



**Raquel de Melo Barbosa**

**“PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS  
LIPÍDICAS COMO CARREADORES DO ANESTÉSICO LOCAL  
DIBUCAÍNA”**

**Campinas, 2013**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**Raquel de Melo Barbosa**

**“PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS  
LIPÍDICAS COMO CARREADORES DO ANESTÉSICO  
LOCAL DIBUCAÍNA”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

Coorientadora: Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA RAQUEL DE MELO BARBOSA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ENEIDA DE PAULA.

  
*Assinatura da Orientadora*

**Campinas, 2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Ana Marria Rabetti - CRB 8/2471

B234p      Barbosa, Raquel de Melo, 1975-  
Preparo e caracterização de nanopartículas lipídicas como carreadores do anestésico local dibucaína / Raquel de Melo Barbosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Eneida de Paula.

Coorientador: Daniele Ribeiro de Araújo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Nanopartículas lipídicas sólidas. 2. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 3. Anestésicos locais. 4. Dibucaína. I. Paula, Eneida de, 1963-. II. Araújo, Daniele Ribeiro de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Preparation and characterization of lipid nanoparticles as carriers of local anesthetic dibucaine

**Palavras-chave em inglês:**

Solid lipid nanoparticles

Nanostructured lipid carriers

Local anesthetics

Dibucaine

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Eneida de Paula [Orientador]

Marlus Chorilli

Marco Vinícius Chaud

Lucimara Gaziola de La Torre

Marcelo Bispo de Jesus

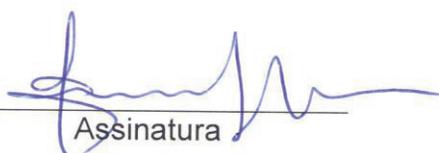
**Data de defesa:** 14-11-2013

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

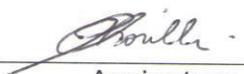
Campinas, 14 de novembro de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Eneida de Paula (orientadora)

  
Assinatura

Prof. Dr. Marlus Chorilli

  
Assinatura

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud

  
Assinatura

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre

  
Assinatura

Dr. Marcelo Bispo de Jesus

  
Assinatura

Dra. Cíntia Maria Saia Cereda

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Newton Andréo Filho

\_\_\_\_\_  
Assinatura



## Resumo

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) têm sido utilizados com sucesso como sistemas de liberação modificada. O anestésico local dibucaína (DBC) foi encapsulado em SLN e NLC objetivando aplicação tópica, para melhora de sua disponibilidade e redução de efeitos adversos. As nanopartículas lipídicas foram preparadas pelas técnicas de sonicação (Son) ou homogeneização à alta pressão (HP), sendo utilizados palmitato de cetila (CP) ou miristato de miristila (MM) como matrizes lipídicas sólidas, acrescidos (NLC) ou não (SLN) de uma mistura de triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico; poloxamer 188 foi usado como tensoativo. A DBC encapsulada foi quantificada por metodologia validada por cromatografia líquida de alta eficiência. As análises físico-químicas compreenderam diâmetro médio, potencial zeta, distribuição de tamanhos e morfologia das nanopartículas, percentual de encapsulação além de medidas de calorimetria exploratória de varredura (DSC), espectroscopia de infravermelho (FTIR), ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e difração de raios X à baixo ângulo (SAXS). Medidas *in vitro* do perfil de liberação do fármaco, da estimativa de fluxo, deformação e elasticidade das partículas através de membranas artificiais e de toxicidade em cultura de células (fibloblastos 3T3 e queratinócitos HaCat) foram feitas. A estabilidade das amostras foi avaliada em função do tempo e testes de antinocicepção (*tail flick*, em ratos Wistar) foram usados para avaliar a atividade terapêutica *in vivo*. O diâmetro médio das partículas de SLN e NLC produzidas foi similar (ca. 200nm). A estabilidade física das nanopartículas foi satisfatória por até 240 dias de armazenamento a 4 °C, principalmente para NLC<sub>MM</sub>/HP com e sem DBC, sugerindo que a metodologia de HP produz partículas mais estáveis. Todas as formulações apresentaram eficiência de encapsulação maior que 70%, sendo que NLC<sub>MM</sub>DBC/HP apresentou a maior encapsulação (90,54 ± 0,95%). Medidas de FTIR e DSC revelaram a DBC molecularmente dispersa na matriz lipídica das nanopartículas. Quanto à organização molecular das SLN e NLC, resultados de SAXS indicaram a existência de arranjos lipídicos lamelares no interior das SLN, não alterados pela adição da DBC; as medidas de RPE com marcadores de spin doxil-estearato

revelaram espectros compatíveis com bicamadas, com maior organização molecular dos lipídios das SLN e NLC, após inserção da DBC. Ensaios *in vitro* confirmaram a liberação modificada da dibucaína associada às partículas, governada por difusão de Fick. Tanto a elasticidade quanto o fluxo das partículas *in vitro* apresentaram baixos valores evidenciando deposição das mesmas nas membranas com poros de 30 nm. A citotoxicidade intrínseca da DBC sobre ambos os tipos celulares foi reduzida após encapsulação nas SLN e NLC. O efeito analgésico *in vivo* da DBC a 0,05% aplicada topicamente (dispersa em gel de carbopol) aumentou significativamente após encapsulação nas formulações, em particular para SLN<sub>CP</sub>DBC liofilizada com o crioprotetor maltose. Assim, formulações de dibucaína em SLN ou NLC, preparadas com MM ou CP mostraram-se promissoras como bases para produtos farmacêuticos de liberação modificada, para anestesia dérmica.

**Palavras-Chave:** Nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, anestésicos locais, dibucaína.

## Abstract

Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC), intended for topical application, were successfully prepared as sustained release systems for the encapsulation of the local anesthetic dibucaine (DBC), aiming to reduce its toxic effects and to improve its availability. The particles were prepared by two different procedures: sonication (Son) or high pressure homogenization (HP), employing either cetyl palmitate (CP) or myristyl myristate (MM) as the solid lipid matrix, in the presence (NLC) or absence (SLN) of a mixture of capric and caprylic acids; poloxamer 188 was used as surfactant. DBC was quantified through a validated HPLC procedure. Physico-chemical analysis of the nanoparticles included measurements of size distribution, zeta potential, morphology, DBC encapsulation efficiency, as well as exploratory scanning calorimetry (DSC), infrared spectroscopy (FTIR), electron paramagnetic resonance (EPR) and small angle X-ray scattering (SAXS) tests. *In vitro* analysis of the release profile, flow and elasticity of the particles were performed through artificial membranes while toxicity was tested in 3T3 fibroblasts and HaCaT keratinocytes in culture. Stability of the formulations as a function of time was also measured. The therapeutic activity of the formulations was determined using antinociception tests (*tail flick*) in Wistar rats. SLN and NLC produced by both methodologies were similar (~200 nm), but HP produced more stable nanoparticles. The physical stability of the nanoparticles was satisfactory during a storage period of 240 days, especially for NLC<sub>MM</sub>/HP with or without DBC. All formulations showed encapsulation efficiencies higher than 70%, the greatest being assigned for NLC<sub>MM</sub>DBC/HP (90.54 ± 0.95%). FTIR and DSC revealed that DBC was molecularly dispersed in the lipid matrix of the nanoparticles. As for the SLN and NLC molecular packing, SAXS diffractograms indicated the existence of lamellar repeats in SLN core region, which were not disturbed by the addition of DBC while EPR data with doxyl stearate probes revealed spectra compatible with bilayers, with higher molecular order in the presence of DBC. *In vitro* assays confirmed the prolonged release of dibucaine from the nanoparticles, by Fickian diffusion. Nanoparticles' elasticity and flow were low showing deposition on the surface of 30 nm pore membranes. The intrinsic

cytotoxicity of DBC against both cell types was decreased, when encapsulated in SLN and NLC. The *in vivo* analgesic effect of 0.05% DBC topically applied (dispersed in carbopol gel) was significantly prolonged in the nanoparticle formulations, largely for SLN<sub>CP</sub>DBC lyophilized with maltosis as crioprotector. In conclusion, dibucaine formulations in SLN or NLC prepared with MM or CP are promising for the development of pharmaceutical products intended for prolonged dermal anesthesia.

**Keywords:** Solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, local anesthetics, dibucaine.

## Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Dor.....	1
1.2. Anestésicos locais .....	4
1.3. Dibucaína .....	10
1.4. Nanocarreadores para liberação prolongada de fármacos.....	12
1.5. Nanopartículas lipídicas.....	12
1.5.1. Metodologia de preparo das SLN .....	15
1.5.2. Escolha dos componentes utilizados na produção das nanopartículas lipídicas .	21
1.5.2.1. Fase lipídica .....	21
1.5.2.2. Estabilizantes coloidais: tensoativos.....	26
1.5.3. Polimorfismo.....	29
1.6. Carreadores lipídicos nanoestruturados .....	32
1.7. Morfologia e estrutura das SLN e NLC .....	34
1.7.1. Modelos propostos .....	34
1.8. Processo de secagem das nanopartículas lipídicas .....	36
1.9. Veiculação de anestésicos locais em SLN/NLC .....	37
1.10. Nanopartículas lipídicas: administração por via tópica .....	38
1.11. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo SLN/NLC.....	41
2. Objetivos .....	45
2.1. Objetivo geral .....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
3. Materiais .....	47
3.1. Reagentes .....	47

3.2. Equipamentos.....	48
3.3. Outros materiais .....	49
3.4. Animais.....	49
4. Métodos .....	51
4.1. Solubilidade da dibucaína.....	51
4.2. Quantificação da dibucaína por CLAE.....	51
4.3. Validação da metodologia analítica .....	53
4.3.1. Especificidade .....	53
4.3.2. Linearidade.....	53
4.3.3. Intervalo.....	54
4.3.4. Precisão.....	54
4.3.5. Exatidão.....	55
4.3.6. Limites de detecção e quantificação.....	55
4.4. Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas e dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo dibucaína .....	56
4.4.1. Nanopartículas lipídicas sólidas .....	56
4.4.2. Carreadores lipídicos nanoestruturados .....	58
4.4.3. Liofilização das nanopartículas.....	61
4.5. Caracterização físico-química das nanopartículas (SLN e NLC).....	61
4.5.1. Determinação teórica do balanço hidrófilo-lipofilo (HBL) das formulações.....	61
4.5.2. Tamanho e distribuição (polidispersidade) das nanopartículas .....	62
4.5.3. Potencial zeta .....	63
4.5.4. Análise de rastreamento de nanopartículas .....	65
4.5.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	67

4.5.6. Microscopia de força atômica (AFM) .....	68
4.5.7. Espectrometria de massas .....	68
4.5.8. Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) .....	69
4.5.9. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) .....	73
4.5.10. Calorimetria exploratória de varredura (DSC) .....	76
4.5.11. Espectroscopia de infravermelho (FTIR) .....	77
4.6. Estabilidade das SLN e NLC .....	77
4.6.1. Potencial hidrogeniônico (pH).....	77
4.6.2. Peroxidação lipídica.....	78
4.7. Porcentagem de encapsulação e capacidade de carregamento .....	79
4.8. Porcentagem de liberação <i>in vitro</i> .....	80
4.8.1. Modelagem matemática dos perfis de liberação <i>in vitro</i> .....	81
4.9. Estimativa do fluxo e elasticidade das SLN e NLC .....	84
4.10. Estudos biológicos.....	85
4.10.1. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	85
4.10.1.1. Cultivo das células.....	85
4.10.1.2. Tratamento das células .....	86
4.10.2. Ensaio <i>in vivo</i> : avaliação da atividade antinociceptiva.....	88
4.10.2.1. Preparação de gel de carbopol.....	88
4.10.2.2. Teste de <i>tail-flick</i> .....	89
4.11. Análises estatísticas .....	92
5. Resultados e discussão .....	95
5.1. Solubilidade da dibucaína.....	95
5.2. Quantificação da dibucaína por CLAE.....	96

5.2.1. Validação de metodologia analítica .....	96
5.3. Preparo e caracterização físico-química das nanopartículas (SLN e NLC) .....	100
5.3.1. Determinação teórica do HLB.....	100
5.3.2. Avaliação do tamanho, distribuição e potencial zeta .....	101
5.3.3. Análise de trajeto de nanopartículas.....	104
5.3.4. Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica.....	106
5.3.5. Avaliação da porcentagem de encapsulação e do coeficiente de partição da dibucaína nas nanopartículas (SLN e NLC) .....	108
5.3.6. Espectrometria de massas .....	110
5.3.7. Medidas de ressonância paramagnética eletrônica.....	114
5.3.7.1. Marcador 5-SASL .....	114
5.3.7.2. Marcador 5 - MeSL.....	119
5.3.8. Medidas de espalhamento de raios X de baixo ângulo .....	124
5.3.9. Efeito do agente crioprotetor durante o processo de liofilização das nanopartículas (SLN e NLC).....	127
5.3.10. Análise de calorimetria exploratória de varredura .....	132
5.3.11. Análises de infravermelho .....	139
5.4. Estudo de Estabilidade das SLN e NLC .....	141
5.4.1. Tamanho, polidispersão e potencial zeta em função do tempo.....	141
5.4.2. Potencial hidrogeniônico em função do tempo .....	144
5.4.3. Peróxidação química em função do tempo.....	145
5.4.4. Percentual encapsulado em função do tempo.....	146
5.5. Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....	148
5.5.1. Modelagem matemática dos perfis de liberação <i>in vitro</i> .....	150

5.6. Estudos de permeação da DBC através de membrana sintética .....	153
5.7. Ensaio biológico .....	158
5.7.1. Ensaio de viabilidade celular (avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> ) .....	158
5.7.2. Ensaio <i>in vivo</i> : avaliação da atividade antinociceptiva.....	161
5.7.2.1. Teste de <i>tail-flick</i> .....	161
6. Conclusões .....	167
7. Sugestões para trabalhos futuros .....	169
8. Referências bibliográficas .....	171
Anexo I: Distribuição de tamanho e potencial zeta das nanopartículas obtidos por PCS .....	201
Anexo II: Tamanho e distribuição das nanopartículas realizadas por NTA antes e após extrusão em membranas sintéticas .....	206
Anexo III: Curva analítica da formação de endoperóxidos .....	209
Anexo IV: Termogramas.....	210
Anexo V: Certificado da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/Unicamp.....	212
Anexo VI: Outras atividades e produção científica no período do doutorado .....	213



*“Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, meus filhos, Gabriel e Mateus, com toda certeza vocês foram a força motriz que me impulsionou a continuar sem olhar para trás”.*



## **Agradecimentos**

Aos meus grandes amores Marcelo, Gabriel e Mateus por todo carinho, paciência, incentivo e pelo simples fato de existirem em minha vida.

Aos meus pais, Antonio e Donatila, por todo amor, confiança e grande incentivo durante a realização deste trabalho, e às minhas irmãs Lára e Karine pela amizade e por acreditarem que seria possível. Aos meus queridos sobrinhos Tyler, Ryan e Alec e irmão de coração, Jamie. Aos meus sogros Raimundo e Bernadete (*in memorian*) que sempre estimularam e apoiaram os nossos estudos.

Ao Prof. Dr. Prof Túlio Flávio Accioly de Lima e Moura e Profa. Dra Fernanda Nervo Raffin pela amizade e por conceder a utilização de equipamentos de seu laboratório na UFRN. Ao Prof Dr. Osvaldo Luiz Alves IQ-UNICAMP e Profa. Dra. Teresa Lammy (Física-USP) por possibilitar a utilização dos equipamentos de seus laboratórios. Aos Profs Drs Rosangela Itri e Leandro Barbosa pelo trabalho colaborativo e execução das medidas de SAXS. À Profa Dra Carmen Veríssima por fornecer as células utilizadas neste trabalho.

Aos professores de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, pela maneira competente e dedicada com que transmitiram seus conhecimentos, ao longo do meu aprendizado nesta instituição.

Aos amigos e técnicos do laboratório de biomembranas Maribel C. Silva (*in memorian*) e Márcio A. Paschoal, o meu muito obrigado. Ao técnico do laboratório de Biofísica da USP, Dr. Evandro L. Duarte por sua atenção, amizade e auxílio nas medidas de RPE.

A todos os colegas do curso, em especial aos meus queridos amigos da UNICAMP: Bruna, Cintia, Camila, Mario, Michelle, Viviane Guilherme, Cleyton, Grillo, Nataly, Viviane Queiroz, Viviane Vieira, Ana Lais, Jeanifer e Elias, pela amizade, bons momentos de descontração e apoio nas horas difíceis. Aos colegas do departamento de Farmácia da UFRN pela amizade.

À todos os amigos de Campinas que de maneira singular minimizaram a dor da distância da família, enquanto realizava a parte experimental deste trabalho. Agradeço especialmente à Bruna, Aline e Roberto, Débora e Ricardo Biloti, Vicente, Zaida e Patricia Baraldi, pela total disponibilidade em me receber durante 3 longos anos de idas e vindas (Natal/Campinas/Natal).

À Profa Dra Daniele Araújo pela sua amizade e colaboração necessária para realização deste trabalho. À Profa Dra Priscyla Daniely Marcato sempre muito prestativa e colaborativa durante todos os anos e todas as etapas do meu doutorado. Não tenho como agradecer a força e o estímulo dados por você, Priscyla.

Ao Prof Nelson Duran o qual tenho grande admiração e por ser exatamente quem é, uma excelente pessoa e um grande pesquisador, me sinto gratificada por ter trabalhado com você. Obrigada por me receber tão bem em seu laboratório e por sua valiosa contribuição na construção de minha vida profissional.

À minha orientadora, Profa Dra Eneida de Paula, pelos momentos em que trabalhamos juntas, por sua orientação e dedicação, sempre buscando máximo aprimoramento de seus alunos para que sejam profissionais ainda mais capacitados. Eneida, para mim você é um exemplo de professor que gosta realmente do que faz e o executa diariamente com destreza e satisfação. Obrigada por sua confiança, que foi de fundamental importância para execução desse trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

A todos aqueles que anônimos e despretensiosamente, colaboraram para a execução desta tese.

Meu agradecimento, acima de tudo, à Deus.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo da propagação de um estímulo nervoso. ....	4
<b>Figura 2.</b> Estrutura química geral dos anestésicos locais (adaptado de Becker & Reed, 2012). ....	6
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação dos ALs apresentando a interação de moléculas protonadas e desprotonadas com a fase lipídica membranar e vias de acesso ao(s) sítio(s) de ação na proteína canal de sódio voltagem-dependente (adaptado de Fraceto et al., 2006). ....	7
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da dibucaína, representada nas suas formas desprotonada (básica) e protonada (ácida) em pH 7,4. ....	11
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática de dois diferentes sistemas carreadores de fármacos: (a) nanoemulsão e (b) SLN. ....	14
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática das diferenças estruturais entre SLN e NLC (de Araújo et al., 2013). ....	33
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática de três diferentes modelos de incorporação de fármacos em SLN e NLC (adaptado de Souto & Müller, 2007). ....	35
<b>Figura 8.</b> Propriedades das nanopartículas lipídicas na pele. (A) Tecido cutâneo danificado (B) propriedades de proteção, reforço e reparação, promovidos pelas SLN e NLC sobre a pele danificada (modificado de Müller et al., 2011). ....	40
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática de SLN/NLC em matrizes formadas por hidrogeis (adaptado Souto et al., 2007). ....	42
<b>Figura 10.</b> Esquema das metodologias empregadas para a preparação das SLN e NLC por alta pressão de homogeneização e por ultrasonicação (Barbosa et al., 2013a). ....	57
<b>Figura 11.</b> Fluxograma da metodologia de preparação das SLN e NLC por homogeneização à alta pressão a quente (HP) e sonicação (Son). ....	59
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática de uma partícula com carga elétrica positiva, camada de Stern com íons negativos e camada difusa, ambas circundando a	

partícula. Decaimento exponencial do potencial zeta com a distância entre a região medida e a superfície da partícula.....	65
<b>Figura 13.</b> (A) Imagem do módulo de iluminação do feixe de luz laser do equipamento NanoSight LM20 (B) representação esquemática do caminho óptico do feixe de laser (modificado de NanoSight, 2013).....	66
<b>Figura 14.</b> Estruturas químicas dos marcadores de spin contendo o grupo paramagnético nitróxido: 5-doxil ácido esteárico (5-SASL), e éster metílico do 5-doxil ácido esteárico (5-MeSL). .....	70
<b>Figura 15.</b> Espectro de RPE do marcador 5-SASL em lipossomas (A) (Schreier et al., 1984) e nanopartículas lipídicas sólidas (B). .....	71
<b>Figura 16.</b> Representação esquemática de difração de raios X (modificado de Duarte, 2005). .....	73
<b>Figura 17.</b> Linhagens celulares de: A) Fibroblastos de embrião de camundongo BALB/c 3T3 e B) Queratinócitos humanos imortalizados, HaCaT em fase inicial do plaqueamento.....	86
<b>Figura 18.</b> Redução do 3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) à formazan. Esta reação ocorre na mitocôndria de células viáveis sendo observada a coloração roxa que indica viabilidade celular (Mosmann, 1983; Fotakis & Timbrell, 2006).....	87
<b>Figura 19.</b> Teste de <i>tail-flick</i> . (a). Aparatos utilizados durante o teste de analgesia – tail-flick, (b) Aplicação local das formulações e (c) animal sendo avaliado quanto à latência analgésica. ....	90
<b>Figura 20.</b> Curva de solubilidade da DBC. (A) DBC neutra em tampão carbonato (5 mmol.L <sup>-1</sup> , pH 10,0); (B) cloridrato de DBC em tampão fosfato (1,5 mol.L <sup>-1</sup> , pH 7,4). A quantidade de DBC no sobrenadante foi determinada por absorbância, em 327 nm. ....	96
<b>Figura 21.</b> CLAE: (A) Cromatograma obtido para a dibucaína em solução (30 µg.mL <sup>-1</sup> ). (B) Cromatograma de amostra de nanopartícula (SLN <sub>MM</sub> , sem DBC), evidenciando que não há picos no tempo de retenção de 1,78 minutos (foram observados resultados semelhantes para as nanopartículas SLN <sub>CP</sub> , SLN <sub>MM</sub> e	

NLC <sub>MM</sub> sem DBC). Fase estacionária: coluna C18 fase reversa e fase móvel mistura de acetonitrila e tampão fosfato de trietilamina (pH 2,3; 0,04 mol.L <sup>-1</sup> , v/v) (55:45), v/v. ....	97
<b>Figura 22.</b> CLAE: Curva analítica da dibucaína, na faixa de concentração de 1,5 - 30 µg.mL <sup>-1</sup> . ....	98
<b>Figura 23.</b> Morfologia das nanopartículas lipídicas por microscopia eletrônica de transmissão, com e sem o anestésico dibucaína, preparadas por homogeneização à alta pressão. (A).SLN <sub>MM</sub> /HP, (B).SLN <sub>MM</sub> DBC/HP, (C).SLN <sub>CP</sub> /HP (D).SLN <sub>CP</sub> DBC/HP, (E).NLC <sub>MM</sub> /HP, (F).NLC <sub>MM</sub> DBC/HP. Aumento de 100.000 (esquerda) e 60.000x (direita). ....	107
<b>Figura 24.</b> Imagem topográfica obtida por AFM das SLN <sub>MM</sub> DBC/HP (varredura da área: 30,1 x 30,1 µm <sup>2</sup> ). ....	108
<b>Figura 25.</b> Espectro de massas da solução padrão de DBC, em pH 7,4 (A) e DBC não encapsulada, extraída da amostra SLN <sub>MM</sub> DBC (B) em pH 7,4 (Barbosa et al., 2013c).....	111
<b>Figura 26.</b> Espectros de massas do (A) miristato de miristila (MM) e (B) palmitato de cetila (CP), utilizados no preparo das formulações SLN e NLC. ....	112
<b>Figura 27.</b> Cromatogramas do (A) miristato de miristila (MM) e (B) palmitato de cetila (CP) utilizados nas formulações das SLN e NLC. ....	113
<b>Figura 28.</b> RPE: espectros do marcador de spin 5-SASL incorporado em SLN <sub>MM</sub> (A), SLN <sub>MM</sub> DBC (B) em diferentes temperaturas e do 5-SASL em água pura (sistema Milli-Q) (C) a 25 °C.....	115
<b>Figura 29.</b> RPE: variação na razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) dos espectros do 5-SASL incorporado nas SLN <sub>MM</sub> e SLN <sub>MM</sub> DBC, em função da temperatura. ....	116
<b>Figura 30.</b> RPE: espectros do 5-SASL incorporado em SLN <sub>CP</sub> (A), SLN <sub>CP</sub> DBC (B) em diferentes temperaturas e 5-SASL em água Mili-Q (C) a 25 °C.....	117
<b>Figura 31.</b> RPE: variação da razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) em espectros do 5-SASL incorporado nas SLN <sub>CP</sub> e SLN <sub>CP</sub> DBC, em função da temperatura. ....	118

<b>Figura 32.</b> Espectros de RPE dos marcadores de spin 5-SASL e 5-MeSL incorporados nas nanopartículas: SLN <sub>MM</sub> , SLN <sub>MM</sub> DBC, SLN <sub>CP</sub> , SLN <sub>CP</sub> DBC, NLC <sub>MM</sub> e NLC <sub>MM</sub> DBC, a 25 °C.....	120
<b>Figura 33.</b> RPE: Variação da razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) dos espectros de RPE dos marcadores de spin 5-SASL e 5-MeSL incorporados nas nanopartículas (SLN <sub>MM</sub> , SLN <sub>MM</sub> DBC, SLN <sub>CP</sub> , SLN <sub>CP</sub> DBC, NLC <sub>MM</sub> e NLC <sub>MM</sub> DBC), a 25 °C.....	121
<b>Figura 34.</b> Variação da razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) dos espectros do marcador 5-SASL incorporado nas SLN <sub>MM</sub> e SLN <sub>MM</sub> DBC (A) e SLN <sub>CP</sub> e SLN <sub>CP</sub> DBC (B), após ciclos de aquecimento/resfriamento/reaquecimento.....	123
<b>Figura 35.</b> Curva de intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento $q$ de SLN <sub>CP</sub> DBC, registrados em diferentes temperaturas (30 a 45 °C). ....	125
<b>Figura 36.</b> Curva de intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento $q$ de SLN <sub>CP</sub> e SLN <sub>MM</sub> com e sem dibucaína: (A) SLN <sub>CP</sub> e (B) SLN <sub>MM</sub> a temperatura ambiente.....	126
<b>Figura 37.</b> Avaliação do tamanho (nm) e polidispersão (PDI) das SLN e NLC preparadas por homogeneização à alta pressão (HP) e liofilizadas, com e sem crioprotetor (maltose ou trealose, 30%, m/v). ....	128
<b>Figura 38.</b> Avaliação do potencial zeta (mV) das SLN e NLC preparadas por homogeneização à alta pressão (HP) liofilizadas com crioprotetor (maltose ou trealose, 30%, m/v).....	131
<b>Figura 39.</b> Termogramas do lipídio, misturas físicas dos componentes utilizados no preparo das nanopartículas sólidas e formulações SLN <sub>MM</sub> e SLN <sub>CP</sub> . (A) amostras contendo MM e (B) amostras contendo CP. ....	133
<b>Figura 40.</b> Termogramas dos componentes formadores das SLN e NLS (A) e das nanopartículas SLN <sub>MM</sub> DBC/HP (B), SLN <sub>CP</sub> DBC/HP (C) e NLC <sub>MM</sub> DBC/HP, (D), com e sem agente crioprotetor. ....	134
<b>Figura 41.</b> Termogramas das nanopartículas SLN <sub>MM</sub> , SLN <sub>CP</sub> e NLS <sub>MM</sub> , com e sem dibucaína. ....	137

- Figura 42.** Influência da composição da matriz lipídica sobre o índice de cristalinidade (%IC) e temperatura de fusão (Tf) dos lipídios puros, das SLN e NLC, medidas 10 dias após a preparação da amostra utilizando o procedimento de homogeneização de alta pressão. .... 138
- Figura 43.** Espectros na região de infravermelho em pastilhas da KBr (FTIR) da DBC livre, mistura física dos compostos da SLN (CP e MM com DBC) e nanopartículas lipídicas sólidas preparadas com CP, MM e DBC pelo método de HP..... 140
- Figura 44.** Diâmetro médio (A), índice de polidispersão (B), e potencial zeta (C) das SLN contendo DBC, durante a estocagem a 4º C por 240 dias (valores expressos em média ± D.P., n=3). .... 142
- Figura 45.** Diâmetro médio (A), índice de polidispersão (B), e potencial zeta (C) dos NLC contendo DBC, durante a estocagem a 4º C por 240 dias (valores expressos em média ± D.P., n=3). .... 143
- Figura 46.** Potencial hidrogeniônico das SLN e NLC com e sem DBC, durante a estocagem à 4º C por 240 dias (valores expressos em média ± D.P., com n=3). .... 145
- Figura 47.** Porcentagem de encapsulação da dibucaína (%EE) nas SLN e NLC, durante a estocagem a 4º C por 240 dias (valores expressos em média ± D.P. com n=3). .... 147
- Figura 48.** Liberação *in vitro* da DBC associada à SLN e NLC preparadas por alta pressão de homogeneização (valores expressos em média ± D.P., n=3). Meio dispersante composto por tampão fosfato (4 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4) com adição de 20% de etanol em temperatura ambiente (25 ± 5 °C). .... 148
- Figura 49.** Ajuste matemático dos dados de liberação *in vitro* da dibucaína das formulações: (A) SLN<sub>MM</sub>DBC/HP, (B) SLN<sub>CP</sub>DBC/HP, (C) NLC<sub>MM</sub>DBC, utilizando os modelos propostos por Korsmeyer-Pepas (1) e Weibull (2) (n=3). .... 152
- Figura 50.** Número de nanopartículas nas amostras avaliadas, antes e depois da extrusão através de membranas de policarbonato com poros nominais de 30

nm, à $2,5 \times 10^5$ Pa. Medidas feitas por NTA (valores expressos em média $\pm$ D.P. (n=3)).	157
<b>Figura 51.</b> Viabilidade celular em fibroblastos, 3T3 e em queratinócitos, HaCat, tratados com SLN e NLC (A), e DBC livre ou encapsulada em SLN e NLC, preparadas por alta pressão de homogeneização (B) (valores expressos em média $\pm$ D.P. com n=6.)	159
<b>Figura 52.</b> Percentagem dos efeitos (atividade analgésica) máximos possíveis (EMP%), em função do tempo, avaliados pelo teste de <i>tail-flick</i> (n = 7 por grupo), após administração da DBC livre e encapsulada em SLN e NLC.	163
<b>Figura 53.</b> Gráfico de distribuição das nanopartículas lipídicas sólidas com e sem dibucaína preparadas por sonicação e homogeneização alta pressão dada por intensidade em função do diâmetro. (A). SLN <sub>MM</sub> e SLN <sub>CP</sub> preparadas por Son e HP e (B). SLN <sub>MM</sub> DBC e SLN <sub>CP</sub> DBC preparadas por Son e HP.	201
<b>Figura 54.</b> Gráfico de distribuição dos carreadores lipídicos nanoestruturados com e sem dibucaína preparadas por sonicação e homogeneização alta pressão dada por intensidade em função do diâmetro. (A). SLN <sub>MM</sub> com e sem DBC preparadas por Son e HP.	202
<b>Figura 55.</b> Gráfico de potencial zeta das nanopartículas lipídicas (SLN) de MM com e sem dibucaína preparadas por sonicação (A) e homogeneização alta pressão (B) dada por intensidade em função do diâmetro.	203
<b>Figura 56.</b> Gráfico de potencial zeta das Nanopartículas lipídicas de CP com e sem dibucaína preparadas por sonicação (A) e homogeneização alta pressão (B) dada por intensidade em função do diâmetro.	204
<b>Figura 57.</b> Gráfico de potencial zeta dos carreadores lipídicos nanoestruturados com e sem dibucaína preparadas por sonicação (A) e homogeneização alta pressão (B) dada por intensidade em função do diâmetro.	205
<b>Figura 58.</b> Distribuição de tamanhos das nanopartículas (SLN <sub>MM</sub> /HP e SLN <sub>MM</sub> DBC/HP) obtidas por NTA, antes e após a extrusão ( $2,5 \times 10^5$ Pa) através de membranas de policarbonato de 30 nm (A) Vídeo obtido para análise de	

	dados, (B) Gráfico 2D (intensidade vs. intensidade) (C) Gráfico em 3D (tamanho vs. intensidade vs. concentração de partículas).....	206
<b>Figura 59.</b>	Distribuição de tamanhos das nanopartículas (SLN <sub>CP</sub> /HP e SLN <sub>CP</sub> DBC/HP) obtidas por NTA, antes e após a extrusão ( $2,5 \times 10^5$ Pa) através de membranas de policarbonato de 30 nm (A) Vídeo obtido para análise de dados, (B) Gráfico 2D (intensidade vs. intensidade) (C) Gráfico em 3D (tamanho vs. intensidade vs. concentração de partículas).....	207
<b>Figura 60.</b>	Distribuição de tamanhos das nanopartículas (NLC <sub>MM</sub> /HP e NLC <sub>MM</sub> DBC/HP) obtidas por NTA, antes e após a extrusão ( $2,5 \times 10^5$ Pa) através de membranas de policarbonato de 30 nm (A) Vídeo obtido para análise de dados, (B) Gráfico 2D (intensidade vs. intensidade) (C) Gráfico em 3D (tamanho vs. intensidade vs. concentração de partículas).....	208
<b>Figura 61.</b>	Curva analítica da formação de endoperóxidos (MDA) (coeficiente angular = 0,0495, coeficiente linear = 0,0168 e coeficiente de correlação da reta = 0,995). .....	209
<b>Figura 62.</b>	Termogramas dos componentes das SLN e NLC. ....	210
<b>Figura 63.</b>	Termogramas das SLN <sub>MM</sub> com e sem DBC e com e sem crioprotetor (maltose ou trealose).....	210
<b>Figura 64.</b>	Termogramas das SLN <sub>CP</sub> com e sem DBC e com e sem crioprotetor (maltose ou trealose).....	211
<b>Figura 65.</b>	Termogramas das NLC <sub>MM</sub> com e sem DBC e com e sem crioprotetor (maltose ou trealose).....	211



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Sintomas e sinais de um quadro clínico de overdose de anestésicos locais (Dippenaar, 2007; Mercado & Weinberg, 2011). .....	9
<b>Tabela 2.</b> Requisitos para a produção de nanopartículas lipídicas sólidas, segundo (Attama, 2011; Battaglia & Gallarate, 2012; Severino et al., 2012a).....	15
<b>Tabela 3.</b> Métodos utilizados na preparação de nanopartículas lipídicas (de acordo com Corrias & Lai, 2011).....	17
<b>Tabela 4.</b> Lipídios e agentes tensoativos utilizados na produção de SLN (Mehnert & Mader, 2001; Puglia, 2012; Severino et al., 2012a).....	23
<b>Tabela 5.</b> Estratégias para contornar problemas de instabilidade em emulsões (Remington, 2006; Battaglia & Gallarate, 2012). .....	27
<b>Tabela 6.</b> Graus de organização tridimensional de cristais lipídicos formados após recristalização (adaptado de Sato, 2001). .....	30
<b>Tabela 7.</b> Condições cromatográficas para quantificação da dibucaína base (Barbosa et al., 2013c).....	52
<b>Tabela 8.</b> Composição das SLN preparadas à alta pressão de homogeneização (HP) e sonicação (Son), utilizando palmitato de cetila (CP) e miristato de miristila (MM) como lipídios estruturais.....	58
<b>Tabela 9.</b> Composição das NLC preparadas por alta pressão de homogeneização (HP) e sonicação (Son), utilizando miristato de miristila (MM) como lipídio estrutural, LIPOGC como lipídio líquido e Pluronic F68 como estabilizante coloidal.....	60
<b>Tabela 10.</b> Componentes químicos utilizados para a preparação das SLN e NLC.....	60
<b>Tabela 11.</b> Composição lipídica das formulações, em porcentagem (%), massa do componente lipídio/massa total da fase lipídica). .....	62
<b>Tabela 12.</b> Predição do mecanismo de transporte de fármacos a partir da determinação do valor de n pelo modelo de Korsmeyer–Peppas (Costa & Lobo, 2001) ....	83
<b>Tabela 13.</b> Amostras e respectivas concentrações avaliadas no ensaio de citotoxicidade utilizando células de fibroblastos (células BALB/c 3T3) e os queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). .....	88

<b>Tabela 14.</b> Componentes utilizados no preparo de 100g gel de carbopol. ....	89
<b>Tabela 15.</b> Grupos experimentais (n=7 animais/grupo) utilizados no ensaio de <i>tail-flick</i> para avaliação do efeito analgésico das nanopartículas veiculadas em gel em ratos Wistar adultos. ....	92
<b>Tabela 16.</b> Equações da reta e os coeficientes de correlação (r) obtidos a partir das curvas analíticas (n=3) construídas em três dias consecutivos. ....	98
<b>Tabela 17.</b> Resultados dos testes de precisão: intra-dia (DPR <sub>1</sub> , DPR <sub>2</sub> e DPR <sub>3</sub> ) e inter-dia, obtidos com medidas de três concentrações diferentes de dibucaína (baixa, média e alta), em 3 dias consecutivos. ....	99
<b>Tabela 18.</b> Resultados do teste de precisão: comparação entre concentração teórica e concentração obtida experimentalmente, da medida de dibucaína por CLAE. 1, 2, 3 correspondem ao primeiro, segundo e terceiro dia de experimento. .	99
<b>Tabela 19.</b> Resultados de exatidão do método quantitativo para determinação da dibucaína por CLAE.....	100
<b>Tabela 20.</b> HLB das emulsões preparadas .....	101
<b>Tabela 21.</b> Diâmetro médio, distribuição (PDI) e potencial zeta das SLN e NLC preparadas por HP e Son, utilizando CP e MM como lipídios estruturais (valores expressos em média ± D.P., com n=3). Medidas feitas por PCS..	103
<b>Tabela 22.</b> Tamanho médio e dados cumulativos do diâmetro das partículas, determinados por NTA (nanoparticle tracking analysis, NTA). Valores expressos em média ± D.P., com n=3. D <sub>10</sub> , D <sub>50</sub> e D <sub>90</sub> referem-se aos diâmetros com base em 10%, 50% e 90% do perfil de distribuição cumulativa. Análise estatística feita pelo teste T de Student, não significativa com p > 0,05.....	105
<b>Tabela 23.</b> Valores de porcentagem de encapsulação e do coeficiente de partição (P) da dibucaína nas SLN e NLC preparados por alta pressão de homogeneização (HP) ou por sonicação (Son) (pH=8,2). Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, com n= 3. ....	109

<b>Tabela 24.</b> Parâmetro de ordem (S) medido à 20 °C com o marcador de spin 5-SASL incorporado nas amostras SLN <sub>MM</sub> e SLN <sub>CP</sub> na presença ou ausência de DBC. .....	119
<b>Tabela 25.</b> Valores nominais referentes ao aumento do diâmetro das partículas após redispersão em água, das SLN e NLC liofilizadas.....	130
<b>Tabela 26.</b> Temperatura de fusão (T <sub>f</sub> ), cristalização (T <sub>c</sub> ) e entalpias (ΔH) da dibucaína, dos lipídios, estabilizante e açúcares, utilizados na preparação das nanopartículas.....	135
<b>Tabela 27.</b> Temperatura de fusão, cristalização e entalpias registradas para as formulações do tipo SLN preparadas com palmitato de cetila, com ou sem crioprotetor. ....	135
<b>Tabela 28.</b> Temperatura de fusão, cristalização e entalpias das formulações de SLN preparadas com miristato de miristila, com ou sem crioprotetor.....	135
<b>Tabela 29.</b> Temperatura de fusão, cristalização e entalpias das SLN preparadas com miristato de miristila, com ou sem crioprotetor.....	136
<b>Tabela 30.</b> Atribuição de bandas dos espectros de FTIR da dibucaína, observadas nas amostras de DBC livre, DBC associada à SLN (MM e CP) e mistura física de seus componentes.....	139
<b>Tabela 31.</b> Peroxidação lipídica das formulações preparadas usando HP estocadas a 4 °C (valores expressos em média ± D.P., com n=3). ....	146
<b>Tabela 32.</b> Coeficiente de correlação (R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub> ) para os modelos Weibull e o Korsmeyer–Peppas, aplicados às curvas de liberação da DBC <i>in vitro</i> . ....	151
<b>Tabela 33.</b> Valores dos parâmetros obtidos após a aplicação dos modelos matemáticos, Korsmeyer – Peppas e Weibull, para a curva da dibucaína associada com SLN <sub>MM</sub> /HP e SLN <sub>CP</sub> /HP.....	153
<b>Tabela 34.</b> Parâmetros da permeação das SLN e NLC, com e sem DBC, através de membranas sintéticas com poros nominais de 30nm e pressão de extrusão de 2,5 × 10 <sup>5</sup> Pa à 32 °C, simulando a permeação através da pele (Barbosa et al., 2013b).....	155

<b>Tabela 35.</b> Tempos de recuperação do efeito analgésico (teste de <i>tail-flick</i> , em ratos Wistar) da dibucaína livre e associada em SLN e NLC, preparadas por HP, com e sem crioprotetor. ....	162
<b>Tabela 36.</b> Porcentagem do Efeito Máximo (EMP, %) atividade analgésica induzida pela DBC livre e associada à nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), preparados por HP liofilizados com e sem crioprotetor. ....	164

## Lista de Abreviações e Siglas

%EE.....	Eficiência de encapsulação do fármaco, em porcentagem
%LC.....	Capacidade de carregamento, em porcentagem
$\Delta H$ .....	Variação de entalpia
3T3.....	Fibroblastos de embrião de camundongo
5-MeSL.....	Éster metílico do 5-doxil ácido esteárico
5-SASL.....	Ácido doxil-esteárico
AFM.....	Microscopia de força atômica
AL.....	Anestésico local
CLAE.....	Cromatografia líquida de alta resolução
CP.....	Palmitato de cetila
D.....	Diâmetro
d.....	Espaçamentos de Bragg entre cadeias de hidrocarbonetos dos lipídios
DBC.....	Dibucaína
DMSO.....	Dimetilsufóxido
DSC.....	Calorimetria exploratória de varredura
E.....	Elasticidade
EMP.....	Efeito máximo possível
FTIR.....	Absorção no Infravermelho
$h_{+1}/h_0$ .....	Razão entre as alturas de campo baixo e central
HaCaT.....	Queratinócitos humanos imortalizados
HLB.....	Balanco hidrofílico e lipofílico
HP.....	Homogeneização de alta pressão
IC.....	Índice de cristalinidade
IC <sub>50</sub> .....	Concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%
J.....	Fluxo
LIPOGC.....	Triglicerídeo de ácido cáprico e caprílico
MET.....	Microscopia eletrônica de transmissão
MM.....	Miristato de miristila

NLC.....Carreadores lipídicos nanoestruturados  
NTA.....Análise de rastreamento de partículas  
O/A.....Óleo/Água  
P.....Coeficiente de partição  
PCS.....Espectroscopia de correlação de fotóns  
PDI.....Polidispersão ou distribuição de tamanhos de partículas  
RPE.....Ressonância paramagnética eletrônica  
S.....Parâmetro de ordem  
SAXS.....Raios X de baixo ângulo  
SLN.....Nanopartículas lipídicas sólidas  
Son.....Homogeneização com ultrasson  
TBA.....Ácido Tiobarbitúrico  
Tc.....Temperatura de cristalização  
TEP.....Tetraetoxipropano  
Tf.....Temperatura de fusão  
T<sub>REC</sub>.....Tempo de recuperação  
UV.....Ultravioleta

## **1. Introdução**

### **1.1. Dor**

Atualmente, grandes pesquisas em todo mundo estão voltadas ao estudo da dor e seus métodos supressores. Felizmente estes são temas muito discutidos e avaliados dentro da área médica (Goldberg & McGee, 2011). A dor pode ter origem física e/ou psíquica e caracteriza-se como aguda ou crônica. A forma aguda da dor possui um caráter transitório e constitui-se em um sintoma de alerta para que o indivíduo procure auxílio médico especializado. Dores crônicas podem perdurar por meses ou anos, dependendo da gravidade e tratamento, porém têm caráter subjetivo, e sua percepção varia de acordo com a condição de cada ser vivo (Saastamoinen et al., 2005).

Quando a dor evolui para um estado crônico torna-se um problema de saúde pública, podendo causar morbidade, absenteísmo, incapacidade temporária ou permanente, com um ônus tanto para serviços médicos como para as companhias de seguro. De acordo com os dados de 2008 do *Medical Expenditure Panel Survey* dos Estados Unidos, aproximadamente 100 milhões de adultos naquele país foram afetados por dores crônicas (Gaskin & Richard, 2012). Foi ainda verificada uma redução drástica na produtividade do trabalhador e aumento no custo com saúde - de U\$ 261 a 300/pessoa/ano tendo como base o valor de US\$ 4.250, gasto anualmente com pessoas sem qualquer sintoma doloroso. Assim, fica claro o alto custo gerado por este sintoma, que requer tratamentos médicos adequados e direcionados. Os autores observaram ainda que o custo anual com o tratamento de dores crônicas foi maior que os relacionados com doenças cardíacas, cânceres e diabetes (Gaskin & Richard, 2012).

No mundo estima-se que 20% dos adultos sofrem com algum tipo de dor e 10% são recém-diagnosticados com dor crônica a cada ano, sendo uma das razões mais frequentes das consultas médicas (Goldberg & McGee, 2011).

Em 2011, no Brasil, por determinação do Conselho Federal de Medicina, a dor passou a ser uma área de atuação não só de anestesistas ou neurologistas, mas também de clínicos gerais, acupunturistas, neurocirurgiões, ortopedistas,

reumatologistas e fisiatras. Esta iniciativa governamental visou aumentar o número de profissionais médicos focados no tema, evitando que a dor, principalmente a crônica, seja negligenciada.

De acordo com Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor, a dor é subtratada e um sintoma frequente no ambiente hospitalar. Apesar de sua fundamental importância, ela ainda é avaliada e tratada inadequadamente, favorecendo sintomas desagradáveis quase sempre associados a um processo destrutivo tecidual, real ou potencial do corpo (Merskey & Bogduk, 1994, Cavalcanti et al., 2004).

A dor pode ser de origem nociceptiva (agressão química, mecânica ou térmica), fundamental para a preservação da integridade do indivíduo, pois alerta para a ocorrência de lesões no organismo, ou neuropática - quando iniciada ou causada por disfunção que compromete primariamente componentes do Sistema Nervoso - sendo esta mais comum em ambientes hospitalares e não obrigatoriamente ligada a uma lesão tecidual (Merskey & Bogduk, 1994, Rang et al., 2011).

A dor neuropática é uma dor espontânea e referida nos locais em que se observam alterações de funções neurológicas (Merskey & Bogduk, 1994). Ela pode, dessa forma, se manifestar em locais não evidentes e a sua fisiopatologia relaciona-se com diversas funções neuroquímicas (sensibilização dos receptores, liberação de substâncias excitatórias pelo sistema nervoso simpático, e.g., noradrenalina (como no caso da inflamação neurogênica) e/ou modificações plásticas dos neurônios (adaptações físicas e neurovegetativas)) (Hall et al., 2006).

Várias alternativas têm sido propostas para o tratamento da dor tais como: mesoterapia (Pastor, 2010), estimulação elétrica transcutânea (Dailey et al., 2011; Dailey Dana et al., 2013), acupuntura (Dorsher, 2011), psicoterapia, hipnose (Castel et al., 2007) e, mais rotineiramente, o tratamento medicamentoso, que inclui a utilização de analgésicos/antiinflamatórios, opióides (Dworkin et al., 2007; de Leon-Casasola, 2013), antidepressivos (Alba-Delgado et al., 2012) e antipsicóticos (Khojainova et al., 2002), anestésicos gerais e locais (Verghese & Hannallah, 2010).

Os analgésicos/antiinflamatórios, tais como cetoprofeno, indometacina, diclofenaco, piroxicam, betametasona e prednisolona, são destinados a dores leves a

moderadas (como no tratamento de artrite, bursite, cefaleias e dismenorréias). Os opióides, como codeína, buprenorfina e metadona, são utilizados no tratamento de pacientes com dores viscerais intensas (câncer, cólicas renais e infarto do miocárdio) (Yaksh & Wallace, 2010).

Nos últimos anos a utilização de antidepressivos (como amitriptilina, imipramina e paroxetina) vem sendo considerada uma poderosa aliada no tratamento da dor crônica neuropática (com ou sem “depressão reativa”, a qual surge em resposta a um estresse identificável, tais como: perdas, doenças físicas importantes ou utilização de medicamentos) e/ou por nocicepção (Jain & Jain, 2011, Bras et al., 2010). Podem-se citar exemplos de antipsicóticos, tais como: fenotiazínicos, tioxantenos, piperidinas e butirofenonas, que são empregados no tratamento da dor crônica em geral, sendo mais utilizados para dores neuropáticas. Já os anticonvulsivantes contribuem na redução das dores neuropáticas (Tremont-Lukats et al., 2000).

