, 2006.

MA, J.; FENG, P.; YE, C.; WANG, Y.; FAN, Y. An improved interfacial coacervation technique to fabricate biodegradable nanocapsules of an aqueous peptide solution from polylactide and its block copolymers with poly(ethylene glycol). **Colloid Polym. Sci.**, v. 279, p. 387–392, 2006.

MAGENHEIM, B.; BENITA; S.; *S.T.P.* Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **Pharma Sci.**, v. 1, p. 221-241, 1991

MALAMED, S. F. **Manual de anestesia local**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MARTIN, O. & AVEROUS, L. Poly (lacticacid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. **Polymer**, v. 42, p. 6209–6219, 2001.

MCCARRON, P. A.; DONNELLY, R. F.; MAROUF, W. Celecoxib-loaded poly(d,l-lactide-co-glycolide)nanoparticles prepared using a novel and controllable combination of diffusion and emulsification steps as part of the salting-out procedure. **J. Microencaps.** v. 23, p. 480-498, 2006.

MCLURE, H. A. & RUBIN, A. P. Review of local anaesthetic agents. **Minerva Anesthesiol.**, v. 71, p. 59-74, 2005.

MELO, N.F.S., GRILLO, R., ROSA, A. H., DIAS FILHO N.L., de PAULA, E, de ARAUJO, D.R., FRACETO L.F. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli(L-lactideo) contendo benzocaína. **Quím. Nova**, v. 33, p. 65-69, 2010.

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

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical J. Pharm. Res.** v. 5, p. 561-573, 2006.

MOINARD-CHÉCOT, D.; CHEVALIER, Y.; BRIANCON, S.; BENEY, L.; FESSI, H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. **J. Colloid Interf. Sci.**, v. 317, p. 458–468, 2008.

MONDAL, N.; SAMANTA, A.; PAL, T. K.; GHOSAL, S. K. Effect of different formulation variables on some particle characteristics of poly(DL-lactide-co-glicolide) nanoparticles. **Pharm. Soc. Japan**, v. 128, p. 595-601, 2008.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v. 385, p. 113-142, 2010.

MORAES, C. M.; ABRAMI, P.; ARAÚJO, D. R.; BRAGA, A. F. A.; ISSA, M. G.; FERRAZ, H. G.; de PAULA, E.; FRACETO, L. F. Characterization of Lidocaine:Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex. v. 57, p. 313 – 316, **J. Inclus. Phenom. Macroc. Chem.**, 2007a.

MORAES, C. M.; ABRAMI, P.; de PAULA, E.; BRAGA, A. F.; FRACETO, L. F. HPLC and solubility study of the interaction between S (-) Bupivacaine and Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. **Int. J. Pharm.**, v. 331, p. 99 - 106 , 2007b.

MORAES, C. M.; ABRAMI, P.; de PAULA, E.; ANDREO FILHO, N.; FRACETO, L. F. Preparo e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidróxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. **Quím. Nova**, v. 30, p. 777-784, 2007c.

MORAES, C.M., de MATOS, A.P., de PAULA, E., ROSA, A.H., FRACETO, L.F. Benzocaine loaded biodegradable poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. **Mater. Sci. Eng., B**, v. 165, p. 243-246, 2009.

MORAES, C.M.; de MATOS, A.P.; GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; PAULA, E.; DIAS FILHO, N.L.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Screening of formulation variables for the preparation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules containing the local anesthetic benzocaine. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, 2010, *in press*.

MORALES, M. M. Terapias Avançadas, Editora Atheneu, 2007.

MÜLLER, C. R.; HAAS, S. E.; BASSANI, V. L.; GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; PERALBA, M. C. R.; POHLMANN, A. R. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Quím. Nova**, v. 27, p. 555-560, 2004.

NAFEE, N.; SCHNEIDER, M.; SCHAEFER, U.F.; LEHR, C.M. Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *Int. J. Pharm.*, v. 381, p. 130-139, 2009.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Prog. Polym. Sci.**, v. 32, p. 762-798, 2007.

NAMPOOTHIRI, K.M. ; NAIR, N.R. ; JOHN, R.P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Biores. Tech.**, v. 101, p. 8493-8501, 2010.

NGUYEN, S. T.; CABRALES, R. E.; BASHOUR, C. A.; ROSENBERGER, T. E.; MICHENER, J. A.; YARED, J. Benzocaine-induced methemoglobinemia. **Anesth. Analg.**, v. 90, p. 369-371, 2000.

- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P.; Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quím. Nova**, v. 27, p. 131-138, 2004.
- PAAVOLA A.; YLIRUUSI, J.; KAJIMOTO, Y.; KALSO, E.; WAHLSTRÖM, T.; ROSENBERG, P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 1997-2002, 1995.
- PANYAM, J. & LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 55, p. 329–347, 2003.
- PATTY, P. J.; FRISKEN, B. Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data. **Appl. Optics**, v. 45, p. 2209-2216, 2006.
- PEPPAS, N.A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.*, v. 60, n. 4, p. 110-111, 1985.
- PEPPAS, N.A. & SAHLIN, J.J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int. J. Pharm.*, v. 57, p. 169-172, 1989.
- PEREZ, C.; SANCHEZ, A.; PUTNAM, D.; TING, D.; LANGER, R.; ALONSO, M.J. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. **J. Control. Release**, v. 75,p. 211–224, 2001.
- PICOS, D. R.; CARRIL, M. G.; MENA, D. F.; FUENTE, L. N. Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. **Rev. Cubana Farm.**, v. 34, p. 70-77, 2000.
- PINTO, L.M.A., YOKAICHIYA, D.K., FRACETO, L.F., DE PAULA, E. Interaction of benzocaína with model membranes. **Biophys. Chem.** 2000, v.87, p.213-223, 2000.
- PINTO, L. M.; FRACETO, L. F.; SANTANA, M. H. A.; PERTINHEZ, T. A.; JUNIOR, S. O.; de PAULA, E. Physicochemical characterization of benzocaine- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **J. Pharm. Biomed. Analysis**, v. 39, p. 956–963, 2005.

- POLAKOVIC, M.; GORNER, T.; GREF, R.; DELLACHERIE, E. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres II. Modelling of drug release. **J. Control. Release**, v. 60, p. 169-177, 1999.
- POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Sprayed-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability and nanostructure models. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 16, p. 305-312, 2002.
- POHLMANN, A.R; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C.G.; CRUZ, L.; BERNARDI, A.; JAGER, E.; BATTASTINI, A.M.O.; DA SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S.S. Determinating the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-load polymeric nanocapsule aqueous suspension: a relation between light scattering and drug content, **Int J Pharm**, v.359, p. 288-293. 2008.
- POLETTI, F.S.; JÄGER, E.; CRUZ, L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 28, p.472–478, 2008.
- PREETZ, C.; RÜBE, A.; REICHE, I.; HAUSE, G.; MÄDER, K. Preparation and characterization of biocompatible oil-loaded polyelectrolyte nanocapsules. **Nanomedicine: NMB**, v. 4, p. 106–114, 2008.
- QUINTANAR-GUERRERO, D.; FESSI, H.; ALLÉMAN, E.;DOELKER, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D-L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. **Int. J. Pharm.**, v. 143, p.133-141, 1996.
- RANDALL, L. O. & SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Archiv. Int. Pharmacodyn**, v. CXI, p. 409-419, 1957
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**, 5.ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, SW. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I: Methods preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

RITGER, P. & PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **J Control Release**, v. 5, p. 37-42, 1987.

ROMERO-CANO, M.S. & VINCENT, B. Controlled release of 4-nitroanisole from poly(lactic acid) nanoparticles. **J. Control. Release**, v. 82, p. 127–135, 2002.

ROSE, J. S.; NEAL, J. M.; KOPACZ, D. J. Extended-duration analgesia: update on microspheres and liposomes. **Reg. Anesth. Pain Med.**, v. 30, p. 275-285, 2005.

SAHOO, S. K.; PANYAM, J.; PRABHA, S.; LABHASETWAR, V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D-L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. **J. Contr. Rel.**, v. 82, p.105-114, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA FREITAS, L; GUTERRES, S. S. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SEMETE, B.; BOOYSEN, L.; LEMMER, Y.; KALOMBO, L.; KATATA, L.; VERSHCOOR, L.; VERSCHOOR, J.; SWAI, H.S. *In vivo* evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. **Nanomedicine**, 2010, *in press*.

SHAW, D.J. **Introduction on colloids and surface chemistry**. Londres: Butterworth & Co.,1992.

SHENOY, D.B. & AMIJI, M.M. Poly(ethylene oxide)-modified poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer, **Int. J. Pharm.** v. 293, p. 261–270, 2005.

SIEPMANN, J. & SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 364, p. 328-343, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**, 6.ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SIMONETTI, M. P. B.; ANDRADE, M. P. Anestésicos locais e opióides encapsulados em lipossomas: um avanço farmacotécnico em progresso. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 46, p. 35-42, 1996.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **Int. J. Pharm.**, v. 278, p. 1–23, 2004.

SINNOTT C.J. & STRICHARTZ G.R. Levobupivacaine versus ropivacaine for sciatic nerve block in the rat. **Reg Anesth Pain Med**, v. 28, p. 294-303, 2003.

SO. T.; FARRINGTON, E. Topical benzocaine-induced methemoglobinemia in the pediatric population. **J. Pediatric Health Care**, v. 22, p. 335 – 339, 2008.

SONAJE, K.; ITALIA, J. L.; SHARMA, G.; BHARDWAJ, V.; TIKOO, K.; RAVI KUMAR, M. N. V. Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. **Pharm. Res.**, v. 24, p. 899-908, 2007.

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

SPIER, R. E. & GRIFFITHS, J. B. **Animal Cell Technology**. Academic Press, London., 1985.

SRIAMORNSAK, P.; SUNGTHONGJEEN, S. Modification of Theophylline Release With Alginate Gel Formed in Hard Capsules. **AAPS PharmSciTech.**, v. 8, p. E1-E8, 2007.