Os anestésicos gerais eliminam a dor com amnésia, perda da consciência e da motricidade do indivíduo (ausência de resposta a estímulos nocivos). Normalmente, concentram-se no tecido adiposo, mas são bem distribuídos em todas as partes do corpo, com principal local de ação no sistema nervoso central (Wouden & Miller, 2012). A anestesia geral é comumente administrada por inalação ou por via intravenosa. Os anestésicos inalatórios em uso corrente são óxido nitroso, halotano, enflurano, isoflurano, sevoflurano e desflurano. Idealmente, os anestésicos gerais inalatórios devem caracterizam-se pela indução rápida e agradável da anestesia e recuperação desta, alterações rápidas da profundidade, relaxamento adequado da musculatura esquelética e ampla margem de segurança (Wouden & Miller, 2012). Na administração de anestésicos gerais por via intravenosa há mais flexibilidade e uso de doses menores que nos inalatórios, porém exige-se maior monitorização para evitar a depressão bulbar grave, de difícil reversão quando comparado aos inalatórios. Como exemplos de anestésicos gerais intravenosos atualmente em uso têm-se: etomidato, quetamina, barbitúricos com rápida indução (tiopental que induz anestesia cirúrgica em segundos) e propofol (formulação intralipídica, também de ação ultracurta) (Patel et al., 2010).

A condução nervosa de um determinado estímulo (químico, físico ou elétrico) (Carvalho, 1994) resulta em aumento gradativo da permeabilidade da membrana aos íons de sódio, com conseqüente carga positiva no potencial de membrana e propagação do potencial de ação ao longo das fibras nervosas (Mclure & Rubin, 2005). Essas fibras, mielinizadas ou não e com grandes ou pequenos diâmetros, são classificadas de acordo com o tamanho, velocidade de condução e função (motora ou sensitiva) (Becker & Reed, 2012). A Figura 1 apresenta um esquema representativo da propagação de um estímulo nervoso.

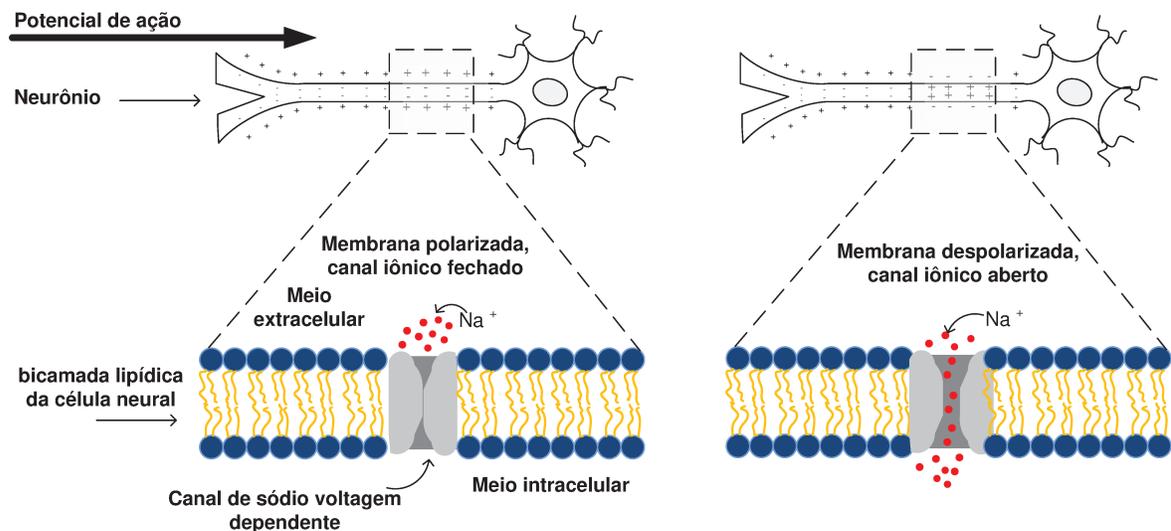


Figura 1. Esquema representativo da propagação de um estímulo nervoso.

Os anestésicos locais evitam ou aliviam a dor por bloquearem reversivelmente o processo de excitação-condução em nervos periféricos (Butterworth & Strichartz, 1990; Catterall & Mackie, 2010; Becker & Reed, 2012).

## 1.2. Anestésicos locais

Em 1860, a cocaína, primeiro anestésico local (AL) descrito e extraído das folhas do arbusto da Coca, foi isolada por Nieman, na Alemanha. Nieman, assim como outros químicos da época, experimentou o componente e observou entorpecimento da língua

(Catterall & Mackie, 2010). Os parâmetros fisiológicos da cocaína foram estudados e divulgados por Sigmund Freud e, em 1884, Carl Koller introduziu a cocaína na prática clínica como anestésico tópico para cirurgia oftálmica (McLure & Rubin, 2005). O uso da cocaína espalhou-se rapidamente pela Europa e América para emprego em anestesia local e regional (Ruetsch et al., 2001). No entanto, poucos anos depois, em virtude de sua alta toxicidade e alto potencial de dependência química, cientistas iniciaram uma pesquisa para identificar substitutos sintéticos da cocaína (Ferreira & Martini, 2001; Catterall & Mackie, 2010). Em 1905, Einhorn e colaboradores sintetizaram a procaína a qual se tornou um protótipo para os ALs, por quase meio século (Catterall & Mackie, 2010). Novas pesquisas em busca de ALs seguros propiciaram a descoberta de várias outras substâncias sintéticas com atividade antinociceptiva, tais como benzocaína, prilocaína, lidocaína, mepivacaína, bupivacaína, ropivacaína, levobupivacaína entre outros (Strichartz, 1987; de Paula & Schreier, 1996; Malamed, 2001).

Os ALs mais usados atualmente são compostos químicos anfifílicos, ou seja, possuem região hidrofílica (polar) e hidrofóbica (apolar) separadas por um ester ou por uma ligação amídica intermediária (Figura 2). A parte polar da estrutura caracteriza-se pela presença, em geral, de uma amina terciária ou quaternária e a parte apolar por um anel aromático. A natureza da ligação é importante, pois define inúmeras propriedades do AL, incluindo sua biotransformação (Weiniger et al., 2010; Becker & Reed, 2012).

A estrutura química dos AL é bastante variável (Malheiros et al., 2004), tal que outras categorias de compostos (além dos amino-ésteres e amino-amidas) foram descritas como: amino-carbamatos, amino-cetonas, alcoóis, tio-ésteres, tio-amidas, derivados da uréia, ésteres fosfóricos poliéteres ou amidas (Gupta, 1991). Além destes compostos sintéticos, existem compostos naturais com propriedades anestésicas, como as toxinas ciguatoxina, batracotoxina e brevetoxina (Pérez et al., 2011).

Dentre os ALs mais utilizados na clínica médica, os que possuem uma ligação éster entre o grupo aromático e a cadeia intermediária são denominados amino-ésteres e quando há uma ligação amida entre a cadeia intermediária e o grupamento aromático, são conhecidos como amino-amidas (Figura 2) (McLure & Rubin, 2005).

A relação estrutura / atividade diferencia os ALs quanto à potência, tempo de latência, duração do efeito farmacológico e tipo do bloqueio (sensorial / motor) (Strichartz, 1987). A porção lipossolúvel do AL, conferida pela presença do anel aromático, é responsável por sua penetração nas membranas biológicas. Variações da cadeia intermediária influenciam tanto a potência anestésica quanto a toxicidade (Crystal et al., 2007). Por fim, o grupamento amina (porção ionizável da molécula), pH dependente, pode ser alterado de forma a favorecer a maiores quantidades de AL protonado ( $\text{NH}^{3+}$ ) ou neutro ( $\text{NH}_2$ ) (Strichartz, 1987).

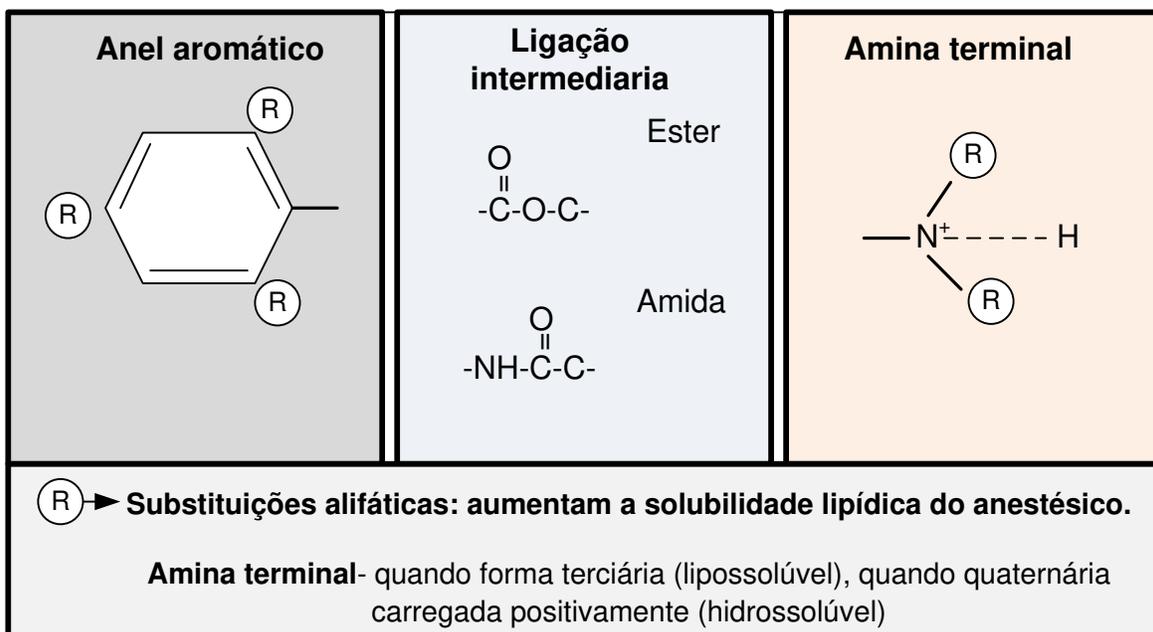


Figura 2. Estrutura química geral dos anestésicos locais (adaptado de Becker & Reed, 2012).

A forma ionizada tem maior solubilidade aquosa e é responsável pela redistribuição do AL entre meios aquosos adjacentes às membranas. Quando ocorre a desprotonação deste grupo amino (em pH acima do seu pKa), há também o aumento da hidrofobicidade da molécula, uma vez que a forma neutra tem maior partição em membranas biológicas (onde se difunde para atingir seu local de ação), e,

consequentemente, menor solubilidade em água. Assim, a prevalência das formas protonada ou neutra determina a velocidade de ação do AL (Carvalho, 1994).

Farmacologicamente, os ALs promovem o bloqueio reversível da condução nervosa na membrana axonal devido à inibição do processo de excitação-condução em nervos periféricos, impedindo a condutância do íon sódio e, consequentemente, a deflagração do potencial de ação (Li et al., 1999) após aplicação local e em concentrações adequadas (Covino, 1986; Hass, 2002; Katzung et al., 2009).

A Figura 3 apresenta esquematicamente o mecanismo de ação dos ALs, os quais contemplam não só a interação com receptores específicos nos canais de sódio voltagem-dependente presentes nas membranas excitáveis das fibras nervosas, mas também interação com fase lipídica membranar. Dessa forma, há o bloqueio reversível da condutância dos íons sódio impedindo a deflagração do potencial de ação (Li et al., 1999; Fraceto et al., 2006). A afinidade dos ALs é maior para receptores específicos nos canais de sódio voltagem-dependente abertos, e menor quando os mesmos estão fechados (Mclure & Rubin, 2005).

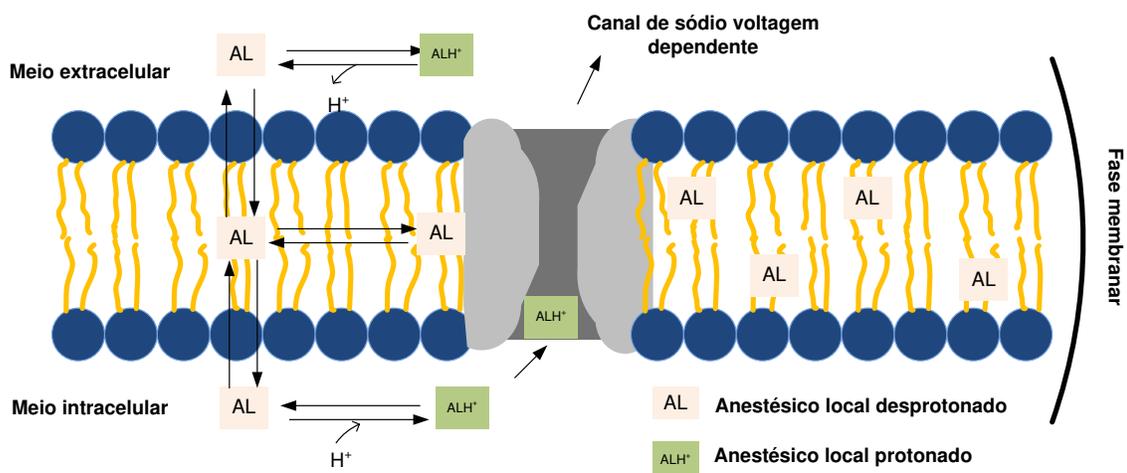


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação dos ALs apresentando a interação de moléculas protonadas e desprotonadas com a fase lipídica membranar e vias de acesso ao(s) sítio(s) de ação na proteína canal de sódio voltagem-dependente (adaptado de Fraceto et al., 2006).

Em geral os ALs de uso clínico são bases fracas, possuem altos valores de pKa (entre 7,8 e 9,0) e são administrados sob a forma de cloridrato (forma protonada ou catiônica), mais solúvel (McLure & Rubin, 2005). Assim, em virtude dos altos valores de pKa dos ALs, prevalece em pH fisiológico do sangue a forma protonada, com menor partição e capacidade de bloqueio do nervo (Gupta, 1991; McLure & Rubin, 2005).

Os sítios de ligação para os ALs nos canais de sódio voltagem dependentes até agora descritos mostram a ligação da forma protonada – no portão de inativação, situado no lado citoplasmático do canal (Narahashi et al., 1970) e da forma neutra no interior da bicamada lipídica (Ragsdale et al., 1994, 1996). O bloqueio da condutância iônica ocasionada pela interação dos ALs com fase lipídica membranar se dá pela modificação e desorganização dos canais de sódio voltagem-dependente, apontando a relação entre a hidrofobicidade do AL e sua potência anestésica (de Paula & Schreier, 1996). Além disso, a introdução (partição) dos ALs (neutro) na bicamada lipídica ocasiona a formação de sítios transientes os quais facilitam a ligação desses fármacos ao(s) sítio(s) de ligação dos canais de sódio voltagem-dependente (Fraceto et al., 2006; de Paula et al., 2008).

A potência e duração de ação dos ALs estão fortemente correlacionadas com sua hidrofobicidade, visto que a associação dos ALs na fase lipídica membranar (membranas neuronais), aumenta sua distribuição para seus locais de ação (receptores específicos nos canais de sódio voltagem-dependente), minimizando a taxa de metabolismo pelas esterases plasmáticas e/ou enzimas hepáticas. A biotransformação dos ésteres e amidas ocorre, respectivamente, pela ação das enzimas colinesterases plasmáticas e nos microsossomos hepáticos. O ácido para-aminobenzóico (derivado de compostos do tipo éster) é produto de degradação, e está associado à reações alérgicas nos pacientes. No entanto, os ALs do tipo amino-amidas não são metabolizados em ácido para-aminobenzóico e os relatos de reações alérgicas a estes agentes são extremamente raros (Covino, 1986).

Os efeitos adversos dos ALs podem ser divididos em três categorias: toxicidade local, toxicidade sistêmica (quando absorvidos) e reações alérgicas. Os efeitos tóxicos locais podem manifestar-se por neurotoxicidade, com alterações neurológicas

transitórias, ou por miotoxicidade. A toxicidade sistêmica (situação mais grave) inclui alterações no sistema nervoso central (casos mais raros) e cardiovasculares (Dippenaar, 2007; Rang et al., 2011). O desenvolvimento de sinais e sintomas relacionados à toxicidade dos ALs está diretamente relacionado com localização e técnica de bloqueio, fatores de riscos individuais do paciente, dose administrada, adequação do tratamento e a concentração do fármaco no plasma (Neal et al., 2010). No entanto, a concentração do fármaco no plasma vai depender da taxa de absorção a partir do local administrado (Dippenaar, 2007). A Tabela 1 mostra os sintomas e sinais de uma overdose de AL ao nível do sistema nervoso central e sistema cardiovascular.

Tabela 1. Sintomas e sinais de um quadro clínico de overdose de anestésicos locais (Dippenaar, 2007; Mercado & Weinberg, 2011).

<b>Sistema nervoso central</b>	<b>Sistema cardiovascular</b>
<b>I. Fase inicial</b>	<b>I. Fase inicial</b>
Parestesia	Hipertensão
Zunido nos ouvidos	Taquicardia
Confusão	
<b>II. Fase excitação</b>	<b>II. Fase intermediária</b>
Tremores	Depressão do miocárdio (contratilidade deprimida das fibras miocárdicas)
Agitação	Diminuição do débito cardíaco
Convulsões	Hipotensão progressiva
<b>III. Fase depressora ou inibitória (elevação da dose)</b>	<b>III. Fase Terminal</b>
Perda de consciência	Vasodilatação periférica
Coma	Hipotensão grave
Depressão respiratória	Bradicardia sinusal
	Defeitos de condução
	Disritmias

A dibucaína (DBC) é um dos mais potentes anestésicos locais e tem ação prolongada (4 horas de duração, com dose máxima de 1mg/kg) (Crystal et al., 2007), mas a sua baixa solubilidade aquosa (de Paula & Schreier, 1995, 1996) limita a sua utilização por via infiltrativa. Devido a sua toxicidade, a DBC na sua forma injetável foi retirada do mercado norte-americano, mas continua a ser muito popular fora dos EUA como anestésico por via espinhal. Os sinais e sintomas de uma *overdose* por DBC relacionam-se com alterações no sistema nervoso central e sistema cardíaco e incluem convulsões, hipóxia, acidose, bradicardia, arritmias e paradas cardíacas (Dayan et al., 1996; Curtis et al., 2009; Hanzlicek & Van der Merwe, 2010) (Tabela 1).

### **1.3. Dibucaína**

A DBC, AL do tipo amino-amida, é um derivado da quinolona, sua estrutura química é diferenciada dos demais ALs de uso clínico pela presença de um anel quinolínico com um grupo butil ligado por uma ligação éter (Figura 4) (Strichartz, 1987; de Paula et al., 2012). Este anel grande e rígido impõe restrições à molécula e modula a sua interação com as membranas (Kuroda & Fujiwara, 1987; Kuroda et al., 1996; Lorite et al., 2009). Além disso, da mesma forma que os outros ALs, a DBC coexiste tanto na forma neutra como na forma de cátions de amônio, em pH 7,4. Como o pKa do grupamento amina terciário da DBC é de 8,3 (Malheiros et al., 2004), em pH fisiológico do sangue (7,4) têm-se predominantemente a forma protonada, mas também uma menor fração da forma neutra do AL.

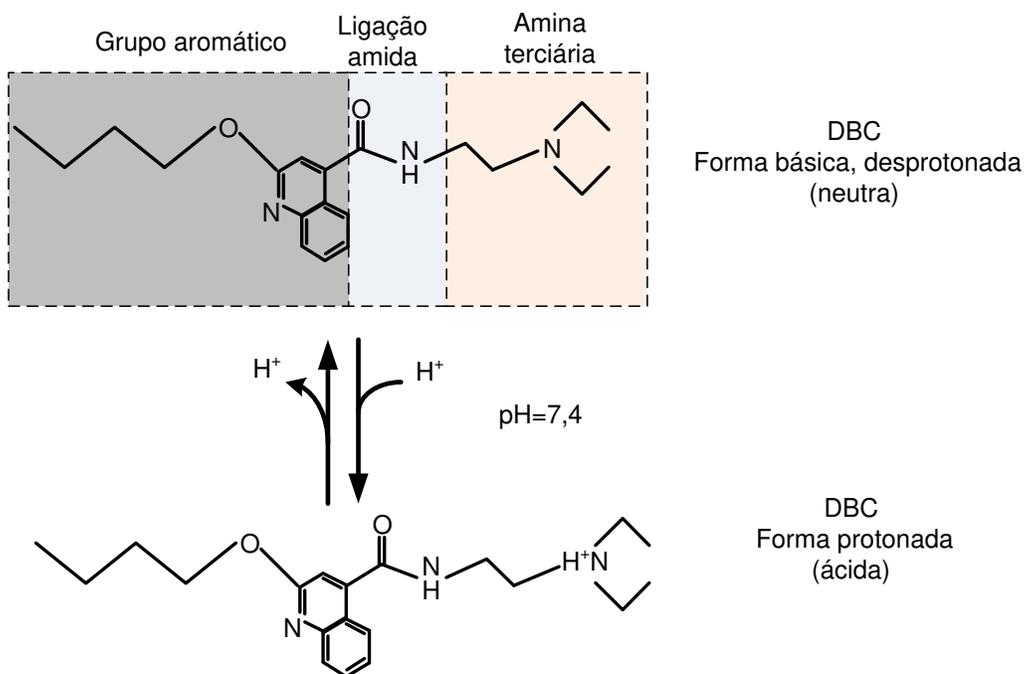


Figura 4. Estrutura química da dibucaína, representada nas suas formas desprotonada (básica) e protonada (ácida) em pH 7,4.

Embora tanto a forma protonada quanto a desprotonada da DBC interajam com membranas lipídicas, a forma neutra tem maior partição entre os lipídios (Eftink et al., 1985). Desta forma, apesar da fração protonada da DBC interagir menos com as membranas biológicas (Strichartz, 1987), sua solubilidade aquosa favorece a distribuição do fármaco no organismo rapidamente, enquanto a forma neutra assegura a inserção do fármaco nas membranas, para atingir o canal de sódio.

Atualmente, no Brasil, a DBC encontra-se comercialmente disponível em cremes e pomadas para uso cutâneo. No entanto, seu uso em mucosas deve ser feito com bastante cautela devido a sua alta toxicidade (Catterall & Mackie, 2010). Esta propriedade levou à investigação de sistemas de liberação para DBC, capazes de melhorar a sua disponibilidade (Foldvari et al., 1993; Elsayed et al., 2007; Kang & Shin, 2010).

Dessa forma, uma estratégia que pode ser adotada é veiculação da DBC em nanocarreadores utilizados com sucesso como sistemas de liberação prolongada de fármacos e capazes de reduzir os efeitos tóxicos de princípios ativos.

#### **1.4. Nanocarreadores para liberação prolongada de fármacos**

Sistemas carreadores nanoparticulados para serem considerados adequados devem possuir as seguintes características: serem atóxicos, possuírem adequada capacidade de carregamento de fármacos ou moléculas bioativas, possibilitarem o direcionamento até alvos específicos (redução de efeitos colaterais), liberarem de forma sustentada o fármaco incorporado, serem estáveis (física e quimicamente) e capazes de proteger fármacos lábeis de degradações, além de permitirem a produção em grande escala e a esterilização, quando necessária, da formulação final (Mehnert & Mäder, 2001; Attama, 2011; Müller et al., 2011; Attama et al., 2012; Puglia & Bonina, 2012).

A veiculação de bioativos em sistemas nanoparticulados tem sido muito estudada para substâncias com baixa biodisponibilidade e alta toxicidade (Pietkiewicz et al., 2006; Cereda et al., 2006; Liu et al., 2007). Dentre os sistemas lipídicos particulados mais estudados estão os lipossomas (Lasic, 1993; Torchilin, 2012), as micro e nanoemulsões (de Paula et al., 2012), as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, *Solid Lipid Nanoparticles*) (Müller et al., 2000; Pardeike et al., 2009; Aji Alex et al., 2011; Marcato et al., 2011, de Araújo et al. 2013), e os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC, *Nanostructured Lipid carriers*) (Kasongo et al., 2011; Müller et al., 2011; Severino et al., 2012a).

#### **1.5. Nanopartículas lipídicas**

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) foram desenvolvidas no final do século XX (Müller et al., 2011) por grupos de pesquisa que trabalhavam em paralelo: M. R. Gasco, na Itália e R. H. Müller e J. S. Lucks, na Alemanha. Em pouco mais de 20 anos, as SLN

atraíram a atenção de muitos outros grupos de pesquisa espalhados pelo mundo com um crescente número de publicações e patentes (Müller et al., 2002; Wissing et al., 2004; Harde & Das, 2011; Battaglia & Gallarate, 2012; Puglia, 2012).

O primeiro produto patenteado à base de SLN, destinados à aplicação tópica foi o Nanobase<sup>®</sup>, pela Yamanouchi (Polônia), que explora as propriedades de adesão das SLN para a hidratação da pele (De Vringer, 1997). Atualmente, mais de 40 produtos cosméticos contendo SLN ou NLC estão ou em desenvolvimento ou já disponíveis no mercado (Nanorepair Q<sub>10</sub> e Nanovital Q<sub>10</sub>). Há também um grande interesse da indústria farmacêutica na fabricação desses produtos, sendo que vários deles encontram-se, atualmente, em fase de estudos pré-clínicos ou clínicos. A empresa AlphaRx, por exemplo, tem avaliado a encapsulação da rifampicina em SLN (Rifamsolin<sup>®</sup>) objetivando aumentar a biodisponibilidade do fármaco (estudos pré-clínicos). Estima-se que produtos farmacêuticos contendo SLN ou NLC só estarão disponíveis nos próximos 3 - 6 anos (Müller et al., 2011; Severino et al., 2012a).

As SLN, com diâmetros médios em torno de 50 a 1000 nm, representam um grande avanço nas áreas farmacêutica e cosmética (zur Mühlen et al., 1998; Wissing et al., 2004; Attama, 2011; Müller et al., 2011; Puglia et al., 2011; Battaglia & Gallarate, 2012). Este tipo de sistema carreador une as vantagens dos sistemas tradicionais, sem desvantagens como a presença de solvente orgânico residual, instabilidade físico-química e problemas com ampliação de escala (Müller et al., 2000), pois são versáteis (usadas por várias vias de administração, tais como: oral, tópica/transdérmica, intravenosa, intramuscular, intra-ocular, intranasal, retal, intraperitoneal, etc), utilizam excipientes seguros (biocompatíveis e com citotoxicidade reduzida) (Müller et al., 1996b; Severino et al., 2012a), possuem um grande potencial para liberação sustentada de fármacos, são estáveis (possuem boa estabilidade física, principalmente, após o processo de liofilização que garante uma longa duração à temperatura ambiente - de 12 - 24 meses), além de serem de baixo custo e facilmente escalonáveis, o que as tornam bastante atrativas para a indústria farmacêutica e cosmética (zur Mühlen et al., 1998; Maia et al., 2000; Wissing et al., 2004; Puglia et al., 2008; Attama, 2011; Battaglia & Gallarate, 2012; Puglia, 2012).

A estrutura das SLN, representada esquematicamente pela Figura 5. B, é bastante similar a de uma nanoemulsão (Figura 5.A) em se tratando dos componentes químicos envolvidos na formulação, tamanho e distribuição de partículas (Müller et al., 2000). No entanto, em relação à fase lipídica, diferentemente das emulsões, as SLN são formadas por uma matriz composta por lipídio sólido em temperaturas ambiente e corporal (que corresponde a 0,1% - 30%, massa de lipídio/massa da fase aquosa) estabilizada por emulsificantes (tensoativos em concentrações variando entre 0,5% - 5%, massa de tensoativo/massa da fase aquosa). Além disso, as propriedades sólidas dos lipídeos conferem às SLN menores mobilidade aos ativos, favorecendo seu desempenho em termos de liberação dos ativos ali aprisionados (Attama, 2011).

A escolha e a concentração do estabilizante coloidal utilizado na formulação dependem da via de administração, podendo ser utilizados tensoativos, polímeros (tais como quitosana), ou ainda na mistura deles (tensoativo + polímero) (Souto et al., 2007; Pawar & Babu, 2010; Attama, 2011; Puglia, 2012). A Tabela 2 apresenta pré-requisitos necessários que devem ser considerados antes do processo de síntese das SLN.

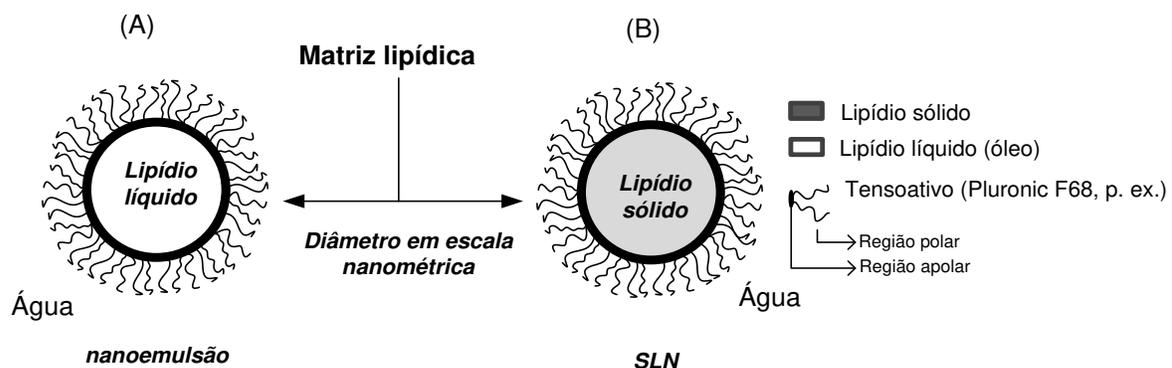


Figura 5. Representação esquemática de dois diferentes sistemas carreadores de fármacos: (a) nanoemulsão e (b) SLN.

Tabela 2. Requisitos para a produção de nanopartículas lipídicas sólidas, segundo (Attama, 2011; Battaglia & Gallarate, 2012; Severino et al., 2012a).

	<b>Pré- Requisitos</b>
1.	Utilização de excipientes reconhecidamente seguros ( <i>Generally Recognized As Safe, GRAS, pela Food &amp; Drug administration (FDA/EUA)</i> ).
2.	Concentração de emulsificantes adequados à via de administração
3.	Possibilita a localização do fármaco nas nanopartículas, favorecendo a cinética de liberação desejada.
4.	Preferência para métodos de produção que possibilitem a larga escala industrial

### **1.5.1. Metodologia de preparo das SLN**

As SLN podem ser preparadas por vários métodos que envolvem processos de fusão e cristalização, emulsificação, evaporação e homogeneização do tamanho das partículas. Dentre eles têm-se: fusão-emulsificação, microemulsão, emulsificação - evaporação de solvente, coacervação, tecnologia de fluido supercrítico com extração de emulsão e atomização de fusão gás assistida (Corrias & Lai, 2011). Todas essas técnicas possuem seus pontos fortes e fatores limitantes, que foram resumidamente descritos na Tabela 3.

Atualmente o método de fusão - emulsificação de solvente, seguido por homogeneização de alta pressão (HP), patenteado por Müller e Lucks destaca-se entre os demais (Müller et al., 2011). Todavia, fármacos instáveis às altas pressões (força de cavitação) e altas temperaturas devem ser processados com cautela, pois é um método que causa significativa estresse mecânico e termodinâmico (Battaglia & Gallarate, 2012) à amostra. Esta técnica consiste em solubilizar o fármaco no lipídio previamente fundido, com sequente emulsificação em fase aquosa contendo o agente tensoativo, sob vigorosa agitação mecânica (Corrias & Lai, 2011).

Os principais fatores que interferem na qualidade das nanopartículas lipídicas preparadas por fusão-emulsificação são: o tipo de homogeneizador empregado e variáveis inerentes ao processo, tais como: pressão, temperatura, força de cisalhamento e o número de ciclos de homogeneização (Wissing et al., 2004). Além disso, pode-se listar como fatores interferentes: a solubilidade do princípio ativo no lipídio fundido, aspectos físico-químicos da matriz lipídica sólida e do agente tensoativo, características do fenômeno de cristalização e polimorfismo do lipídio (Üner, 2006; Üner & Yener, 2007).

Os homogeneizadores de alta pressão ou ultrassons (Son) causam redução do tamanho, pela ruptura das gotículas lipídicas que permanecem em suspensão na fase aquosa e se solidificam ao atingir a temperatura ambiente (Corrias & Lai, 2011).

A utilização de ultrassons com elevada força de cavitação para redução de tamanhos deve ser cuidadosamente avaliada, pois apesar de ser uma técnica simples, gera partículas com distribuição de tamanhos heterogêneos e contaminação por titânio (isto, quando a ponteira do sonicador não é de safira, de custo muito elevado), que pode ocasionar uma instabilidade físico-química nos princípios ativos e/ou nas matrizes lipídicas (Müller et al., 2000; Heurtault et al., 2003).

Tabela 3. Métodos utilizados na preparação de nanopartículas lipídicas (de acordo com Corrias & Lai, 2011).

Técnica	Metodologia	Pontos Fortes e Fracos
Fusão-emulsificação/HP	Processo de emulsificação de fases (O/A) com posterior redução de tamanho, usando alta pressão (a quente ou a frio).	<b><u>Pontos fortes:</u></b> escalabilidade, tecnologia estabelecida e comercialmente viável, operação contínua. <b><u>Pontos fracos:</u></b> degradação de fármacos lábeis quando submetidos a altas temperaturas.
Fusão-emulsificação/ultrasonicação	Processo de emulsificação de fases (O/A) com posterior redução de tamanho, utilizando ultrasonicação.	<b><u>Pontos fortes:</u></b> mínimo estresse mecânico. <b><u>Pontos fracos:</u></b> contaminação por metais, distribuição de tamanhos com polidispersão alta, escalabilidade não comprovada.
Microemulsão	Emulsificação com posterior diluição da amostra em água à 2-10 °C (Gasco, 1993).	<b><u>Pontos fortes:</u></b> técnica realizada a baixas temperaturas, considerada reprodutível e de baixo custo. <b><u>Pontos fracos:</u></b> sensível a modificações quanto a escalabilidade e produz dispersões diluídas.
Extrusão de microemulsão	Microemulsão seguida por extrusão em membrana de policarbonato de 100 nm (de Jesus et al., 2013; Radaic et al., 2014).	<b><u>Pontos fortes:</u></b> mínimo estresse mecânico, fabricação de pequenas quantidades de formulações (escala laboratorial) com um custo acessível. <b><u>Pontos fracos:</u></b> escalabilidade não avaliada.
Emulsificação-evaporação de solvente ou difusão solvente	Dissolução do lípido em solvente orgânico (etanol, acetona ou isopropanol) diluído em H <sub>2</sub> O, com posterior injeção em fase aquosa. Evaporação do solvente orgânico: sob agitação à 0 e 2 °C em pressão reduzida (Schubert & Müller-Goymann, 2003) ou ocorre a diluição em água. (Gallarate et al., 2009; Trotta et al., 2003).	<b><u>Pontos fortes:</u></b> encapsulação de moléculas instáveis, tais como peptídeos e proteínas. <b><u>Pontos fracos:</u></b> Toxicidade do solvente orgânico residual.

Tabela 3. Métodos utilizados na preparação de nanopartículas lipídicas (de acordo com Corrias & Lai, 2011) (continuação).

Técnica	Metodologia	Pontos Fortes e Fracos
Coacervação	Interação de solução micelar de um sal de sódio de ácido graxo em presença de uma solução coacervante (solução ácida) e um agente tensoativo. A precipitação ocorre com a redução do pH da dispersão (Battaglia et al., 2010).	<b>Pontos fortes:</b> Encapsulação de substâncias termossensíveis. Não necessita de equipamentos complexos ou solventes orgânicos, reduzido custo no nível laboratorial e industrial. <b>Pontos fracos:</b> diluição da amostra.
Fluido supercrítico	Modula a solubilidade e opera acima das condições críticas de temperatura e pressão (SCF- CO <sub>2</sub> : 31 °C e 72 bar). Métodos: extração de emulsão por SCF (extração do solvente e precipitação das SLN) e atomização de fusão gás assistida (fusão dos lipídios, despressurização, supersaturação, precipitação das partículas e dispersão em água sob agitação mecânica ou ultrassônica) (Chattopadhyay et al., 2007; Salmaso et al., 2009).	<b>Pontos fortes:</b> remoção mais eficiente de solvente orgânico comparado aos métodos convencionais. <b>Pontos fracos:</b> metodologia adotada há poucos anos, que requer ser melhor avaliada.
Membranas	Membrana cerâmica porosa para separação das fases oleosa e aquosa, aquecimento da fase lipídica, pressão e passagem usando poros (diâmetros: 0,1, 0,2 e 0,45 µm), formação de pequenas gotículas e dispersão em fluxo de água tangencial. As nanopartículas são formadas após refrigeração da dispersão (Charcosset et al., 2005; El-Harati et al., 2006).	<b>Pontos fortes:</b> sem contaminação por solventes orgânicos. <b>Pontos fracos:</b> metodologia adotada há poucos anos, que requer ser melhor avaliada.

\* O/A = óleo em água; SCF = fluido supercrítico

Siekmann & Westesen (1994) produziram nanopartículas lipídicas sólidas de tripalmitina estabilizadas com lecitina de soja e tiloxapol com diâmetros variáveis de 30 a 180 nm, no entanto, foram necessários mais que 15 minutos de exposição ao ultrassom, sendo este um fator limitante quanto ao uso dessa tecnologia. Em contrapartida, dados obtidos por Silva e col. (2011) visando estabelecer as vantagens e as limitações das técnicas de HP a quente e o uso da técnica de ultrasonicação na produção de nanopartículas lipídicas sólidas para a encapsulação de risperidona destinada ao uso oral, revelaram que ambos os métodos foram eficazes. De fato, os resultados obtidos representaram um avanço na simplificação dos métodos de produção das SLN, porém ao se pensar em termos de ampliação de escala, a técnica de HP ainda é a mais adequada para a produção das SLN (Silva et al., 2011). Assim, quando o foco está em pesquisas acadêmicas, devido à facilidade de preparação e o baixo custo do equipamento, a ultrasonicação pode ser utilizada como um método adequado para a produção desses nanocarreadores (Silva et al., 2011).

Modelos estatísticos, fatorial  $2^2$ , visando otimizar o processo de produção das SLN e NLC foram utilizados por Severino e col. (Severino et al., 2012b). Os processos avaliados foram homogeneização de alto cisalhamento (HSH) e homogeneização de alta pressão (HP). As variáveis respostas obtidas (diâmetro médio, índice de polispersão e potencial zeta) permitiram determinar condições otimizadas para a produção das SLN (~ 100 nm usando 20.000 rpm e 500 bar quando submetidas a HSH e HP respectivamente) e NLC (~ 300 nm usando 15.000 rpm e 700 bar quando submetidas a HSH e HP respectivamente).

Desde a década de 50 a HP é utilizada na indústria farmacêutica, no preparo de emulsões parenterais (Battaglia & Gallarate, 2012). É, portanto, uma tecnologia que se encontra bem estabelecida, sem problema regulatório e industrialmente viável (Wissing et al., 2004; Seo et al., 2010; Shegokar et al., 2011). A HP aplica princípios básicos da mecânica dos fluidos com alta dissipação de energia ( $10^9 - 10^{12} \text{ m}^{-3} \cdot \text{kW}$ ) provocada pelo cisalhamento e pelas forças de cavitação responsáveis pela redução no tamanho da fase dispersa na emulsão. Com a utilização de pressões de 100 a 2000 bar, o fluido é impulsionado, em alta velocidade (>1000 km/h), a passar por um orifício (com diferentes

geometrias) de tamanho de 25 - 30  $\mu\text{m}$  (Mehnert & Mader, 2001). A alta energia dissipada durante o processo de homogeneização seguida de uma redução drástica de pressão causa a cavitação que promove a elevação da temperatura em torno de 20 °C, sendo necessário ter cautela quando fármacos lábeis são utilizados.

A HP pode ser realizada a quente ou a frio, com até 5 ciclos de homogeneização em dois estágios de pressão: 500/1500 bar. Acima de cinco ciclos há tendência a aumentar o tamanho das gotículas, devido ao processo de coalescência entre partículas, resultado do aumento de energia cinética aplicada ao sistema (Siekman & Westesen, 1994). Quando realizada a quente, o sistema é mantido sob aquecimento de 10 °C acima do ponto de fusão do lipídio da emulsão, até a homogeneização. A solidificação das partículas ocorre somente após o último ciclo de pressão aplicado à amostra.

No intuito de driblar problemas relacionados com a deposição de fármacos na interface da nanopartícula ocasionada pela partição entre as fases oleosa e lipídica, a HP pode ser empregada a frio (Dingler & Gohla, 2002). O aumento da deposição de fármaco é proporcional ao aumento da hidrofiliabilidade em altas temperaturas.

Na metodologia de HP a frio, após a solubilização do fármaco no lipídio fundido, a amostra é rapidamente resfriada em gelo seco ou em nitrogênio líquido, sendo posteriormente triturada e redispersa em fase aquosa contendo um agente tensoativo. A suspensão obtida é adicionada ao homogeneizador, em temperatura ambiente, utilizando-se 10 ciclos de homogeneização para obtenção de partículas que são mais polidispersas e de diâmetros maiores que as obtidas no processo a quente (Gohla & Dingler, 2001; Dingler & Gohla, 2002).

Há uma relação inversa entre a hidrofiliabilidade do fármaco e a capacidade de carreamento em SLN, sendo a técnica de HP a frio a mais adequada para fármacos com maior solubilidade em água, pois aumenta a capacidade de encapsulação e reduz partição do fármaco na fase aquosa durante a etapa do preparo da amostra. Dessa forma, a solubilidade do fármaco a ser incorporado nas matrizes lipídicas é um dos pontos que define a metodologia de produção, além de definir o tipo de lipídio a ser utilizado na formulação (Souto et al., 2007).

## **1.5.2. Escolha dos componentes utilizados na produção das nanopartículas lipídicas**

### **1.5.2.1. Fase lipídica**

Lipídios com ponto de fusão acima da temperatura corpórea são preferidos, pois a estrutura sólida das SLN causa redução da mobilidade dos fármacos ou moléculas bioativas carregadas permitindo a liberação sustentada ou prolongada ao longo do tempo (Mehnert & Mader, 2001; Attama et al., 2012).

Lipídios como trilaurina, tricaprina e glicerídeos de ácidos graxos saturados (bases *Witepsol*<sup>®</sup> contendo de 10 a 18 carbonos em suas estruturas, p.ex.) devem ser evitados se o objetivo é a produção de nanopartículas lipídicas com características de liberação prolongada ou que possuam propriedades oclusivas na pele, pois a diferença entre o ponto de fusão destes lipídios é baixa, o que torna as partículas semelhantes às emulsões O/A, com alta capacidade de encapsulação, mas com baixa retenção dos fármacos na fase oleosa (Attama et al., 2012). A recristalização pode ser, no entanto, induzida com armazenamento em baixas temperaturas (0 - 4 °C), que mantém a estabilidade física do sistema. Todavia a aplicação do produto na superfície da pele (32 °C) induz a liquefação da matriz lipídica (Souto et al., 2007).

Em experimentos realizados utilizando lipídios com altos pontos de fusão, submetidos à HP para a produção de nanopartículas lipídicas, foi possível correlacionar o ponto de fusão com o aumento da viscosidade da formulação e do diâmetro das partículas (menos estáveis e mais propícias à agregação). Além disso, a velocidade de cristalização, a hidrofiliabilidade (influência as propriedades auto-emulsionantes) e a forma dos cristais de lipídios devem ser bem avaliadas, pois estão intimamente ligadas à qualidade das nanopartículas (Mehnert & Mäder, 2001).

A composição dos lipídios também é de extrema importância, pois pode variar entre fornecedores e até mesmo entre lotes do mesmo fornecedor (Üner, 2006). A presença de pequenas quantidades de impurezas pode ter grande impacto na qualidade das dispersões de nanopartículas lipídicas (modificação do potencial zeta e

retardo no processo de cristalização, p. ex.). Como referido por Mehnert & Mader (2001) ao produzir nanopartículas com diferentes fornecedores de palmitato de cetila, foram observados diferentes tamanhos de partículas e estabilidade frente à estocagem. Além disso, na maioria dos casos o aumento na concentração de lipídios utilizada resultou em aumento da viscosidade da fase dispersa, com elevação no tamanho e na polidispersão das partículas.

Os lipídios utilizados na preparação das SLN podem ser classificados em grupos, de acordo com a sua composição: ácidos graxos, ésteres de glicerídeos e ceras. A natureza química e concentração dos lipídios utilizados influencia na incorporação dos princípios ativos e tamanho das SLN. A Tabela 4 apresenta exemplos de lipídios e tensoativos que têm sido estudados para a produção das SLN.

Há um grande número de artigos que reportam a utilização de glicerídeos para a fabricação de SLN (Heiati et al., 1996; Hamdani et al., 2003; Souto et al., 2006). Glicerídeos são produtos de uma reação de trans-esterificação do glicerol com um ácido graxo (mono ou poliácido) (Sato et al., 1999; Sato, 2001). Glicerídios exibem polimorfismo característico, com três ou mais arranjos cristalinos: hexagonal, ortorrômbico e triclínico (Larsson, 1966). Como exemplos pode-se citar: behenato de glicerila (ou Compritol<sup>®</sup> 888 ATO), que consiste em uma mistura de mono - (12 - 18%), di - (52 - 54%), e triglicerídeos (28 - 32%), com ponto de fusão de 72 °C e o tripalmitato de glicerila (Dynasan<sup>®</sup> 116), um triglicerídeo de ácido palmítico, com ponto de fusão de 65 °C.

Tabela 4. Lipídios e agentes tensoativos utilizados na produção de SLN (Mehnert & Mader, 2001; Puglia, 2012; Severino et al., 2012a).

<b>Lipídios sólidos</b>	<b>Tensoativos</b>
<b>Triacilglicerol</b>	<b>Fosfolipídeos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tricaprina</li> <li>• Trilaurina</li> <li>• Trimiristina</li> <li>• Tripalmitina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lecitina de soja</li> <li>• Lecitina de ovo</li> <li>• Fosfatidilcolina</li> </ul>
	<b>Copolímeros de óxido de etileno/óxido e propileno</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Triestearina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poloxamer 188</li> <li>• Poloxamer 407</li> <li>• Poloxamine 908</li> </ul>
<b>Acilglicerol</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicerol monostearato</li> <li>• Glicerol behenato</li> </ul>	<b>Copolímeros de óxido de etileno sorbitano / óxido de propileno</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicerol palmitostearato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polissorbato 20</li> <li>• Polissorbato 60</li> <li>• Polissorbato 80</li> </ul>
<b>Ácidos Graxos</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido esteárico</li> <li>• Ácido palmítico</li> <li>• Ácido decanóico</li> <li>• Ácido behênico</li> </ul>	<b>Sais biliares</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colato de sódio</li> <li>• Glicolato de sódio</li> <li>• Taurocolato de sódio</li> </ul>
<b>Ceras</b>	<b>Álcool</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Palmitato de cetila</li> <li>• Miristato de miristila</li> <li>• Cera de carnaúba</li> <li>• Cera de abelha</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etanol</li> <li>• Butanol</li> <li>• Álcool polivinílico</li> </ul>

As ceras são ésteres simples produzidos a partir de uma reação de esterificação de um álcool com um ácido graxo de cadeia longa, com ou sem grupamentos funcionais. No entanto, contrariamente aos glicerídeos, o álcool não é representado por um glicerol (Venturella, 1990). Em temperatura ambiente, as ceras caracterizam-se como plásticos sólidos e acima dos seus pontos de fusão derretem e tornam-se líquidos com baixa viscosidade. A incidência de polimorfos nas ceras é menor que nos glicerídeos, tendo sido observado que o arranjo cristalino mais frequente é o ortorrômbico ( $\beta'$ ) e sua taxa de transição polimórfica é mais baixa (Lukowski et al., 2000).

As ceras de abelha e de carnaúba são ceras naturais obtidas a partir do mel de abelhas e das folhas da palmeira brasileira, respectivamente. Ambas são formadas por misturas complexas de ésteres de ácidos e hidroxiácidos (cera de carnaúba) e quantidades variadas de ácidos livres, alcoóis, hidrocarbonetos e resinas (cera de abelha) (Ozyazici et al., 2006; Pawar & Babu, 2010).

O palmitato de cetila (CP ou éster de ácido palmítico ou hexadecanóico), (Pawar & Babu, 2010) e o miristato de miristila (MM ou éster de ácido mirístico ou ácido tetradecanóico) são ceras brancas e cristalinas. Ambas possuem um leve odor e sabor suave. São solúveis em éter e clorofórmio e insolúveis em água e álcool. Os ácidos precursores do CP e MM são extraídos de fontes naturais, tais como, espermacete de baleia e óleo de Jojoba, respectivamente. Embora, ambos os ésteres, MM e CP, sejam estruturalmente saturados e não sofram autoxidação rapidamente, podem ocorrer degradações enzimáticas e químicas dos mesmos (Nair, 1997). Estes ésteres são rotineiramente utilizados em formulações cosméticas como agentes emolientes e umectantes, em concentrações de 10% e 25% para o CP e MM, respectivamente. Dados obtidos e sumarizados por Nair (1997) mostraram que ambos os ésteres são seguros para utilização em produtos cosméticos, visto não apresentarem toxicidade sistêmica, nenhuma sensibilização ou fotossensibilização e apenas uma pequena irritação que não comprometeu sua utilização como componente de formulação cosmética. Além disso, as SLN preparadas com CP exibiram elevada estabilidade física em relação às compostas por mono e triglicerídeos (Jenning & Gohla, 2000).

A toxicidade *in vivo* de SLN preparadas com Compritol® (gliceril behenato) e CP foi avaliada por Weyhers e col. (2006). As dispersões foram administradas em ratos por via intravenosa, com seis aplicações (doses relativamente elevadas) em um período de 20 dias. Os resultados mostraram que as SLN compostas por CP não causaram qualquer sintoma patológico, em nenhuma das doses testadas; no entanto, foi observado acúmulo de SLN preparadas com Compritol® no fígado e no baço dos animais.

O CP tem sido reportado em vários artigos como componente principal da matriz lipídica das nanopartículas lipídicas. De acordo com Müller e col. (Müller et al., 2002) quando as SLN foram avaliadas para uma possível utilização como absorventes de raios UV, as partículas preparadas apenas com CP atuaram como bloqueadores solares, além de serem veículos de filtros solares (tais como 2-hidroxi-4-metoxi benzofenona; Eusolex® 4360). Os mesmos autores também observaram um aumento de três vezes na proteção UV com uso das SLN, o que permitiria uma redução na concentração do composto fotoprotetor presente na formulação (Müller et al., 2002).

Kumar et al. (2007) avaliaram a biodisponibilidade oral do anti-hipertensivo nitrendipina, encapsulado em diferentes tipos de SLN. Os resultados mostraram que a biodisponibilidade de nitrendipina encapsulada em nanopartículas compostas por CP e estabilizada com Poloxamer 188 foi aumentada em três vezes após administração intraduodenal, se comparada com a suspensão aquosa de nitrendipina.

Elnaggar et al. (2011) obtiveram resultados promissores na aplicação transdérmica de citrato de sildenafil, utilizado no tratamento de disfunção erétil, quando encapsulado em nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) compostas por CP. Os resultados evidenciaram que as SLN apresentaram alta capacidade de encapsulação do fármaco (acima de 90%), com excelente estabilidade física (durante seis meses) e perfil de liberação do fármaco na pele mais rápida, seguida de uma liberação prolongada (< menor tempo de latência e > duração de ação do fármaco) quando comparada à formulação com o fármaco em suspensão aquosa.

Trabalhos utilizando o MM e a produção de SLN ainda são bastante escassos. Ridolfi et al. (2012) prepararam e caracterizaram SLN compostas por MM contendo tretinoína, com e sem adição de quitosana. O objetivo foi averiguar a citotoxicidade *in*

*vitro* sobre queratinócitos e a atividade antimicrobiana da tretinoína, contra bactérias relacionadas com a acne. Os resultados mostraram elevada encapsulação da tretinoína nas SLN associadas à quitosana, alta estabilidade física, sem citotoxicidade às células da pele avaliadas e elevada atividade antibacteriana contra *P. acnes* e *S. aureus*, quando comparada à tretinoína livre indicando a utilização dessas partículas para o tratamento tópico de acne.

#### **1.5.2.2. Estabilizantes coloidais: tensoativos**

A natureza anfifílica de agentes emulsificantes (ou agentes tensoativos) possibilita a disposição dessas moléculas, preferencialmente, em regiões de superfície das partículas, em contato com a água, os quais atuam com a função de reduzir a tensão interfacial entre água e óleo, impedindo a separação de fases promovida pela formação de sedimentos (*creaming*, processo reversível), pelo envelhecimento de Ostwald (quando partículas menores crescem à custa de maiores), por floculação (atração intermolecular de moléculas hidrofóbicas por ligações de van der Waals, processo reversível) e coalescência (fusão das partículas até a formação de uma fase sólida e contínua, processo irreversível) das partículas. A influência que a formação de sedimentos exerce sobre as SLN é indireta, mas deve ser considerada, pois favorece a aproximação entre as partículas levando ao envelhecimento de Ostwald, floculação e coalescência das partículas (Remington, 2006). A Tabela 5 mostra estratégias a serem adotadas para contornar os problemas relacionados com a instabilidade física das emulsões que se aplicam ao preparo das SLN.

Tabela 5. Estratégias para contornar problemas de instabilidade em emulsões (Remington, 2006; Battaglia & Gallarate, 2012).

Fenômenos físico-químicos	Estratégia
I. Sedimentação ou creaming	Redução da diferença de densidades entre as fases
II. Flocculação e coalescência	Adição de estabilizantes coloidais que promovam a repulsão eletrostática, onde há formação de uma dupla camada elétrica na interface O/A.
III. Envelhecimento de Ostwald	Não se evita, porém pode ser reduzido preparando-se sistemas mais homogêneos, isto é, com baixa polidispersão.

A escolha do tensoativo baseia-se nas propriedades de carga elétrica, massa molar, estrutura química e balanço hidrofílico/lipofílico (HLB do inglês *hydrophilic / lipophilic balance*) que é dado pela fração dos grupamentos hidrofílicos e lipofílicos da molécula (Attwood & Florence, 1983). Além disso, sua utilização está condicionada à via de administração para qual a formulação será utilizada. Para formulações destinadas à via parenteral deve ser observado o limite de concentração do agente tensoativo empregado, nas vias ocular e tópica fazem-se necessários ensaios prévios de sensibilização e por via oral, o tensoativo não deve ter qualquer ação farmacológica na concentração utilizada (Attama et al., 2012).

Os lipídios e tensoativos mais comumente utilizados na produção de SLN e NLC estão apresentados na Tabela 4. Müller e col. (2000) relataram que a adição de fosfatidilcolina (soja ou ovo) ao lipídio fundido ocasiona maior estabilidade das nanopartículas, e correlacionou o aumento da sua concentração com a redução da cristalinidade das nanopartículas. Attama e Muller-Goymann (2008) confirmaram esse efeito em SLN produzidas com cera de abelha (matriz lipídica), polissorbato 80 e

fosfatidilcolina de soja (tensoativo e co-tensoativo respectivamente) (Attama & Mueller-Goymann, 2008). Além disso, pesquisas apontaram o efeito sinérgico de tensoativos utilizados na mesma formulação, produzindo sistemas coloidais mais estáveis como, por exemplo, a utilização de fosfolipídios (como a fosfatidilcolina) na fase lipídica e o poloxamer (estabilizante estereoquímico) na fase aquosa externa (Chen et al., 2006; Helgason et al., 2009).

De acordo com Bruxel et al. (2012) é possível aumentar a estabilidade de uma emulsão com a adição de tensoativos não iônicos do grupo dos poloxâmeros e polioxietileno-sorbitanos (Tweens) em combinação com os fosfolipídios, pois levam à formação de filmes mistos compactos, conferindo formulações com prazos de validade maiores.

Helgason et al. (2009) demonstraram que elevadas concentrações de tensoativo reduzem a tensão interfacial (baixa mobilidade dos tensoativos adsorvidos, de alta concentração de cadeias lipídicas na interface), e originam SLN com comportamento cristalino alterado com reduzidas modificações em suas formas. No entanto, o aumento no tamanho das partículas devido ao aumento da concentração de fosfatidilcolina é devido à formação de múltiplas camadas de fosfatidilcolina à sua superfície ou à formação de lipossomas na fase aquosa que podem incorporar os fármacos e, conseqüentemente, reduzir a eficiência de encapsulação das SLN.

Olbrich e Müller (1999) avaliaram diferentes tipos de SLN quanto à composição lipídica e tensoativos usados em relação às velocidades de degradação enzimática. Os resultados obtidos permitiram concluir que o comprimento das cadeias de ácidos graxos (triglicerídeos e os tensoativos) se correlaciona com a taxa de degradação enzimática (< degradação enzimática, > cadeias de ácidos graxos). Os dados revelaram ainda que a degradação das SLN pode ser acelerada com o uso de colato de sódio ou reduzida pelo efeito de estabilização estérica conferida pelos tensoativos Poloxamer 407 ou Polissorbato 80, embora quanto maior o número de cadeias de óxido de etileno, mais difícil seja o ataque das lipases às SLN. Assim, é possível ajustar a degradação de SLN e, conseqüentemente, obter a liberação do fármaco de uma forma controlada.

### **1.5.3. Polimorfismo**

Logo após os primeiros estudos envolvendo a produção e caracterização das SLN para carreamento de fármacos, foram verificadas algumas desvantagens desses sistemas, tais como a baixa capacidade de encapsulação de fármacos hidrofílicos e a expulsão dos fármacos em função do tempo de estocagem, promovida principalmente por instabilidade estrutural causada pela presença de polimorfos lipídicos nas nanopartículas (Wissing et al., 2004).

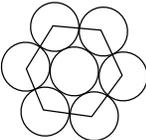
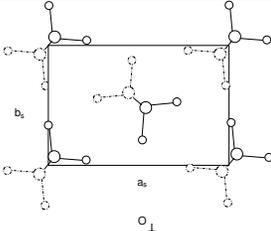
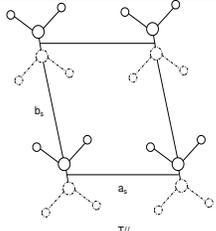
O polimorfismo caracteriza-se pela capacidade de compostos se solidificarem em diferentes formas cristalinas (Souto et al., 2007), com significativas mudanças físicas e químicas quanto à forma, solubilidade, ponto de fusão e cristalização (Attama et al., 2012). Os triglicerídeos, lipídios bastante utilizados na produção de SLN e NLC (Tabela 4) são exemplos típicos de moléculas que apresentam comumente três distintas e importantes formas polimórficas:  $\alpha$  (hexagonal, instável e com menor ponto de fusão e calor latente),  $\beta'$  (ortorrômbica, metaestável) e  $\beta$  (triclínica, com maior estabilidade e maior ponto de fusão e calor latente) (Jenning & Gohla, 2000; Bunjes, 2011).

De acordo com a natureza química dos lipídios e dos parâmetros de produção das nanopartículas lipídicas podem ocorrer modificações nas frações dos polimorfos presentes na composição das nanopartículas, o que conduz à redução, deslocamento ou alteração na temperatura de fusão do sistema (Souto et al., 2007). A Tabela 6 mostra diferenças nos graus de organização tridimensional de cristais lipídicos formados após recristalização (Jenning & Gohla, 2000; Souto et al., 2006).

A recristalização da amostra é realizada submetendo o sistema à temperatura ambiente ou, se necessário, à liofilização (p.ex. no caso de se trabalhar com acilgliceróis de baixo ponto de fusão). O congelamento rápido favorece a formação de cristais  $\alpha$  (forma polimórfica mais instável), caso contrário, se o congelamento ocorrer mais lentamente (rearranjo das cadeias hidrocarbonadas dos lipídios numa forma mais ordenada e estável), também há tendência de formação das formas  $\beta$  (Freitas & Müller, 1999). Este comportamento correlaciona-se com a quantidade de energia de ativação (energia livre de Gibbs) para nucleação de formas cristalinas, sendo necessária menor

energia de formação para as formas  $\beta$  (Sato, 2001). O termo subcélula refere-se à secção transversal do empacotamento das cadeias de hidrocarbonetos dos lipídios (Tabela 6), na qual os espaçamentos curtos e longos de Bragg ( $d$ ) entre cadeias são caracterizados através de medidas de difração de raio X.

Tabela 6. Graus de organização tridimensional de cristais lipídicos formados após recristalização (adaptado de Sato, 2001).

Cristal	Polimorfos		
	$\alpha$	$\beta'$	$\beta$
	Hexagonal	Ortorrômbica perpendicular	Paralela triclinica
Subcélulas	$d^* = 0,415 - 0,42\text{nm}$	$d^* = 0,42 - 0,43\text{ nm}$ ou $d^* = 0,37 - 0,40\text{ nm}$	$d^* = 0,46\text{ nm}$
			

\* $d$ : espaçamentos curtos e longos de Bragg entre cadeias de hidrocarbonetos dos lipídios

Estudos apontam que a presença de polimorfos nas SLN afetam importantes propriedades físico-químicas das partículas, tais como o ponto de fusão e a cristalização. As propriedades relacionadas à rede cristalina do lipídio, tais como textura, espalhabilidade, capacidade de encapsulação, degradação do produto e, conseqüentemente, perfil de liberação, também são afetadas. A forma polimórfica  $\beta$  é

estável e altamente ordenada, rígida e com baixa capacidade de veiculação de fármacos (cristais  $\alpha$  > cristais  $\beta'$  > cristais  $\beta$ ). Assim, é necessário um rígido controle e avaliação do lipídio a ser empregado nas nanopartículas, principalmente se o objetivo é a ampliação para larga escala industrial (Jenning & Gohla, 2000; Garte & Sato, 2001; Souto et al., 2006; Attama et al., 2012).

Misturas de lipídios e de tensoativos são preferidos por favorecer a formação de uma rede cristalina que permite, através dos espaços ou imperfeições formadas, acomodar moléculas de interesse farmacêutico e/ou cosmético. Já lipídios puros podem levar a expulsão dos princípios ativos da matriz lipídica das SLN (Souto et al., 2007; Paliwal et al., 2009).

Matrizes lipídicas constituídas de ácido esteárico ou de misturas de triglicéridos de ácido esteárico cáprico/caprílico destinadas à veiculação de fármacos foram estudadas por Severino e col. (Severino et al., 2011). Esses lipídios foram analisados isoladamente e misturados com agentes tensoativos (Span<sup>®</sup> 85 e Tween<sup>®</sup> 80), após o processo de fusão e temperagem (1 hora a 80 °C). Resultados de calorimetria exploratória de varredura (DSC), difração de raios X e microscopia de luz polarizada apontaram alterações estruturais no arranjo cristalino das substâncias com a redução tanto da temperatura de fusão quanto da intensidade dos picos dos difratogramas de raios X e, por fim, identificação de estruturas amorfas (mistura lipídica: ácido esteárico/triglicéridos). Todas essas alterações físicas e químicas são desejadas para a encapsulação de princípios ativos e estabilidade das SLN e NLC durante a estocagem.

As nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados também têm sido caracterizados utilizando-se a técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS, "*Small angle X Ray Scattering*"). Esta técnica é uma ferramenta muito útil no estudo de partículas coloidais, já que permite a medida do tamanho, da forma e de possíveis interações entre as partículas espalhadoras (Pereira, 2004). Dados de SAXS publicados por Lukowski e col (2000) e de Souza et al., (2012) demonstraram que os lipídios CP e ácido esteárico presentes nas SLN se organizam

em lamelas sugerindo que compostos incorporados nas SLN podem ser armazenados entre essas bicamadas.

### **1.6. Carreadores lipídicos nanoestruturados**

Carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), considerados a segunda geração das SLN, surgiram no final dos anos 1990 para melhorar algumas de suas características e, por isso, são geralmente referidos na literatura como sendo uma evolução das SLN. Diferenciam-se das SLN por apresentarem pelo menos um lipídio líquido à temperatura ambiente em sua composição, em razão molar que varia de 70:30 a 99,9:0,1 (lipídio sólido: lipídio líquido) (Pardeike et al., 2009). A presença do óleo (lipídio líquido na temperatura ambiente) nestes carreadores favorece principalmente a eficiência de encapsulação e impede a expulsão do fármaco das partículas durante a estocagem, pela redução da cristalização da matriz lipídica. Dentre as vantagens desse sistema têm-se: o aumento de carga e retenção de fármaco nas estruturas (devido à redução de compressão), melhor estabilidade física e liberação prolongada das moléculas ativas encapsuladas (Saupe et al., 2005), como ilustrado na Figura 6.

Assim como as SLN, os NLC podem ser produzidos utilizando triglicerídeos, ácidos graxos e ceras como matrizes, além de tensoativos como estabilizantes coloidais. As NLC são capazes de encapsular um alto percentual de fármacos com características hidrofóbicas, sendo menos eficazes para carrear compostos com características hidrofílicas. Por isso, apenas fármacos hidrofílicos com alta potência terapêutica seriam interessantes para serem carreados por SLN ou NLC, como o  $\beta$ -Interferon (Müller et al., 2011; Puglia, 2012).

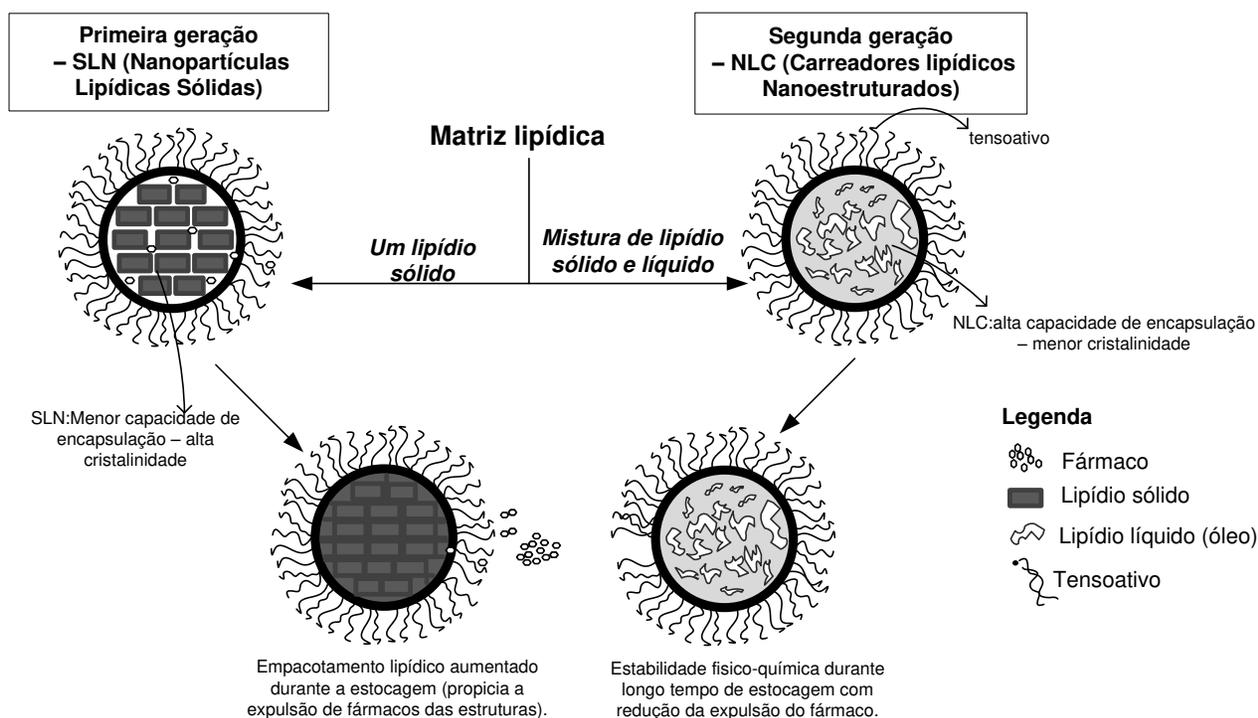


Figura 6. Representação esquemática das diferenças estruturais entre SLN e NLC (de Araújo et al., 2013).

Teeranachaidekul e col. (2008) avaliaram as propriedades físico-químicas de NLC e sua distribuição na superfície da pele. As formulações avaliadas possuíam quantidades variáveis de óleo em sua formulação. O aumento em 20% na quantidade de óleo nas nanopartículas preparadas com CP e triglicerídeos de cadeia média aumentou a viscosidade, com conseqüente aumento no tamanho das partículas. No entanto, foi observada uma posterior redução no tamanho das NLC logo após a cristalização, provavelmente devido à expulsão do excesso de óleo da matriz lipídica, e acúmulo na superfície das nanopartículas. O efeito oclusivo sobre a pele foi reduzido com o aumento de lipídio líquido, devido à redução da viscosidade na formulação. Além disso, estudos de permeação revelaram o direcionamento das partículas na camada mais superficial da pele (epiderme), onde foi observada a deposição do corante vermelho Nilo.

Matrizes lipídicas produzidas com CP produzem nanopartículas estáveis e não completamente recristalizáveis, quando associadas com outros lipídios líquidos (Anantachaisilp et al., 2010). Essas matrizes possuem também menor taxa de degradação *in vitro* e reduzida toxicidade (Müller et al., 1996a; Lukowski et al., 2000; Sarmiento et al., 2007).

Resultados recentes comparando SLN e NLC produzidos com CP e Maisine TM 35-1 (monolinoleato de glicerol), obtidos por Elnaggar e colaboradores não demonstraram a superioridade habitual em relação à capacidade de encapsulação e estabilidade dos NLC sobre as SLN. Isto foi atribuído à estrutura cristalina do CP altamente ordenada, que sofreu pouca perturbação estrutural quando foi adicionada 0,6% (m/v) de lipídio líquido à matriz composta por 1,4% (m/v) (Elnaggar et al., 2011).

## **1.7. Morfologia e estrutura das SLN e NLC**

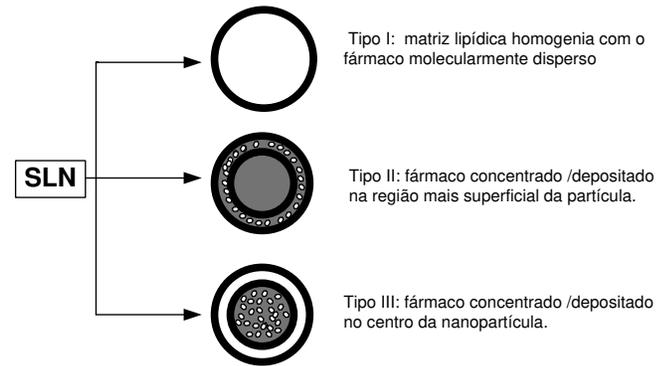
### **1.7.1. Modelos propostos**

A incorporação de fármacos em SLN e NLC (Figura 7) pode ser representada em três diferentes formas, como mostram as Figuras 7.A e B, respectivamente (Müller et al., 2005; Souto & Müller, 2007).

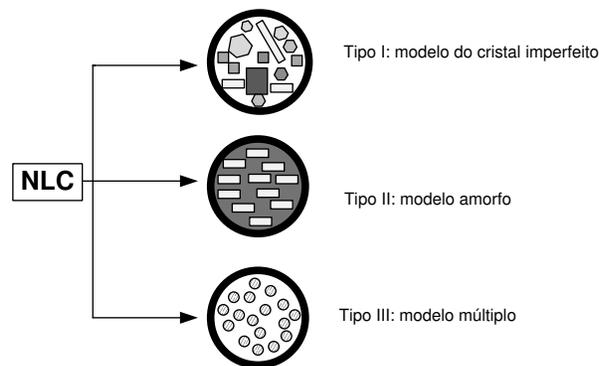
Nas SLN - tipo I (Figura 7.A) a matriz lipídica contém o fármaco molecularmente disperso, sendo que este modelo pode ser obtido utilizando-se a metodologia de homogeneização a frio. O fármaco é solubilizado na matriz fundida com posterior solidificação dessa mistura (fármaco / lipídio) por congelamento. Este procedimento reduz diferenças nas concentrações de fármacos em distintas regiões das partículas (Souto & Müller, 2007).

Nas SLN - tipo II (Figura 7.A) a concentração do fármaco em relação ao lipídio é baixa; este tipo de SLN é produzida utilizando-se HP a quente. Durante o processo de recristalização das SLN haverá a solidificação, inicialmente, dos lipídios com a formação de um núcleo lipídico livre de fármaco, o princípio ativo atinge sua saturação de solubilidade no lipídio e há formação de uma camada externa de lipídios enriquecida

com o fármaco. Em ensaios de liberação *in vitro*, foi observado que nesse tipo de partícula ocorre a liberação brusca do princípio ativo (Souto & Müller, 2007; Teeranachaideekul et al., 2007).



(A)



(B)

Figura 7. Representação esquemática de três diferentes modelos de incorporação de fármacos em SLN e NLC (adaptado de Souto & Müller, 2007).

A deposição do fármaco no centro da nanopartícula ocorre quando a concentração do princípio ativo é elevada em relação à fase lipídica ou pode estar próxima à região de saturação no lipídio (SLN - tipo III, (Figura 7.A)). Como é necessário reduzir a temperatura da dispersão para que ocorra o processo de recristalização dos componentes das SLN, há uma consequente redução na solubilidade do ativo fundido (observado na maior parte dos casos), seguida pela cristalização do mesmo antes dos

lipídios, com posterior formação de uma partícula com o núcleo enriquecido com o ativo (Souto & Müller, 2007).

Os três modelos propostos para os NLC estão representados na Figura 7.B. O NLC- tipo I é composto por lipídios sólidos e pequenas quantidades de lipídio líquido a temperatura ambiente (óleo). Essas estruturas possuem pouca ou nenhuma habilidade para formar estruturas cristalinas ordenadas devido às diferenças entre os comprimentos das cadeias acilas dos constituintes e da mistura de lipídios que os formam. Este modelo é também conhecido como cristal imperfeito, por possuir imperfeições capazes de alojar o fármaco (Müller et al., 2002).

O modelo de NLC do tipo II, chamado de modelo amorfo, utiliza lipídios que conseguem manter a forma polimórfica  $\alpha$  durante o tempo de estocagem, minimizando ou evitando a expulsão dos ativos das partículas (Souto & Müller, 2007).

O modelo múltiplo descrito como NLC – tipo III foi proposto para aumentar a solubilidade do ativo nas NLC e ocorre quando o fármaco é mais solúvel no lipídio líquido que no lipídio sólido. Estas partículas são derivadas de emulsões múltiplas (O/A/O), o que propicia a formação de nanocompartimentos formados pelo lipídio líquido nos NLC. Para que isso ocorra, o óleo deve estar saturado em relação ao lipídio sólido (Souto & Müller, 2007).

### ***1.8. Processo de secagem das nanopartículas lipídicas***

As SLN e NLC otimizadas demonstraram ser estáveis por vários anos (Müller et al., 2000; Müller et al., 2011; Puglia, 2012). No entanto, processos de secagem têm sido empregados como estratégia para contornar os problemas correlacionados com instabilidade das dispersões aquosas (Freitas & Müller, 1998; Zimmermann et al., 2000; Battaglia et al., 2010).

A secagem por aspersão ou a liofilização das suspensões de nanopartículas são úteis, todavia vários parâmetros devem ser observados para que a amostra, depois de seca, seja um pó com propriedades redispersíveis. Freitas & Müller (1998) adicionaram carboidratos (lactose, manitol e trealose) e etanol à suspensão de SLN para evitar a

coalescência das partículas e reduzir a temperatura de secagem da amostra, respectivamente. Estes autores observaram que, quando o processo de liofilização foi utilizado, observou-se agregação das partículas devido à destruição do filme formado pelo tensoativo em torno das nanopartículas e, por esta razão, a utilização de crioprotetores foi recomendada (Zimmermann et al., 2000). Battaglia e col. (2010) descreveram SLN preparadas por coacervação e redispersão após liofilização, devido à presença de estabilizantes poliméricos não iônicos (alcoóis polivinílicos e hidroxipropilmetilcelulose) na formulação, que atuou como agente crioprotetor.

### **1.9. Veiculação de anestésicos locais em SLN/NLC**

Vários estudos têm sido realizados para encapsulação de diferentes fármacos em SLN e NLC, tais como insulina (Fonte et al., 2012), citrato de sildenafil (Elnaggar et al., 2011), anfotericina B (Patel & Patravale, 2011), metotrexato (Battaglia et al., 2011), entre outros (Souto et al., 2007; Müller et al., 2011; Attama, 2011; Attama et al., 2012).

No entanto, ainda existem poucos trabalhos que descrevem a encapsulação de anestésicos locais nesses carreadores coloidais. Zur Mühlen e colaboradores (zur Mühlen et al., 1998) avaliaram a incorporação de fármacos lipofílicos (tetracaína, etomidato e prednisolona) em SLN, que se apresenta como carreadores adequados para essas moléculas, sendo observado um perfil de liberação lento e alta eficiência de encapsulação. Em outro trabalho, os pesquisadores concluíram que SLN (preparadas com palmitato de cetila ou behenato de glicerila estabilizadas com Pluronic F68 e preparadas com trilaurato de glicerol estabilizada com lecitina de soja) associadas à tetracaína e ao etomidato permaneceram fisicamente estáveis durante 3 meses com capacidade de carga suficiente para liberar de forma prolongada aqueles fármacos (Schwarz & Mehnert, 1999).

Uma década mais tarde, objetivando a liberação dérmica, formulações de hidrogéis de lidocaína encapsulada em SLN e NLC (compostas por mistura de behenato de glicerila e diestearato de glicerila acrescida de Miglio<sup>®</sup> 810 para o preparo dos NLC e estabilizadas com Tween<sup>®</sup> 80) foram preparadas e caracterizadas. Os

autores demonstraram a formação de partículas esféricas (caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão) com tamanho e polidispersidade equivalentes e com elevada eficiência de encapsulação. Os autores também evidenciaram (utilizando as técnicas de difração de raios X e DSC) a encapsulação da lidocaína na matriz lipídica, em ambos os tipos de nanopartículas. Tais formulações apresentaram um processo lento de permeação *in vitro* através da pele abdominal de porco, mas com duração prolongada da anestesia local após a aplicação tópica, quando comparada com a formulação comercial de lidocaína (Xylocaine® gel) contendo o dobro da concentração do ativo (Pathak & Nagarsenker, 2009).

Recentemente Puglia et al. (2011) avaliaram os anestésicos locais benzocaína e lidocaína encapsulados em NLC composto por behenato de glicerila e Migliol® 812 estabilizada com Lutrol® F68. Assim como relatado por Pathak & Nagarsenker (2009) as nanopartículas lipídicas exibiram elevada eficiência de encapsulação para ambos ALs avaliados, com redução da taxa de liberação *in vitro* em relação às formulações contendo ALs na fase aquosa. Além disso, testes *in vivo*, utilizando camundongos machos CD1 (ou IRC - não isogênico), mostraram aumento na eficiência da anestesia tópica, com duração prolongada, indicando serem as NLC um carreador promissor para a liberação de anestésicos locais por via dérmica.

### **1.10. Nanopartículas lipídicas: administração por via tópica**

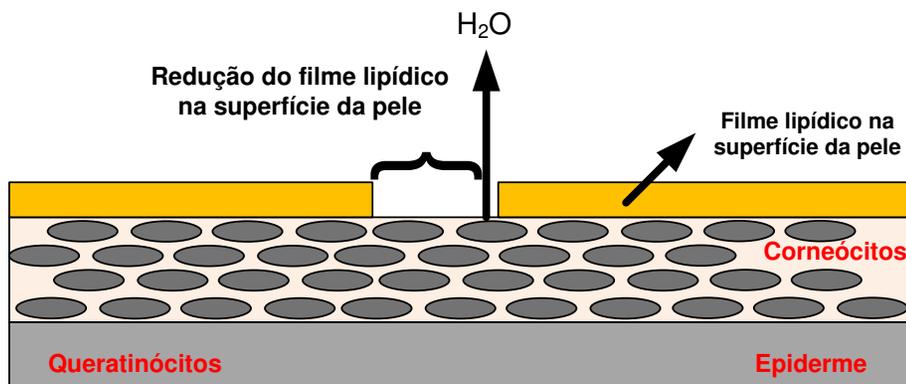
As nanopartículas lipídicas podem ser administradas por diversas vias que incluem oral, parenteral, oftálmica e dérmica. No entanto, na última década, a utilização das SLN como veículo de fármacos pela via tópica tem se destacado frente aos demais carreadores de moléculas bioativas, devido a vantagens quanto à proteção de degradação química dos ativos da formulação, hidratação (oclusão do estrato córneo) e penetração do ativo nas diferentes camadas da pele, além de promover a liberação prolongada com redução da absorção sistêmica e possuir propriedades de fotoproteção contra raios UV. Recentemente um trabalho de revisão foi publicado por Pardeike et al., (2009) dedicado à aplicação dérmica de nanopartículas lipídicas tanto de uso cosmético

quanto farmacêutico. Neste trabalho, as SLN e NLC foram classificadas como sendo “*nanoseguras*” devido, principalmente, às suas características de excelente tolerabilidade, com menor irritabilidade no local de aplicação em relação às formulações convencionais (Müller et al., 2002; Pawar & Babu, 2010; Battaglia & Gallarate, 2012) e baixa nanotoxicidade dérmica (Pardeike et al., 2009).

O efeito oclusivo sobre o estrato córneo ocorre devido ao desenvolvimento de um filme lipídico formado pela deposição das nanopartículas, após aplicação na pele. A adesão é devida a interações hidrofóbicas que ocorrem entre os componentes lipídios da pele e da formulação, promovendo aumento tanto no grau de hidratação, quanto na penetração de fármacos (Müller et al., 2011). A Figura 8 mostra um esquema onde são representadas as propriedades de proteção, reforço e reparação da pele, após a aplicação das nanopartículas lipídicas (SLN/NLC).

Estudos realizados por Wolf et al. (2009) investigaram o potencial das SLN e de dendrímeros (polímeros de estrutura ramificada regular, globular e nanométrico contendo grupos funcionais periféricos) como carreadores de opióides destinados à aplicação tópica, no tratamento de tecidos danificados, e mostraram que ambos os tipos de carreadores (com e sem opióides) foram capazes de estimular o crescimento migratório de queratinócitos (HaCat) em tecidos previamente danificados, sendo maior o crescimento observado com as SLN que com os dendrímeros. Segundo os autores as SLN devem ser consideradas na utilização da redução da dor e cicatrização de feridas.

(A). Tecido cutâneo danificado - estímulo químico físico ou mecânico



(B). Mecanismo de Ação das SLN ou NLC na superfície da pele danificada

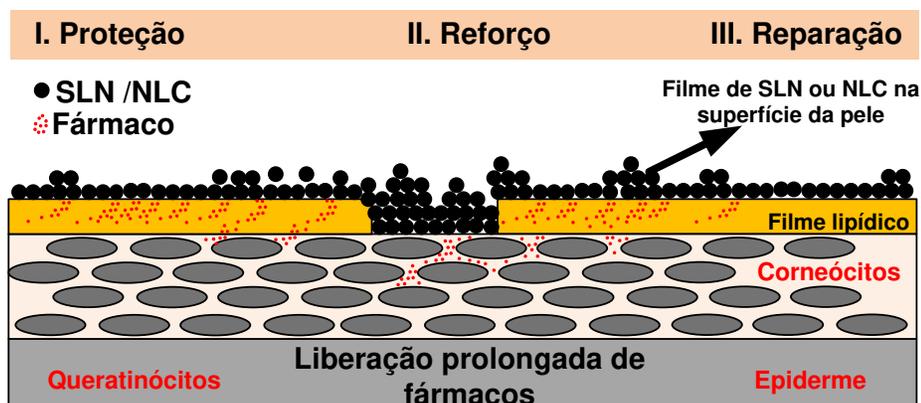


Figura 8. Propriedades das nanopartículas lipídicas na pele. (A) Tecido cutâneo danificado (B) propriedades de proteção, reforço e reparação, promovidos pelas SLN e NLC sobre a pele danificada (modificado de Müller et al., 2011).

Pardeike et al. (2009) revisaram resultados publicados entre 1999-2009 demonstrando que as nanopartículas lipídicas maximizam a penetração de fármacos e elevam o grau de hidratação da pele *in vivo*, em relação às nanoemulsões. Usando RPE *in vivo* com sonda sensível à presença de oxigênio, Krzic et al. (2001) foram capazes de avaliar a ação do nicotinato de benzila veiculado em diferentes formulações tópicas sobre a oxigenação da pele (a oxigenação cutânea é um parâmetro importante

especialmente quando se deseja maximizar o efeito de radiação ionizante em tumores) após aplicação tópica. Os resultados mostraram que as SLN dispersas em gel hidrofílico foram mais eficientes na oxigenação da pele que lipossomas dispersos no mesmo gel hidrofílico, seguidas das formulações onde o fármaco estava disperso no referido gel hidrofílico, pomada hidrofóbica e creme hidrofóbico. Segundo os autores, ocorreu sinergismo entre as SLN e o veículo hidrofílico, causando aumento da oxigenação cutânea. A encapsulação do nicotinato de benzila em SLN favoreceu a liberação prolongada do fármaco na pele, de forma mais eficiente que a encapsulação com lipossomas. O veículo hidrofílico no qual as nanopartículas foram dispersas, composto principalmente por água e glicerol, foi capaz de alterar a estrutura do estrato córneo (por alteração de domínios lipofílicos e/ou queratinizados) permitindo, assim, a elevação do fluxo do fármaco sobre a pele.

### ***1.11. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo SLN/NLC***

O desenvolvimento de formulações tópicas contendo SLN e NLC tem sido realizado com a incorporação desses carreadores em bases hidrofílicas, hidrofóbicas ou com a produção de géis ou cremes contendo nanopartículas lipídicas (Souto et al., 2007). A Figura 9 apresenta um esquema da dispersão das nanopartículas em géis ou cremes (O/A).

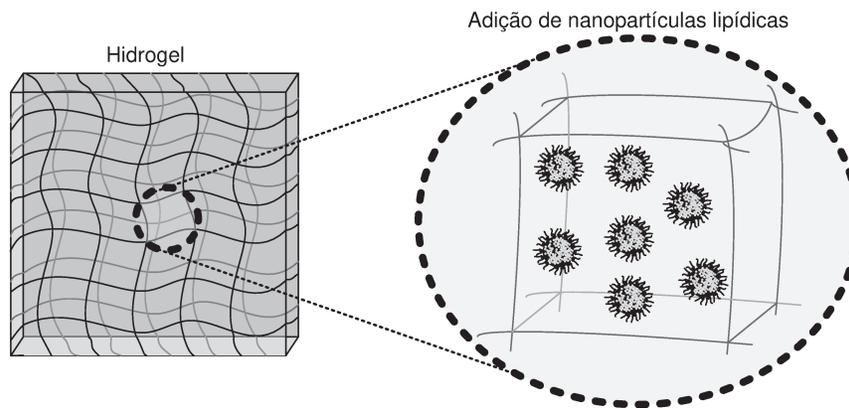


Figura 9. Representação esquemática de SLN/NLC em matrizes formadas por hidrogéis (adaptado Souto et al., 2007).

As bases hidrofílicas incluem sistemas monofásicos (hidrogéis) ou bifásicos (cremes e loções óleo/água) (Mei et al., 2005; Joshi & Patravale, 2006). A incorporação das SLN/NLC em hidrogéis ou em cremes é feita misturando-se os componentes do gel a uma dispersão concentrada de nanopartículas, antes do processo de gelificação dos componentes do hidrogel e durante ou após o preparo dos cremes. A presença de eletrólitos, por exemplo, em géis preparados com poliacrilatos, pode influenciar negativamente o sistema carreador, por desestabilização e, conseqüente agregação devido à redução do potencial zeta das partículas. A adição de agentes neutralizantes tais como trometamina e 2 -hidroxipropil-etilenodiamina, pode minimizar este problema (Jenning et al., 2000b).

Sistemas supersaturados podem ser desenvolvidos quando o fármaco está em ambas fases (encapsulado nas nanopartículas ou disperso no gel ou creme). O princípio da supersaturação em microemulsões tópicas visa maximizar a absorção do fármaco na pele. Microemulsões saturadas, quando em contato com a pele, atuam difundindo a água presente nas camadas mais superficiais da pele para o local de aplicação do produto, promovendo a elevação do conteúdo de água da formulação com conseqüente aumento da solubilidade do fármaco e absorção na pele. Similarmente, é viável o desenvolvimento de formulações contendo nanopartículas lipídicas dispersas

em bases semi-sólidas já saturadas com fármacos. Durante a estocagem, o fármaco permanece na matriz lipídica e após a aplicação sobre a pele, ocorrem transformações nas moléculas lipídicas para uma forma mais ordenada com a expulsão do ativo da matriz de lipídio. O fármaco é expelido dentro do veículo semi-sólido (creme ou hidrogel hidrofílico) já saturado com o ativo, levando à supersaturação e penetração na pele (Souto et al., 2007). O efeito oclusivo sobre a pele foi determinado por Wissing et al. (2001), sendo observado em dispersões lipídicas com 50% de conteúdo sólido.

A principal vantagem de dispersar SLN e NLC em bases hidrofóbicas é a possibilidade da redução da concentração do conteúdo lipídico das nanopartículas com eficiente oclusão na pele. A utilização das bases hidrofóbicas é adequada, se o objetivo é a obtenção do efeito tópico evitando exposição sistêmica do fármaco (Souto et al., 2007).

Assim, o preparo e a caracterização de SLN e NLC destinados à encapsulação da DBC para aplicação tópica se justifica, por seu caráter inovador e com pontencial para originar um produto farmacêutico promissor, de liberação prolongada da dibucaína para anestesia dérmica.



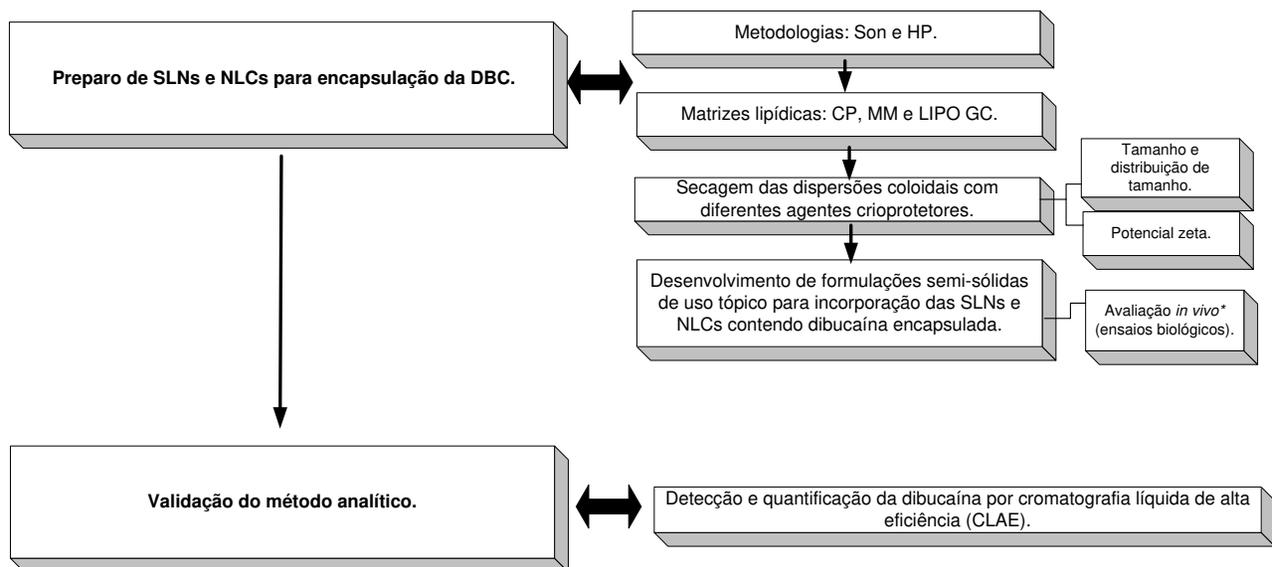
## 2. Objetivos

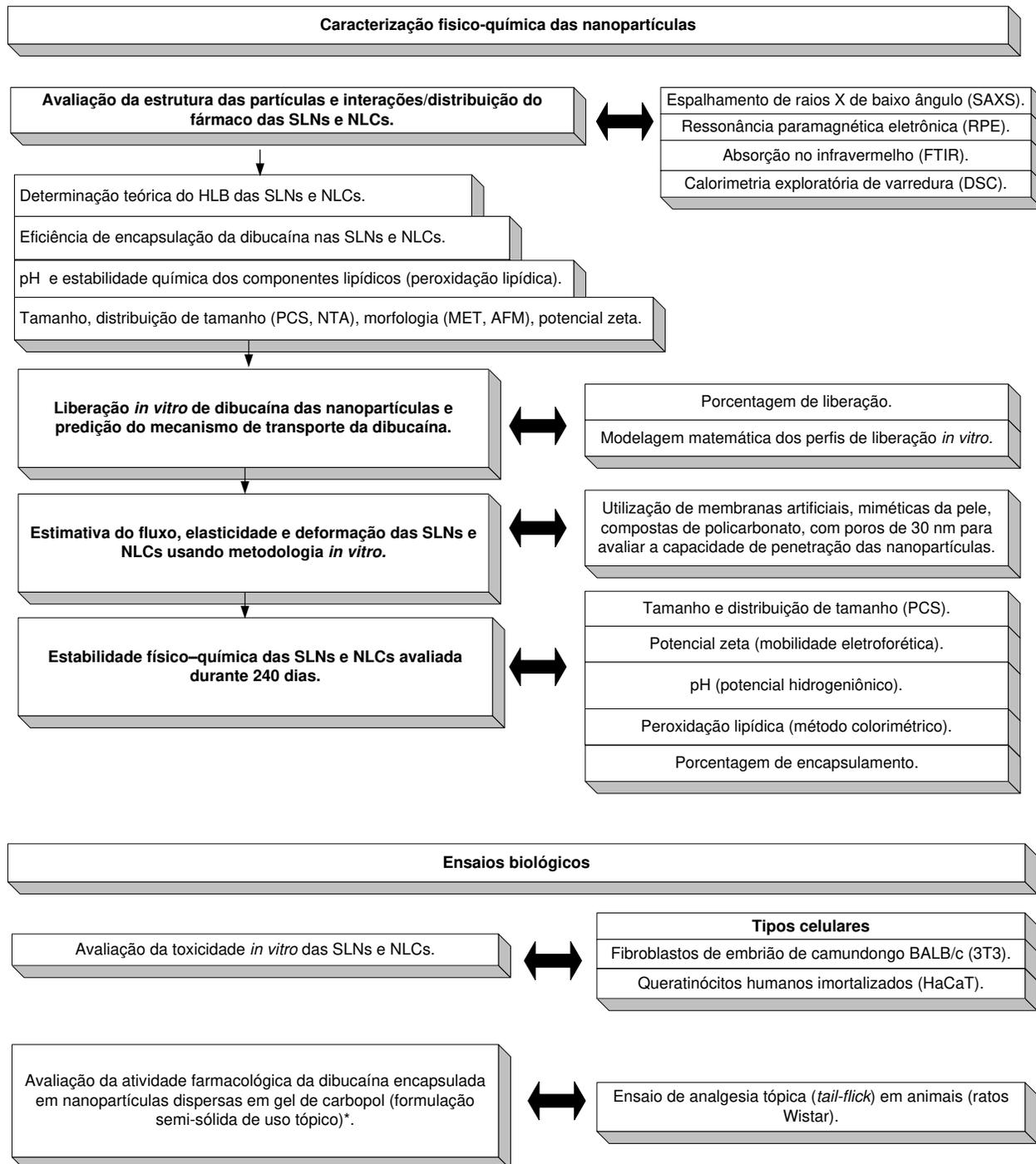
### 2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) contendo DBC. A encapsulação deste anestésico objetivou prolongar a ação terapêutica e reduzir seus efeitos tóxicos.

### 2.2. Objetivos específicos

Para alcançar esse objetivo as seguintes etapas foram realizadas:





### **3. Materiais**

#### **3.1. Reagentes**

- Miristato de Miristila, MM 424,74 g.mol<sup>-1</sup> (Croda, Brasil),
- Palmitato de Cetila, MM 480,85 g.mol<sup>-1</sup> (Dhaymers Química Fina, Brasil),
- Liponate GC (Lipo do Brasil Ltda, Brasil),
- Dibucaína, MM 343,46 g.mol<sup>-1</sup> (Sigma Chem. Co., EUA),
- Pluronic F68 (Sigma Chem. Co., EUA),
- D (+) Maltose, MM 360,31 g.mol<sup>-1</sup> (Reagen Quimibras, Brasil),
- Trealose, MM 342,296 g.mol<sup>-1</sup> (Sigma Chem. Co., EUA),
- Ácido 5-doxil esteárico (5-SASL) (Sigma Chem. Co., EUA),
- Éster metílico do 5-doxil ácido esteárico (5-MeSL) (Sigma Chem. Co., EUA),
- Acetato de Uranila (Sigma-Aldrich, EUA),
- Acetona (Labsynth Ltda, Brasil),
- DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Nutricell, Brasil),
- Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil),
- Penicilina (Nutricell, Brasil),
- Estreptomicina (Nutricell, Brasil),
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma, EUA),
- Etanol (Labsynth Ltda, Brasil),
- Tripsina EDTA (Sigma Chem. Co., EUA),
- Glicerina (Galena Química e Farmacêutica, Brasil),
- Metilparabeno (Nipagin, Galena Química e Farmacêutica, Brasil),
- Polímero Carboxivinílico (Carbopol Ultrez, Galena Quím. e Farmacêutica, Brasil),
- Propilenoglicol (Galena Química e Farmacêutica, Brasil),
- Trietanolamina (Labsynth Ltda, Brasil),
- Tetraetoxipropano (Sigma Chem. Co., EUA),
- Ácido acético glacial (Labsynth Ltda, Brasil),

- Ácido clorídrico (Dinâmica, Brasil),
- Clorofórmio (Merk, EUA),
- Cloreto férrico (Labsynth Ltda, Brasil),
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma Chem. Co., EUA),
- Glicina (Sigma Chem. Co., EUA),
- Butil-idroxi-tolueno (Sigma Chem. Co., EUA),
- Dodecilsulfato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA),
- Acetonitrila P.A. (J. T. Baker, EUA),
- Trietilamina (Ecriba, Brasil),
- Ácido ortofosfórico (Labsynth Ltda, Brasil),
- Dimetilsufóxido (Sigma Chem. Co., EUA),
- Solução de tampão carbonato de sódio (5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 10,0) (Sigma Chem. Co., EUA),
- Solução de tampão fosfato de sódio (1,5 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4) (Sigma Chem. Co., EUA).