STELLA, B.; ARPICCO, S.; ROCCO, F.; MARSAUD, V.; RENOIR, J.M.; CATTEL, L.; COUVREUR, P. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **Int. J. Pharm.**, v. 344, p. 71–77, 2007.

STORMA, G.; BELLIOTA, S.O.; LASICC, T.D.D.D. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. **Adv. Drug Deliv.Rev.**, v. 17, p. 31,1995.

SUGIMOTO, T. Preparation of monodispersed colloidal particles. **Adv. Colloid Interf. Sci.**, v. 28, p. 65–108, 1987.

TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 59, p. 491–500, 2005.

TOBIO, M.; SANCHEZ, A.; VILA, A.; SORIANO, I.; EVORA, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG–PLA nanoparticles following oral administration, **Colloids Surf. B.**, v. 18, p. 315–323, 2000.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 58, p. 1532-1555, 2006.

TSUJI, H. & IKADA, Y. Autocatalytic hydrolysis of amorphous-made polylactides: effects of lactide content, tacticity and enantiomeric polymer blending. **Macromolecules**, v. 25, p. 5719, 1992.

VANDERVOORT, J.; YONCHEVA, K.; LUDWIG, A. Influence of the homogenisation procedure on the physicochemical properties of PLGA nanoparticles. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, p. 1273-1279, 2004.

VERGER, M. L.; FLUCKIGER, L.; KIM, Y.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 46, p. 137–143, 1998.

VENKATRAMAN, S. S.; JIE, P.; MIN, F.; FREDDY, B. Y, C.; LEONG-HUAT, G. Micelle-like nanoparticles of PLA–PEG–PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. **Intl J. Pharm.**, v. 298, p. 219–232, 2005.

- VICKROY, T.B. Lactic acid. In: MOO-YOUNG, (Ed.), **Comprehensive Biotechnology**, DicToronto: Pergamon Press, 1985.
- VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M.J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **J. Controlled Release**, v. 78, p. 15-24, 2002.
- WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **Int. J. Pharm.**, v. 58, p. 1-12, 1990.
- WELDER, A. A. A primary culture system of adult rat heart cells for the evaluation of cocaine toxicity. **Toxicology**, v. 72, p. 175-187, 1992.
- WILES, M.D. & NATHANSON, M.H. Local anaesthetics and adjuvants – future developments. **Anaesthesia**, v. 65, p. 22-37, 2010.
- WOODRUFF, M. A. & HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in 21<sup>th</sup> century. *Prog. Polym. Sci.*, 2010, *in press*, doi: [10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002)
- WRIGHT, R. O.; LEWANDER, W. J.; WOOLF, A. D. Methemoglobinemia: Etiology, pharmacology, and clinical management. **Ann. Emerg. Med.**, v. 34, p. 646-656, 1999.
- YAGIELA, J.A.; NEIDLE, E.A.; DOWD, F.J. **Farmacologia e terapêutica para dentistas**, 4 ed., Guanabara Koogan :Rio de Janeiro, 1998.
- YONCHEVA, K.; VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Influence of process parameters of high-pressure emulsification method on the properties of pilocarpine-loaded nanoparticles. **J. Microencaps.** v. 20, p. 449-458, 2003
- ZAMBAUX, M.F.; BONNEAUX, F.; GREF, R.; DELLACHERIE, E.; VIGNERON, C. MPEO-PLA nanoparticles: Effect of MPEO content on some of their surface properties. **J. Biomed. Mat. Res.**, v. 44, p. 109-115, 1999.
- ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 3 ed., New Jersey : Prentice-Hall, 1996.
- ZILLI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **Int. J. Pharm.**, v. 294, p. 261–267, 2005.

## 7. ANEXOS



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

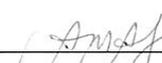
## CERTIFICADO

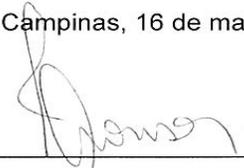
Certificamos que o Protocolo nº 1785-1, sobre "Ensaio farmacológicos de uma formulação de benzocaína em nanocapsulas de ácido poli(l-láctico)", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 16 de março de 2009.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1785-1, entitled "Pharmacological assays for benzocaine-loaded nanocapsules from poly(l-lactide) acid", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 16, 2009.

Campinas, 16 de março de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Instituto de Biologia  
Departamento de Bioquímica

À

**Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira**

**Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular**

*Ref.: declaração de vínculo – certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp (protocolo n° 1785-1)*

#### DECLARAÇÃO

Venho por meio desta, esclarecer à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular que a dissertação intitulada "Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas como sistema carreador para liberação modificada do anestésico local benzocaína", da aluna Nathalie Ferreira Silva de Melo, orientada pelo Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, está vinculada ao certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp (protocolo n° 1785-1) aprovado em meu nome, na data de 16 de março de 2009.

Atenciosamente,

Daniele Ribeiro de Araujo

*Pesquisadora Colaboradora*

*Laboratório de Biomembranas*