### **3.2. Equipamentos**

- Ultraturrax (T18 basic, IKA Work, Brasil),
- Homogeneizador de alta pressão (GEA Niro Soavi, Itália),
- Ultra-sonicador de ponta (Vibracell, Sonics e Materials Inc, EUA), 20 kHz,
- Analisador de partículas modelo ZetaSizer (Malvern Instruments, Reino Unido),
- Analisador de partículas modelo NanoSight LM10-HS (NanoSight, Reino Unido),
- Agitador de tubos (Phoenix<sup>®</sup> AP56, Brasil),
- Aparelho para teste de *tail-flick*, com lâmpada projetora de 150W (Onda Científica Ltda., Brasil),
- CLAE (Varian<sup>®</sup> Pro Star, EUA),
- Centrífuga (MC 12 V, Thermo Scientific Sorval, EUA),
- Centrifuga tubos falcon (Quimis<sup>®</sup>, Brasil),
- Microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss – LEO 906, Alemanha),

- Agitador de tubos AP 56 (Phoenix<sup>®</sup>, Brasil),
- Banho de ultrassom (Thornton T14, Brasil),
- Banho – aquecimento e resfriamento (Quimis<sup>®</sup>, Brasil),
- Medidor de pH/Ions (Modelo 300M, Analyser Instrumentação Analítica, Brasil),
- Microscópio óptico (Eclipse TS100, Nilkon, Japão),
- Estufa (REVCO – incubadora de CO<sub>2</sub>, EUA),
- Liofilizador (Labconco, Freeze dry System/Freezone 4,5, EUA),
- Espectrofotometro (Varian, Modelo Cary 5, EUA),
- Espectrofotômetro (Biotek EL x 800, EUA),
- Espectrofotometro de infravermelho (PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR, EUA),
- Espectrofotometro de massas (Ion-trap: marca Thermo Scientific, modelo: LCQ DECA XP MAX, EUA),
- Equipamento de DSC (DSC Q100 V9.9 Build 303, TA instruments, EUA),
- Equipamento RPE (Bruker BVT-2000, Alemanha),
- Equipamento SAXS (Nanostar, Bruker, Alemanha).

### **3.3. Outros materiais**

- Coluna C18 (Merck KGaA, LiChroCART<sup>®</sup> 100 RP-18, EUA),
- Filtros com poros de 10 kDa (MILEX<sup>®</sup> – Microcon, EUA),
- Filtros de 0,45 µm (MILEX<sup>®</sup>, EUA).

### **3.4. Animais**

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos, machos e com peso variando entre 250 e 350 g foram utilizados para a avaliação de atividade analgésica das formulações. 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 ± 3°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 pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEA)-IB UNICAMP (protocolo nº 2464 - 1) (Anexo V).

## **4. Métodos**

### **4.1. Solubilidade da dibucaína**

A solubilidade da dibucaína foi avaliada em soluções de tampões carbonato (5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 10,0) e fosfato (1,5 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4). A amostra adicionada (dibucaína, 5 mmol.L<sup>-1</sup>) em tampão carbonato foi mantida em banho de ultrassom por 80 minutos e submetida, posteriormente, à centrifugação durante 20 minutos (3.600 x g). Para a realização dos testes no pH fisiológico do sangue (pH 7,4), foi utilizado o cloridrato de dibucaína (1,5 mmol.L<sup>-1</sup>), mantido em banho de ultrassom por apenas 5 minutos e, também, submetido à centrifugação nas mesmas condições da amostra anterior (20 minutos, 3.600 x g).

Logo após a centrifugação das amostras foram realizadas diluições sucessivas utilizando o sobrenadante até atingir as concentrações de 0,03 a 0,21 mmol.L<sup>-1</sup> para o tampão carbonato pH 10 e de 0,003 a 1,100 mol.L<sup>-1</sup> para ensaios realizados em tampão fosfato, pH 7,4. A concentração de DBC no sobrenadante foram avaliados utilizando por espectrofotometria U.V. (Varian, Modelo Cary 50), no comprimento de onda de máxima absorção da DBC (327 nm) (de Paula & Schreier, 1995).

### **4.2. Quantificação da dibucaína por CLAE**

A dibucaína foi quantificada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Resolução), utilizando o equipamento Varian<sup>®</sup> Pro Star. A metodologia analítica por CLAE para quantificação da dibucaína (forma base) foi aplicada de acordo com Elsayed, 2007, com modificações, visando à obtenção de um pico simétrico e dentro dos padrões exigidos pela Farmacopeia Americana (USP, 2009). A Tabela 7 mostra as condições empregadas no desenvolvimento da metodologia para determinação do teor de dibucaína nas SLN e NLC (Barbosa et al., 2013c).

Tabela 7. Condições cromatográficas para quantificação da dibucaína base (Barbosa et al., 2013c).

Amostra	Dibucaína base dissolvida em solução aquosa contendo 0,1% de Dimetilsufóxido (DMSO). A solução estoque foi preparada na concentração de $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , com sucessivas diluições até 1,5, 4,5, 9,0, 15, 0, 30,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ou seja 0,44, 1,31, 2,62, 4,37 e 8,73 $\text{nmol.L}^{-1}$ ). O DMSO, aqui, foi utilizado para agilizar o processo de dissolução da DBC.
Fase móvel	Mistura de acetonitrila e tampão fosfato de trietilamina (pH 2,3, 0,04 $\text{mol.L}^{-1}$ , v/v) (55:45), v/v. O tampão foi preparado adicionando 4,61 g de ácido ortofosfórico (85%, p/p) e 3,57 g de trietilamina para 900 mL de água, seguindo o ajuste do pH para 2,3 com ácido ortofosfórico. Finalmente, a fase móvel foi completada com água para o volume final de 1000 mL e, posteriormente filtrada usando membrana de 0,45 $\mu\text{m}$ (Millex <sup>®</sup> ) e degaseificada antes de sua utilização.
Injeção	30 $\mu\text{L}$
Fluxo	1 $\text{mL.min}^{-1}$
Temperatura	35 °C
Detector	247 nm
Coluna	Merck KGaA, LiChroCART <sup>®</sup> 100 RP-18, C18 fase reversa, 5 $\mu\text{m}$ 110 Å, 125 x 4 mm.

A curva analítica foi construída tomando-se concentrações crescentes de DBC entre 1,5 a 30,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , conforme previsto na Resolução nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasileira (ANVISA, 2003).

### **4.3. Validação da metodologia analítica**

A validação de métodos analíticos é importante, pois garante a confiabilidade dos dados experimentais e é o alvo de vários artigos (Ribani et al., 2004; Moraes et al., 2008; Salas et al., 2008; Grillo et al., 2009), nos quais há uma completa definição do tema, assim como parâmetros, procedimentos e estratégias de validação (Lanças, 2004).

O Guia para validação de métodos analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e o International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Human Use (ICH, 2005) foram utilizados no intuito de direcionar a validação do método de quantificação da dibucaína por CLAE.

Os parâmetros envolvidos na validação da metodologia analítica utilizada nesse trabalho foram: precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção, especificidade, linearidade, intervalo e sensibilidade (Barbosa et al., 2013c).

#### **4.3.1. Especificidade**

A especificidade foi avaliada para assegurar que o método possuía a capacidade de medir exatamente um composto quando outros estivessem presentes (por exemplo: impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz) (ANVISA, 2003). Foi utilizado o meio dispersante (tampão fosfato, 4 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4) com adição de 20% de etanol na determinação da porcentagem de liberação da DBC das SLN e NLC para avaliar a especificidade do método analítico.

#### **4.3.2. Linearidade**

A linearidade do método foi determinada no intuito de demonstrar que os resultados obtidos eram proporcionais à concentração do analito na amostra, no intervalo especificado. Cinco concentrações distintas, realizadas em triplicata e em três dias consecutivos, foram utilizadas para a construção da curva analítica, sendo o

cálculo de regressão linear feito pelo método dos mínimos quadrados (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

#### **4.3.3. Intervalo**

A faixa entre os limites de quantificação utilizados na construção da curva analítica é denominada intervalo; este é derivado da avaliação da linearidade, sendo dependente da aplicação desejada (ANVISA, 2003; ICH, 2005). O Intervalo especificado foi determinado pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas.

#### **4.3.4. Precisão**

A precisão, expressa pela Equação 1, avalia a proximidade dos resultados gerados em vários experimentos de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Equação 1

A precisão de um método analítico pode ser expressa como desvio padrão (coeficiente de variação, CV) de várias medidas, onde DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. Não se admitem valores superiores a 5%, que deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, com a concentração do analito na amostra, com o tipo de matriz e a finalidade do método.

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

#### **4.3.5. Exatidão**

A proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro define a exatidão de um método analítico. Após o estabelecimento da linearidade e da especificidade do método analítico, determina-se a sua exatidão, a partir de, no mínimo, nove determinações, sendo contemplado o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas de cada. A exatidão (E) foi obtida usando-se a Equação 2, a qual relaciona a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica (ANVISA, 2003),

$$E = \frac{CMD}{CT} \times 100$$

Equação 2

onde, CT é a concentração teórica e CMD é a concentração média determinada.

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

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados usando-se as Equações 3 e 4, respectivamente.

O LD refere-se à menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

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

Equação 3

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

Equação 4

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

Através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, pode-se mensurar o limite de detecção. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra a ser determinada com precisão e exatidão admissíveis sob as condições experimentais já determinadas.

#### ***4.4. Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas e dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo dibucaína***

##### ***4.4.1. Nanopartículas lipídicas sólidas***

Dois tipos de lipídios sólidos à temperatura ambiente foram avaliados como componentes estruturais das SLN: palmitato de cetila e miristato de miristila, gentilmente cedidos pela Dhymers Química Fina e Croda (ambas em São Paulo, Brasil), respectivamente, e comercialmente disponíveis como Palmitato de cetila e Crodamol MM. Tanto o palmitato de cetila como o miristato de miristila não possuem toxicidade sistêmica, nenhuma sensibilização ou fotosensibilização como já referido (item 1.5.2.1). Estudos realizados por Marcato et al. 2008 e Ridolfi, 2011 indicaram e nortearam a viabilidade na preparação das nanopartículas lipídicas contendo CP e MM tendo sido necessárias adaptações nas composições.

A obtenção das SLN foi realizada utilizando homogeneização a alta-pressão a quente (Marcato, 2009; Üner, 2006) ou sonicação, como mostram, esquematicamente, as Figuras 10 e 11. Em ambas, as técnicas de homogeneização o lipídio (MM ou CP) foi aquecido 10°C acima da sua temperatura de fusão (39 e 54°C para MM e CP, respectivamente (Teeranachaideekul et al., 2007; Aydın & Okutan, 2011)). Logo após, 0,3 g de DBC foram adicionadas e misturadas por agitação magnética até completa solubilização na fase oleosa (6 g). Posteriormente, para a formação da pré-emulsão (O/A), a fase oleosa foi adicionada à 300 mL da solução aquosa de Pluronic F68 (1,5 g, 0,5%), na mesma temperatura do lipídio, sob agitação de 10.000 rpm por 3 minutos em Ultra-Turrax (Ultra-turrax® T18). A pré-emulsão formada e mantida sob aquecimento foi

rapidamente transferida para equipamento de HP (Panda 2k da Niro Soavi, Itália) ou de sonicação (Vibracell, Sonics e Materials Inc). A concentração de DBC usada foi a máxima solúvel na matriz lipídica, correspondente a 5% (m/m, DBC : lipídio).

O processo de HP foi realizado com dois estágios de pressão: 1º estágio com pressão de 600 bar e 2º estágio com pressão de 60 bar (geralmente 10% do valor do 1º estágio). A pré-emulsão foi submetida a três ciclos consecutivos no HP. Ao final do último ciclo, a nanoemulsão formada foi imersa em um banho de gelo até alcançar a temperatura de 25 °C, para formação das nanopartículas lipídicas sólidas (Schwarz et al., 1994; Liedtke et al., 2000; Üner, 2006; Mitri et al., 2011).

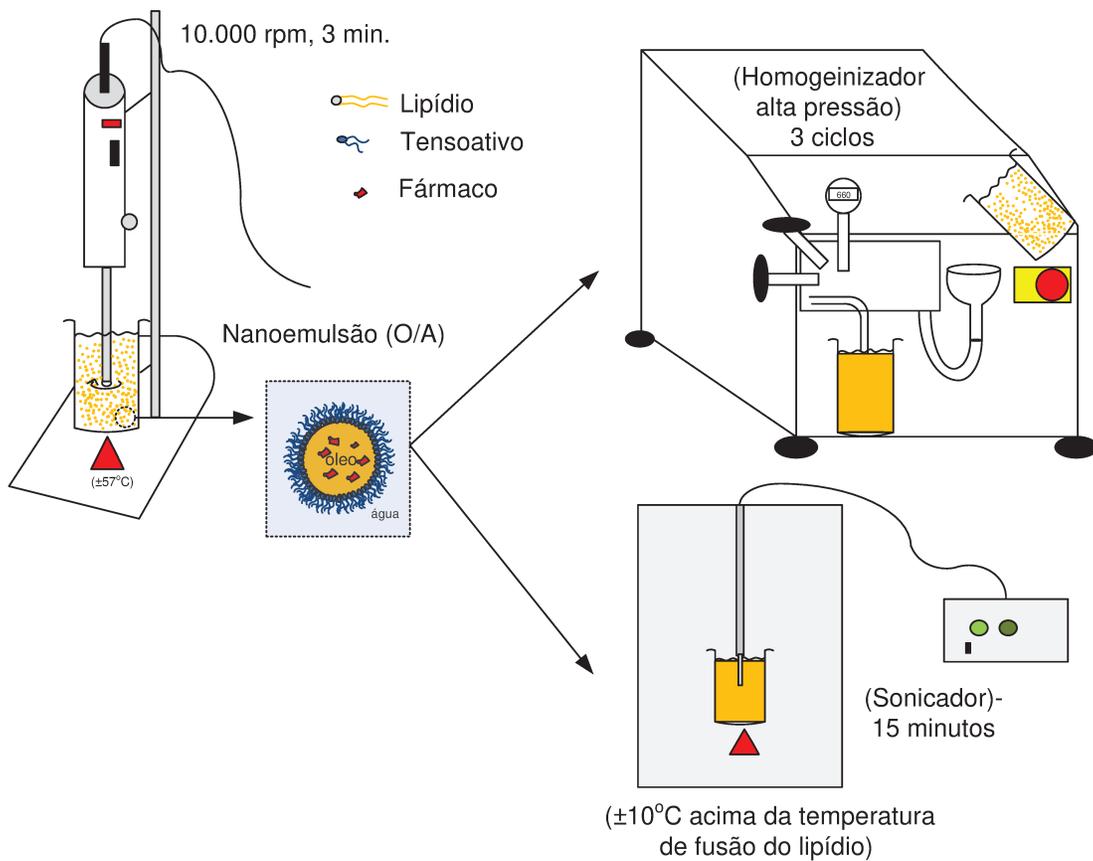


Figura 10. Esquema das metodologias empregadas para a preparação das SLN e NLC por alta pressão de homogeneização e por ultrasonicação (Barbosa et al., 2013a).

No processo de homogeneização usando sonicação, a pré-emulsão foi sonicada utilizando um micro-tip de titânio (Vibracell, Sonics e Materials Inc Danbury, EUA) com potência de 50 W, 20 kHz de frequência nominal em ciclos de 30 segundos (ligado/desligado) durante 15 minutos. A amostra foi mantida sob aquecimento (10 °C acima da temperatura de fusão dos respectivos lipídios) durante todo o processo. Passados os 15 minutos, a nanoemulsão foi rapidamente resfriada em banho de gelo (assim como as amostras preparadas por HP) até atingir 25 °C.

As quantidades de cada componente utilizado no preparo das amostras contendo SLN estão descritos na Tabela 8. Ao final das preparações, todas as amostras de SLN foram armazenadas em frascos de vidro e mantidas à 4 °C para caracterizações posteriores.

Tabela 8. Composição das SLN preparadas à alta pressão de homogeneização (HP) e sonicação (Son), utilizando palmitato de cetila (CP) e miristato de miristila (MM) como lipídios estruturais.

<b>Amostra</b>	<b>MM ou CP (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pluronic F68 (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>DBC (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>
SLN <sub>MM</sub>	20	5	-
SLN <sub>MM</sub> DBC	20	5	1
SLN <sub>CP</sub>	20	5	-
SLN <sub>CP</sub> DBC	20	5	1

#### **4.4.2. Carreadores lipídicos nanoestruturados**

Os NLC foram preparados usando a mesma metodologia descrita na preparação das SLN (Figura 11) com algumas modificações em relação aos componentes adicionados às amostras. Para tanto, além do miristato de miristila, foi também adicionado Liponate GC (ou LIPOGC, que consiste em uma mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, lipídio líquido à temperatura ambiente e cedido pela Lipo<sup>®</sup>, Lipo do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para a formação da fase oleosa da

formulação. Ocorreu também a adição de diferentes concentrações de estabilizante coloidal, Pluronic F68 (0,5 a 1,5%, m/v). A quantidade de cada componente utilizado no preparo das amostras contendo NLC está descrito na Tabela 9. Ao final das preparações, todas as amostras de NLC foram armazenadas em frascos de vidro e mantidas à 4 °C para caracterizações posteriores.

A Tabela 10 apresenta os componentes químicos utilizados para a preparação das SLN e NLC com suas respectivas massas molares, temperaturas de fusão, concentrações utilizadas em cada amostra e suas estruturas químicas.

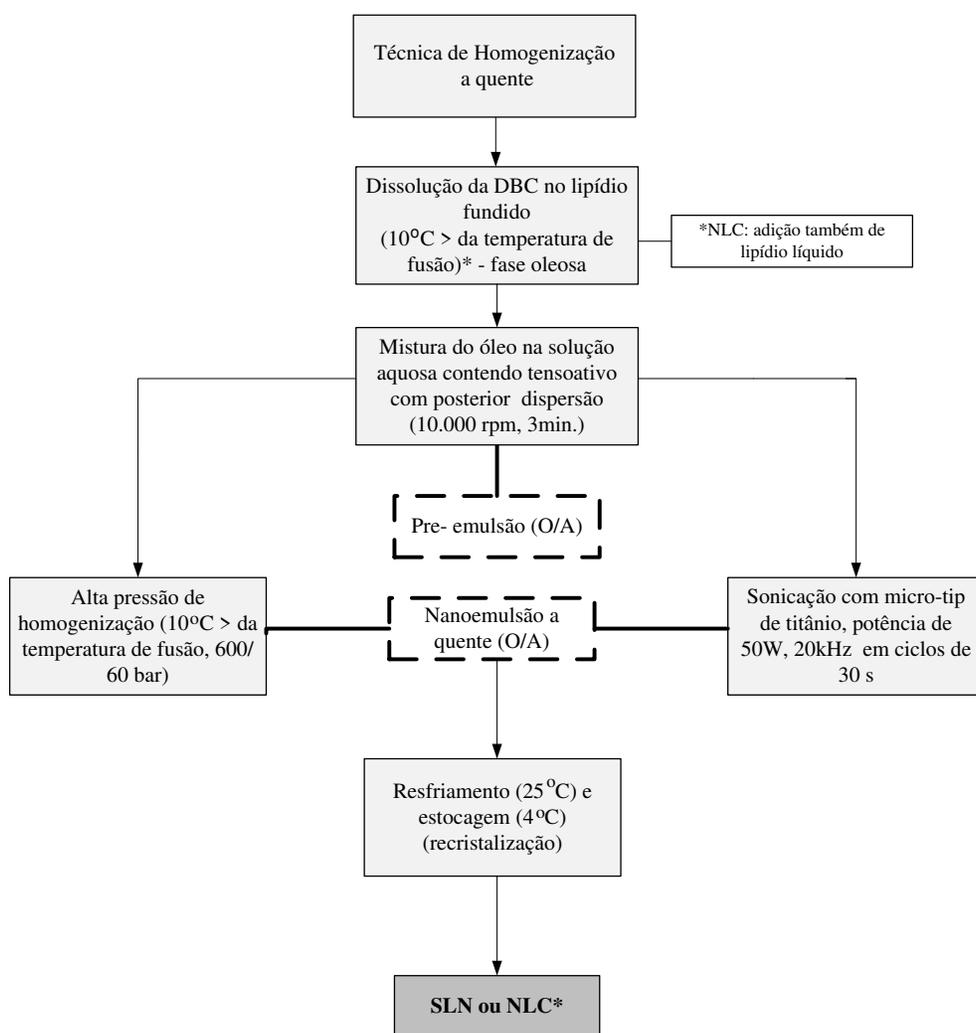


Figura 11. Fluxograma da metodologia de preparação das SLN e NLC por homogeneização à alta pressão a quente (HP) e sonicação (Son).

Tabela 9. Composição das NLC preparadas por alta pressão de homogeneização (HP) e sonicação (Son), utilizando miristato de miristila (MM) como lipídio estrutural, LIPOGC como lipídio líquido e Pluronic F68 como estabilizante coloidal.

<b>Amostra*</b>	<b>MM (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LIPOGC (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pluronic F68 (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>DBC (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>
NLC <sub>MM</sub>	20	0,3	5	-
	20	0,3	10	-
	20	0,3	15	-
NLC <sub>MM</sub> DBC	20	0,3	5	1
	20	0,3	10	1
	20	0,3	15	1

Tabela 10. Componentes químicos utilizados para a preparação das SLN e NLC.

	<b>MM (g.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tf (°C)</b>	<b>(mmol.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Estrutura química</b>
DBC	343,46	63,0	2,9	
MM	424,74	39,0	47,0	
CP	480,85	47,0	42,0	
PF68*	8358	80,0	0,02 (SLN) 0,06 (NLC)	

Conc.: concentração, \* x = 78, y = 30, z = 78. Temperatura de fusão=Tf

#### **4.4.3. Liofilização das nanopartículas**

A secagem das amostras em suspensão (SLN e NLC) foi realizada submetendo as amostras ao contato com gelo seco/etanol com posterior liofilização (Labconco, Freeze dry System / Freezone 4,5) por 24 horas.

A agregação das partículas foi minimizada com a adição de crioprotetores antes do processo de congelamento (Schwarz & Mehnert, 1997; Mehnert & Mäder, 2012). Para tanto, foram avaliados dois tipos de açúcares, maltose e trealose, a 30% (m/v, massa de crioprotetor/volume de suspensão). Antes e após o processo de liofilização, o diâmetro, polidispersidade e o potencial zeta das nanopartículas foram medidos (de acordo com os itens 4.5.2 e 4.5.3) ressuspensando a amostra em água pura (sistema Milli-Q).

#### **4.5. Caracterização físico-química das nanopartículas (SLN e NLC)**

##### **4.5.1. Determinação teórica do balanço hidrófilo-lipofilo (HLB) das formulações**

Emulsão é um sistema coloidal termodinamicamente instável e, geralmente, envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como, fase aquosa, fase oleosa e tensoativo, quando necessário, o co-tensoativo. O tensoativo e o co-tensoativo são também conhecidos como agentes emulsificantes, os quais conferem homogeneidade e estabilidade às emulsões, pois reduzem a tensão interfacial entre as fases imiscíveis do sistema (Oliveira et al., 2004; Macedo et al., 2006). Como já referido no item 4.4, uma das etapas na formação das SLN e NLC envolve o preparo de uma pré-emulsão.

A metodologia de HLB auxilia no cálculo de quantidades relativas de agentes emulsificantes necessários à produção de emulsões fisicamente mais estáveis. Para cada tensoativo é calculado um valor numérico de HLB, o qual representa as proporções relativas das partes lipofílicas e hidrofílicas da molécula. As porções lipofílicas são cadeias de hidrocarbonetos saturadas, insaturadas ou sistemas de anéis

aromáticos e a região hidrofílica pode ser aniônica, catiônica ou não iônica (Aulton, 2001).

O valor teórico requerido de HLB das formulações, de acordo com a composição dos lipídios (Tabela 11) foi calculado conforme a Equação 5 (Aulton, 2001):

$$HLB = \frac{\text{concentração lipídica} \times \text{HLB do lipídio}}{100}$$

Equação 5

Tabela 11. Composição lipídica das formulações, em porcentagem (%), massa do componente lipídio/massa total da fase lipídica).

<b>Amostra</b>	<b>MM</b>	<b>CP</b>	<b>LIPOGC</b>
SLN <sub>MM</sub>	100	-	-
SLN <sub>CP</sub>	-	100	-
NLC <sub>MM</sub>	98,52	-	1,48

O valor do HLB dos lipídios, conforme dados dos fabricantes foi de 9, 10 e 10, para MM, CP e LIPOGC, respectivamente, mas pode também ser calculado pelo método de Davies, baseando-se na atribuição de valores para grupamentos presentes na molécula, na soma desses valores e na aplicação dos mesmos em Equação que fornece o HLB (Aulton, 2001).

#### **4.5.2. Tamanho e distribuição (polidispersidade) das nanopartículas**

A espectroscopia de correlação de fotóns (do inglês *Photon Correlation Spectroscopy*, PCS), foi utilizada para determinar o diâmetro hidrodinâmico e a distribuição de tamanho (PDI) das nanopartículas, utilizando-se o equipamento Nano ZS Zetasizer (Malvern<sup>®</sup>, instruments, Reino Unido) acoplado a um sistema de aquisição

de dados. O software utilizado para coletar e analisar os dados foi o DTS, versão 6.01 Malvern®.

O movimento Browniano, próprio de suspensões coloidais, é detectado pelo feixe de luz (laser He-Ne, 633 nm) que o equipamento emite sobre a amostra. Para tanto, parte do feixe de luz é disperso e o remanescente é transmitido através da amostra. A luz dispersa, derivada de um campo elétrico e associada à luz incidente, varia (devido ao movimento Browniano) conforme o tamanho das partículas. Através da determinação do coeficiente de difusão, também relacionado ao movimento Browniano das partículas no meio, consegue-se calcular o diâmetro médio equivalente ao de uma esfera utilizando a equação de Stokes–Einstein (Equação 6) (Tscharnuter, 2006).

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Equação 6

onde:  $k$  = constante de Boltzmann,  $T$  = temperatura absoluta,  $R$  = raio das vesículas e  $\eta$  = viscosidade da solução dispersante.

As medidas foram feitas com ajuste automático do ângulo em relação ao feixe de luz incidente ( $163^\circ$ ), a  $25^\circ\text{C}$ . As suspensões contendo as nanopartículas foram diluídas em água pura (sistema milli-Q) (1:100, amostra: água, v/v), minutos antes de cada medida. As medidas foram feitas em triplicata e os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.5.3. Potencial zeta**

A carga superficial das partículas é um dos fatores que determina a estabilidade física das mesmas. Quanto maior a repulsão eletrostática entre as partículas, maior é a estabilidade física da formulação. A quantificação da carga superficial das partículas, também denominada potencial zeta, é medida comumente através da mobilidade eletroforética das partículas em um campo elétrico (Mishra et al., 2009).

A Equação 7 relaciona os parâmetros utilizados para o cálculo do potencial zeta (Remington, 2006).

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta}$$

Equação 7

onde  $U_E$  = mobilidade eletroforética,  $\varepsilon$  é constante dielétrica,  $z$ , o potencial zeta,  $f(\kappa a)$  é a função de Henry e  $\eta$  representa a viscosidade do meio.

A Figura 12 mostra uma representação esquemática da medida do potencial zeta das partículas. Como pode ser observado, há duas regiões distintas em torno da partícula, uma região interna chamada de camada de Stern, onde os íons são fortemente ligados à partícula, e outra mais externa (ou também chamada difusa), na qual os íons são menos firmemente associados. A medida do potencial zeta é dada pela carga existente na superfície de cisalhamento hidrodinâmico (ou no plano de *splinning*). A magnitude do potencial zeta dá uma indicação da potencial estabilidade do sistema coloidal. Partículas com potenciais zeta mais próximos de + 30 mV ou - 30 mV são normalmente consideradas estáveis (Remington, 2006; Mishra et al., 2009). No entanto cada sistema deve ser individualmente avaliado.

As medidas de potencial zeta foram realizadas diluindo-se 100 vezes (v/v) a dispersão de nanopartículas com uma solução de NaCl (0,1 mmol.L<sup>-1</sup>) para propiciar um meio eletrolítico e garantir a formação de uma dupla camada elétrica compacta. As análises foram feitas em equipamento ZetaSizer (Malvern<sup>®</sup> Instruments, Reino Unido), à temperatura de 25 °C, em cubetas de poliestireno (10 mm de caminho óptico) (Marcato et al., 2008). As medidas foram feitas em triplicata e os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

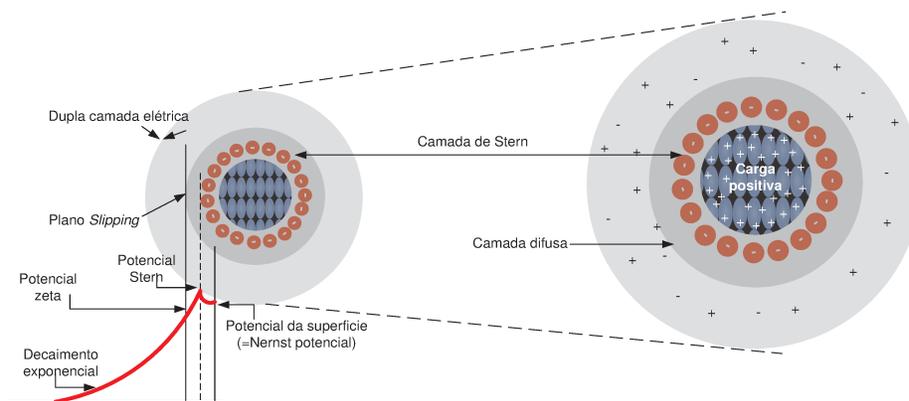


Figura 12. Representação esquemática de uma partícula com carga elétrica positiva, camada de Stern com íons negativos e camada difusa, ambas circundando a partícula. Decaimento exponencial do potencial zeta com a distância entre a região medida e a superfície da partícula.

#### 4.5.4. Análise de rastreamento de nanopartículas

A análise de rastreamento das nanopartículas (ou *nanoparticle tracking analysis*, NTA) é uma técnica que, assim como o PCS, baseia-se na dispersão de luz, no entanto, analisa individualmente o movimento Browniano de cada nanopartícula presente na dispersão (tempo real usando câmara CCD, do inglês *charge-coupled device*) (Filipe et al., 2010).

O NTA foi feito em equipamento NanoSight LM20 (NanoSight, Reino Unido) com software NTA 2,0 Analytical (NanoSight, Reino Unido) (Figura 13) sendo utilizado para caracterizar o tamanho, distribuição, intensidade e concentração das nanopartículas, além de fornecer informações visuais das mesmas (Filipe et al., 2010; Hoffmeister et al., 2012).

As medidas foram realizadas após diluição das amostras em água Mili-Q (1:5.000, v/v). Em seguida, as amostras foram introduzidas no interior do porta amostra por meio de uma seringa esterilizada, até seu total preenchimento (0,5 mL). A análise foi realizada utilizando um feixe de laser de diodo ( $\lambda = 635 \text{ nm}$ ) (Bender et al., 2012;

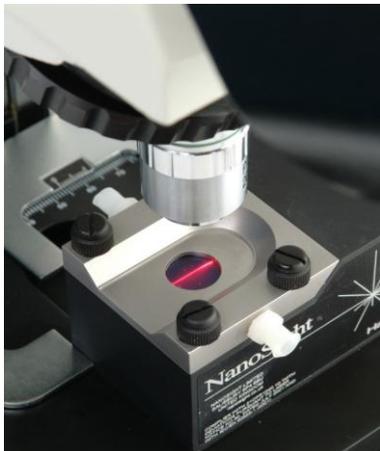
Hoffmeister et al., 2012). Cada vídeo foi obtido durante 10 segundos à temperatura ambiente. As medidas de tamanho foram realizadas em triplicata, com os dados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

Os dados de polidispersidade ou distribuição de tamanho das partículas obtidos através NTA (*Span*) foram calculados utilizando-se a Equação 8 (Teeranachaideekul et al., 2007).

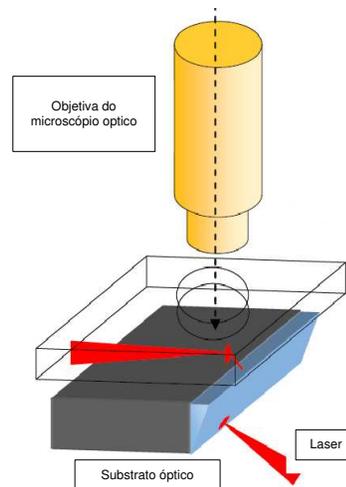
$$Span = \frac{(D_{0,9} - D_{0,1})}{D_{0,5}}$$

Equação 8

Com  $D_{0,9}$ ,  $D_{0,5}$  e  $D_{0,1}$  representando os respectivos diâmetros médios das nanopartículas obtidas em 90, 50 e 10% do conjunto de nanopartículas totais obtidas por NTA (Bender et al., 2012).



(A)



(B)

Figura 13. (A) Imagem do módulo de iluminação do feixe de luz laser do equipamento NanoSight LM20 (B) representação esquemática do caminho óptico do feixe de laser (modificado de NanoSight, 2013).

As técnicas de NTA e PCS diferem entre si principalmente quanto à precisão (precisa tanto para amostras poli como monodispersas no NTA) e faixa de tamanho das

partículas (PCS - 1–1000 nm e NTA - 30–1000 nm), resolução de pico (< para PCS), faixa de concentração da amostra (amplo, entre  $10^8$  -  $10^{12}$  partículas/mL para PCS e limitado, entre  $10^7$  -  $10^9$  para NTA), reprodutibilidade (NTA < PCS) e influência de contaminantes na coleta de dados (poeira, microorganismos ou agregados são facilmente detectados na análise com NTA e partículas grandes têm pouca influência sobre os resultados finais, sendo que o contrário ocorre com PCS). Além disso, os aspectos operacionais mais relevantes compreendem a manipulação dos aparatos (mais fácil para PCS), tempo operacional (entre 2 - 5 minutos/medida no PCS contra 5 minutos e 1 hora no NTA dependendo da habilidade do operador), coleta de dados e visualização da amostra (apenas utilizando o NTA é possível à obtenção da concentração aproximada e visualização da amostra) (Filipe et al., 2010; Bender et al., 2012; Hoffmeister et al., 2012).

#### **4.5.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

As análises foram feitas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-LEO 906 (Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp), 60 kV. Uma gota das amostras contendo SLN ou NLC com e sem DBC foi adicionada no grid de cobre com 200 Mesh (Electron Microscopy Sciences). Após 10 segundos, o excesso da amostra foi retirado com auxílio de um papel filtro, e, em seguida, uma gota de solução aquosa de uranila a 2% (m/m) foi adicionada sobre a mesma no intuito de melhorar o contraste das imagens. Oito segundos depois, o excesso foi novamente retirado com o auxílio de papel filtro e, na sequência, uma gota de água Milli-Q foi adicionada à grade, seguindo o mesmo procedimento para a retirada do excesso 5 segundos depois. Após o preparo das amostras nas grades, as mesmas permaneceram em repouso em temperatura ambiente, até que estivessem totalmente secas (Bozzola & Russell, 1999; Guterres et al., 2010, Cereda et al., 2013).

#### **4.5.6. Microscopia de força atômica (AFM)**

As nanopartículas foram investigadas por microscopia de força atômica. Amostras previamente diluídas (50 x, foram depositadas em uma superfície de silício previamente limpa com solução de ácido nítrico e água. As amostras imobilizadas foram secas com ar comprimido e deixadas por 24 horas em ambiente com baixa umidade. As amostras foram analisadas no microscópio de força atômica Nanosurf Easy Scan 2 Basic AFM – padrão BT02217 (Nanosurf, Suíça) em modo de contato intermitente no Departamento de Engenharia Ambiental na UNESP (Araraquara – SP). Foram utilizados cantivelever comercial Contr 10. A velocidade de scan foi proporcional ao tamanho da área de varredura e à frequência de varredura (0,6 Hz), conforme descrito por Silva e col. (2010).

#### **4.5.7. Espectrometria de massas**

Para confirmação e verificação da pureza, os lipídios MM e CP foram analisados por CG-EM (Cromatografia a gás acoplada a Espectrometria de Massas) utilizando o equipamento GCT-Premier da Waters, no laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da UNICAMP. Para esta análise, 1 mg da amostra foi diluída em diclorometano e injetada sob as seguintes condições de operação: fluxo do gás de arraste 1 mL.min<sup>-1</sup>, coluna 50 °C (5 min), rampa 15 °C até 300 °C (5 min) , coluna HP-5 MS Agilent, split 50:1, 1 uL de volume injetado.

Em se tratando do fármaco, após o ensaio realizado para a determinação %EE da DBC nas nanopartículas, uma das alíquotas filtradas, a partir da amostra SLN<sub>MM</sub>DBC/HP, foi analisada por espectrometria de massas (Ion-trap: marca Thermo Scientific, modelo: LCQ DECA XP MAX - Instituto de Química na Universidade de São Paulo), para confirmar a massa molar da dibucaína presente nas formulações. Para esta análise, a amostra foi diluída 1:20 em solução de metanol : água, 1:1, v/v, contendo 0,1% de ácido fórmico e as condições de operação foram: 5 mL.min<sup>-1</sup> do fluxo de líquido (50:50 metanol/água desionizada), modo de ionização positiva ESI, 4,5 kV de

tensão de pulverização de íons, 250 °C temperatura de capilar e 8 unidades arbitrárias (ARB) do fluxo de gás de azoto. Os dados foram obtidos no modo de varredura completa, de 300 a 370 m.z<sup>-1</sup> (Barbosa et al., 2013c).

#### **4.5.8. Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)**

A ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica espectroscópica que opera na região de microondas (faixa de 9 a 10 GHz) e consiste em detectar, de maneira indireta, um ou mais elétrons desemparelhados (transições de estados de spin eletrônicos) de compostos químicos (moléculas paramagnéticas) que, ao serem submetidos a um campo magnético, reorientam seus spins eletrônicos de acordo com seus momentos magnéticos de spin (Knowles et al., 1976 e Marsh, 1981).

A precessão do spin eletrônico ocasionada pela adição de uma onda magnética ressonante promove absorção de energia e transição do estado de spin. A energia correspondente a essas transições é da ordem de grandeza daquela envolvida em movimentos translacionais, rotacionais e segmentares das moléculas, o que permite a análise desses movimentos através dos espectros obtidos.

A Equação 9 pode ser utilizada para discutir a técnica de RPE, onde:

$$h\nu = g\beta H$$

Equação 9

onde,  $h$ =constante de Planck;  $\nu$ = frequência da radiação incidente;  $g$ =fator característico do elétron ;  $\beta$ =magneton de Bohr ;  $H$ =campo magnético externo.

Geralmente a frequência da radiação incidida na amostra é mantida constante e o espectro de absorção é determinado em função do campo magnético externo variável. O espectro de RPE é registrado como a primeira derivada da curva do espectro de absorção (Knowles et al., 1976; Schreier et al., 1978; Marsh, 1981). Após algum tempo há relaxação e retorno ao estado de spin original.

O radical nitróxido (Figura 14) é marcador de spin mais utilizado por ser estável em amplas faixas de temperatura e pH. Nele, o momento magnético do elétron desemparelhado interage com o campo magnético externo e com o momento magnético nuclear do nitrogênio ( $I = 1$ ). Essa última interação é chamada de interação hiperfina e possibilita desdobramentos dos níveis de energia (Knowles et al., 1976; Schreier et al., 1978), responsável pelos 3 picos característicos do espectro do nitróxido. A anisotropia espectral é dependente da orientação do eixo molecular do radical nitróxido em relação ao campo magnético e reflete a mobilidade desse marcador de spin, quando incorporado em sistemas orientados. Portanto, através dos espectros de RPE é possível monitorar a viscosidade e/ou a ocorrência de interações no ambiente onde se encontra o marcador de spin. Marcadores do tipo ácido n - doxil esteárico se intercalam e orientam-se com o eixo z do radical nitróxido aproximadamente paralelo ao eixo normal da bicamada (Marsh, 1981), em membranas modelo e biológicas.

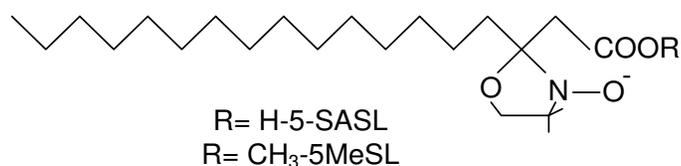


Figura 14. Estruturas químicas dos marcadores de spin contendo o grupo paramagnético nitróxido: 5-doxil ácido esteárico (5-SASL), e éster metílico do 5-doxil ácido esteárico (5-MeSL).

A partir de espectros de RPE é possível calcular o parâmetro de ordem ( $S$ ), que é uma medida da anisotropia do ambiente em que se encontram as moléculas do marcador de spin. O espectro desses marcadores apresenta parâmetros que refletem as orientações nos eixos  $x$ ,  $y$  (extremos internos) e  $z$  (extremos externos) que são usados para a determinação de  $S$  (Figura 15).

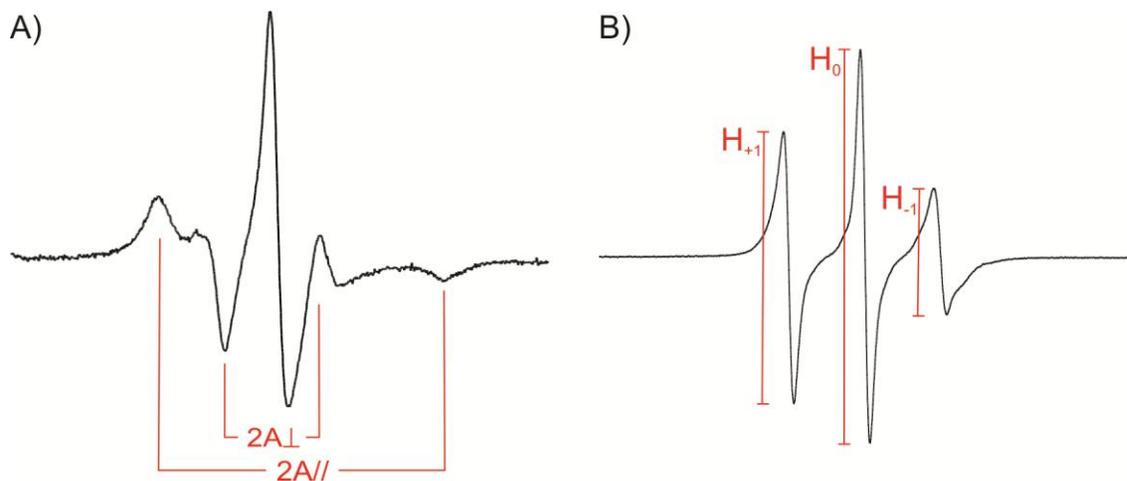


Figura 15. Espectro de RPE do marcador 5-SASL em lipossomas (A) (Schreier et al., 1984) e nanopartículas lipídicas sólidas (B).

O parâmetro de ordem é uma medida da orientação da molécula em relação ao eixo diretor (normal à bicamada lipídica) e varia de 0, em sistemas isotrópicos a 1, para uma molécula perfeitamente orientada (Jost et al., 1971). S reflete a amplitude angular do movimento anisotrópico da molécula e pode ser calculado pela Equação 10, a qual relaciona os parâmetros determinados a partir dos espectros experimentais.

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - \left[ \frac{(A_{xx} + A_{yy})}{2} \right]}$$

Equação 10

onde,  $A_{//}$  e  $A_{\perp}$  são medidos diretamente no espectro de RPE.  $A_{zz}$ ,  $A_{xx}$  e  $A_{yy}$  são os principais componentes do tensor hiperfino, medidos em monocristal, e tem os valores constantes de 32, 6 e 6, respectivamente (Schreier et al., 1978).

Em membranas, se o grau de ordem da bicamada é pequeno, os extremos externos do espectro não são resolvidos e o parâmetro de ordem não pode ser medido diretamente. Este é, em geral, o caso dos metil estearatos, que não interagem

fortemente com a interface aquosa da membrana por não possuírem um grupamento carregado para ancorar-se ao nível da cabeça polar dos lipídios. Pela falta de uma forte interação, o espectro dos MESL mostra um baixo grau de anisotropia, o que impede tanto a medida do parâmetro de ordem, como o cálculo preciso do tempo de correlação rotacional da molécula, empregando a teoria desenvolvida para sistemas isotrópicos (Schreier et al., 1984). Neste caso pode-se acompanhar a razão das alturas dos picos de campo baixo ( $h_{+1}$ ) e médio ( $h_0$ ), o que indica uma medida do grau de organização da membrana; este parâmetro resulta da contribuição da orientação e da mobilidade rotacional dos marcadores de spin inseridos na bicamada (Schreier et al., 1978).

Quanto mais anisotrópico o movimento do marcador incorporado na nanopartícula, mais alargadas as linhas espectrais e, conseqüentemente, maior é a diferença entre os picos de campo baixo ( $h_{+1}$ ) e médio ( $h_0$ ), enquanto uma menor organização no ambiente ao redor da sonda é acompanhada por razões  $h_{+1}/h_0$  maiores.

As medidas de RPE foram conduzidas no Instituto de Física da USP, Laboratório de Biofísica sob responsabilidade da Profa. Dra. Teresa Lammy com o auxílio técnico - científico do Dr. Evandro Luis Duarte, em espectrômetro Bruker EMX em banda-X operando em frequência de 10 GHz.

As amostras de SLN e NLC foram marcadas utilizando marcadores de spin do tipo nitróxido-ácido esteárico e nitróxido-metil ácido esteárico (5-SASL ou 5-MeSL, SIGMA, EUA), de forma a obter uma concentração final de aproximadamente 1 mol% de marcador de spin (em relação à concentração total de lipídios da formulação), incubados por aproximadamente 30 min a 37 °C. Alíquotas das amostras marcadas foram colocadas numa cavidade ressonante retangular, com controle de temperatura realizado por um dispositivo de temperatura variável Bruker BVT-2000. Os espectros de RPE foram inicialmente obtidos a 25 °C para as  $SLN_{MM}$  e  $NLC_{MM}$  com e sem DBC, e no intervalo de 5 °C a 55 °C para as  $SLN_{MM}$  e  $SLN_{CP}$  com e sem DBC preparadas por HP. O grau de organização foi analisado principalmente pela alteração dos parâmetros de ordem (S) e empírico  $h_{+1}/h_0$  (de Paula & Schreier, 1995).

#### 4.5.9. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados também foram caracterizados utilizando-se a técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS, “*Small angle X Ray Scattering*”) (Pereira, 2004).

As técnicas de espalhamento de raios X a alto e baixo ângulo permitem a caracterização de estruturas cristalinas ou semi-cristalinas com periodicidade na ordem de alguns angstroms e de algumas centenas de angstroms respectivamente. Segundo a lei de Bragg, o ângulo de difração  $\theta$  é inversamente proporcional à distância entre os planos de rede da amostra; assim, com ângulos menores é possível medir distâncias maiores.

A Figura 16 apresenta, esquematicamente, a metodologia de difração de raios x (a e e) em um corte no cristal com átomos arranjados em um conjunto de planos paralelos (linhas 1 e 2) e espaçados por uma distância  $d$ . Ali, um feixe paralelo e monocromático de raios X de comprimento de onda  $\lambda$  incide neste cristal a um ângulo  $\theta$  (chamado de ângulo de Bragg), medido entre o raio incidente e o plano cristalino (Duarte, 2005).

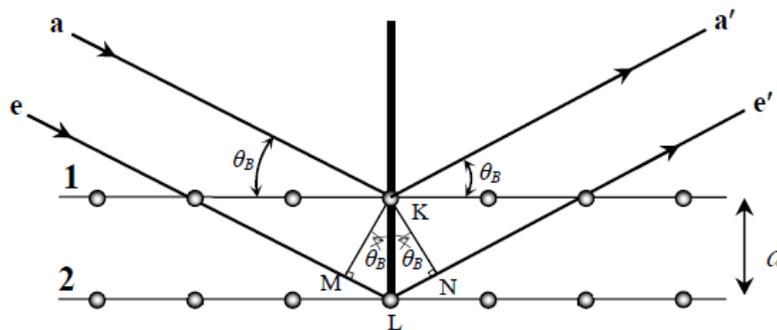


Figura 16. Representação esquemática de difração de raios X (modificado de Duarte, 2005).

Os raios X podem ser espalhados elasticamente quando atingem um material, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo do material. O fóton dos raios X modifica sua trajetória posteriormente à colisão com o elétron, mas mantém a mesma

fase e energia do fóton incidente. Fisicamente, pode-se considerar que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e a mesma onda será reemitida, tal que cada elétron pode ser considerado um centro de emissão de raios X. Raios X espalhados, provenientes de átomos organizados em estruturas cristalinas e apresentando entre si distâncias próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente, caracterizam-se por periodicidade entre os espaçamentos (Mertins, 2008).

O número de elétrons no átomo e a distribuição espacial desses átomos em uma determinada estrutura são fatores determinantes da intensidade de radiação difratada. Assim, é possível verificar distintas intensidades difratadas de diversos planos cristalinos que possuem densidades de átomos e elétrons desiguais. Cada material cristalino possui planos de difração, distâncias interplanares, densidades de átomos (elétrons) ao longo de cada plano cristalino, características estas específicas e únicas, da mesma forma que o padrão difratométrico por ele gerado (Mertins, 2008).

No SAXS, os raios X utilizados são de alta energia e possuem comprimentos de onda na ordem de 1,5 Å, os quais são compatíveis com as dimensões atômicas. Há uma interação direta da radiação com os elétrons, fornecendo informações sobre a organização da densidade eletrônica da estrutura que está sendo investigada (Pereira, 2004).

Existe uma relação inversa entre comprimento de onda e a dimensão da partícula em estudo, que pode ser expressa pela Lei de Bragg, quando o material é perfeitamente organizado em nível atômico, como, por exemplo, um cristal. Bragg, em 1912, definiu o fenômeno de difração de raios X, quando o objeto de estudo era um cristal utilizando a equação de Bragg, onde o tamanho  $d$  pode ser calculado de acordo com a Equação 11:

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta}$$

Equação 11

onde,  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação utilizada,  $\theta$  é o ângulo de incidência e  $d$  é a distância entre camadas atômicas em um cristal.

No entanto a intensidade difratada pode ser assumida como uma função do vetor de espalhamento  $q$ , que representa a mudança no vetor de onda do feixe difratado (Castro et al., 2009). O módulo do vetor de onda é dado pela Equação 12:

$$q = 4\pi \sin \theta / \lambda_0$$

Equação 12

No espalhamento de luz, o vetor de onda  $q$  está relacionado com o tamanho do objeto observado (na ordem de 1 a 100nm) e para o SAXS obtêm-se informações dimensionais de estruturas significativamente maiores do que as dimensões atômicas. Portanto, o domínio típico dessa técnica compreende valores de  $q$  menores do que  $0,1 \text{ \AA}^{-1} (\theta \approx 1^\circ)$  (Pereira, 2004). Equivalentemente, a lei de Bragg pode ser escrita pela Equação 13.

$$q = n(2\pi/d)$$

Equação 13

onde  $n$  é um número inteiro e  $d$  é a separação entre dois planos espalhantes.

A intensidade de espalhamento medida no detector varia somente com a magnitude de  $q$ , e não com sua direção. Assim, o perfil de espalhamento é representado por um gráfico de intensidade em função de  $q$ .

As informações dimensionais avaliadas por SAXS para as SLN e NLS compreendem a identificação de arranjos lamelares, bem como a sua periodicidade (organização estrutural) e sua composição cristalina ou amorfa (Lukowskin et al. 2000 e Souza et al. 2012).

As medidas de SAXS foram feitas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas - SP), em colaboração junto com os Prof. Dr Leandro Ramos Souza Barbosa e Rosangela Itri, do Instituto de Física da USP. As análises foram realizadas no equipamento de SAXS/WAXS Nanostar (Bruker), a uma distância amostra-detector de aproximadamente 1000 mm. As curvas de espalhamento foram corrigidas pela

contribuição do tampão, considerando-se a absorção da amostra. O vetor de espalhamento  $q$  foi definido como  $q = 4\pi/\lambda \sin\theta$ ; onde  $2\theta$  é o ângulo de espalhamento e  $\lambda$  o comprimento de onda de raios X (em nosso caso de 1,488 Å). O tempo de exposição das amostras variou de 2 a 5 minutos. A amostra SLN<sub>CP</sub> foi submetida a um processo de aquecimento (30, 35, 40, 45 °C) que foi realizado utilizando banho de água com controle de temperatura. As demais amostras (SLN<sub>MM</sub>, SLN<sub>MM</sub>DBC e SLN<sub>CP</sub>DBC) foram feitas somente a temperatura ambiente.

#### **4.5.10. Calorimetria exploratória de varredura (DSC)**

Todas as amostras avaliadas por calorimetria exploratória de varredura foram previamente liofilizadas de acordo com o item 4.4.3. Os termogramas de DSC (“Differential Scanning Calorimetry”) foram obtidos por um Calorímetro Diferencial de Varredura DSC-Q10 (TA instruments) em um porta amostra padrão de alumínio selado. As análises foram feitas em atmosfera de nitrogênio, a um fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura de + 20 a + 80 °C para as amostras sem crioprotetor e de + 20 a + 180 °C para as amostras liofilizadas com maltose ou trealose. A taxa de aquecimento foi de 10 °C.min<sup>-1</sup> (Liu et al., 2007; Marcato, 2009). O índice de cristalinidade (IC em %) foi calculado usando a massa lipídica (MM ou CP) como referência (100% de cristalinidade), de acordo com a Equação 14 descrita por Schubert & Müller-Goymann (2005) e Liu et al. (2007).

$$IC\% = \frac{\Delta H \text{ (J/g)}_{\text{nanopartícula(SLN ou NLC)}}}{\Delta H \text{ (J/g)}_{\text{lipídio(MM ou CP)} \cdot \text{concentração da fase lipídica}} \times 100$$

Equação 14

#### **4.5.11. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)**

Na caracterização das amostras por espectroscopia de infravermelho também foi necessário a previa liofilização das nanopartículas de acordo com o item 4.4.3. Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier das formulações de SLN liofilizadas (sem açúcar) e os seus componentes individuais foram medidos a fim de caracterizar as estruturas moleculares e identificar as alterações relacionadas à formação de nanopartículas e o encapsulamento da dibucaína. Os espectros foram obtidos com a utilização de espectrofotômetro da Perkin Elmer 100 FTIR no intervalo de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ . As medidas foram feitas usando 1 mg de amostra, que foi misturado com 200 mg de KBr e prensados em pastilhas empregando carga de 10 t.

#### **4.6. Estabilidade das SLN e NLC**

O estudo de estabilidade foi realizado durante 240 dias com as amostras preparadas por Son e HP avaliando tamanho, distribuição de tamanho e potencial zeta de acordo com os itens 4.5.2 e 4.5.3, respectivamente. Além disso, as amostras  $SLN_{MM}$ ,  $SLN_{CP}$  e  $NLC_{MM}$  com e sem DBC preparadas HP foram ainda avaliadas quanto ao pH, teor de endoperóxidos e o percentual de DBC encapsulado em função do tempo de estocagem a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### **4.6.1. Potencial hidrogeniônico (pH)**

Alterações de pH foram avaliadas utilizando o Medidor de pH/Ions (Modelo 300M, Analyser Instrumentação Analítica), calibrado com os padrões de pH 7,0 e 4,0. Este protocolo de análise foi adotado para verificar se não estava ocorrendo grandes variações de pH ao longo do processo de estocagem, que pudesse causar danos à formulação. O pH foi monitorado ao longo de 240 dias e as medidas foram realizadas em triplicata. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.6.2. Peroxidação lipídica**

As SLN e NLC foram avaliados quanto à estabilidade química da sua matriz estrutural, por meio da estimativa de oxidação de seus componentes lipídicos.

Mecanismos de formação de radicais livres, mesmo na ausência de agentes oxidantes específicos, provocam a oxidação de ácidos graxos dos lipídios. Sabe-se que a exposição à radiação eletromagnética ou à contaminação de íons metálicos de transição pode ocasionar a retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia lipídica e gerar danos aos componentes da formulação. De modo geral, na avaliação da oxidação dos lipídios considera-se o aparecimento de conjugação de duplas ligações, a produção de aldeído com quebra de cadeia ou ainda a formação de peróxidos (Torchilin & Weissig, 2003).

O teste de peroxidação lipídica detecta endoperóxidos através da reação de produtos de sua quebra em altas temperaturas, os malondialdeídos, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), na qual um cromóforo vermelho com absorvância em 532 nm é produto dessa reação (Ohkawa et al., 1979; Asakawa & Matsushita, 1980).

Amostras da suspensão com as nanopartículas (0,1 mL) foram adicionadas em tubos falcon com 0,1 mL de solução de cloreto férrico ( $0,27 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), 0,1 mL de solução etanólica de hidroxitolueno butilado ( $0,22 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), 1,5 mL de tampão glicina ( $0,2 \text{ mol.L}^{-1}/\text{pH } 3,6$ ) e 1,5mL de reagente TBA ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) em solução de dodecilsulfato de sódio ( $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). A curva analítica com tetraetoxipropano (TEP  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) em concentrações que variaram de 1 a  $6 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  com a adição das mesmas soluções citadas acima, foi também construída (Anexo III, Figura 61), obtendo-se a seguinte equação linear:  $y = 49,476x + 0,0168$  com  $R^2 = 0,995$ . Após 15 minutos em banho fervente, os tubos foram resfriados (banho de gelo) até a temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se 1 mL de ácido acético glacial e 2 mL de clorofórmio, com agitação seguida de centrifugação ( $500 \times g$ , 20 min, temperatura ambiente). O sobrenadante foi analisado em um espectrofotômetro de UV/Vis - Modelo Cary 50, fabricante Varian, 532 nm. Foi feita uma análise inicial (logo após o preparo) e análises

em períodos de 30, 180 e 240 dias após a preparação da formulação. As medidas foram feitas em triplicata e os dados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.7. Porcentagem de encapsulação e capacidade de carregamento**

A eficiência de encapsulação foi obtida medindo-se a concentração de DBC livre no meio de dispersão. A porcentagem de encapsulação (%EE) da DBC nas SLN e NLC foi determinada utilizando o método de filtração-centrifugação. Cada amostra foi diluída em água Milli-Q (2: 100, v/v), e logo após, 0,3 mL foi transferido para uma unidade de filtração de 10 kDa (Millex, Millipore), e centrifugada durante 20 minutos (4.100 x g, Centrífuga, MC 12 V, Sorval). A DBC livre, presente no sobrenadante foi quantificada utilizando-se a metodologia descrita no item 4.2. %EE, calculada pela Equação 15, e a capacidade de carregamento (%LC) (dada pela Equação 16) foram calculadas utilizando a curva analítica (item 4.3.2) obtida para DBC.

$$\%EE = \frac{A}{B} \times 100$$

Equação 15

$$\%LC = \frac{B - A}{P_r} \times 100$$

Equação 16

onde, A é a quantidade de DBC encapsulada nas SLN ou NLC e B é a quantidade inicial de DBC, adicionada na amostra.  $A = B - [\text{DBC não encapsulada}]$ , detectada por CLAE.  $P_r$  é a massa de partículas (lipídios) recuperados. As medidas de %EE e %LC foram feitas em triplicata e os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (Marcato et al., 2011; Ridolfi et al., 2012).

A eficiência de encapsulação também ser expressa na forma do coeficiente de partição (P) (Equação 17) do anestésico entre duas fases imiscíveis, pela razão das concentrações desse entre a fase lipídica (*l*) e a aquosa (*a*):

$$P(s) = \frac{n_l}{v_l} / \frac{n_a}{v_a}$$

Equação 17

na qual *n* é o número de moles da DBC e *V* é o volume (*L*) das fases. O número total de moles da DBC na dispersão é a soma de *n<sub>l</sub>* e *n<sub>a</sub>*.

Os dados de P consideram a concentração da fase lipídica no sistema (47 mmol.L<sup>-1</sup> e 42 mmol.L<sup>-1</sup> para os lipídios MM e CP respectivamente) e o valor da densidade lipídica igual a 1 g.mL<sup>-1</sup> (de Paula & Schreier, 1996).

#### **4.8. Porcentagem de liberação *in vitro***

A avaliação da liberação *in vitro* da dibucaína encapsulada nas SLN e NLC foi acompanhada ao longo do tempo antes do processo de liofilização, com as amostras em tubos independentes, observados nos intervalos de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 10,0, 24,0 e 48,0 horas, na temperatura ambiente (25 ± 5 °C) sob frequente agitação, utilizando como meio dispersante tampão fosfato (4 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4) com adição de 20% de etanol (co-solvente). Nos referidos intervalos, as amostras foram filtradas em unidades de filtração de 10 kDa (Millex, Millipore) e centrifugadas durante 20 minutos (4100 x g, Centrífuga, MC 12 V, Sorval). Posteriormente, a alíquota filtrada foi quantificada por CLAE (item 4.2), utilizando-se a curva analítica obtida na etapa de validação do método analítico (item 4.3.2) (Ridolfi, 2011).

#### 4.8.1. Modelagem matemática dos perfis de liberação *in vitro*

Na literatura encontra-se um vasto número de modelos matemáticos que descrevem o perfil de liberação de fármacos, entre eles destacam-se Weibull, Higuchi, Baker–Lonsdale e Korsmeyer–Peppas. Como critério de escolha do modelo matemático mais adequado aos dados, faz-se a determinação do  $R^2$  ajustado que é calculado através da Equação 18 (Costa & Lobo, 2001).

$$R_{ajustado}^2 = 1 - \frac{n-1}{n-p} (1 - R^2),$$

Equação 18

sendo  $n$  o número de pontos dos dados da dissolução e  $p$  o número de parâmetros do modelo. O modelo matemático mais adequado a ser aplicado deve apresentar o maior coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$ ).

Neste trabalho os modelos matemáticos utilizados foram Weibull e Korsmeyer–Peppas.

O modelo de Weibull, adaptado para os processos de liberação de fármacos por Langenbucher, 1972, revela a fração cumulativa do fármaco na solução em função do tempo  $t$ , como pode ser observado nas Equações 19 e 20.

$$m = 1 - \exp \left[ \frac{-(t - Ti)^\beta}{\alpha} \right]$$

Equação 19

ou

$$\log[-\ln(1 - m)] = \beta \log(t - Ti) - \log \alpha$$

Equação 20

onde  $\alpha$  define a escala temporal do processo,  $Ti$  é o intervalo de tempo antes do início do processo de liberação (zero na maior parte dos casos),  $\beta$  é o parâmetro de forma

que caracteriza a curva como sendo exponencial ( $\beta = 1$ , cinética de primeira ordem), sigmóide ( $\beta > 1$ , cinética rápida) ou parabólica ( $\beta < 1$ , cinética lenta).

Assim, o valor do expoente  $\beta$  é o indicador do mecanismo de transporte do fármaco através da matriz:

- $\beta$  menores que 0,75: difusão segundo Fick,
- entre 0,75 e 1 associados a dois mecanismos: a difusão Fickiana e transporte de caso II (intumescimento),
- $\beta$  maiores que 1: o transporte do fármaco envolve um complexo mecanismo de liberação (fenômenos de difusão, intumescimento e erosão simultânea).

No entanto, por ser empírico (sem fundamento cinético) este modelo apresenta deficiências que são objetos de muitas críticas, entre elas: não caracterizar adequadamente as propriedades cinéticas de dissolução e não possuir parâmetros relacionados com a taxa de dissolução intrínseca do fármaco, além da correlação *in vivo* / *in vitro* ser bastante limitada (da Costa, 2002).

O modelo proposto por Korsmeyer–Peppas, simples e semi-empírico, é principalmente utilizado quando o mecanismo de liberação não é bem definido ou quando se tem mais de um mecanismo de liberação (Korsmeyer & Peppas, 1981; Peppas, 1985; Costa & Lobo, 2001).

O modelo matemático proposto por Korsmeyer & Peppas (1981) correlaciona exponencialmente a liberação do fármaco em função do tempo como descrito pela Equação 21,

$$f_t = at^n$$

Equação 21

na qual  $a$  é uma constante que reúne características estruturais e geométricas da forma farmacêutica em questão,  $n$  é o expoente de liberação, referente ao mecanismo de liberação do fármaco, e  $t$  é a  $\frac{Mt}{M_\infty}$  (liberação fracionada do fármaco em um tempo) (Equação 22). Onde  $Mt$  é quantidade de fármaco liberado em um tempo  $t$ ,  $M_\infty$  é a quantidade de fármaco liberado em um tempo infinito.

Dessa forma, pode afirmar que,

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = at^n$$

Equação 22

O tempo de espera (l) para iniciar a liberação do fármaco da forma farmacêutica transformou a Equação 22 em Equação 23:

$$\frac{M(t-l)}{M_{\infty}} = a(t-l)^n$$

Equação 23

No entanto, se for considerada a possibilidade de uma liberação abrupta inicial do fármaco (b), tem-se a Equação 24:

$$\frac{M(t-l)}{M_{\infty}} = at^n + b$$

Equação 24

O valor encontrado de  $n$  é, então, utilizado para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, como descrito na Tabela 12.

Tabela 12. Predição do mecanismo de transporte de fármacos a partir da determinação do valor de  $n$  pelo modelo de Korsmeyer–Peppas (Costa & Lobo, 2001)

Expoente de liberação (n)	Mecanismo de transporte do fármaco
$n \leq 0,43$	Difusão Fickiana
$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
$n > 0,85$	Transporte Caso-II
Superior a 0,85	Transporte Super-Caso-II

#### 4.9. Estimativa do fluxo e elasticidade das SLN e NLC

A elasticidade das SLN e NLC foi estimada através de ensaios *in vitro* em membranas de policarbonato com poros regulares. Para a realização dos ensaios utilizando membranas de poros regulares, a extrusora, de aço inox modelo T.001 da Lipex Biomembranes Inc., com capacidade para um volume de 10 mL, com camisa térmica para circulação de água aquecida, com regulação de pressão constante de nitrogênio, foi utilizada juntamente com membrana de policarbonato com poros de diâmetros nominais de 30 nm, colocada sobreposta a um disco de dreno.

Visando maior sensibilidade do método, foi utilizada apenas uma membrana. Ensaios posteriores seriam realizados com duas membranas sobrepostas, visando simular os poros tortuosos presentes na pele.

Os fluxos das amostras foram determinados utilizando 2,5 mL a 1 mmol.L<sup>-1</sup> em extrusora a 32 °C (temperatura da pele), sob baixa pressão (2,5 × 10<sup>5</sup> Pa), simulando a pressão osmótica da pele (van den Bergh et al., 2001; Barbosa et al., 2013b) durante um tempo máximo de 10 minutos e utilizando com meio poroso membrana com poros nominais de 30 nm. O volume permeado foi medido (pipeta volumétrica). As medidas foram feitas em triplicata e os dados expressos como a média ± desvio padrão (Equação 25).

$$J = \frac{V_p(mL)}{t(min)}$$

Equação 25

onde: J = fluxo (mL/min), V<sub>p</sub> = volume permeado (mL), t = tempo de permeação (min).

A elasticidade de nanopartículas à passagem através dos poros de membranas sintéticas foi determinada por Cevc (1996) e utilizada por van den Bergh et al., (1999) e van den Bergh et al. (2001) para caracterização de lipossomas convencionais e elásticos (Equação 26). Teixeira et al. (2010), caracterizaram a elasticidade de nanocápsulas poliméricas utilizando a mesma metodologia, a qual foi adaptada para as SLN e NLC neste trabalho.

$$E = J \left( \frac{dv}{dp} \right)^2$$

Equação 26

onde  $J$  é o fluxo obtido através da extrusão das partículas em membrana de policarbonato,  $dv$ , é o diâmetro médio dos lipossomas antes da extrusão e  $dp$  é o diâmetro do poro da membrana de policarbonato utilizada.

#### **4.10. Estudos biológicos**

##### **4.10.1. Avaliação da citotoxicidade in vitro**

###### **4.10.1.1. Cultivo das células**

As linhagens celulares de fibroblastos de embrião de camundongo BALB/c 3T3, adquiridas do NIH (National Institute of Health-Baltimore, EUA) e de queratinócitos humanos imortalizados, HaCaT (Academic Medical Center, Amsterdam University) (Figura 17) foram gentilmente doadas pela professora Dra Carmen Veríssima Ferreira do Instituto de Biologia da UNICAMP.

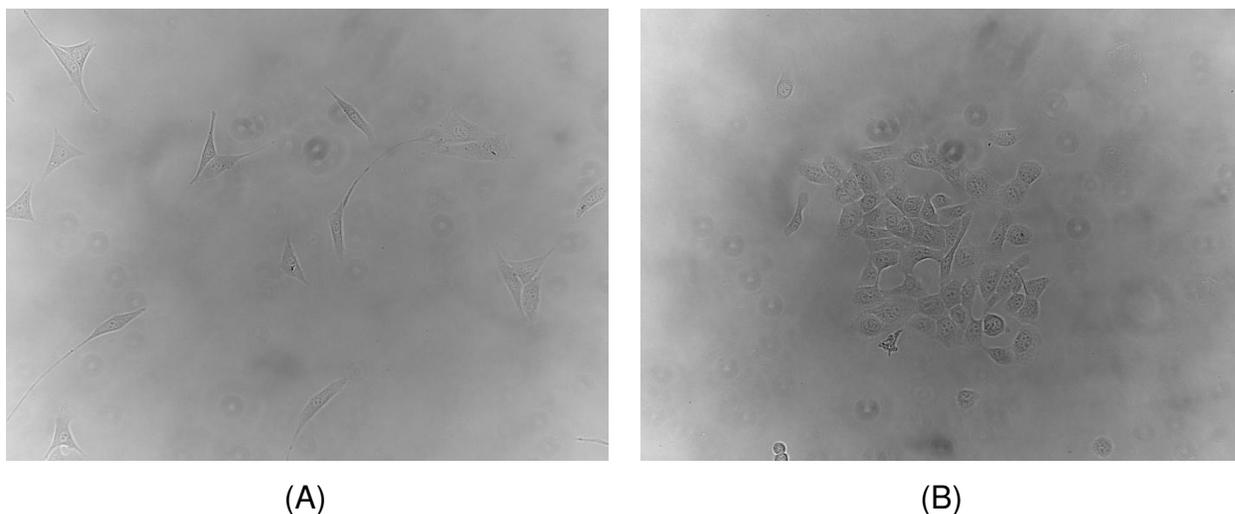


Figura 17. Linhagens celulares de: A) Fibroblastos de embrião de camundongo BALB/c 3T3 e B) Queratinócitos humanos imortalizados, HaCaT em fase inicial do plaqueamento.

As células 3T3 e HaCaT foram cultivadas em meio DMEM e suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico ( $100 \text{ UI. mL}^{-1}$  de penicilina e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de sulfato de estreptomicina). As células foram plaqueadas em garrafas de  $75 \text{ cm}^2$  na densidade de  $2 \times 10^4 \text{ células.mL}^{-1}$  para células Balb/c 3T3 e  $1,4 \times 10^4 \text{ células.mL}^{-1}$  para HaCaT e incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sob atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$  (REVCO – incubadora de  $\text{CO}_2$ ) e monitoradas a cada 24 horas em microscópio óptico (Eclipse TS100, Nikon), verificando se as células estavam aderidas as paredes das garrafas. As culturas foram repicadas periodicamente a cada 24 ou 48 horas. O plaqueamento foi realizado inoculando-se  $2 \times 10^4$  células viáveis em placas de 96 cavidades, incubadas por 48 horas, até atingirem a semi-confluência (de Araújo, 2005, Barbosa et. al., 2013a).

#### **4.10.1.2. Tratamento das células**

As células de fibroblastos (células BALB/c 3T3) e os queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) incubados nas placas de 96 cavidades foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade. Neste estudo foi avaliada a atividade mitocondrial através da

redução do sal de tetrazólio à formazan, composto insolúvel e de coloração roxa (Mosmann, 1983). Para tanto, o meio de cultura, presente em cada poço da placa, foi substituído pelas amostras diluídas em DMEM de acordo com a Tabela 13, que, em seguida foram incubadas por 2 horas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 2 horas, ambos os tipos celulares foram incubados com MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) durante 3 horas. Ao final desse período, o meio contendo MTT não reduzido foi removido cuidadosamente e, a cada placa, foi adicionado 0,1 mL de álcool etílico P.A., para dissolução dos cristais de formazan produzidos pela redução do corante (Figura 18). As placas foram agitadas vigorosamente por cerca de 10 min. para garantir a solubilização do formazan. A absorbância da solução em cada cavidade foi medida por espectrofotometria (570 nm) (Welder, 1992).

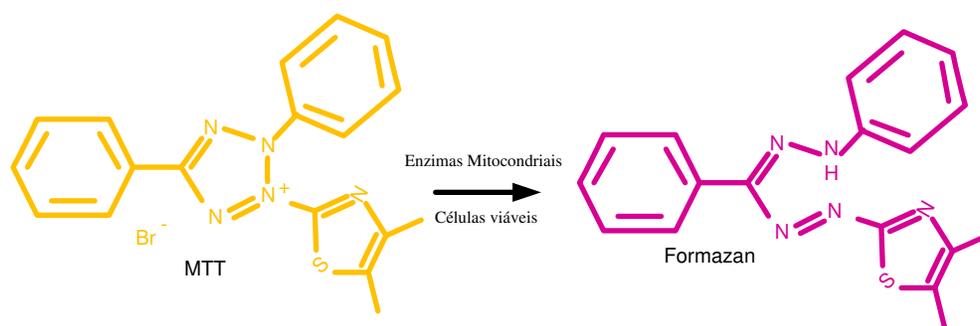


Figura 18. Redução do 3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) à formazan. Esta reação ocorre na mitocôndria de células viáveis sendo observada a coloração roxa que indica viabilidade celular (Mosmann, 1983; Fotakis & Timbrell, 2006).

Tabela 13. Amostras e respectivas concentrações avaliadas no ensaio de citotoxicidade utilizando células de fibroblastos (células BALB/c 3T3) e os queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT).

Amostras	Concentração (mmol.L <sup>-1</sup> )
DBC livre	0,02 - 0,30
SLN <sub>MM</sub> /HP	0,53 - 4,20
SLN <sub>CP</sub> /HP	0,53 - 4,20
NLC <sub>MM</sub> /HP	0,53 - 4,20
SLN <sub>MM</sub> DBC/HP	0,02 - 0,30
SLN <sub>CP</sub> DBC/HP	0,02 - 0,30
NLC <sub>MM</sub> DBC/HP	0,02 - 0,30

#### **4.10.2. Ensaios in vivo: avaliação da atividade antinociceptiva**

##### **4.10.2.1. Preparação de gel de carbopol**

O gel de carbopol, utilizado como matriz de hidrogel para a incorporação das SLN e NLC foi preparado de acordo com o procedimento operacional padrão descrito pela resolução da RDC 67/2007 da ANVISA (BRASIL, 2007) e pela ANFARMAG (Boas práticas de manipulação). Os componentes e as respectivas quantidades utilizados na preparação estão descritos na Tabela 14.

Inicialmente o polímero carboxivinílico, foi incorporado na água até o total intumescimento; em seguida, o metilparabeno (conservante) foi adicionado ao propilenoglicol e misturado ao polímero já intumescido. Logo após, a glicerina foi acrescentada e, por fim, o pH ajustado com TEA ( $\pm 20$  gotas). O gel de carbopol foi acondicionado em frasco plástico devidamente fechado a 4 °C. Destaca-se a alta concentração de umectante na formulação (totalizando ca. 13% m/m do gel de carbopol) capaz de induzir alterações estruturais do estrato córneo (domínios lipofílicos e/ou queratinizados) (Krzic et al., 2001).

Tabela 14. Componentes utilizados no preparo de 100g gel de carbopol.

<b>Componentes</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Função</b>
Polímero carboxivinílico	2,0	Gelificante e de fácil dispersão
Propilenoglicol	5,0	Levitação, co-solvente e umectante.
Metilparabeno	0,2	Conservante (fungos e leveduras)
Glicerina	8,0	Umectante
Água Deionizada	84,8	Solvente
Trietanolamina (TEA)	q.s.p.	Alcalinizante (pH = 7,0)

#### **4.10.2.2. Teste de tail-flick**

D'Amour e Smith (1941) descreveram o teste de "tail-flick", o qual possibilita mensurar a latência do movimento da cauda de um animal (ratos ou camundongos) frente a um estímulo térmico focalizado (Figura 19). A partir da década de 1990, esse teste, antes muito usado para avaliar a atividade antinociceptiva de fármacos administradas por diferentes vias, foi também aplicado quando se desejava mensurar a duração do efeito analgésico de anestésicos locais administrados topicamente na região da base da cauda do animal (Grant et al., 1994; Yu et al., 2002).

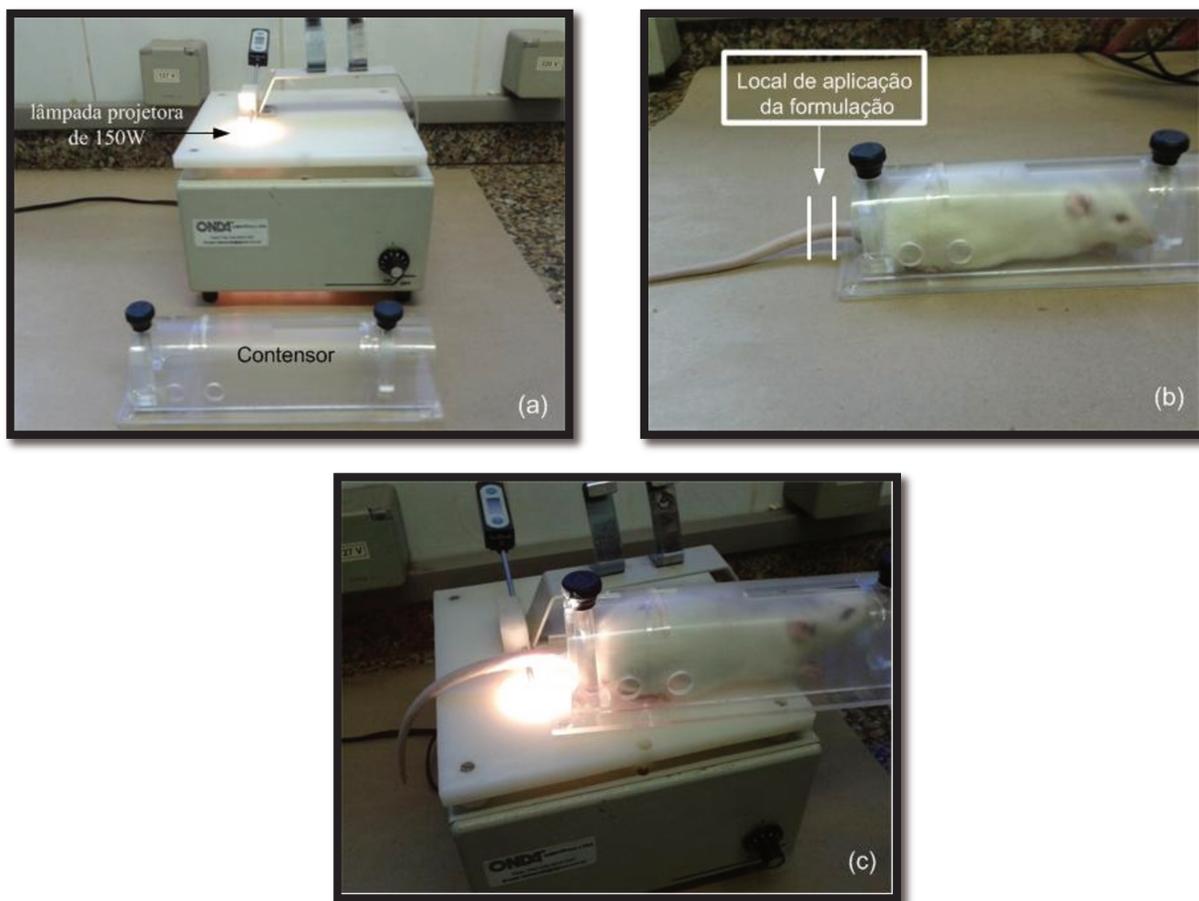


Figura 19. Teste de *tail-flick*. (a). Aparatos utilizados durante o teste de analgesia – *tail-flick*, (b) Aplicação local das formulações e (c) animal sendo avaliado quanto à latência analgésica.

Na avaliação da atividade analgésica (verificação da atividade antinociceptiva) das formulações foi necessário estabelecer grupos experimentais, de acordo com a Tabela 15. A concentração do anestésico livre e encapsulado nas nanopartículas foi de 0,23 mg de dibucaína/0,5 g de gel de carbopol que corresponde a 0,05% de dibucaína presente no gel de carbopol aplicado. Neste ensaio foram utilizadas as nanopartículas liofilizadas, de acordo com o item 4.4.3 sendo que a mistura delas ao gel de carbopol (4.10.2.1) foi realizada por simples dispersão.

No dia anterior ao teste, ratos (*Rattus norvegicus albinus*) do tipo Wistar adultos (250-350 g) foram submetidos ao teste (sem a aplicação de qualquer formulação) para

determinação da linha basal e observação do tempo de reação (movimento da cauda) frente ao estímulo térmico (~ 55 °C) gerado por uma lâmpada projetora de 150 W do aparelho para teste de *tail-flick* (Onda Científica Ltda.). As formulações, descritas na Tabela 15, foram cuidadosamente aplicadas na base da cauda dos animais (Figura 19.b).

Em seguida, o animal foi colocado em um contensor de acrílico, colocando a base da cauda sob estímulo térmico por um tempo de latência de, no máximo, 15 segundos (*cut off*), até a reação de movimentação da cauda. A cada 10 minutos o animal foi submetido a esse procedimento, até que o tempo de latência atingisse o valor da linha basal. Os resultados obtidos permitiram mensurar a duração do efeito analgésico e foram expressos pela média da percentagem de efeito máximo possível (%EMP), por meio da Equação 27 (Yu et al., 2002). Todos os experimentos foram realizados pelo mesmo observador.

$$\% \text{ EMP} = \frac{\text{Tempo de latência} - \text{linha basal}}{\text{cut off} - \text{linha basal}} \times 100$$

Equação 27

Os tempos de recuperação do efeito analgésico da DBC livre e associada em SLN e NLC puderam também ser calculados de acordo com a Equação 28:

$$\Delta T_{rec} = \frac{T_{\text{REC gel com SLN ou NLC com AL}} - T_{\text{REC gel AL}}}{T_{\text{REC gel AL}}} \times 100$$

Equação 28

onde  $T_{\text{REC gel com SLN ou NLC com AL}}$  é o tempo de recuperação dos animais após a aplicação das formulações contendo SLN ou NLC com dibucaína encapsulada e  $T_{\text{REC gel AL}}$  é o tempo de recuperação dos animais após a aplicação das formulações contendo apenas a dibucaína dispersa no gel de carbopol.

Tabela 15. Grupos experimentais (n=7 animais/grupo) utilizados no ensaio de *tail-flick* para avaliação do efeito analgésico das nanopartículas veiculadas em gel em ratos Wistar adultos.

<b>Grupo*</b>	<b>Amostras dispersas em gel de carbopol</b>
Grupos controle	- SLN <sub>MM</sub> /HP - SLN <sub>CP</sub> /HP - NLC <sub>MM</sub> /HP
Fármaco livre	- Dibucáína
Formulações de liberação modificada	- SLN <sub>CP</sub> DBC/HP - SLN <sub>CP</sub> DBC/HP + maltose - SLN <sub>MM</sub> DBC/HP - SLN <sub>MM</sub> DBC/HP + maltose - NLC <sub>MM</sub> DBC/HP + maltose

#### **4.11. Análises estatísticas**

As análises estatísticas realizadas compreenderam o teste *T de Student* e análise de variância (ANOVA) com posterior teste de *Turkey-Kramer*. O nível de significância ( $\alpha$ ) foi de 5%. O software utilizado foram o Origin 6.0 (Microcal TM Software Inc., EUA) e o Graph Pad InStat (Graph Pad Software Inc., EUA).

A ANOVA e o teste de *Turkey-Kramer* são testes estatísticos que foram frequentemente aplicados durante a execução desse trabalho. O primeiro visa comparar diferenças entre todas as amostras e o segundo discrimina de forma mais clara a análise entre as amostras avaliadas (sempre dois a dois) dando maior embasamento estatístico às análises. Em todas as análises realizadas considerou-se  $p < 0,001$ (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*).

Os resultados apresentados de diâmetro, distribuição e potencial zeta das formulações preparadas por HP e Son foram avaliados estatisticamente por ANOVA com posterior teste de *Turkey-Kramer*. Foi verificado, inicialmente, se a DBC alterou

significativamente tais parâmetros, posteriormente, se havia diferença significativa em relação à metodologia de preparação (HP e Son).

Os valores obtidos de tamanho médio das SLN e NLC, com e sem DBC produzidas por HP e determinados por NTA foram avaliados estatisticamente utilizando teste *T de Student* considerando o nível de significância  $p < 0,05$ . Posteriormente, o mesmo teste estatístico foi usado para avaliar a diferença entre as duas metodologias (NTA e PCS) empregadas para a determinação do tamanho das nanopartículas.

Os valores de porcentagem de encapsulação e do coeficiente de partição (P) da dibucaína (DBC) para SLN e NLC preparados por sonicação (Son) e por alta pressão de homogeneização (HP) foram comparados usando o teste *T de Student* e análise de variância (ANOVA), com posterior teste de *Turkey-Kramer*.

Os resultados de estabilidade (diâmetros médios, distribuição, potencial zeta e porcentagem de encapsulação das SLN e NLC) durante a estocagem a 4<sup>o</sup> C por 240 dias foram avaliados por ANOVA e *Turkey-Kramer*. As análises estatísticas foram realizadas analisando alterações em cada uma das formulações do 1<sup>o</sup> ao 240<sup>o</sup> dia. O teste *T de Student* foi usado para avaliar se o processo de preparo da amostra difere quanto a conservação do tamanho, polidispersão e potencial zeta.

Na avaliação do tamanho, polidispersão e potencial zeta das SLN e NLC preparadas por HP liofilizadas com e sem crioprotetor foi aplicado ANOVA e, posteriormente o teste de *Turkey-Kramer*.

Quanto aos parâmetros da permeação (diâmetros antes e após a extrusão, fluxo, porcentagem de dibucaína encontrada na amostra permeada e elasticidade) das SLN e NLC realizadas em membrana sintética com poros nominais de 30nm e pressão de extrusão e temperatura controladas ( $2,5 \times 10^5$  Pa e 32 °C) foi avaliada inicialmente a ocorrência de alterações significativas nos diâmetros antes e após o ensaio de extrusão aplicando o teste *T de Student*. Em relação aos outros parâmetros aplicou-se ANOVA com posterior teste de *Turkey-Kramer* (todas as amostras foram analisadas entre si, inicialmente com todas as amostras sem o AL e depois todas como AL).

A viabilidade celular em fibroblastos (3T3) e em queratinócitos (HaCat) tratadas com DBC livre e encapsulada em SLN e NLC, assim como as amostras SLN e NLC

sem DBC, preparadas por HP foram submetidas a ANOVA e *Turkey-Kramer*. Avaliou-se a diferença na viabilidade quando as células foram submetidas a presença de diferentes amostras na mesma concentração. Já para a porcentagem de efeito máximo da DBC livre e associada à SLN e NLC liofilizados com e sem crioprotetor foram avaliadas as diferenças estatísticas entre as amostras em cada tempo no qual foi realizado o teste de *tail-flick* por ANOVA e *Turkey-Kramer*.

## **5. Resultados e discussão**

### **5.1. Solubilidade da dibucaína**

O uso clínico da DBC possui algumas limitações, entre elas sua baixa solubilidade. A Figura 20.A mostra a curva de solubilidade da dibucaína (forma neutra) determinada em tampão carbonato (pH 10,0). Neste gráfico pode-se observar que a solubilidade da DBC neste pH foi de  $0,06 \text{ mmol.L}^{-1}$  corroborando os resultados obtidos por de Paula & Schreier (1995):  $0,03 \text{ mmol.L}^{-1}$  em pH 10,5. A Figura 20.B mostra a curva experimental para determinação da solubilidade do cloridrato de DBC em tampão fosfato, pH 7,4, onde determinou um máximo de solubilidade de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Este resultado, além de estar de acordo com os dados de literatura, é consistente com a ionização parcial do grupamento amino da dibucaína ( $\text{pK}_a = 8,3$ ), que em pH 7,4 está 88% protonada, explicando porque a solubilidade determinada em pH 7,4 está mais próxima àquela da forma protonada do anestésico ( $1,9 \text{ mol.L}^{-1}$ ) (de Paula & Schreier, 1995).

A solubilidade aquosa da dibucaína em pH 7,4 ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) corresponde a 3 g%, próxima à dose clínica de anestésicos locais como a lidocaína (2%), prilocaína (3%) e articaína (4%) (Malamed, 2001).

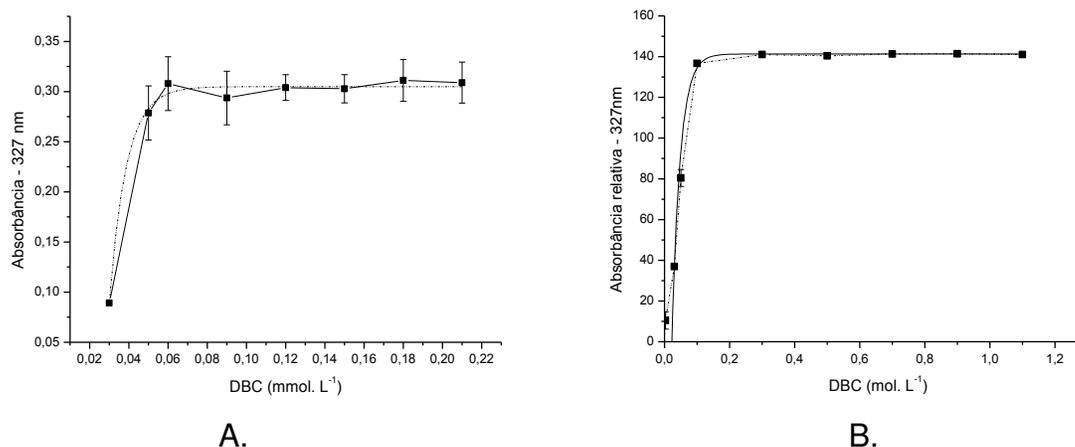


Figura 20. Curva de solubilidade da DBC. (A) DBC neutra em tampão carbonato (5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 10,0); (B) cloridrato de DBC em tampão fosfato (1,5 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4). A quantidade de DBC no sobrenadante foi determinada por absorbância, em 327 nm.

## 5.2. Quantificação da dibucaína por CLAE

### 5.2.1. Validação de metodologia analítica

A Figura 21.A apresenta o cromatograma de uma amostra padrão de DBC, cujo pico pode ser visualizado em um tempo de retenção de 1,78 minutos. Não foram observados outros picos no mesmo tempo de retenção quando amostras de nanopartículas lipídicas (SLN<sub>MM</sub>, Figura 21.B), SLN<sub>CP</sub>, SLN<sub>MM</sub> e NLC<sub>MM</sub> sem DBC foram avaliadas nas mesmas condições de análise cromatográfica, bem como não foram observadas impurezas dos componentes, demonstrando, assim, especificidade na técnica estabelecida. A validação da metodologia aqui descrita foi recentemente publicada (Barbosa et al., 2013c).

Soluções de dibucaína foram preparadas contendo entre 1,5 µg.mL<sup>-1</sup> a 30 µg.mL<sup>-1</sup>, o que corresponde a 7,5% - 150% da concentração de trabalho (20 µg. mL<sup>-1</sup>) (Figura 22). A linearidade do método foi avaliada utilizando-se a curva analítica média, obtida a partir de nove curvas individuais, medidas em três dias consecutivos (três por dia). Os

coeficientes de correlação ( $r$ ) foram superiores a 0,999, nos 3 dias avaliados, de acordo com as recomendações da RE 899 da ANVISA (ANVISA, 2003) (Tabela 16). Resultados semelhantes foram observados por (Elsayed, 2007) que desenvolveu e validou metodologia de quantificação por CLAE para determinação da DBC após aplicação tópica da DBC na pele intacta.

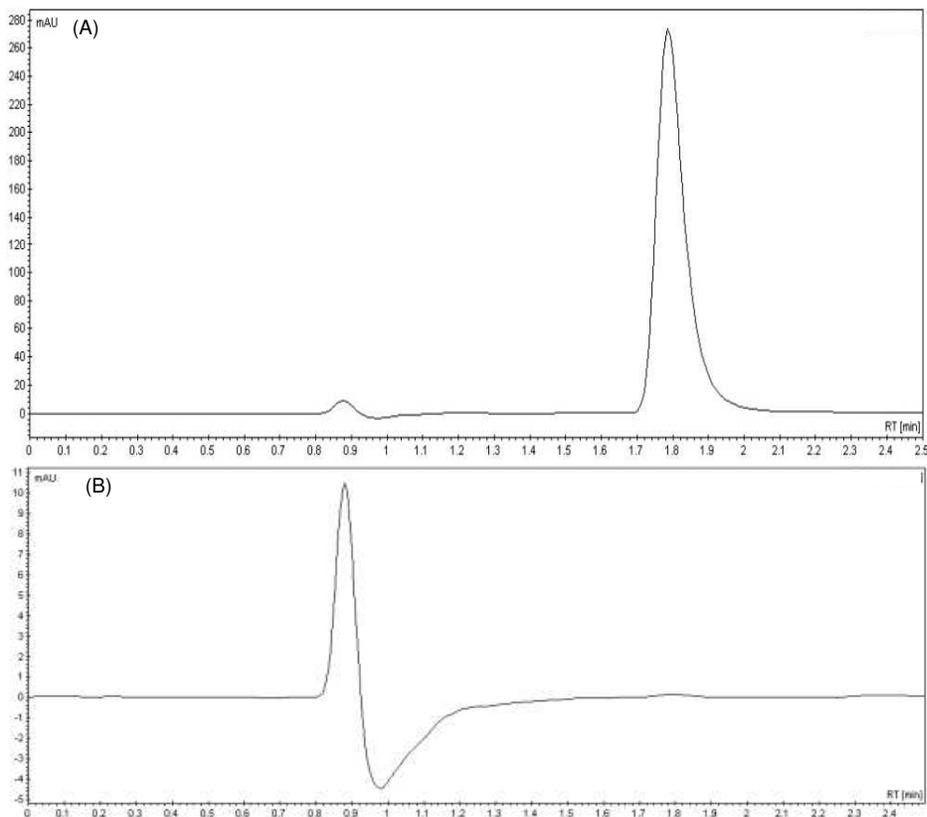


Figura 21. CLAE: (A) Cromatograma obtido para a dibucaína em solução ( $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). (B) Cromatograma de amostra de nanopartícula ( $\text{SLN}_{\text{MM}}$ , sem DBC), evidenciando que não há picos no tempo de retenção de 1,78 minutos (foram observados resultados semelhantes para as nanopartículas  $\text{SLN}_{\text{CP}}$ ,  $\text{SLN}_{\text{MM}}$  e  $\text{NLC}_{\text{MM}}$  sem DBC). Fase estacionária: coluna C18 fase reversa e fase móvel mistura de acetonitrila e tampão fosfato de trietilamina ( $\text{pH } 2,3$ ;  $0,04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , v/v) (55:45), v/v.

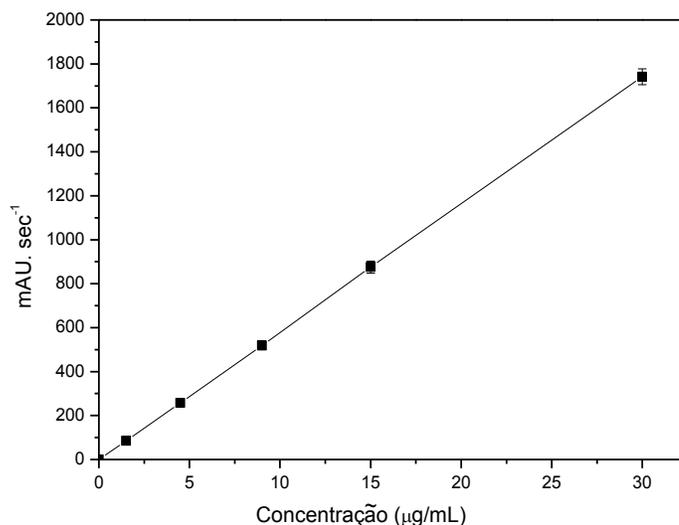


Figura 22. CLAE: Curva analítica da dibucaína, na faixa de concentração de 1,5-30 µg.mL<sup>-1</sup>.

Tabela 16. Equações da reta e os coeficientes de correlação (r) obtidos a partir das curvas analíticas (n=3) construídas em três dias consecutivos.

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>
<b>Regressão linear</b>	$y = 58,56x - 11,60$	$y = 57,31x + 5,34$	$y = 58,52x - 0,52$
<b>R</b>	0,9994	0,9994	0,9999

As regressões lineares foram utilizadas para calcular o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) da dibucaína, de acordo com as Equações 3 e 4 (item 4.3.6) determinados a partir do intercepto e da inclinação da curva analítica. Segundo estas análises, a menor quantidade de DBC que pode ser detectada e quantificada com precisão em uma determinada amostra foi de 0,49 e 1,48 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A Tabela 17 apresenta os dados de precisão intra-dia e da precisão intermediária (inter-dia), determinados a partir dos desvios padrão relativos medidos. Em todos os casos, o DPR foi  $\leq 3\%$ , de acordo com orientações recomendadas (ANVISA, 2003).

Tabela 17. Resultados dos testes de precisão: intra-dia (DPR<sub>1</sub>, DPR<sub>2</sub> e DPR<sub>3</sub>) e inter-dia, obtidos com medidas de três concentrações diferentes de dibucaína (baixa, média e alta), em 3 dias consecutivos.

[DBC] (µg.mL <sup>-1</sup> )	DPR 1 (%)	DPR 2 (%)	DPR 3 (%)	DPR Inter-dia (%)
4,5	3,00	2,36	1,46	0,22
9,0	0,79	1,95	2,45	1,51
30,0	0,36	2,77	1,88	1,70

As concentrações teóricas da DBC foram comparadas com os valores obtidos experimentalmente e os resultados estão apresentados na Tabela 18, sendo possível observar que o método avaliado pode ser considerado preciso (concentrações teóricas  $\cong$  concentrações experimentais). As recuperações médias em três dias consecutivos ficaram entre 97,58 e 100,87% do esperado (Tabela 19), de acordo com o exigido pela USP (2009) que limita valores entre 97-102%, assim demonstrando boa exatidão do método (Elsayed, 2007).

Tabela 18. Resultados do teste de precisão: comparação entre concentração teórica e concentração obtida experimentalmente, da medida de dibucaína por CLAE. 1, 2, 3 correspondem ao primeiro, segundo e terceiro dia de experimento.

[DBC*] (µg.mL <sup>-1</sup> )	[DBC**] ± DP (µg.mL <sup>-1</sup> ) Dia 1	[DBC**] ± DP (µg.mL <sup>-1</sup> ) Dia 2	[DBC**] ± DP (µg.mL <sup>-1</sup> ) Dia 3	[DBC**] ± DP (µg.mL <sup>-1</sup> ) Inter-dia
4,5	4,48 ± 0,13	4,47 ± 0,11	4,39 ± 0,01	4,47 ± 0,01
9,0	8,80 ± 0,07	8,7 ± 0,18	9,06 ± 0,22	8,91 ± 0,13
30,0	30,26 ± 0,11	29,26 ± 0,81	29,89 ± 0,56	29,80 ± 0,51

\* Concentração teórica da DBC; \*\* Concentração obtida experimentalmente da DBC.

Tabela 19. Resultados de exatidão do método quantitativo para determinação da dibucaína por CLAE.

[DBC*] ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	% recuperada			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter - dia
4,5	99,47	99,44	97,58	98,83
9,0	97,79	98,61	100,68	99,03
30,0	100,87	97,54	99,64	99,35

\* Concentração teórica da DBC.

### 5.3. Preparo e caracterização físico-química das nanopartículas (SLN e NLC)

#### 5.3.1. Determinação teórica do HLB

A Tabela 20 apresenta os valores de HLB dos componentes lipídicos constituintes das nanopartículas. De acordo com o fabricante do MM e LIPOGC, o HLB desses lipídios é 8,5 e 11, respectivamente. Assim, utilizando a Equação 5, as amostras SLN<sub>MM</sub> e NLC<sub>MM</sub> obtiveram HLB requerido de 8,5. Já a SLN<sub>CP</sub>, que tem como componente lipídico apenas CP (HLB 10), necessita de um agente emulsificante com HLB de 10.

Neste trabalho, a pré-emulsão (etapa que precede a formação das SLN ou NLC) é do tipo O/A, sendo dessa forma desejado que o emulsificante seja mais solúvel na fase aquosa do que na fase oleosa e que confira homogeneidade e estabilidade pela redução da tensão interfacial dos dois líquidos imiscíveis. A fase aquosa constituída de água e tensoativo hidrofílico; poloxamer 188 (Pluronic F68), com o valor de HLB=29 (de acordo com o fabricante), foi capaz de estabilizar a suspensão coloidal na concentração de 0,5 e 1,5% (m/v) para SLN e NLC, respectivamente, após a etapa de formação das nanopartículas lipídicas, que será apresentado a seguir. Assim, cabe observar que o processo de produção das SLN e NLC (com uma rápida passagem entre a formação de uma emulsão seguida da precipitação das nanopartículas) e a utilização de um agente emulsificante com um valor de HLB mais alto que o requerido, conferiu formulações de

nanopartículas estáveis (estabilizadas estericamente) por um período de tempo prolongado (armazenamento a 4 °C durante 240 dias).

Tabela 20. HLB das emulsões preparadas

<b>Amostras</b>	<b>MM</b>	<b>CP</b>	<b>LIPOGC</b>	<b>HLB</b>
SLN <sub>MM</sub>	100	-	-	8,5
SLN <sub>CP</sub>	-	100	-	10,0
NLC <sub>MM</sub>	98,5	-	1,5	8,5

### **5.3.2. Avaliação do tamanho, distribuição e potencial zeta**

As SLN e os NLC foram preparados de acordo com as Tabelas 8 e 9, descritas no item 4.4. Os lipídios utilizados neste trabalho foram selecionados devido aos seus baixos pontos de fusão, que favoreceram a preparação das formulações e evitou eventuais problemas de degradação térmica. Um dia após a preparação das amostras, foram realizadas as avaliações quanto ao tamanho (diâmetro médio das partículas, em nanômetros, nm) polidispersão ou distribuição de tamanhos (PDI) e potencial zeta (Z, em mV). Estes mesmos parâmetros foram avaliados em diferentes tempos de armazenamento (a 4 °C), por até 240 dias.

Para a otimização da nanopartículas, inicialmente NLC foram preparados com diferentes concentrações do estabilizante coloidal Pluronic F68, mas apenas a formulação contendo 15 mg.mL<sup>-1</sup> deste estabilizante foi estável durante 3 meses de estocagem quando as partículas foram preparadas por Son. As demais amostras apresentaram separação de fases após a preparação.

Os diâmetros médios das SLN preparadas com os lipídios MM e CP (SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub>) e NLC preparadas com o lipídio sólido MM e lipídio líquido LIPOGC (NLC<sub>MM</sub>) preparadas pelos métodos HP e Son variaram entre 166,62 ± 14,96 nm e 287,75 ± 15,20 nm, não havendo diferenças estatísticas (ANOVA, p > 0,05) entre as formulações, em relação à presença ou ausência de DBC (em ambas as partículas, nos

dois processos de preparação) (Tabela 21). Com exceção das formulações SLN<sub>CP</sub>/Son e SLN<sub>CP</sub>DBC/Son, o índice de polidispersidade para todas as amostras foi de aproximadamente 0,25, o que sugere se tratar de sistemas coloidais homogeneamente dispersos (Müller et al., 2002, Marcato et al. 2008, Barbosa et al. 2013a). Foi observada diferença significativa referente à polidispersão das partículas quanto à presença ou ausência do anestésico, em se tratando da metodologia de preparo (HP ou Son), para as amostras com matrizes lipídicas compostas por palmitato de cetila (CP). As demais amostras foram consideradas iguais quanto à polidispersão, após a análise de variância. Além disso, na Tabela 21 observa-se ainda que o processo de homogeneização das partículas, realizado por 3 ciclos à alta pressão produziu nanopartículas com distribuição de tamanho mais uniforme que as obtidas pelo processo de sonicação, em concordância com o observado por Mehnert & Mader (2001) e Wissing et al., (2004), o que direcionou a escolha da metodologia de alta pressão para a preparação das formulações.

O potencial zeta das formulações é um dos fatores que determina a estabilidade física das emulsões e suspensões, tal que, quanto maior a repulsão eletrostática entre as partículas maior será a sua estabilidade. *A priori*, valores elevados (em módulo) de cargas superficiais ( $> \pm 30$  mV) são benéficos para a estabilidade física das formulações, como descrito no item 4.5.3. Potenciais zeta em torno de  $\pm 20$  mV estão relacionados com estabilidade por um curto espaço de tempo e valores entre - 5 mV e + 5 mV são compatíveis com rápida agregação das partículas. No entanto, isto só é válido quando são utilizados tensoativos de baixo peso molecular e quando ocorre estabilização elétrica das nanopartículas. Isto não se aplica quando são usados estabilizantes com alta massa molar, que agem principalmente por estabilização estérica (potenciais zeta menores que 20 mV), que é o caso do Pluronic F68. A adsorção de polímeros ou grandes moléculas na superfície das nanopartículas favorece o afastamento das cargas (*slipping plane*) das nanopartículas, com consequente redução do potencial zeta. Neste caso, embora haja redução do potencial zeta, são comprovadamente estáveis (Mishra et al., 2009).

Tabela 21. Diâmetro médio, distribuição (PDI) e potencial zeta das SLN e NLC preparadas por HP e Son, utilizando CP e MM como lipídios estruturais (valores expressos em média  $\pm$  D.P., com n=3). Medidas feitas por PCS.

<b>Amostra/ processo</b>	<b>Diâmetro médio (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
SLN <sub>MM</sub> /Son	227,80 $\pm$ 3,80	0,22 $\pm$ 0,05	-25,13 $\pm$ 7,62
SLN <sub>MM</sub> DBC/Son	250,17 $\pm$ 61,40	0,21 $\pm$ 0,07	-19,18 $\pm$ 3,73
SLN <sub>MM</sub> /HP	188,02 $\pm$ 7,07	0,15 $\pm$ 0,02	-26,91 $\pm$ 7,72
SLN <sub>MM</sub> DBC/HP	234,33 $\pm$ 42,87	0,23 $\pm$ 0,06	-18,47 $\pm$ 2,55
SLN <sub>CP</sub> /Son	287,75 $\pm$ 15,20	0,32 $\pm$ 0,01 <sup>a**</sup>	-26,03 $\pm$ 6,50 <sup>e*</sup>
SLN <sub>CP</sub> DBC/Son	271,60 $\pm$ 30,72	0,27 $\pm$ 0,02 <sup>b***</sup>	-10,67 $\pm$ 1,53
SLN <sub>CP</sub> /HP	239,37 $\pm$ 18,31	0,18 $\pm$ 0,03 <sup>c***</sup>	-45,93 $\pm$ 4,64 <sup>f***g**</sup>
SLN <sub>CP</sub> DBC/HP	262,63 $\pm$ 48,42	0,14 $\pm$ 0,03	-3,89 $\pm$ 0,96
NLC <sub>MM</sub> /Son	227,44 $\pm$ 34,91	0,27 $\pm$ 0,01 <sup>d*</sup>	-20,57 $\pm$ 5,13 <sup>h*</sup>
NLC <sub>MM</sub> DBC/Son	197,93 $\pm$ 15,56	0,26 $\pm$ 0,03	-10,73 $\pm$ 1,36
NLC <sub>MM</sub> /HP	166,62 $\pm$ 14,96	0,12 $\pm$ 0,01	-28,83 $\pm$ 4,41 <sup>i**</sup>
NLC <sub>MM</sub> DBC/HP	177,39 $\pm$ 15,87	0,20 $\pm$ 0,08	-14,89 $\pm$ 2,78

**Estatística:** ANOVA com posterior teste de Turkey-Kramer com  $p < 0,001$  (\*\*\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,05$  (\*). PDI: a. SLN<sub>CP</sub>/Son e SLN<sub>CP</sub>DBC/Son, b. SLN<sub>CP</sub>DBC/Son e SLN<sub>CP</sub>DBC/HP, c. SLN<sub>CP</sub>/Son e SLN<sub>CP</sub>/HP, d. NLC<sub>MM</sub>/Son e NLC<sub>MM</sub>/HP. Potencial Zeta: e. SLN<sub>CP</sub>/Son e SLN<sub>CP</sub>DBC/Son, f. SLN<sub>CP</sub>/HP e SLN<sub>CP</sub>DBC/HP, g. SLN<sub>CP</sub>/Son e SLN<sub>CP</sub>/HP, h. NLC<sub>MM</sub>/Son e NLC<sub>MM</sub>DBC/Son, i. NLC<sub>MM</sub>/HP e NLC<sub>MM</sub>DBC/HP.

A estabilização estérica pelo tensoativo não-iónico Pluronic F68 na superfície das nanopartículas forneceu valores de potencial zeta entre -25 e -46 mV nas partículas sem DBC (Tabela 21), suficientes para evitar a agregação e assegurar estabilidade (Mitri et al., 2011) durante o tempo de armazenamento (240 dias). Os resultados apresentados estão de acordo com os resultados de obtidos por Lai et al. (2007) e Mitri et al. (2011), os quais obtiveram SLN com baixos valores de potencial zeta, mas com alta estabilidade física ao longo de dois anos de estocagem, justificado pela adição de um estabilizante estérico adequado.

Os resultados apresentados na Tabela 21 indicam ainda que a adição de dibucaína nas SLN e NLC tornou a superfície das nanopartículas menos negativa, principalmente para SLN<sub>CP</sub> preparadas por HP ou Son. Uma vez que dibucaína (pKa = 8,3) (Malheiros et al., 2004) está parcialmente protonada no pH da formulação (pH 8,2), este resultado indica que, pelo menos uma fração das moléculas do anestésico deve estar presente na superfície das nanopartículas, o que também foi inferido dos ensaios de liberação *in vitro*, como será discutido posteriormente (Figura 48) (zur Mühlen et al., 1998).

### **5.3.3. Análise de trajeto de nanopartículas**

Os diâmetros hidrodinâmicos das SLN e NLC, com e sem DBC produzidos por HP, foram também avaliados por NTA (Tabela 22), através da monitorização do movimento Browniano das nanopartículas pelo registro da luz dispersa, como descrito no item 4.5.4. Partículas bem dispersas e espacialmente resolvidas foram visualizadas através de gravações de vídeos (10 segundos), utilizando uma câmara CCD. Nos quadros de vídeo (apresentados nas Figura 58 a Figura 60, Anexo II) é possível observar que as partículas maiores apresentam-se como pontos luminosos definidos e as partículas menores movem-se mais rapidamente, o que era esperado devido ao movimento browniano das partículas (Filipe et al., 2010; Hoffmeister et al., 2012).

Diferentes intensidades de espalhamento de luz puderam ser observadas para cada formulação, mas os dados cumulativos em percentil da distribuição de partículas indicaram diâmetros com homogeneidade de tamanhos, ou seja, com tamanhos similares e sem a necessidade de qualquer procedimento de purificação para a obtenção de uma única população de partículas.

A polidispersidade das nanopartículas (dada, neste caso, pelo valor do *Span* calculado pela Equação 8 (Tabela 22) foi igual ou menor que 1, confirmando a homogeneidade do sistema, em concordância com os dados obtidos por PCS. Além disso, também não foram observadas diferenças significativas no tamanho das partículas com a adição do anestésico nas SLN (Teste *T de Student* com  $p > 0,05$ ). Em

contrapartida, diferentemente das análises realizadas por PCS, no NTA não foi detectada a presença de uma pequena população com partículas de grandes dimensões, em relação ao diâmetro médio (Figuras 56 e 57, Anexo I).

De acordo com Filipe e col. (Filipe et al., 2010) o diâmetro médio das partículas obtidas por PCS é influenciado significativamente por um pequeno número de grandes partículas. Em contrapartida, o NTA, por se tratar de uma técnica de análise individual, é menos sensível à presença desses “contaminantes”.

Tabela 22. Tamanho médio e dados cumulativos do diâmetro das partículas, determinados por NTA (*nanoparticle tracking analysis*, NTA). Valores expressos em média  $\pm$  D.P., com  $n=3$ .  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$  referem-se aos diâmetros com base em 10%, 50% e 90% do perfil de distribuição cumulativa. Análise estatística feita pelo teste *T de Student*, não significativa com  $p > 0,05$ .

Amostras	Dados cumulativos do diâmetro (D)			Diâmetro médio (nm)	
	$D_{10}$ (nm)	$D_{50}$ (nm)	$D_{90}$ (nm)		Span
$SLN_{MM}/HP$	118	178	248	$172,00 \pm 7,81$	0,7
$SLN_{MM}DBC/HP$	119	174	243	$175,67 \pm 10,69$	0,7
$SLN_{CP}/HP$	96	181	255	$173,33 \pm 5,13$	0,9
$SLN_{CP}DBC/HP$	80	148	234	$178,00 \pm 9,54$	1,0
$NLC_{MM}/HP$	134	178	242	$178,67 \pm 8,96$	0,6
$NLC_{MM}DBC/HP$	120	168	220	$170,67 \pm 3,79$	0,6

Assim, comparando os valores de diâmetro médio das nanopartículas obtidos por PCS e NTA, foi possível observar diferenças significativas apenas para as amostras  $SLN_{CP}/HP$  e  $SLN_{CP}DBC/HP$  (teste *t de Student*,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente), onde a presença de uma pequena população de partículas de grandes dimensões foi responsável pelo aumento no diâmetro médio registrado por PCS. Estas populações minoritárias não foram consideradas no cálculo da média daquelas amostras, quando

avaliadas por NTA, justificando a diferença de resultados encontrados entre as técnicas. As demais amostras não diferiram estatisticamente (teste *t de Student*,  $p > 0,05$ ).

#### ***5.3.4. Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica***

As imagens de MET das SLN e NLC com DBC (Figura 23.(B), (D), (F)) e sem DBC (Figura 23.(A), (C), (E)) revelaram partículas aproximadamente esféricas, com superfícies delineadas, distribuição de tamanhos homogênea e tamanhos da ordem de 200 a 250 nm. A incorporação da DBC não alterou a morfologia e o tamanho das nanopartículas.

Essas imagens, obtidas por MET, confirmaram os resultados de espectroscopia de correlação de fótons (PCS e NTA). A mesma morfologia e distribuição foram observadas por AFM, como mostra a Figura 24, para a formulação SLN<sub>MM</sub>DBC preparada por HP e usada como modelo das demais partículas lipídicas. A imagem de AFM (Figura 24) mostra distribuição homogênea compatível com as demais análises (MET, PCS e NTA).

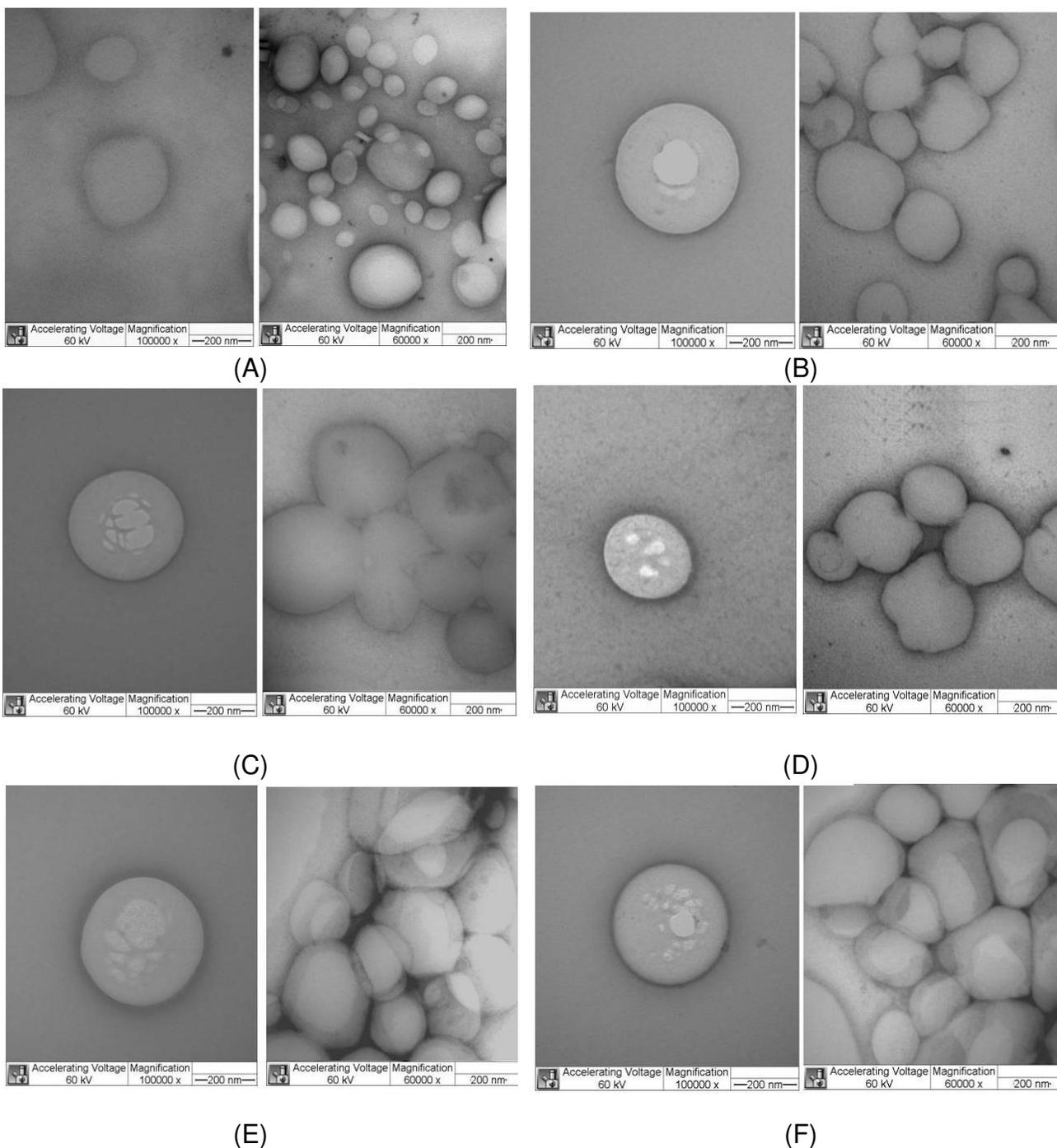


Figura 23. Morfologia das nanopartículas lipídicas por microscopia eletrônica de transmissão, com e sem o anestésico dibucaína, preparadas por homogeneização à alta pressão. (A).SLN<sub>MM</sub>/HP, (B).SLN<sub>MM</sub>DBC/HP, (C).SLN<sub>CP</sub>/HP (D).SLN<sub>CP</sub>DBC/HP, (E).NLC<sub>MM</sub>/HP, (F).NLC<sub>MM</sub>DBC/HP. Aumento de 100.000 (esquerda) e 60.000x (direita).

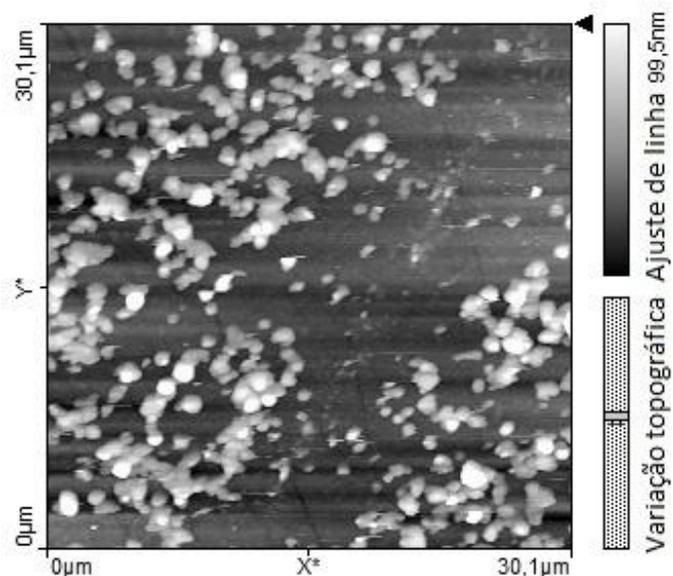


Figura 24. Imagem topográfica obtida por AFM das SLN<sub>MM</sub>DBC/HP (varredura da área: 30,1 x 30,1 μm<sup>2</sup>).

### **5.3.5. Avaliação da porcentagem de encapsulação e do coeficiente de partição da dibucaína nas nanopartículas (SLN e NLC)**

A porcentagem de fármaco encapsulado foi determinada indiretamente pela quantificação da DBC não encapsulada (encontrada livre na fase aquosa, após filtração, item 4.7), usando a Equação 15. A curva analítica utilizada para o cálculo de %EE foi  $y = 58,56x - 11,60$  (Figura 22 e Tabela 16).

A Tabela 23 mostra os resultados da influência da matriz lipídica e do processo de homogeneização sobre a eficiência de encapsulação da DBC. As formulações exibiram alta eficiência de encapsulação (acima de  $69,93 \pm 0,86\%$ ). Este resultado indica que a elevada lipofilia da DBC favoreceu a interação do anestésico com os lipídios formadores das partículas. Foram observadas diferenças estatísticas significantes entre as amostras preparadas por HP e Son, sendo que a maior %EE foi obtida para amostras preparadas por HP, excetuando-se SLN<sub>MM</sub>DBC/Son (*teste T de Student*  $p < 0,05$ ). A amostra NLC<sub>MM</sub>DBC/HP apresentou a maior eficiência de encapsulação (90,54

± 0,95%) dentre as demais partículas (ANOVA com posterior de teste de *Turkey-Kramer*,  $p < 0,05$ ).

No entanto, a capacidade de carregamento da NLC<sub>MM</sub>DBC/HP (LC 4,70 ± 0,11 %) não foi significativamente maior (ANOVA,  $p > 0,05$ ) que a das demais amostras preparadas por alta-pressão (SLN<sub>MM</sub>DBC/HP com LC de 4,37 ± 0,27% e SLN<sub>CP</sub>DBC/HP com 4,33 ± 0,17%).

Tabela 23. Valores de porcentagem de encapsulação e do coeficiente de partição (P) da dibucaína nas SLN e NLC preparados por alta pressão de homogeneização (HP) ou por sonicação (Son) (pH=8,2). Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, com n= 3.

<i>Amostra</i>	<i>%EE</i>	<i>P (pH= 8,2)</i>
<i>SLN<sub>MM</sub>DBC/HP</i>	76,58 ± 7,88 <sup>a**j***</sup>	(115,10 ± 39,49) x10 <sup>2</sup> (e <sup>***</sup> )
<i>SLN<sub>MM</sub>DBC/Son</i>	89,33 ± 3,54 <sup>c, d***</sup>	(313,76 ± 110,81) x10 <sup>2</sup> (g, h, l <sup>***</sup> )
<i>SLN<sub>CP</sub>DBC/HP</i>	78,42 ± 4,96 <sup>b**</sup>	(132,25 ± 49,54) x10 <sup>2</sup> (f <sup>***</sup> )
<i>SLN<sub>CP</sub>DBC/Son</i>	72,28 ± 4,20	(90,68 ± 22,27) x10 <sup>2</sup>
<i>NLC<sub>MM</sub>DBC/HP</i>	90,54 ± 0,95 <sup>i***</sup>	(315,27 ± 34,87) x10 <sup>2</sup>
<i>NLC<sub>MM</sub>DBC/Son</i>	69,93 ± 0,86	(76,25 ± 3,15) x10 <sup>2</sup> (k <sup>**</sup> )

Em relação aos valores do coeficiente de partição (P) da dibucaína entre as fases (oleosa - matriz lipídica e aquosa), foi observado um alto coeficiente de partição para todos os casos, com valores maiores para as amostras compostas por MM. Sabe-se que quanto maior a solubilidade aquosa, mais rápido o anestésico se distribui e alcança a membrana biológica, bem como é mais rapidamente retirado do local de ação, favorecendo a redução do seu efeito farmacológico. Todavia, quanto maior a lipossolubilidade do anestésico, maior será a penetração do mesmo na membrana nervosa, onde se concentrará e terá seu efeito biológico mais pronunciado em termos de potência anestésica. Assim, altos valores de P são desejáveis nas formulações estudadas, pois estão diretamente correlacionados com a potência anestésica da

formulação (Strichartz, 1987; Mclure & Rubin, 2005). Os valores de P aqui determinados, em relação à partição da DBC em outros sistemas de liberação sustentada baseados em lipídios (P da DBC em lipossomas  $2614 \pm 49$ ) (Malheiros et al., 2004), são aproximadamente 100 vezes maiores, e comparáveis ao de anestésicos locais lipofílicos como a tetracaína, bupivacaína e etidocaína (Malheiros et al., 2004), reafirmando o caráter hidrofóbico deste agente anestésico.

### **5.3.6. Espectrometria de massas**

A Figura 25 exibe o espectro de massas da DBC pura ( $343 \text{ g.mol}^{-1}$ ), sendo observado um pico em  $344 \text{ m.z}^{-1}$ . O mesmo pico foi observado para DBC não encapsulada, separada das amostras de  $\text{SLN}_{\text{MM}}\text{DBC}$  de acordo com o item 4.7, confirmando a presença da forma protonada da dibucaína na suspensão coloidal (Barbosa et al., 2013c)

Os espectros de massas dos lipídios sólidos (MM e CP com massas molares teóricas de  $424,74$  e  $480,85 \text{ g.mol}^{-1}$  respectivamente), utilizados nas formulações das SLN e NLC, apresentados nas Figura 26 (A e B) indicam compatibilidade dos componentes avaliados (MM e CP) com os dados daqueles compostos, existentes na biblioteca NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos EUA). Os cromatogramas da Figura 27 (A e B), mostram que são produtos com alto grau de pureza e, apesar do MM apresentar um pequeno pico com tempo de retenção em 11,59 minutos, sua área frente à total da amostra, foi pequena.

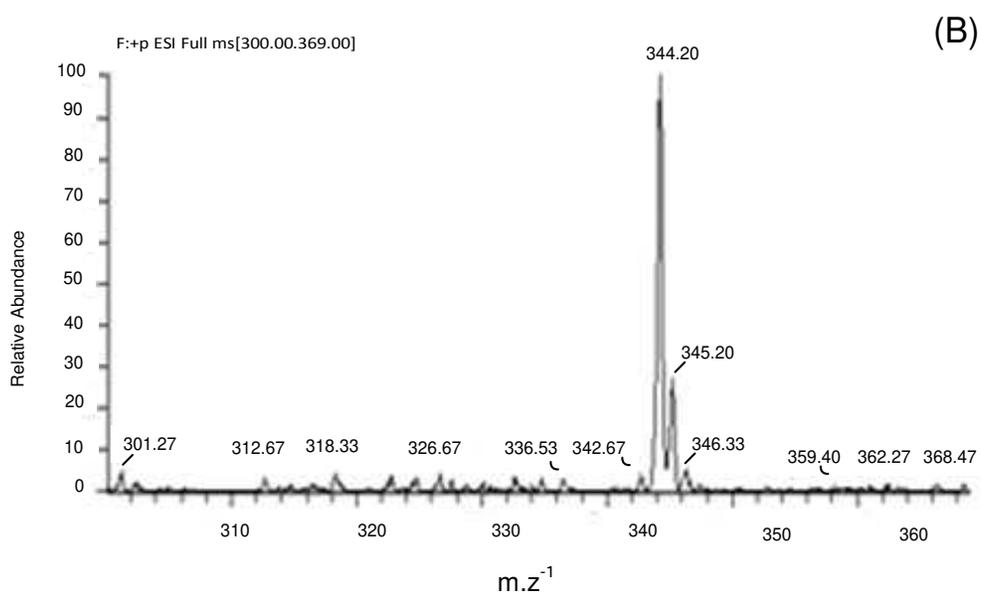
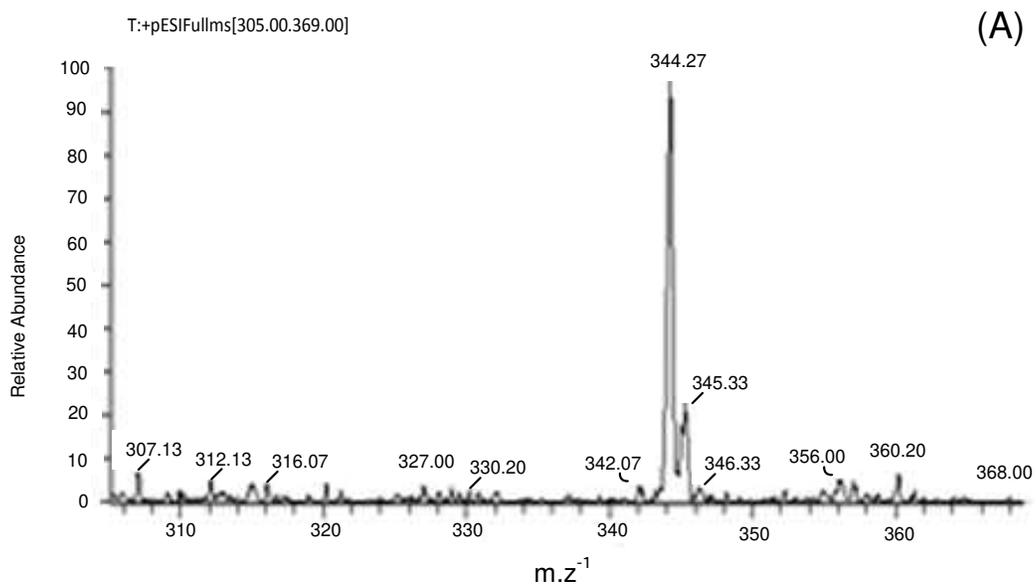


Figura 25. Espectro de massas da solução padrão de DBC, em pH 7,4 (A) e DBC não encapsulada, extraída da amostra SLN<sub>MM</sub>DBC (B) em pH 7,4 (Barbosa et al., 2013c).

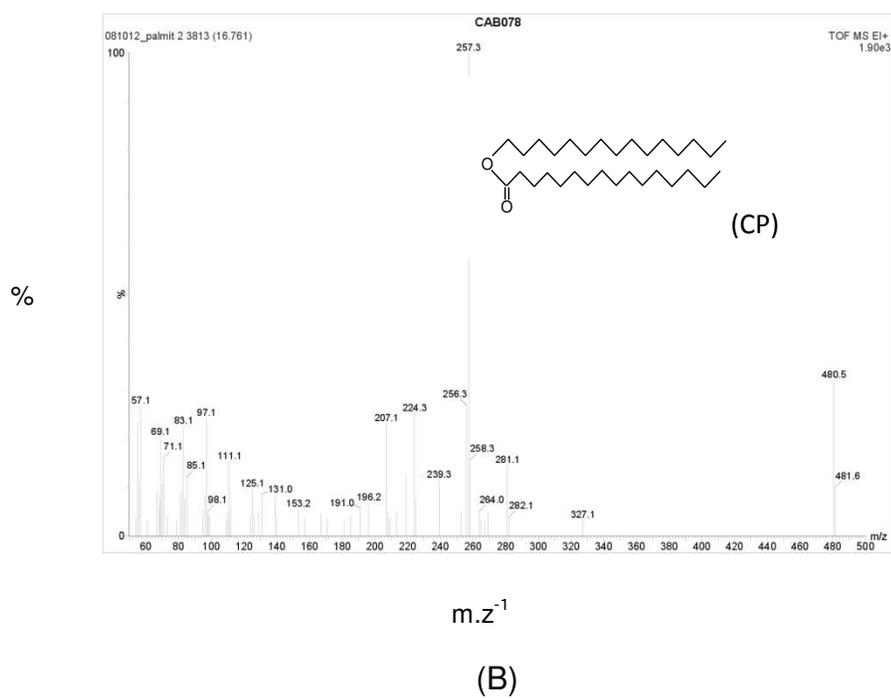
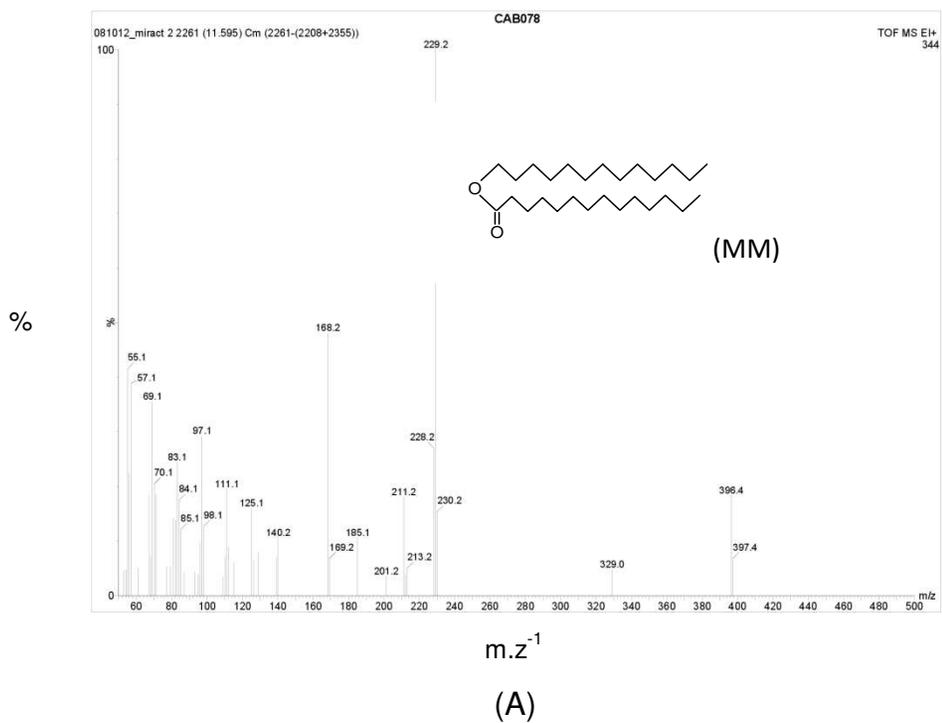


Figura 26. Espectros de massas do (A) miristato de miristila (MM) e (B) palmitato de cetila (CP), utilizados no preparo das formulações SLN e NLC.

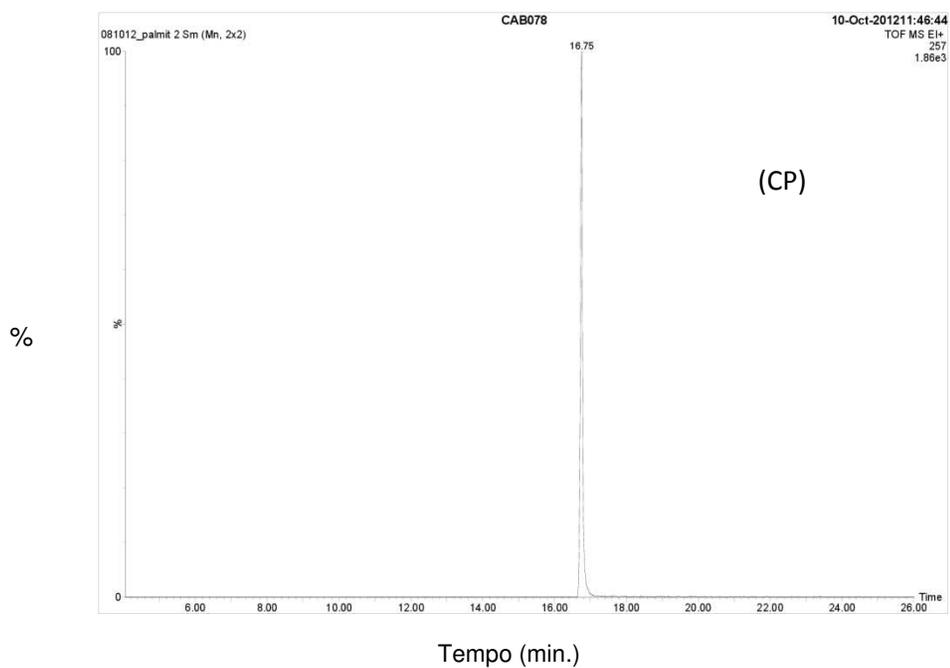
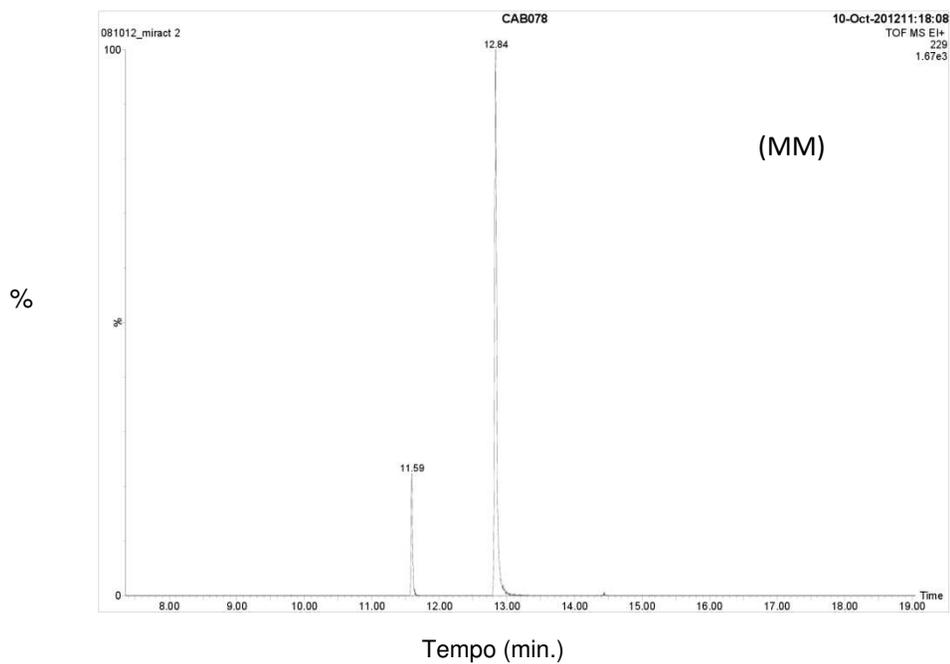


Figura 27. Cromatogramas do (A) miristato de miristila (MM) e (B) palmitato de cetila (CP) utilizados nas formulações das SLN e NLC.

### **5.3.7. Medidas de ressonância paramagnética eletrônica**

A análise dos dados obtidos pela técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) objetivou um estudo comparativo entre o efeito da DBC sobre a mobilidade e a organização dos lipídios MM e CP, nas regiões monitoradas pelos marcadores de spin 5-SaSL e 5-MeSL.

#### **5.3.7.1. Marcador 5-SASL**

Dada a polaridade do ácido esteárico, o marcador de spin 5-SASL monitora regiões mais próximas à superfície da partícula. Conforme pode ser observado, a presença da DBC parece alargar os espectros do SASL nas  $SLN_{MM}$ , o que é mais evidente nas temperaturas de até 30 °C (Figura 28), o que parece evidenciar um maior grau de anisotropia na ambiência química do marcador de spin, nessas baixas temperaturas. O efeito da DBC em organizar os espectros do 5-SASL fica evidente nas temperaturas mais baixas (5, 10 °C), pela separação dos componentes do pico de campo baixo, como mostram as setas na Figura 28.

A análise da razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) em função da temperatura dos espectros do 5-SASL incorporado nas  $SLN_{MM}$  e  $SLN_{MM}DBC$  (Figura 29) revelou mais detalhes do efeito da DBC sobre estas partículas. Na Figura 29 foi possível observar que em temperaturas entre 40 e 55 °C, acima da temperatura de fusão do lipídio MM, a presença da DBC favoreceu a isotropia dos lipídios na região de análise, ou seja, os valores de  $h_{+1}/h_0$  foram maiores para a partícula com o fármaco, do que para a mesma sem o fármaco. Isto pode indicar que as moléculas de DBC tornam o arranjo lipídico menos organizado (sinal mais isotrópico) na região que foi monitorada, isto é, de inserção do marcador 5-SASL, nas temperaturas mais elevadas. Em contrapartida, como já mencionado, foram verificados menores valores da razão entre alturas de campo baixo e central das partículas com DBC em relação às partículas sem DBC, nas temperaturas entre 5 °C a 30 °C, confirmando que nesse intervalo de

temperatura, a presença da DBC aumentou a anisotropia da região monitorada pelo 5-SASL.

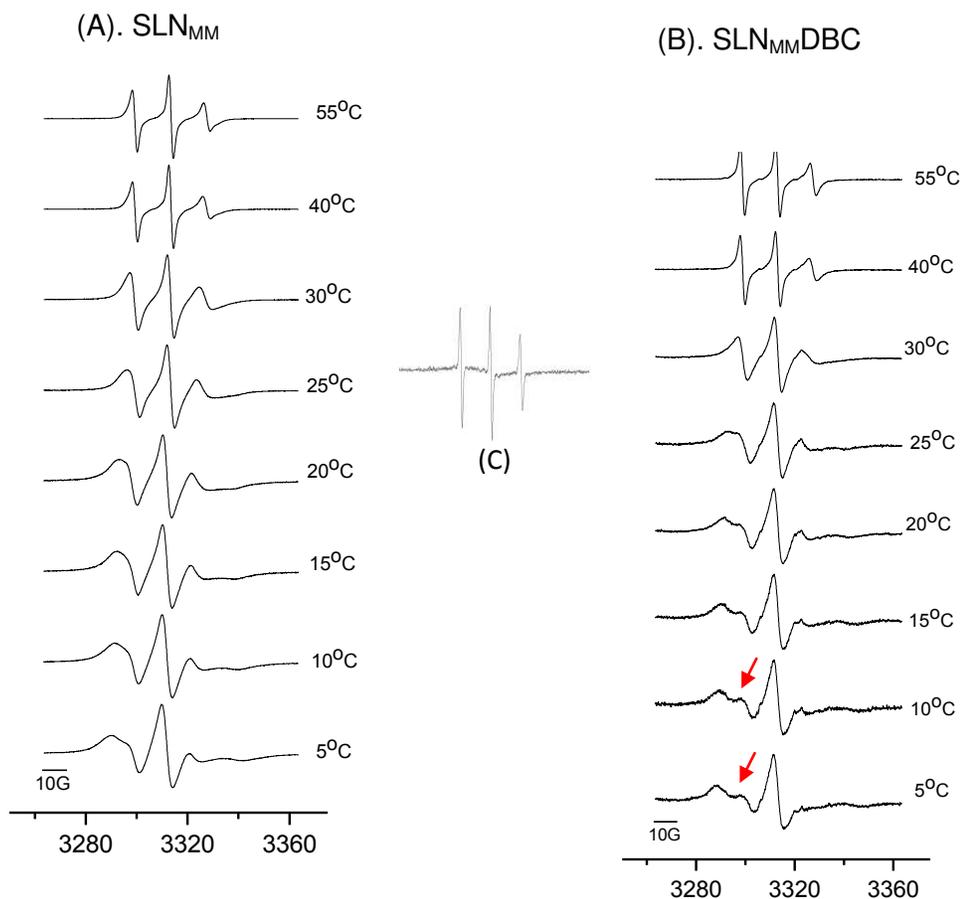


Figura 28. RPE: espectros do marcador de spin 5-SASL incorporado em SLN<sub>MM</sub> (A), SLN<sub>MM</sub>DBC (B) em diferentes temperaturas e do 5-SASL em água pura (sistema Milli-Q) (C) a 25 °C.

Da mesma forma que nas amostras contendo MM, o marcador de spin 5-SASL foi incorporado em SLN de CP, com e sem DBC. A DBC também causou alargamento dos espectros em temperaturas abaixo da de fusão do CP (Figura 30), o que evidencia um

maior grau de anisotropia do palmitato de cetila, na região monitorada pelo 5-SASL, na presença de DBC.

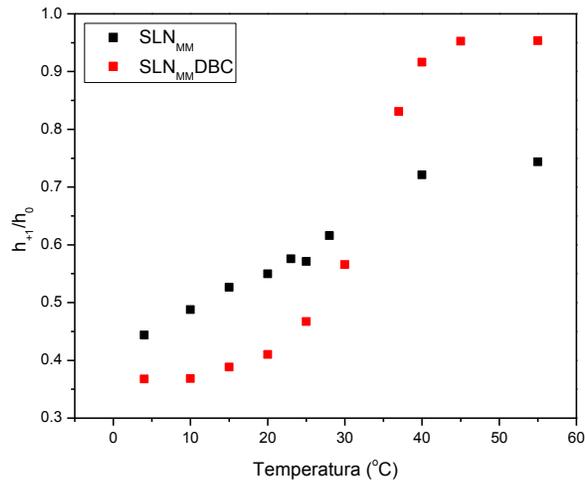


Figura 29. RPE: variação na razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) dos espectros do 5-SASL incorporado nas SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>MM</sub>DBC, em função da temperatura.

A Figura 31 mostra a variação da razão  $h_{+1}/h_0$  nos espectros obtidos com 5-SASL em SLN<sub>CP</sub> e SLN<sub>CP</sub>DBC em diferentes condições de temperatura (5 à 55 °C). Diferentemente das amostras preparadas com MM, as partículas sem DBC sempre tiveram valores maiores da razão  $h_{+1}/h_0$  (entre 5 à 55 °C) quando comparadas com a amostra contendo DBC (Figura 31). Isto se explica porque as medidas foram feitas abaixo da temperatura de fusão do CP.

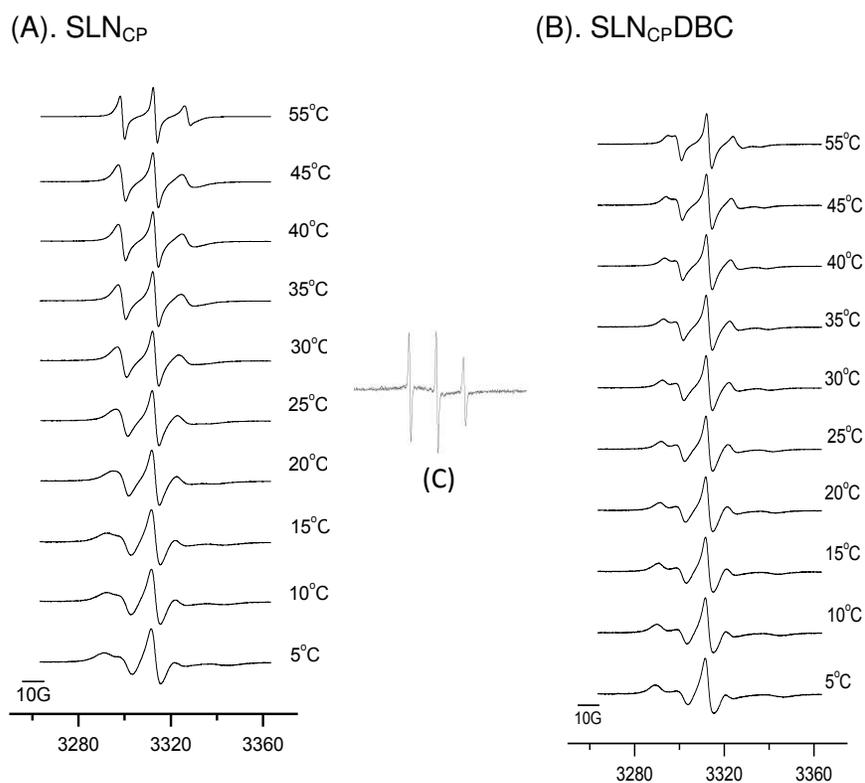


Figura 30. RPE: espectros do 5-SASL incorporado em SLN<sub>CP</sub> (A), SLN<sub>CP</sub>DBC (B) em diferentes temperaturas e 5-SASL em água Mili-Q (C) a 25 °C.

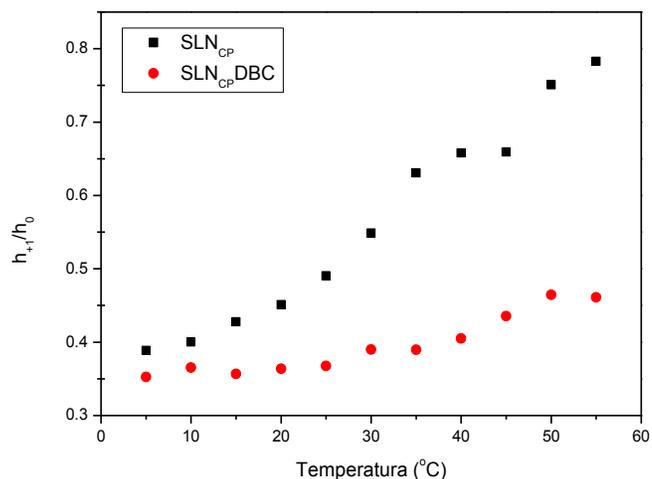


Figura 31. RPE: variação da razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) em espectros do 5-SASL incorporado nas SLN<sub>CP</sub> e SLN<sub>CP</sub>DBC, em função da temperatura.

Os resultados de RPE com o marcador de 5-SASL incorporado nas SLN forneceram indícios inequívocos da inserção da DBC nas nanopartículas lipídicas (MM e CP), visto que foi possível verificar que na região monitorada pelo marcador de spin, ocorreu modificação no sinal, indicando maior (em temperaturas mais baixas) ou menor (acima da temperatura de fusão do lipídio) organização molecular no ambiente químico ao redor da sonda paramagnética.

Um outro parâmetro espectral que pode ser medido é o parâmetro de ordem segmentar,  $S$ . Em vesículas lipídicas,  $S$  descreve o grau de organização da bicamada em que o radical nitróxido se encontra e possui valor entre 0 e 1, sendo que quanto maior for a anisotropia do sistema, mais próximo da unidade será o valor do parâmetro de ordem (Marsh, 1981). Na Tabela 24 são apresentados os parâmetros de ordem ( $S$ ), medidos à 20 °C, com o marcador de spin 5-SASL incorporado nas amostras de SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub>, na presença ou ausência de DBC. Como esperado, o parâmetro de ordem das SLN compostas de CP foi maior que o das SLN de MM, evidenciando maior empacotamento do interior das nanopartículas de palmitato de cetila, compatível com o maior tamanho da cadeia acila e maior caráter hidrofóbico deste lipídio, em comparação

com o MM. Assim como evidenciado pela razão  $h_{+1}/h_0$  em baixas temperaturas, a medida de S confirmou que a dibucaína, quando incorporada em ambas às amostras (SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub>), favoreceu um rearranjo dos lipídios, evidenciando que um ambiente mais organizado foi monitorado pela sonda magnética, com valores de S sempre maiores para o das partículas sem o fármaco.

Tabela 24. Parâmetro de ordem (S) medido à 20 °C com o marcador de spin 5-SASL incorporado nas amostras SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub> na presença ou ausência de DBC.

Amostras	Parâmetro de ordem (S)
SLN <sub>MM</sub>	0,47
SLN <sub>MM</sub> DBC	0,66
SLN <sub>CP</sub>	0,62
SLN <sub>CP</sub> DBC	0,68

### 5.3.7.2. Marcador 5 - MeSL

A avaliação das modificações da razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) dos espectros de RPE obtidos com os marcadores de spin 5-SASL e 5-MeSL, incorporados nas SLN<sub>MM</sub>, SLN<sub>MM</sub>DBC, SLN<sub>CP</sub>, SLN<sub>CP</sub>DBC, NLC<sub>MM</sub> e NLC<sub>MM</sub>DBC, a 25 °C estão apresentadas na Figura 32. Como esperado, o marcador 5-MeSL, menos polar que o 5-SASL, insere-se mais profundamente nas nanopartículas, resultando em espectros mais isotrópicos (picos mais estreitos e com menor separação entre as linhas espectrais), em relação ao sinal do 5-SASL. Assim como o 5-SASL, o marcador 5-MeSL foi capaz de detectar a partição da DBC nas SLN e NLC, por modificação espectral.

A Figura 33 mostra a variação na razão entre os picos de campo baixo e médio ( $h_{+1}/h_0$ ) dos espectros de RPE dos marcadores 5-MeSL e 5-SASL, nas nanopartículas estudadas. A razão  $h_{+1}/h_0$  medida nos espectros do 5-MeSL é maior do que com 5-SASL, indicando que este marcador monitora uma região de menor organização molecular (provavelmente mais profunda), no interior das nanopartículas lipídicas. Assim como observado para o marcador 5-SASL, a inserção da DBC nas SLN e NLC

diminui a razão  $h_{+1}/h_0$ , indicando maior empacotamento molecular dos lipídios na região monitorada pelo 5-MeSL.

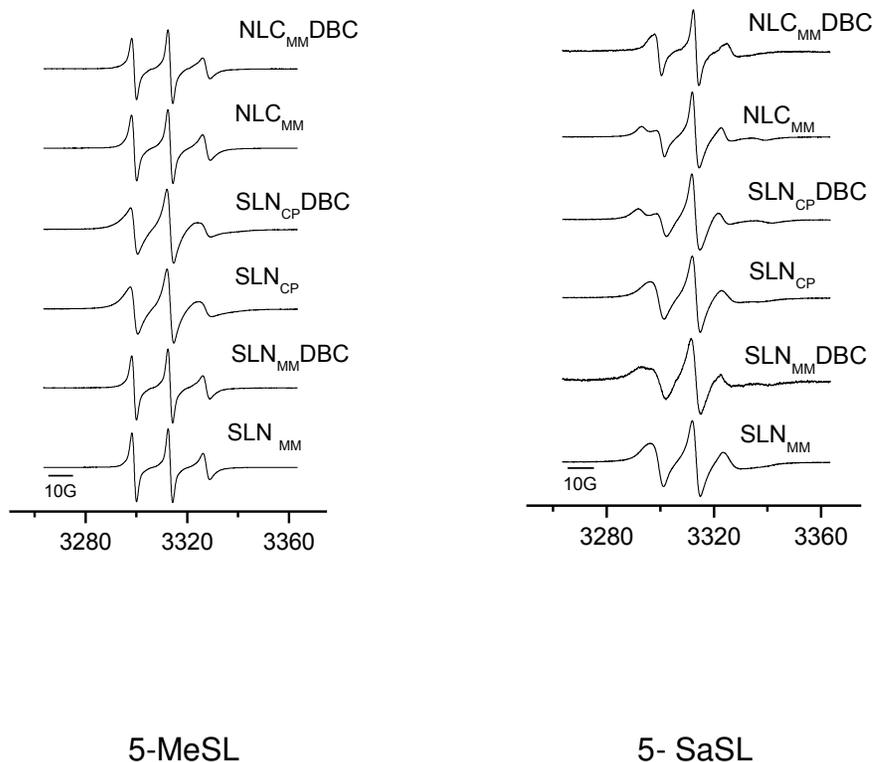


Figura 32. Espectros de RPE dos marcadores de spin 5-SaSL e 5-MeSL incorporados nas nanopartículas: SLN<sub>MM</sub>, SLN<sub>MM</sub>DBC, SLN<sub>CP</sub>, SLN<sub>CP</sub>DBC, NLC<sub>MM</sub> e NLC<sub>MM</sub>DBC, a 25 °C.

Em sistemas lamelares como lipossomas, os marcadores nitróxido do tipo metil-estearato tem espectros menos estruturados que os do tipo estearato correspondente (p.ex 5-MeSL vs. 5-SaSL), o que é atribuído à sua inserção mais profunda na bicamada, de menor empacotamento (menor orientação e maior mobilidade da cadeia acila dos lipídios) (de Paula & Schreier, 1995; Fraceto et al., 2002). Também em bicamadas, o marcador 5-MeSL foi usado para monitorar o efeito da partição da forma

neutra de diferentes anestésicos locais, em lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (de Paula & Schreier, 1995). Todos os anestésicos do tipo amino-amida, incluindo a dibucaína, causaram aumento na razão  $h_{+1}/h_0$  em todas as concentrações testadas. Somente compostos do tipo amino-éster (clorprocaína, procaína e tetracaína), causaram, quando em razões molares altas, o aparecimento de um componente espectral adicional (como o assinalado pela seta sobre os picos  $h_{+1}$  dos espectros do 5-SASL na Figura 28.B), causou diminuição da razão  $h_{+1}/h_0$  (de Paula & Schreier, 1995). Este componente adicional, mais imobilizado, foi atribuído à partição do marcador em uma fase lipídica enriquecida do anestésico, responsável pelo maior empacotamento lipídico local (Frezzatti et al., 1986).

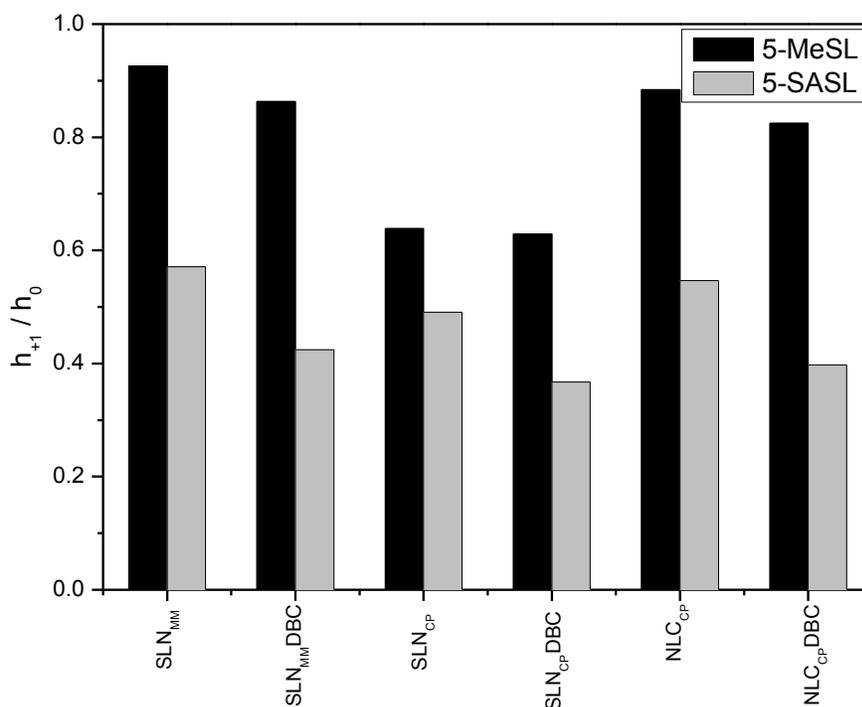
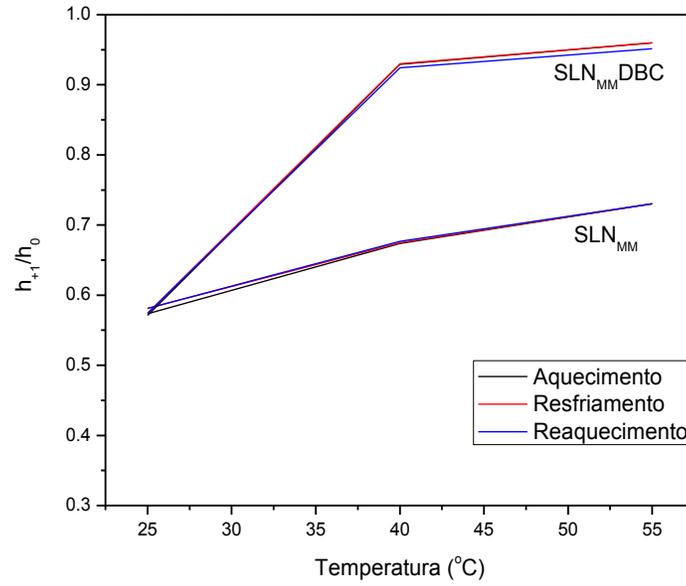


Figura 33. RPE: Variação da razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) dos espectros de RPE dos marcadores de spin 5-SASL e 5-MeSL incorporados nas nanopartículas (SLN<sub>MM</sub>, SLN<sub>MM</sub>DBC, SLN<sub>CP</sub>, SLN<sub>CP</sub>DBC, NLC<sub>CP</sub> e NLC<sub>CP</sub>DBC), a 25 °C.

Desta forma, as medidas de RPE com as nanopartículas revelaram que a dibucaína particiona em todas as formulações de SLN e NLC estudadas, causando maior organização molecular dos lipídios na região do interior das partículas monitoradas pelos marcadores de spin nítróido usados (5-SASL e 5-MeSL). Se o arranjo lipídico no interior das SLN e NLC for lamelar (como sugerem os resultados de SAXS, descritos no item 5.3.8), este maior empacotamento ocorre pela inserção da DBC entre os lipídios que compõem a bicamada, numa profundidade compatível com o posicionamento dos marcadores, que contém o radical nítróido ligado ao carbono 5 do ácido esteárico.

Os espectros de RPE foram ainda usados para observar a estabilidade do arranjo lipídico das SLN e da partição do anestésico nas SLN, em função do aquecimento e resfriamento das nanopartículas. A histerese das formulações foi verificada avaliando-se a razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) dos espectros de 5-SASL, após ciclos de aquecimento/resfriamento/reaquecimento das amostras  $SLN_{MM}$ ,  $SLN_{MM}DBC$ ,  $SLN_{CP}$  e  $SLN_{CP}DBC$  (Figura 34). Os resultados obtidos mostraram que nas partículas de MM sem dibucaína, o ambiente químico monitorado pelo marcador 5-SASL é o mesmo, e não há reorganização lipídica mensurável, em função da temperatura, ficando somente evidente a  $T_f$  do MM em cerca de 40 °C (Figura 34.A). E ainda, a partição do DBC nas partículas preparadas com MM é também um processo estável uma vez que nenhuma histerese foi observada depois de ciclos de aquecimento/resfriamento na presença do anestésico local (Figura 34.A). Já nas partículas preparadas com CP (Figura 34.B) foi observada uma pequena diferença nos valores medidos após o resfriamento da amostra que continha DBC, indicando provável alteração na partição das moléculas de DBC em função da modificação térmica do sistema. De qualquer forma, a mudança não foi grande, tal que a  $SLN_{CP}$  pode ser considerada uma formulação com estabilidade, no que se refere a partição de DBC.

(A)



(B)

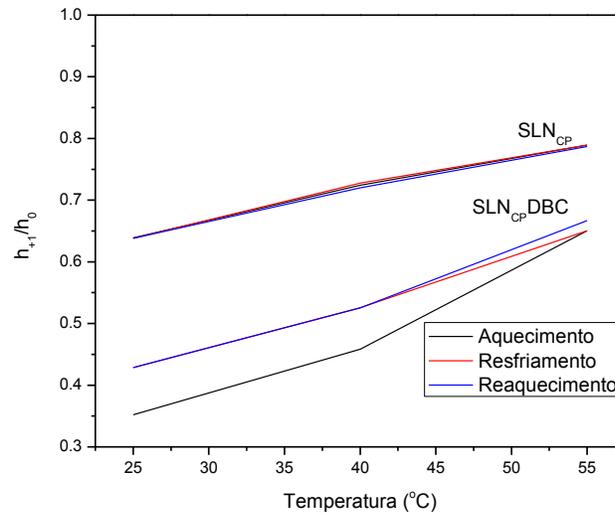


Figura 34. Variação da razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) dos espectros do marcador 5-SASL incorporado nas  $SLN_{MM}$  e  $SLN_{MM} DBC$  (A) e  $SLN_{CP}$  e  $SLN_{CP} DBC$  (B), após ciclos de aquecimento/resfriamento/reaquecimento.

### **5.3.8. Medidas de espalhamento de raios X de baixo ângulo**

Sistemas compostos de múltiplas fases, com densidades de elétrons distintas e possuindo dimensões nanométricas, podem ser estudados por espalhamento de raios X a baixo ângulo, que fornecem importantes informações sobre a estrutura destes sistemas. Os picos observados nas curvas de SAXS são associados com a presença fases ordenadas, como cristais líquidos, por exemplo. A partir da posição de picos pode-se calcular as distâncias de repetição e por fim, obtém-se o tipo de estrutura dos sistemas (Lukowski et al., 2000 e Mertins, 2008).

Portanto, a utilização da técnica de SAXS objetivou uma maior compreensão da estruturação dos lipídios utilizados nas SLN e NLC. A Figura 35 mostra a curva de intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento  $q$  para a amostra SLN<sub>CP</sub>DBC. Pode-se observar dois picos, em 1,61 e 1,44 nm<sup>-1</sup>, com intervalos de repetição. Estes são característicos para as nanopartículas de CP e, conseqüentemente, representam arranjos específicos do referido lipídio dentro das nanopartículas. Estes picos localizados em posições periódicas com mesmo intervalo de repetição são compatíveis com uma estrutura lipídica composta por arranjos multilamelares (de Souza et al., 2012), e possuem distâncias de centro a centro da bicamada de 4,35 e 3,89 nm.

Resultados similares foram obtidos por Lukowski e col (2000) e confirmados por de Souza et al. (2012), que demonstraram por dados de SAXS que os lipídios CP e ácido esteárico, presentes nas SLN se organizam em lamelas. Foi ainda sugerido que compostos incorporados nas SLN podem ser armazenados entre essas bicamadas.

Em temperaturas fixadas, abaixo de 30 °C, não foram observadas modificações estruturais, como mostra a Figura 35, no entanto, acima dessa temperatura pequenas alterações foram visualizadas (desaparecimento do pico a  $q_3=2.9$ , existente nas curvas realizadas a 30 °C e não mais observadas em temperaturas acima de 35 °C, assim como a redução de intensidade de picos formados), mas sem comprometimento da estruturação interna da partícula. Não foram observadas alterações nas curvas de SAXS quando na presença de dibucaína nas nanopartículas (Figura 36).

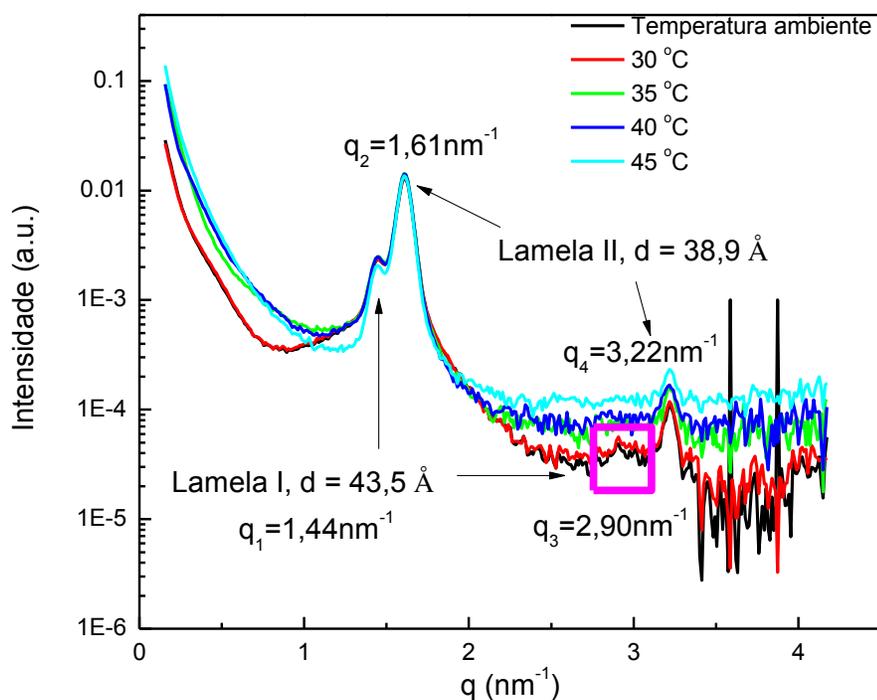
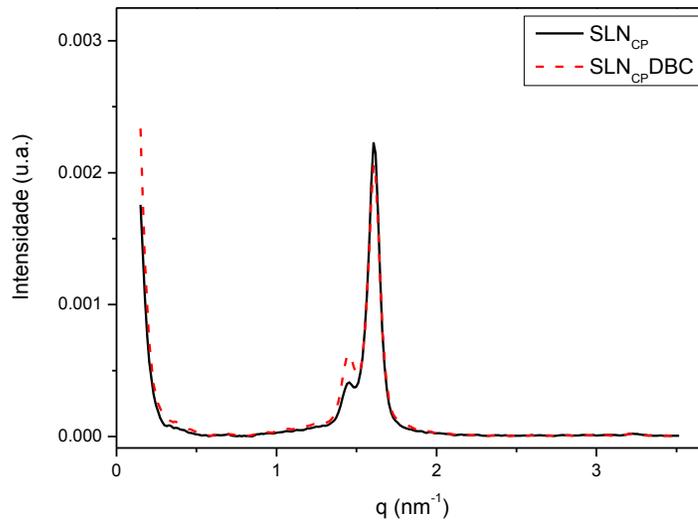
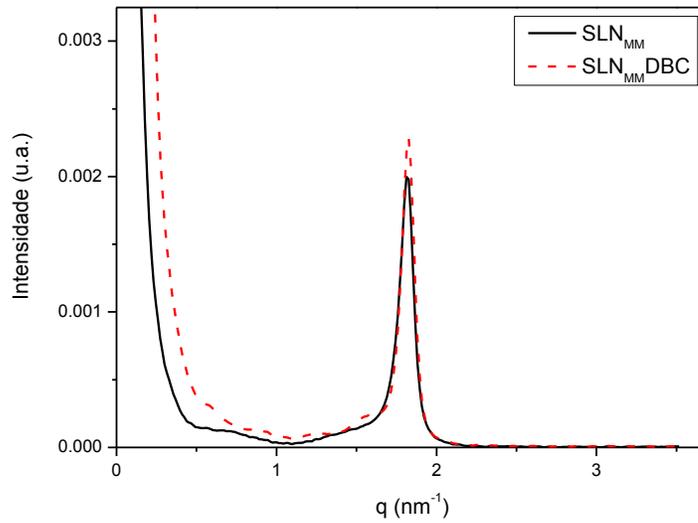


Figura 35. Curva de intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento  $q$  de  $SLN_{CPDBC}$ , registrados em diferentes temperaturas (30 a 45 °C).

De forma geral, as medidas de SAXS mostraram-se mais sensíveis para monitorar pequenos rearranjos lipídicos em função da temperatura do que as medidas de RPE. No entanto, o efeito da DBC sobre o empacotamento lipídico (aumento da ordem local monitorada pelos marcadores doxil-estearato) não foi percebido nas medidas de SAXS, que indicaram manutenção do arranjo cristalino lipídico das SLN na presença do anestésico. As medidas de SAXS indicam um possível arranjo multilamelar para os lipídios que compõem o interior das nanopartículas, o que ainda precisa ser comprovado.



(A)



(B)

Figura 36. Curva de intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento  $q$  de  $SLN_{CP}$  e  $SLN_{MM}$  com e sem dibucaína: (A)  $SLN_{CP}$  e (B)  $SLN_{MM}$  a temperatura ambiente.

### **5.3.9. Efeito do agente crioprotetor durante o processo de liofilização das nanopartículas (SLN e NLC)**

Para a realização dos ensaios de DSC e de infravermelho e pensando em obter uma formulação com maior concentração do ativo, adequada à avaliação *in vivo*, foi necessário recorrer a uma metodologia de secagem de amostra de acordo com o item 4.4.3. O processo de liofilização foi escolhido em virtude do fácil acesso ao equipamento e por permitir a concentração sem uso de calor ou outro meio físico que levasse à desestruturação das nanopartículas. Depois de liofilizadas, as amostras foram avaliadas pelo ensaio de redispersão, com adição da amostra seca em água pura (sistema Milli-Q), na concentração de 42 e 47 mmol.L<sup>-1</sup> para as nanopartículas preparadas com CP e MM, respectivamente. Após dispersão das partículas, as análises de tamanho, distribuição e potencial zeta foram realizadas de acordo com os itens 4.5.2 e 4.5.3.

A Figura 37 mostra valores de tamanho e polidispersão das SLN e NLC preparadas por homogeneização a alta pressão, antes e após a secagem da amostra, e liofilizadas com e sem crioprotetor (maltose ou trealose, a 30%, m/v). Após o processo de liofilização sem nenhum crioprotetor, ocorreu expressiva alteração no tamanho das partículas e no índice de polidispersão em todas as formulações, e mais expressivamente nos NLC. Entretanto, quando foram adicionados crioprotetores, maltose ou trealose, os valores dos diâmetros médios não aumentaram significativamente, quanto nas formulações liofilizadas sem crioprotetor. Os crioprotetores atuam impedindo o contato direto entre nanopartículas lipídicas, pois interagem com grupamentos polares das moléculas dos tensoativos formando uma pseudo-camada de hidratação na superfície desses carreadores (Zhang et al., 2008 e Mehnert & Mäde, 2012).

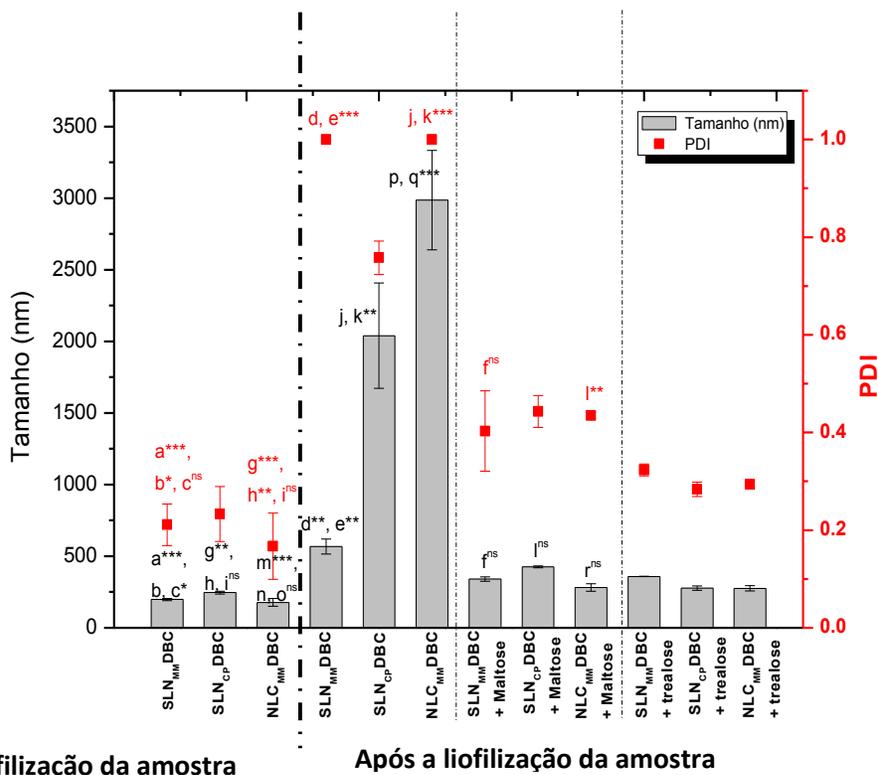


Figura 37. Avaliação do tamanho (nm) e polidispersão (PDI) das SLN e NLC preparadas por homogeneização à alta pressão (HP) e liofilizadas, com e sem crioprotetor (maltose ou trealose, 30%, m/v).

**Estatística:** as análises estatísticas foram realizadas avaliando a influência dos crioprotetores sobre os diâmetros e polidispersão (PI) das partículas (ANOVA com posterior teste de Turkey-Kramer).  $p < 0,001$ (\*\*\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,05$  (\*). **Tamanho:** a. SLN<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. SLN<sub>MM</sub>DBC liofilizado, b. SLN<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose, c. SLN<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + trealose, d. SLN<sub>MM</sub>DBC liofilizado vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose, e. SLN<sub>MM</sub>DBC liofilizado vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + trealose, f. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + trealose. g. SLN<sub>CP</sub>DBC antes da liofilização vs. SLN<sub>CP</sub>DBC liofilizado, h. SLN<sub>CP</sub>DBC antes da liofilização vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose, i. SLN<sub>CP</sub>DBC liofilizado vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + trealose, j. SLN<sub>CP</sub> DBC liofilizado vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose, k. SLN<sub>CP</sub>DBC liofilizado vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + trealose, l. SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + trealose, m. NLC<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. NLC<sub>MM</sub>DBC liofilizado, n. NLC<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose, o. NLC<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + trealose, p. NLC<sub>MM</sub>DBC liofilizado vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose, q. NLC<sub>MM</sub>DBC liofilizado vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + trealose, r. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + Trealose. **PDI:** a. SLN<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. SLN<sub>MM</sub>DBC liofilizado, b. SLN<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose, c. SLN<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + trealose, d. SLN<sub>MM</sub>DBC liofilizado vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose, e. SLN<sub>MM</sub>DBC liofilizado vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + trealose, f. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + trealose. g. NLC<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. NLC<sub>MM</sub>DBC liofilizado, h. NLC<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose, i. NLC<sub>MM</sub>DBC antes da liofilização vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + trealose, j. NLC<sub>MM</sub>DBC liofilizado vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose, k. NLC<sub>MM</sub>DBC liofilizado vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + trealose, l. NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + trealose.

Dessa forma, observa-se que nas amostras contendo os crioprotetores, os diâmetros médios, em todos os casos, aumentaram menos que 2x em relação ao diâmetro inicial (Tabela 25), mantendo tamanho adequado para as formulações destinadas à via tópica e dérmica. Resultados similares foram apresentados por Kim et al., (2005) onde os tamanhos médios das SLN liofilizadas com 5 e 10% de sorbitol, manitol, frutose e maltose aumentaram de 1,5 a 5,5 vezes, em relação ao das dispersões originais, tendo sido considerados satisfatórios.

Para todas as formulações testadas, não foram observadas, diferenças estatisticamente significativas (ANOVA e *Turkey-Kramer*,  $p > 0,05$ ) no diâmetro das partículas entre as amostras liofilizadas com os crioprotetores maltose e trealose, como mostra a Figura 37.

Em se tratando do PDI, a amostra NLC<sub>MM</sub>DBC liofilizada com trealose mostrou valores menores de polidispersão e com diferenças estatísticas daquelas liofilizadas com maltose (ANOVA e *Turkey-Kramer*,  $p < 0,05$ ).

O potencial zeta de todas as amostras avaliadas após a liofilização (Figura 38) teve um aumento, em módulo, significativo (ANOVA e *Turkey-Kramer*,  $p < 0,001$ ) em relação às suspensões coloidais antes da liofilização. Este resultado indica que a presença do agente crioprotetor melhorou a estabilidade das formulações e impediu que a DBC protonada livre no meio dispersante (mais concentrada após congelamento) causasse redução do potencial zeta. Dessa forma, não se faz necessário a remoção da DBC livre em solução, das amostras antes do processo de liofilização. Normalmente ocorre redução do potencial zeta em processos de congelamento de amostras de SLN causando a agregação entre as partículas com rápida desestabilização do sistema, sendo este um dos motivos para o uso de crioprotetores durante o processo de liofilização (Schwarz & Mehnert, 1997; Zimmermann et al., 2000; Battaglia & Gallarate, 2012). Em se tratando dos potenciais zetas das amostras liofilizadas sem o crioprotetores a presença de grandes agregados impossibilitou a análise.

Tabela 25. Valores nominais referentes ao aumento do diâmetro das partículas após redispersão em água, das SLN e NLC liofilizadas.

Amostra	Diâmetro médio (nm) antes da liofilização	Diâmetro médio (nm) após ressuspensão em água			Relação dos diâmetros médios das amostras secas ressuspensas (após liofilização) / amostras antes da liofilização	
		amostra seca sem crioprotetor	amostra seca com maltose	amostra seca com trealose	com maltose / antes da liofilização	com trealose/ antes da liofilização
SLN <sub>MM</sub> DBC/HP	198,20 ± 7,92	566,90 ± 52,47	340,21 ± 14,81	359,05 ± 1,34	1,7	1,8
SLN <sub>CP</sub> DBC/HP	246,05 ± 9,97	2039,50 ± 368,40	425,98 ± 6,33	277,35 ± 15,63	1,7	1,1
NLC <sub>MM</sub> DBC/HP	177,16 ± 27,41	2986,00 ± 347,90	281,86 ± 26,60	275,75 ± 18,03	1,6	1,5

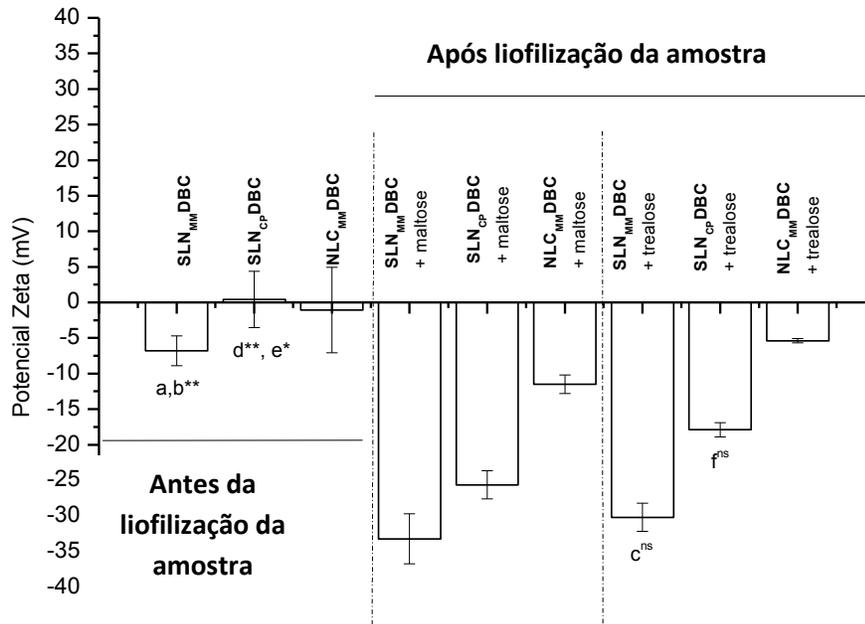


Figura 38. Avaliação do potencial zeta (mV) das SLN e NLC preparadas por homogeneização à alta pressão (HP) liofilizadas com crioprotetor (maltose ou trealose, 30%, m/v).

**Estatísticas:** as análises estatísticas foram realizadas avaliando a influência dos crioprotetores sobre o potencial zeta das partículas (ANOVA com posterior teste de Turkey-Kramer).  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,05$  (\*). a. SLN<sub>MM</sub>DBC antes secagem vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose, b. SLN<sub>MM</sub>DBC antes secagem vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + trealose, c. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + trealose, d. SLN<sub>CP</sub>DBC antes secagem vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose, e. SLN<sub>CP</sub>DBC antes secagem vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + trealose, f. SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + trealose.

Levando-se em consideração, como critérios de qualidade, a baixa quantidade de micropartículas e a uniformidade do produto reconstituído, ou seja, com ausência de agregados macroscopicamente visíveis, pode-se verificar que a liofilização das SLN e NLC nas condições estudadas foi satisfatória, gerando liofilizados com boas propriedades de reconstituição.

### **5.3.10. Análise de calorimetria exploratória de varredura**

Análises de DSC fornecem informações sobre a estabilidade física e o grau de cristalinidade das matrizes das SLN e NLC, através dos seus comportamentos térmicos. Como uma das vantagens das SLN é o estado sólido de sua matriz lipídica, a cristalização lipídica é um ponto bastante importante para a performance dessas nanopartículas transportadoras de fármaco, tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo* (de Souza et al., 2012).

Na Tabela 26 encontram-se os dados após a análise de DSC dos componentes das amostras (SLN e NLC), ou seja, de todos os lipídios sólidos, estabilizante, fármaco e açúcares estudados neste trabalho. Os dados de fusão dos lipídios foram utilizados como parâmetro quanto à preparação das SLN e NLC, formadas 10 °C acima da temperatura de fusão do lipídio sólido. Os pontos de fusão determinados para MM e CP estão em conformidade com a literatura, 38,0 a 41,6 °C para MM (Aydın & Okutan, 2011 e Ridolfi, 2011) e 43,0 a 53,0 °C para CP (Teeranachaideekul et al., 2007; Marcato et al., 2008; Aydın & Okutan, 2011 e de Souza et al., 2012).

A Figura 39 (A) e (B) comparam os termogramas obtidos para os lipídios (MM e CP), misturas físicas dos componentes e as nanopartículas SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub>, onde foi observado alargamento dos picos de fusão das nanopartículas, principalmente para a SLN<sub>MM</sub>, em relação aos lipídios e sua mistura física. Este resultado pode ser devido ao tamanho nanométrico das partículas que possuem uma grande área superficial, associada à presença do tensoativo na mesma. Resultados similares foram encontrados por outros autores (Doktorovova et al., 2010 e de Souza et al., 2012).

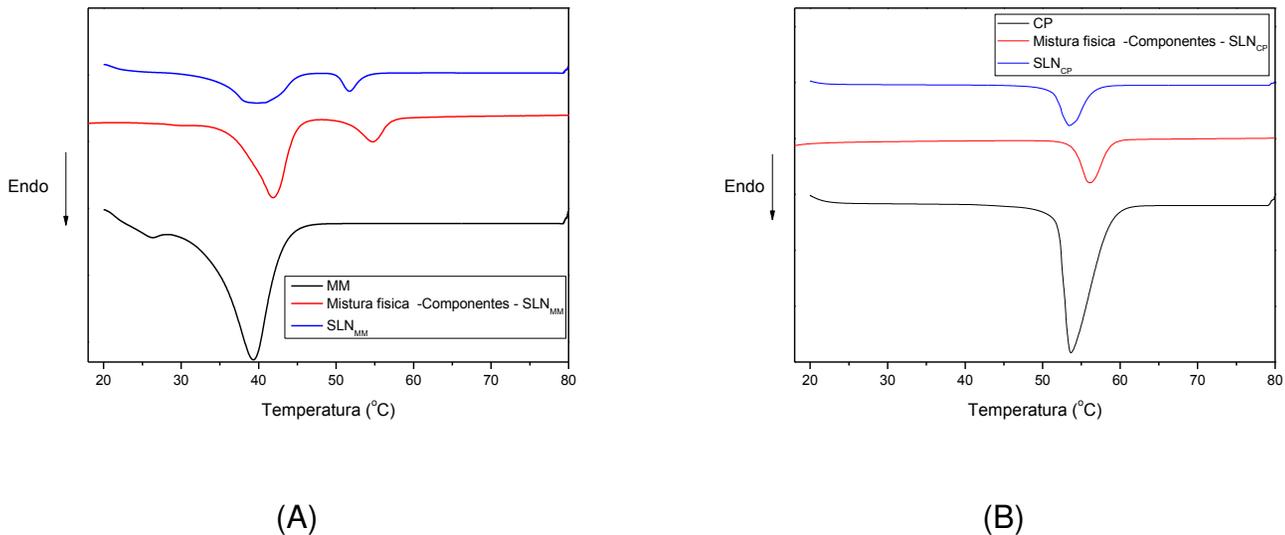


Figura 39. Termogramas do lipídio, misturas físicas dos componentes utilizados no preparo das nanopartículas sólidas e formulações SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub>. (A) amostras contendo MM e (B) amostras contendo CP.

A Figura 40 (A - D) apresenta os termogramas para os componentes e as SLN e NLC, preparados usando MM e CP através do método de homogeneização de alta pressão e, posteriormente, liofilizados com e sem crioprotetor. A dibucaína apresentou um pico correspondente ao seu ponto de fusão, em 66,7° C (Padmanabhan, 1983). Esta transição não aparece nos termogramas das SLN associadas à DBC (Figura 40. (B, C e D)), o que pode ser explicado pela distribuição homogênea da dibucaína na matriz lipídica de ambos SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub>, devido à estrutura amorfa ou molecularmente dispersa da DBC na matriz lipídica das nanopartículas (Chen et al., 2006; de Souza et al., 2012).

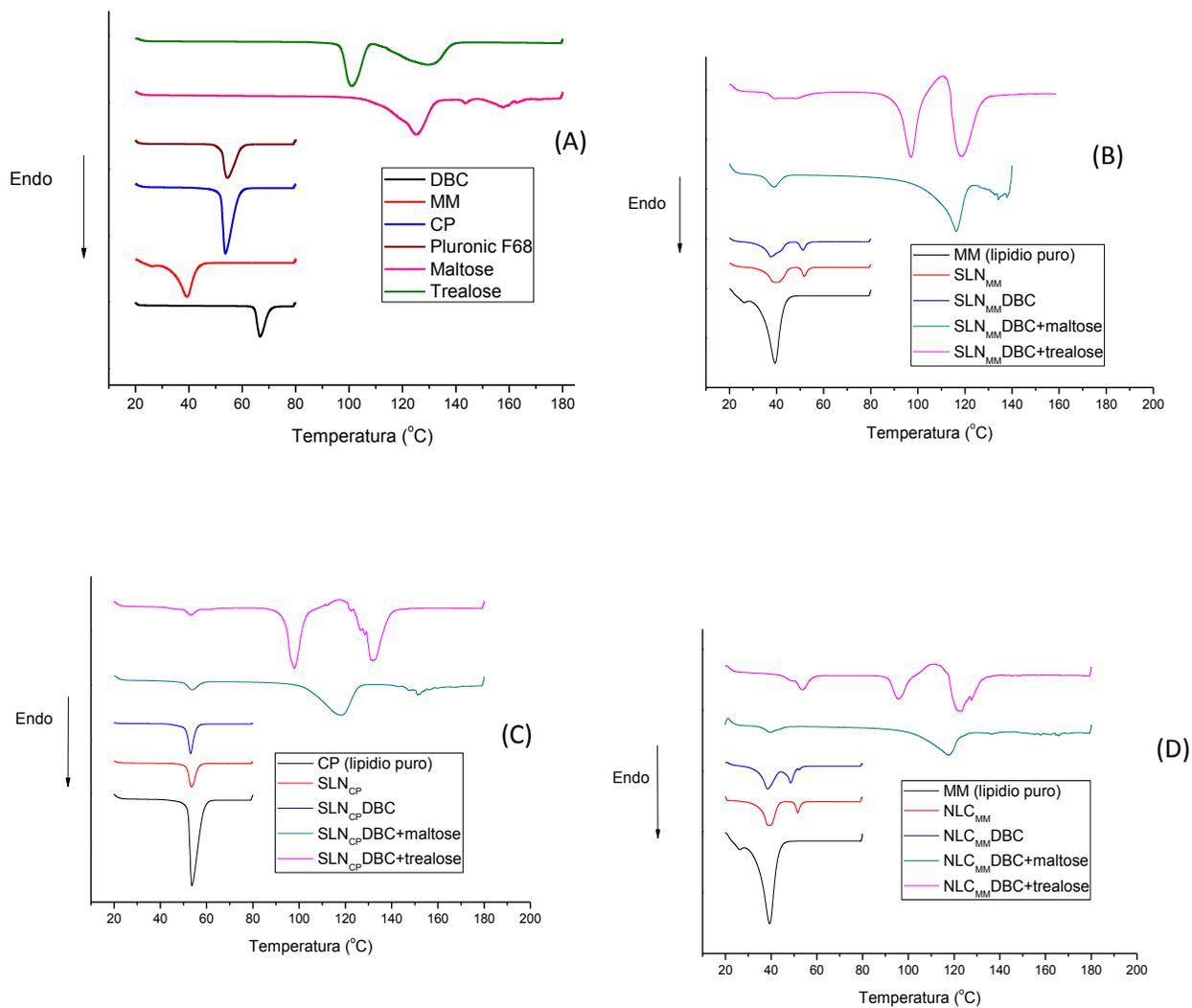


Figura 40. Termogramas dos componentes formadores das SLN e NLS (A) e das nanopartículas  $SLN_{MM}DBC/HP$  (B),  $SLN_{CP}DBC/HP$  (C) e  $NLC_{MM}DBC/HP$ , (D), com e sem agente crioprotetor.

Os dados de temperatura de fusão, de cristalização e entalpias das SLN e NLC estão apresentados nas Tabelas 26, 27, 28 e 29.

Tabela 26. Temperatura de fusão (Tf), cristalização (Tc) e entalpias ( $\Delta H$ ) da dibucaína, dos lipídios, estabilizante e açúcares, utilizados na preparação das nanopartículas.

	Tf (°C)		Tc (°C)	$\Delta H$ (J/g)	
DBC	66,7	-	33,5	-94,3	-
Pluronic F68	54,6	-	30,1	-145,6	-
Miristato de miristila	39,3	-	31,5	-179,5	-
Palmitato de cetila	53,7	-	47,4	-212,1	-
Maltose	125,2	143,65	-	-441,6	-69,2
Trealose	101,0	129,65	-	-226,0	-318,5

Tabela 27. Temperatura de fusão, cristalização e entalpias registradas para as formulações do tipo SLN preparadas com palmitato de cetila, com ou sem crioprotetor.

	Tf (°C)		Tc (°C)	$\Delta H$ (J/g)
SLN <sub>CP</sub> /HP	53,4	-	48,3	-66,74
SLN <sub>CP</sub> DBC/HP	53,1	-	47,8	-65,42
SLN <sub>CP</sub> DBC/HP + maltose	53,7	118,4	47,5	-92,90
SLN <sub>CP</sub> DBC/HP + trealose	53,2	97,8	47,0	-51,60

Tabela 28. Temperatura de fusão, cristalização e entalpias das formulações de SLN preparadas com miristato de miristila, com ou sem crioprotetor.

	Tf (°C)		Tc (°C)	$\Delta H$ (J/g)
SLN <sub>MM</sub> /HP	39,8	-	34,1	-65,60
SLN <sub>MM</sub> DBC/HP	37,4	51,2	33,3	-69,30
SLN <sub>MM</sub> DBC/HP + maltose	38,9	116,3	33,5	-84,42
SLN <sub>MM</sub> DBC/HP + trealose	58,9	110,5	32,9	1233,86

Tabela 29. Temperatura de fusão, cristalização e entalpias das SLN preparadas com miristato de miristila, com ou sem crioprotetor.

	Tf (°C)		Tc (°C)	ΔH (J/g)
NLC <sub>MM</sub> /HP	38,8	51,60	34,5	-76,6
NLC <sub>MM</sub> DBC/HP	38,5	-	32,6	-49,14
NLC <sub>MM</sub> DBC/HP + maltose	49,5	129,0	34,1	-833,5
NLC <sub>MM</sub> DBC/HP + trealose	53,7	95,6	45,9	-82,7

Observando a Figura 41 e as Tabelas 27 e 28 foi possível verificar que a presença de DBC, em ambas as nanopartículas sólidas (SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub>), não alterou a entalpia da formulação, demonstrando pouca interação entre os componentes da formulação (de Souza et al., 2012). Além disso, nos termogramas obtidos para as amostras SLN<sub>MM</sub>, SLN<sub>CP</sub>, NLC<sub>MM</sub> liofilizadas sem crioprotetor (com e sem DBC) foram observadas apenas pequenas variações nas temperaturas de fusão dos lipídios em relação aos lipídios puros (Figura 41). Isto pode ser explicado pelo tamanho nanométrico da partícula, com aumento da área superficial específica e pela presença de tensoativos (Marcato et al., 2008). Essa alteração também pode ser atribuída à presença de outras formas polimórficas. Enfim, a expansão (ou alargamento) dos picos de aquecimento, assim como a redução do ponto de fusão indicam o aumento de imperfeições estruturais nas nanopartículas (Westesen & Siekmann, 1993 e Marcato et al., 2008).

Nota-se ainda que a trealose elevou a temperatura de fusão do lipídio miristato de miristila, tanto para as SLN quanto para as NLC, uma vez que interagiu melhor com os grupamentos polares do poloxamer na superfície da partícula quando comparada a maltose. Este resultado indica maior efeito crioprotetor da trealose (em relação a maltose), o que foi comprovado através das medidas de tamanho das partículas após ressuspensão da amostra (item 5.3.9) com formação de efetiva camada de hidratação entre as nanopartículas.

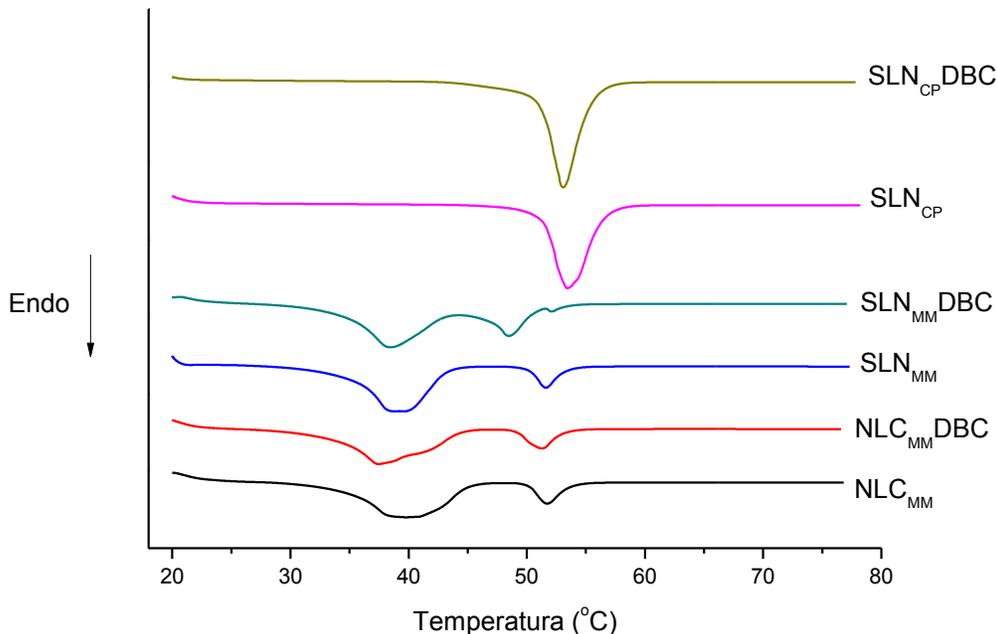


Figura 41. Termogramas das nanopartículas SLN<sub>MM</sub>, SLN<sub>CP</sub> e NLS<sub>MM</sub>, com e sem dibucaína.

Os comportamentos térmicos de MM e CP foram utilizados como referências para avaliar a cristalinidade das SLN e NLC (Doktorovova et al., 2010). Os valores da cristalinidade dos lipídios puros foram normalizados, ou seja, considera-se que todo lipídio puro está 100% cristalino como descrito na literatura (Siekman & Westesen, 1994). A cristalinidade das nanopartículas (com e sem DBC) foi calculada de acordo com a Equação 14, após 10 dias de preparação e os resultados estão apresentados na Figura 42. Ambos os tipos de nanopartículas (SLN e NLC) apresentaram valores de cristalinidade abaixo de 50%, sendo observado comportamento mais amorfo para as partículas NLC<sub>MM</sub> sem DBC (aproximadamente 30% em relação ao lipídio puro). Este resultado demonstra que a presença do lipídio líquido (Liponate GC) influenciou no tipo de estrutura sólida formada pela matriz lipídica. Observa-se ainda que a presença de DBC levou a aumento em 20% na cristalinidade nas NLC, no entanto, para as SLN não

foi observada variação no IC% após adição do fármaco. No que diz respeito à disposição do núcleo lipídico sólido das SLN e dos NLC, é sempre desejável uma baixa cristalinidade, visto que este parâmetro se relaciona com uma menor perda do fármaco do sistema transportador, conferindo maior estabilidade às formulações e aumentando o tempo de prateleira do produto (Ruktanonchai et al., 2008; Pardeike et al., 2009). As temperaturas de fusão das formulações permaneceram acima 34 °C, para todos os casos, sendo este um pré-requisito para a manutenção do estado sólido das nanopartículas, quando em contato com a pele, local de aplicação destas formulações.

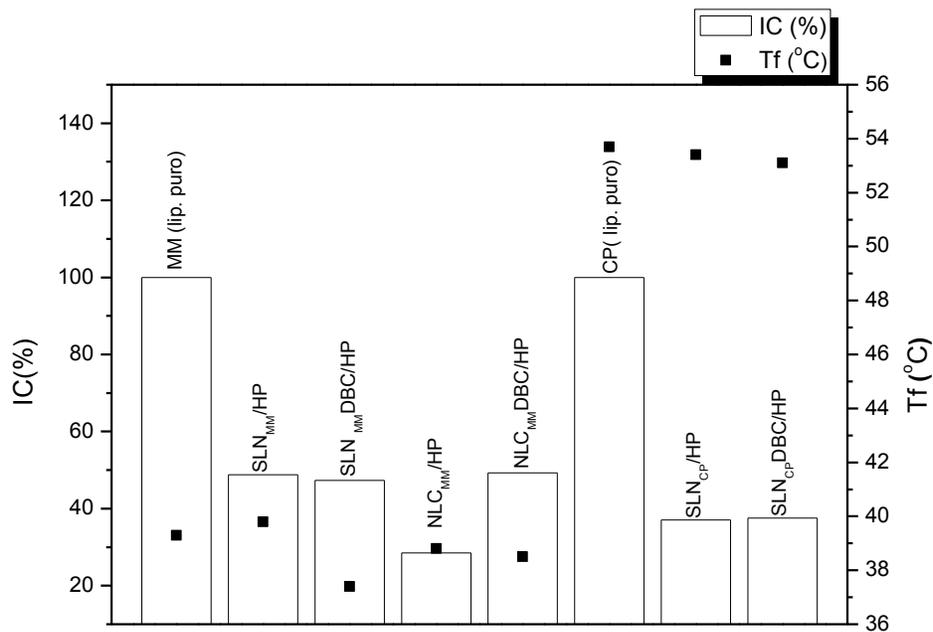


Figura 42. Influência da composição da matriz lipídica sobre o índice de cristalinidade (%IC) e temperatura de fusão (Tf) dos lipídios puros, das SLN e NLC, medidas 10 dias após a preparação da amostra utilizando o procedimento de homogeneização de alta pressão.

### 5.3.11. Análises de infravermelho

Os espectros de FTIR da DBC livre, da mistura física e das nanopartículas lipídicas sólidas de MM e CP com DBC estão apresentados na Figura 43. As atribuições das bandas são dadas na Tabela 30.

As principais bandas de absorção da DBC foram observadas nas amostras de nanopartículas contendo DBC. No entanto, os espectros mostraram que não houve nenhum deslocamento dessas bandas comparando os espectros do fármaco livre e da mistura física dos componentes das formulações. Este resultado é sugestivo de uma fraca interação entre fármaco e as SLN indicando que, provavelmente, a dibucaína está apenas dissolvida na matriz lipídica. Resultados obtidos por Araújo e col. (2010) para carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), associados com triancinolona revelaram o mesmo comportamento, ou seja, não foi observada interação química entre o fármaco e a matriz lipídica, indicando que a triancinolona estava apenas dissolvida na matriz lipídica das partículas.

Tabela 30. Atribuição de bandas dos espectros de FTIR da dibucaína, observadas nas amostras de DBC livre, DBC associada à SLN (MM e CP) e mistura física de seus componentes.

Banda	Atribuições
3412 cm <sup>-1</sup>	Estiramento do O-H
3286 cm <sup>-1</sup>	Estiramento do N-H
1642 cm <sup>-1</sup>	
1597 cm <sup>-1</sup>	Estiramento do C=O da DBC e
1547 cm <sup>-1</sup>	C=C do anel aromático
1574 cm <sup>-1</sup>	
1235 cm <sup>-1</sup>	Estiramento do C-O-C
1064 cm <sup>-1</sup>	

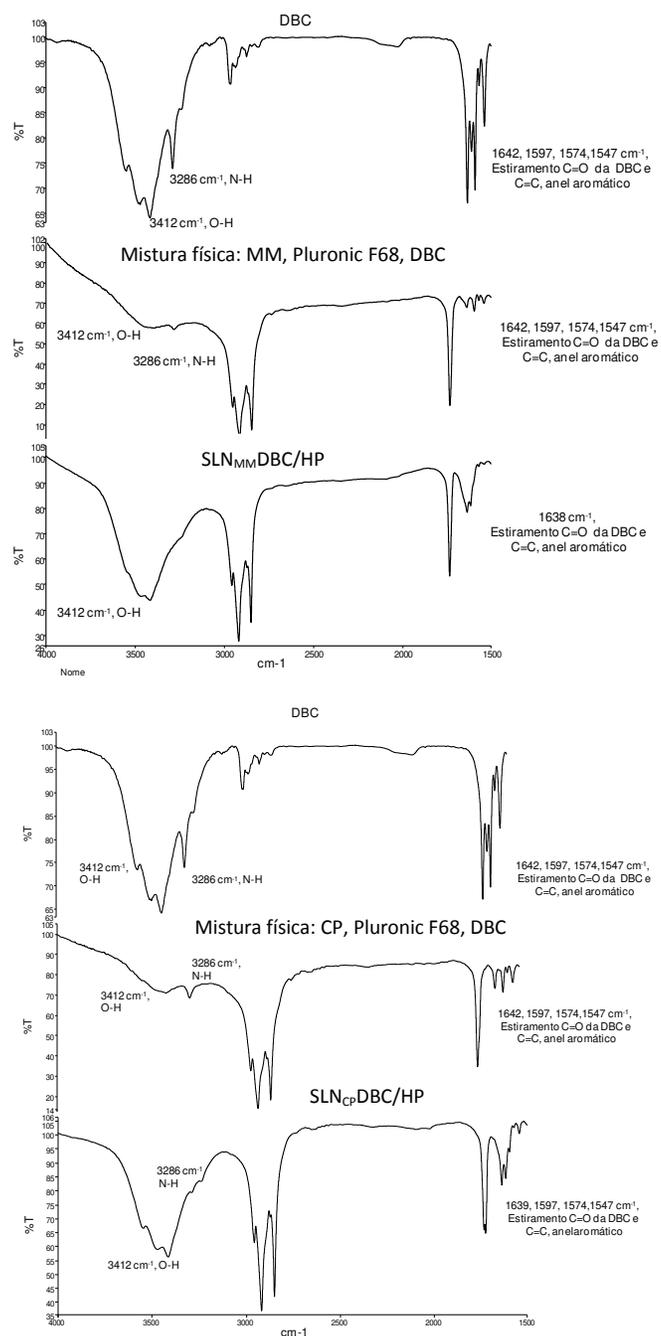


Figura 43. Espectros na região de infravermelho em pastilhas de KBr (FTIR) da DBC livre, mistura física dos compostos da SLN (CP e MM com DBC) e nanopartículas lipídicas sólidas preparadas com CP, MM e DBC pelo método de HP.

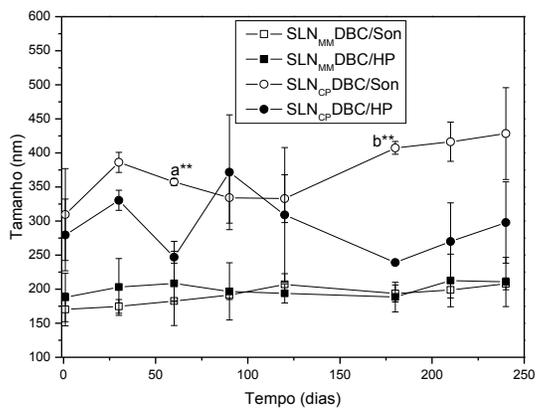
## **5.4. Estudo de Estabilidade das SLN e NLC**

### **5.4.1. Tamanho, polidispersão e potencial zeta em função do tempo.**

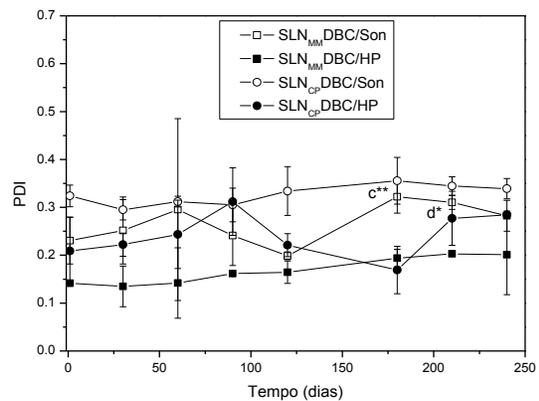
As SLN carreando DBC permaneceram estáveis durante mais de seis meses de armazenamento sob-refrigeração à 4 °C (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Essa estabilidade pode ser explicada pela homogeneidade das dispersões coloidais, com mínimo envelhecimento de Ostwald (item 1.5.2.2), baixo índice de polidispersão (PDI) e estabilização eletroestérica induzida pelo tensoativo Pluronic F68 (Heurtault et al., 2003; Lai et al., 2007; Mishra et al., 2009). Além disso, o caráter anfifílico da dibucaína, e sua baixa solubilidade em água (Lorite et al., 2009) reduzem sua saída das SLN durante a estocagem (Müller et al., 1994; Müller et al., 2000; Ruktanonchai et al., 2008).

No entanto, foram observadas diferenças (de tamanho, polidispersão e potencial zeta) significantes entre os processos HP e Son, ao longo do tempo de estocagem (teste *T de student*,  $p < 0,05$ ), sugerindo distintas redistribuições de DBC, ao longo do tempo (Figura 44). As SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub> sem DBC não apresentaram aumentos significativos no diâmetro médio, polidispersão, ou potencial zeta (teste *T de student*,  $p > 0,05$ ), independente da técnica usada, em função do tempo de armazenamento à 4°C.

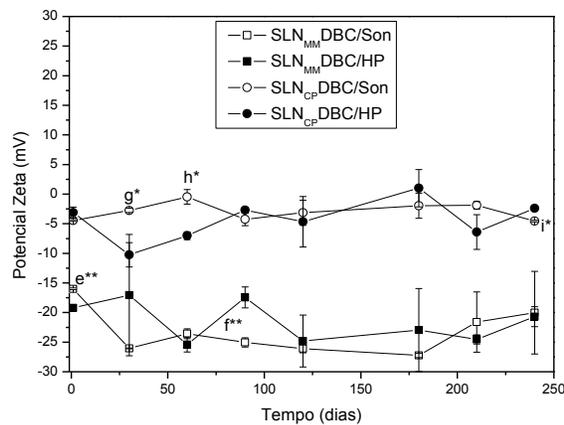
Os NLC com e sem DBC, preparados por Son não apresentaram variações de tamanho durante 60 dias de estocagem, porém em 90 dias ocorreu desestabilização do sistema (com separação de fases facilmente visualizada, macroscopicamente) como mostra a Figura 45. O PDI (Figura 45.B) e o potencial zeta (Figura 45.C), no 90º dia também aumentaram, apesar de não terem sido considerados significativos (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



(A)



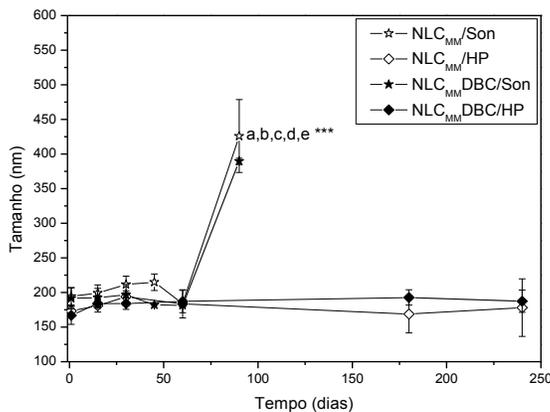
(B)



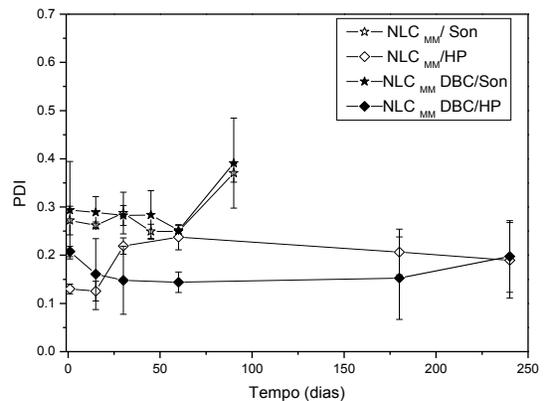
(C)

Figura 44. Diâmetro médio (A), índice de polidispersão (B), e potencial zeta (C) das SLN contendo DBC, durante a estocagem a 4°C por 240 dias (valores expressos em média  $\pm$  D.P., n=3).

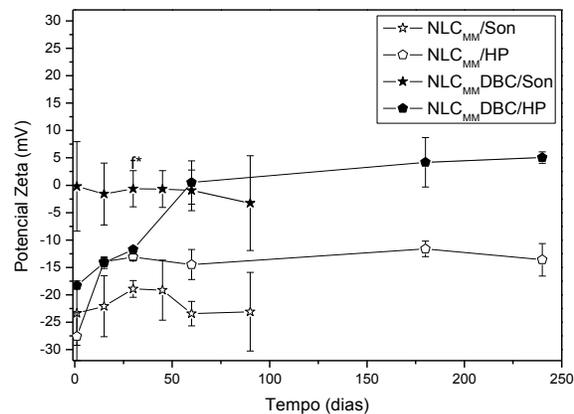
**Estatística:** análises estatísticas foram realizadas avaliando alterações em cada uma das formulações do 1 ao 240 dia (ANOVA) e o tipo de processo empregado (Teste T de Student considerando o nível de significância  $p < 0,05$ ).  $p < 0,001$ (\*\*\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,05$  (\*). Alterações em cada uma das formulações do 1 ao 240 dia: não significativa. Comparação dos processos Son e HP: Tamanho: a.  $SLN_{CP}DBC/Son$  vs.  $SLN_{CP}DBC/HP$  em 60 dias de estocagem, b.  $SLN_{CP}DBC/Son$  vs.  $SLN_{CP}DBC/HP$  em 180 dias de estocagem. PI: c.  $SLN_{MM}DBC/Son$  vs.  $SLN_{MM}DBC/HP$  em 180 dias de estocagem, d.  $SLN_{MM}DBC/Son$  vs.  $SLN_{MM}DBC/HP$  em 210 dias de estocagem. Potencial Zeta: e.  $SLN_{MM}DBC/Son$  vs.  $SLN_{MM}DBC/HP$  em 1 dia de estocagem, f.  $SLN_{MM}DBC/Son$  vs.  $SLN_{MM}DBC/HP$  em 90 dia de estocagem, g.  $SLN_{CP}DBC/Son$  vs.  $SLN_{CP}DBC/HP$  em 30 dias de estocagem, h.  $SLN_{CP}DBC/Son$  vs.  $SLN_{CP}DBC/HP$  em 60 dia de estocagem, i.  $SLN_{CP}DBC/Son$  vs.  $SLN_{CP}DBC/HP$  em 240 dias de estocagem.



(A)



(B)



(C)

Figura 45. Diâmetro médio (A), índice de polidispersão (B), e potencial zeta (C) dos NLC contendo DBC, durante a estocagem a 4<sup>o</sup> C por 240 dias (valores expressos em média  $\pm$  D.P., n=3).

**Estatística:** as análises estatísticas foram realizadas avaliando alterações em cada uma das formulações do 1 ao 240 dias (ANOVA) e o tipo de processo empregado (Teste T de Student considerando o nível de significância  $p < 0,05$ ).  $p < 0,001$  (\*\*\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,05$  (\*). Alterações em cada uma das formulações do 1 ao 240 dias: NLC<sub>MM</sub>/Son e NLC<sub>MM</sub>/DBC/Son Tamanho: a. 1 dia de estocagem vs. 90 dias de estocagem, b. 15 dias de estocagem vs. 90 dias de estocagem, c. 30 dias de estocagem vs. 90 dias de estocagem, d. 45 dias de estocagem vs. 90 dias de estocagem, e. 60 dias de estocagem vs. 90 dias de estocagem. PDI e Potencial Zeta: não significantes (ns). NLC<sub>MM</sub>/DBC/HP e NLC<sub>MM</sub>/HP. Tamanho: ns. PDI: ns. Potencial Zeta: ns. Processo Son e HP: NLC<sub>MM</sub>/DBC/Son e NLC<sub>MM</sub>/DBC/HP. Tamanho: ns até 30 dias de estocagem. PDI: ns até 30 dias de estocagem. Potencial Zeta: f. observado diferença significativa após 30 dias de estocagem  $p < 0,05$  (\*).

De acordo com Müller et al. (2000) e Heurtault et al.(2003), o processo de sonicação pode ser considerado um agente indutor de desestabilização, que provoca instabilidade físico-química nas formulações compostas por partículas lipídicas. Foram observadas diferenças significativas nos carreadores lipídicos (NLC), em se tratando do potencial zeta a partir do trigésimo dia de estocagem (teste *T de Student*, considerando o nível de significância  $p < 0,05$ ). Essa alteração certamente refletiu na desestabilização das amostras NLC<sub>MM</sub>DBC/Son após 90 dias de armazenamento. Em contrapartida, a homogeneização a alta pressão forneceu amostras com grande estabilidade (durante 240 dias), favorecendo a escolha desta técnica, em relação à sonicação.

Comparando a estabilidade das formulações SLN<sub>MM</sub>DBC e NLC<sub>MM</sub>DBC preparadas por HP, é possível observar que ambas exibiram estabilidades equivalentes (ambas satisfatórias), quanto ao tamanho e distribuição durante 240 dias de estocagem. No entanto quando a produção utilizou o processo de sonicação foram observadas nanopartículas (SLN e NLC) com menor estabilidade indicando a necessidade de uma otimização tanto na composição das formulações quanto nas variáveis do processo de sonicação.

#### **5.4.2. Potencial hidrogeniônico em função do tempo**

Alterações nos valores do potencial hidrogeniônico (pH) podem ser indicativas de degradação dos componentes da formulação (Heurtault et al., 2003). Assim, o pH das amostras foi monitorado por 240 dias, de acordo com o item 4.6.1.

As formulações preparadas por HP e Son tiveram resultados semelhantes, no período avaliado. As SLN e NLC vazias apresentaram uma redução do pH de 7,0 a 6,0 no referido período, enquanto que nas nanopartículas associadas com DBC foi observada uma diminuição de 8,0 para 7,5 (Figura 46). Essa redução pode ser justificada pela presença de endoperóxidos e/ou liberação de DBC das SLN e NLC na fase aquosa como foi observado nos itens 5.4.3 e 5.4.4 respectivamente, favorecendo a liberação de H<sup>+</sup> na dispersão que reflete a redução de pH. No entanto, não foram

observadas alterações de pH que pudessem comprometer a estabilidade química das partículas.

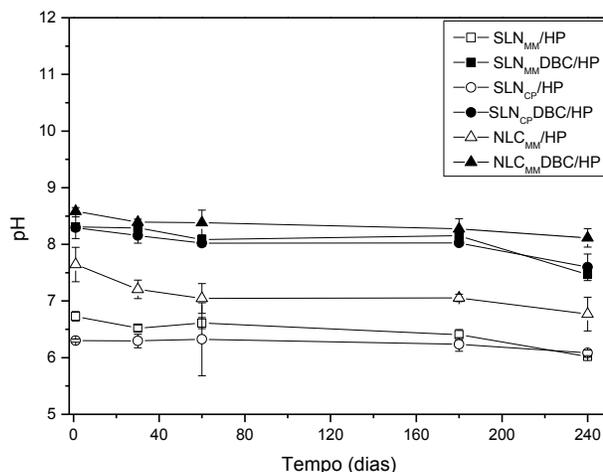


Figura 46. Potencial hidrogeniônico das SLN e NLC com e sem DBC, durante a estocagem à 4° C por 240 dias (valores expressos em média  $\pm$  D.P., com n=3).

### 5.4.3. Peróxidação química em função do tempo

A formação de endoperóxidos (MDA) foi também usada para monitorar a estabilidade química dos componentes lipídicos das formulações. Os MDA são identificados pela formação de um cromóforo vermelho com absorvância em 532nm (item 4.6.2) (Ohkawa et al., 1979; Asakawa & Matsushita, 1980; New, 1990).

As concentrações de endoperóxidos para todas as formulações testadas foram menores que  $5,0 \pm 0,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Tabela 31) o que representa 0,012%, em relação ao total de lipídios presentes nas formulações. Dessa forma, a formação endoperóxido foi, muito baixa em todos os casos avaliados, sendo este mais um indicativo de formulações com alta estabilidade química, apesar da alta tensão de cisalhamento que ambos os processos de produção (Son e HP) imprimem às amostras, e que poderia causar a formação de radicais livres (responsável pela formação de endoperóxidos) (Gohla & Dingler, 2001; Dingler & Gohla, 2002).

Tabela 31. Peroxidação lipídica das formulações preparadas usando HP estocadas a 4 °C (valores expressos em média  $\pm$  D.P., com n=3).

Tempo (dias)	SLN <sub>MM</sub>	SLN <sub>MM</sub> DBC)	SLN <sub>CP</sub>	SLN <sub>CP</sub> DBC	NLC <sub>MM</sub>	NLC <sub>MM</sub> DBC
	(μmol.L <sup>-1</sup> )					
1	2,8±0,7	1,7±0,4	1,8±0,8	4,7±1,3	1,2±0,1	2,9±0,7
30	5,0±0,7	4,2±0,4	4,4±1,4	3,0±0,8	1,8±0,4	2,2±0,2
180	1,8±0,8	4,6±1,0	1,3±0,8	2,7±1,0	2,3±0,6	3,1±0,8
240	1,5±0,3	1,7±0,8	1,1±0,2	1,4±0,1	4,0±0,1	4,1±0,9

#### 5.4.4. Percentual encapsulado em função do tempo

A eficiência de encapsulação foi avaliada em 1, 30, 90 e 240 dias após o preparo das amostras (mantidas nas mesmas condições das demais análises realizadas, a 4 °C). A Figura 47 mostra que ocorreu um decréscimo na quantidade de dibucaína encapsulada ao longo do tempo de estocagem para as SLN (SLN<sub>MM</sub>DBC e SLN<sub>CP</sub>DBC). Após 90 dias de estocagem a %EE da DBC já se apresentava significativamente menor (ANOVA e *Turkey-Kramer*, com p variando entre valores menores que 0,05 e 0,001, respectivamente) que a do tempo zero. Todavia, a %EE das amostras NLC<sub>MM</sub>DBC/HP manteve-se constante (apenas com pequenas variações consideradas não significativas, ANOVA, p > 0,05). Estes resultados estão de acordo com observações de outros pesquisadores (Souto et al., 2007; Pawar & Babu, 2010; Attama, 2011 e Battaglia & Gallarate, 2012) que atribuem maior capacidade de retenção de fármacos aos NLC, os quais, dependendo do método de produção e da composição lipídica, podem apresentar um arranjo cristalino imperfeito (com cristalização lipídica alterada por pequenas quantidades de óleo), amorfo (matriz sólida, mas não cristalina) ou múltiplo (com a matriz lipídica sólida contendo nanocompartimentos de óleo), que favorecem o aprisionamento do fármaco, em relação às SLN.

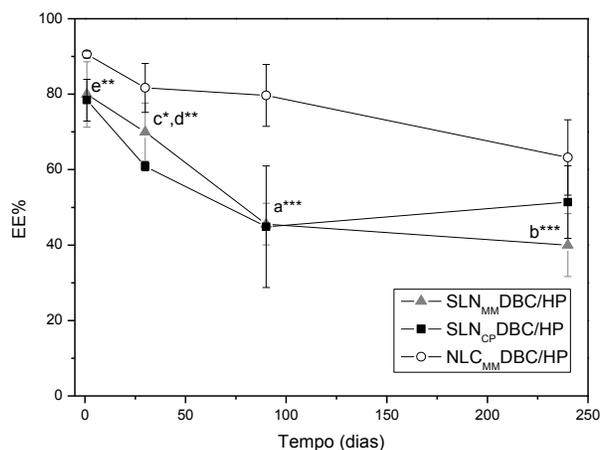


Figura 47. Porcentagem de encapsulação da dibucaína (%EE) nas SLN e NLC, durante a estocagem a 4<sup>o</sup> C por 240 dias (valores expressos em média  $\pm$  D.P. com n=3).

**Estatística:** as análises estatísticas foram realizadas avaliando alterações em cada uma das formulações do 1 ao 240 dia (ANOVA com posterior teste de Turkey-Kramer).  $p < 0,001$  (\*\*\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,05$  (\*). **SLN<sub>MM</sub> DBC/HP:** a. 1 dia de estocagem vs. 90 dias de estocagem, b. 1 dia de estocagem vs. 240 dias de estocagem, c. 30 dias de estocagem vs. 90 dias de estocagem, d. 30 dias de estocagem vs. 240 dias de estocagem. **SLN<sub>CP</sub> DBC/HP:** e. 1 dia de estocagem vs. 90 dias de estocagem, f. 1 dia de estocagem vs. 240 dias de estocagem.

## 5.5. Estudo de liberação *in vitro*

Medidas da liberação *in vitro* fornecem informações úteis sobre a associação do fármaco com as formulações. O ensaio de liberação *in vitro*, realizado neste trabalho, revelou uma liberação instantânea (efeito "burst") da DBC em todos os casos em que a DBC está associada ao sistema carreador, caracterizada por uma liberação inicial rápida (primeira meia hora), provavelmente pelo fármaco adsorvido na superfície da partícula ou presente em solução, seguida por liberação mais lenta, possivelmente da fração presente no interior das partículas (Figura 48).

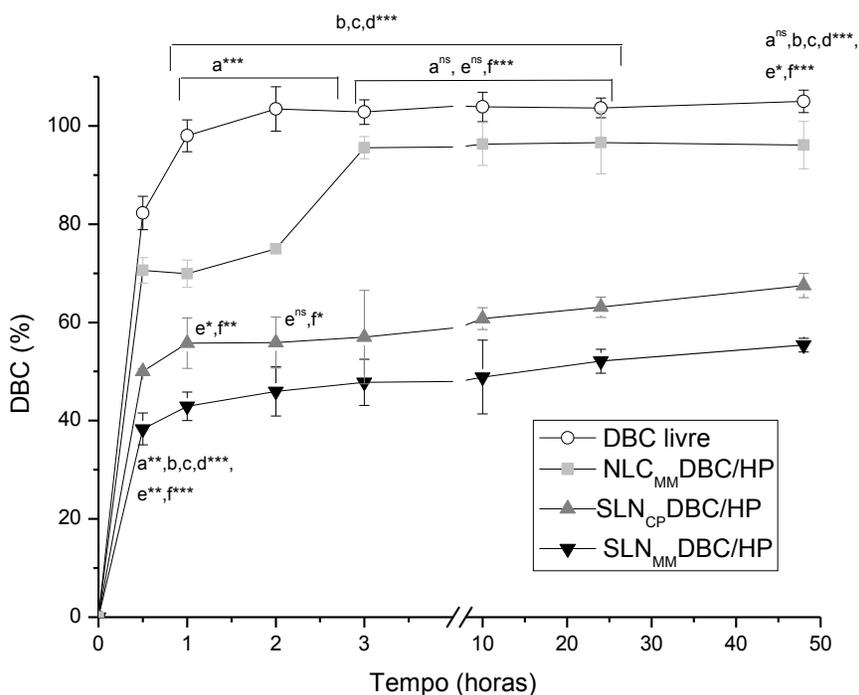


Figura 48. Liberação *in vitro* da DBC associada à SLN e NLC preparadas por alta pressão de homogeneização (valores expressos em média  $\pm$  D.P.,  $n=3$ ). Meio dispersante composto por tampão fosfato ( $4 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,4) com adição de 20% de etanol em temperatura ambiente ( $25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

**Estatística:** as análises estatísticas foram realizadas avaliando a % de liberação *in vitro* das formulações livre e encapsuladas do tempo 0 ao 48 horas (ANOVA com posterior teste de Turkey-Kramer).  $p < 0,001$ (\*\*\*)  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,05$  (\*). a. DBC livre vs. NLC<sub>MM</sub> DBC /HP, b. DBC livre vs. SLN<sub>CP</sub> DBC/HP, c. DBC livre vs. SLN<sub>MM</sub> DBC/HP, d. SLN<sub>MM</sub> DBC/HP vs. NLC<sub>MM</sub> DBC /HP, e. SLN<sub>MM</sub> DBC /HP vs. SLN<sub>CP</sub> DBC/HP, f. SLN<sub>CP</sub> DBC/HP vs. NLC<sub>MM</sub> DBC/HP.

Somente após 48 horas é que cerca de 60 e 55% do fármaco foram liberados das SLN<sub>CP</sub> e SLN<sub>MM</sub>, respectivamente, enquanto que a DBC livre estava 100% dissolvida no sistema, após 2 horas do início do ensaio. A DBC carregada nas SLN preparadas por HP mostrou o efeito de liberação modificada mais pronunciada que nas formulações de DBC em NLC. Esta observação pode ser atribuída ao comportamento amorfo ou à baixa cristalinidade dos carreadores lipídicos, quando comparados com as nanopartículas lipídicas sólidas (como discutido no item 5.3.10) (Bhaskar et al., 2009). Além disso, a maior concentração de Pluronic F68 nos NLC (3 vezes > que nas SLN) e a presença dos triglicerídeos cáprico e caprílico, com elevação da polaridade da formulação, pode melhorar a solubilidade da dibucaína (conforme resultados obtidos de %EE e coeficiente de partição), dessa forma, há um aumento na mobilidade dos lipídios e tensoativos, promovendo uma liberação mais rápida do fármaco.

De acordo com Jensen e col. (2010) existe uma correlação entre a quantidade de acilgliceróis (trimiristato de glicerol, mistura de mono e trimiristato de glicerol, triestearato de glicerol, diestearato de glicerol, mistura de monoestearato/diestearato de glicerol) e a quantidade de fármaco liberado. Os dados obtidos por estes autores com SLN preparadas com os referidos acilgliceróis contendo 17-valerato de betametasona, mostraram que durante as primeiras 24 horas, quanto maior o teor de monoglicerídeos, maior a solubilidade do corticosteroide nas partículas (devido às propriedades tensoativas e a maior polaridade em relação aos triglicerídeos), e maior a liberação do fármaco. Esse tipo de liberação é importante quando se deseja alcançar ação rápida do fármaco (Müller et al., 2000), seguida por uma liberação sustentada.

Deve ainda ser considerado que o meio de dispersão também pode não ter sido o mais adequado para a efetiva liberação da DBC das SLN (MM e CP), podendo ser considerado em próximos experimentos a utilização de enzimas de degradação lipídica ou modificação da composição química do meio de liberação com o uso de outros co-solventes.

As análises estatísticas dos dados obtidos no ensaio de liberação *in vitro* da DBC associada às SLN e NLC preparadas por alta pressão de homogeneização mostraram

diferenças estatisticamente significativas (ANOVA e *Turkey-Kramer*,  $p < 0,001$ ) entre a liberação do fármaco entre todas as amostras analisadas.

### **5.5.1. Modelagem matemática dos perfis de liberação *in vitro***

Os dados obtidos nos ensaios de liberação foram avaliados através dos modelos matemáticos Weibull e Korsmeyer–Peppas, que se adequaram à descrição da liberação das formulações estudadas, com valores de  $R^2_{\text{ajustado}}$  apresentados na Tabela 32 (Costa & Lobo, 2001). Ambos os modelos possuíram  $R^2_{\text{ajustado}}$  entre 0,934 e 0,956 (Tabela 32), assim ambos foram utilizados para descrever o perfil de liberação da DBC nas SLN e NLC. Outros modelos matemáticos também foram aplicados aos dados, tais como os de ordem zero, primeira ordem e Higuchi (Costa & Lobo, 2001, Bhaskar et al., 2008, Paul, 2011; de Melo et al., 2011), mas não mostraram vantagens, quanto ao ajuste dos dados experimentais.

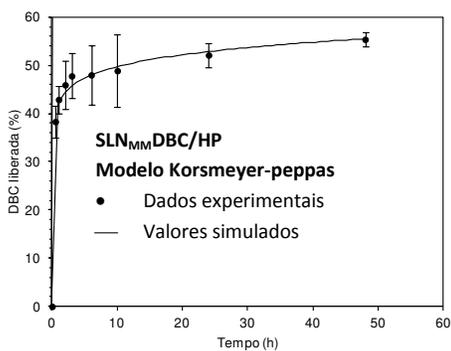
Modelos descritos nos trabalhos de Müller et al. (2000) e Üner & Yener (2007) preconizam que partículas lipídicas compostas por matrizes enriquecidas de fármaco possuem a velocidade na liberação do ativo controlada por sua membrana circundante, representada pelo lipídio que envolve o fármaco, e governada por difusão segundo a lei de Fick.

Assim, no intuito de determinar o mecanismo de liberação da DBC nas nanopartículas lipídicas (SLN/NLC) utilizam-se os dados experimentalmente obtidos nos ensaios de liberação *in vitro* e procedeu-se à modelagem utilizando as equações propostas por Korsmeyer - Peppas (método semi-empírico) e Weibull (empírico) para a determinação dos parâmetros  $n$  ( $\leq 0,43$ ) e  $\beta$  ( $\leq 0,75$ ) inerentes aos respectivos modelos (Tabela 33). Os resultados obtidos revelaram, em ambos os casos, que o mecanismo de liberação está associado com a difusão de Fick. A Figura 49 (A.1 a A.3, B.1 a B.3 e C.1 a C.3) apresenta os dados obtidos experimentalmente que foram exibidos juntamente com os simulados. Vale ressaltar que a DBC presente na superfície da partícula sugerida pelas medidas de potencial zeta (item 5.3.2) e RPE (item 5.3.7) contribui para o efeito *burst* observado na primeira hora do experimento de liberação *in*

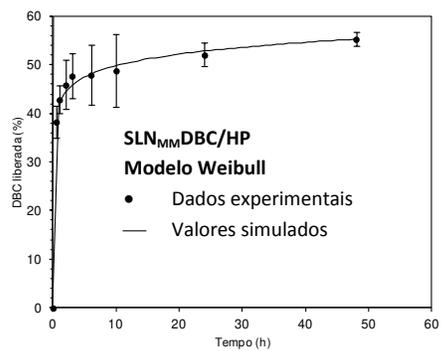
*vitro*. No entanto, foi verificado que o modelo matemático de Korsmeyer–Peppas que leva em consideração o efeito *burst* (Equação 24) não foi o mais adequado ao ajuste dos dados experimentais, com valores de  $R^2$  ajustado de 0,901, 0,934 e 0,496 para  $SLN_{MM}DBC/HP$ ,  $SLN_{CP}DBC/HP$  e  $NLC_{MM}DBC/HP$  respectivamente. Objetivando melhorar o ajuste dos dados experimentais com o modelo matemático, seria necessário avaliar a cinética de liberação do fármaco em um intervalo de tempo menor que o obtido (30 minutos), visto que a DBC adsorvida à superfície da partícula contribui para a liberação imediata, mas não representa o fármaco imediatamente dissolvido em solução no tempo próximo ao tempo zero. Por isso, a Equação 21 foi utilizada para correlacionar exponencialmente à liberação do fármaco em função do tempo (Gifani et al., 2009).

Tabela 32. Coeficiente de correlação ( $R^2_{ajustado}$ ) para os modelos Weibull e o Korsmeyer–Peppas, aplicados às curvas de liberação da DBC *in vitro*.

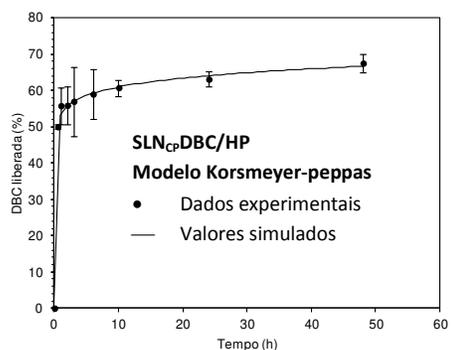
Amostra	$R^2_{ajustado}$ Weibull	$R^2_{ajustado}$ Korsmeyer–Peppas
$SLN_{MM}DBC/HP$	0,951	0,956
$SLN_{CP}DBC/HP$	0,951	0,957
$NLC_{MM}DBC/HP$	0,940	0,934



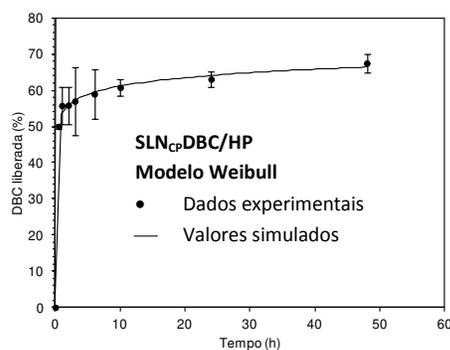
(A.1)



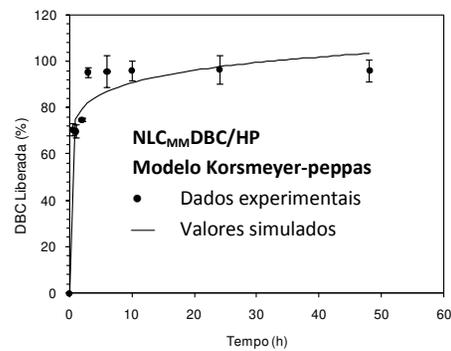
(A.2)



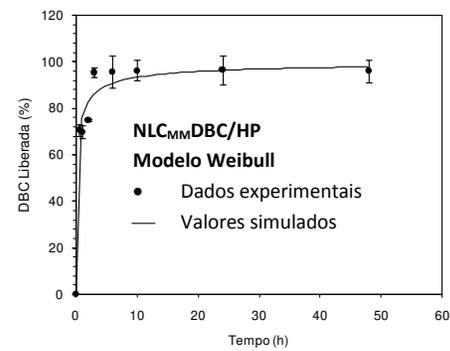
(B.1)



(B.2)



(C.1)



(C.2)

Figura 49. Ajuste matemático dos dados de liberação *in vitro* da dibucaína das formulações: (A) SLN<sub>MM</sub>DBC/HP, (B) SLN<sub>CP</sub>DBC/HP, (C) NLC<sub>MM</sub>DBC, utilizando os modelos propostos por Korsmeyer-Peppas (1) e Weibull (2) (n=3).

Tabela 33. Valores dos parâmetros obtidos após a aplicação dos modelos matemáticos, Korsmeyer – Peppas e Weibull, para a curva da dibucaína associada com SLN<sub>MM</sub>/HP e SLN<sub>CP</sub>/HP.

<i>Parâmetros dos modelos</i>	<i>Amostras</i>		
<i>Korsmeyer – Peppas</i>	SLN <sub>MM</sub> DBC/HP	SLN <sub>CP</sub> DBC/HP	NLC <sub>MM</sub> DBC/HP
<i>n</i>	0,07	0,06	0,07
<i>Constante k (min<sup>-1</sup>)</i>	42,26	53,41	76,55
<i>(r)</i>	0,9936	0,9968	0,9595
<i>Weibull</i>			
<i>Constante α</i>	1,82	1,31	0,6690
<i>Constante β</i>	0,0982	0,0915	0,2663
<i>(r)</i>	0,9941	0,9967	0,9719

### **5.6. Estudos de permeação da DBC através de membrana sintética**

No intuito de verificar a possibilidade de permeação das SLN e NLC em membranas sintéticas que simulam a pele (poros nominais de 30 nm), foram realizados testes que mensuram fatores como: concentração do fármaco, quantidade aproximada das partículas permeadas, bem como sua elasticidade e fluxo em condições simuladas de pressão e temperatura da pele (item 4.9).

Os parâmetros de elasticidade das SLN e NLC foram pesquisados utilizando a mesma metodologia empregada para lipossomas convencionais e elásticos (van den Bergh et al., 1999; Barbosa et al., 2013b). Inicialmente, amostras de SLN/NLC com altas concentrações dos lipídios MM e CP (47 e 42 mmol.L<sup>-1</sup> de lipídio respectivamente), com e sem DBC, foram estudadas, porém não conseguimos extrudar essas amostras nas condições de pressão e tempo empregadas no experimento. Dessa forma, as amostras foram diluídas à 1 mmol.L<sup>-1</sup>, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 34.

Os valores de diâmetros médios das partículas, obtidos por NTA, antes e depois do ensaio de extrusão (Figuras 58 a 60, Anexo II), apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste *T student*,  $p < 0,05$ ) apenas para as amostras  $SLN_{MM}/HP$  e  $NLC_{MM}DBC/HP$  (Tabela 34). Estes ensaios mostraram que todas as partículas estudadas apresentaram baixa capacidade de permeação quando comparados aos lipossomas elásticos, compostos de fosfolípidios e tensoativos (Barbosa et al., 2013b), ou nanocápsulas poliméricas flexíveis (Teixeira et al., 2010) as quais são capazes de atravessar poros na epiderme, sendo possível o transporte de fármacos até as camadas mais profundas da pele. Lipossomas convencionais e elásticos (compostos por dimiristoilfosfatidilcolina: polietilenoglicol 8 lauril ester, 100:0 e 60:40, respectivamente) foram avaliados, usando a mesma metodologia aqui empregada, mas utilizando membranas com poro de 50 nm, apresentaram fluxos de 0,03 e 17,50 mL.min<sup>-1</sup> respectivamente. O fluxo das SLN e NLC preparadas com MM foi maior que as  $SLN_{CP}$ . Os valores de elasticidade calculados diferiram apenas entre as amostras  $SLN_{CP}$  e  $NLC_{MM}$ , sendo maiores para o carreador nanoestruturado ( $NLC_{MM}$ ) (ANOVA e *Turkey-Kramer*,  $P < 0,05$ )

Tabela 34. Parâmetros da permeação das SLN e NLC, com e sem DBC, através de membranas sintéticas com poros nominais de 30nm e pressão de extrusão de  $2,5 \times 10^5$  Pa à 32 °C, simulando a permeação através da pele (Barbosa et al., 2013b).

Amostras	D antes (nm)	D depois (nm)	Fluxo das nanopartículas (mL/min)	% de DBC*	E (mL/min)
SLN <sub>MM</sub> /HP	172,00 ± 7,81 <sup>a*</sup>	189,33 ± 7,37	0,114 ± 0,002 <sup>c**</sup>	-	4,46 ± 0,39
SLN <sub>MM</sub> DBC/HP	175,67 ± 10,69	169,67 ± 3,06	0,115 ± 0,021	14,13 ± 0,53 <sup>i**</sup>	3,68 ± 0,50
SLN <sub>CP</sub> /HP	173,33 ± 5,13	176,67 ± 20,40	0,069 ± 0,007 <sup>d**</sup>	-	2,62 ± 0,27 <sup>e*</sup>
SLN <sub>CP</sub> DBC/HP	178,00 ± 9,54	179,33 ± 12,10	0,056 ± 0,001	10,66 ± 0,50 <sup>j**</sup>	2,05 ± 0,32
NLC <sub>MM</sub> /HP	188,67 ± 8,96	210,00 ± 18,36	0,115 ± 0,007	-	5,85 ± 0,95
NLC <sub>MM</sub> DBC/HP	170,67 ± 3,79 <sup>b*</sup>	161,33 ± 4,16	0,106 ± 0,027	15,94 ± 0,24	3,07 ± 0,57

**Estatística:** D antes: diâmetro médio das nanopartículas antes do processo de extrusão. D depois: diâmetro médio das nanopartículas depois do processo de extrusão. \*DBC(%): Porcentagem de DBC na amostra permeada em relação à concentração inicial de fármaco nas nanopartículas (valores expressos em média ± D.P., n=3). As análises estatísticas: avaliação dos diâmetros antes e após a extrusão usando o teste T student e ANOVA e Turkey-Kramer para fluxo, elasticidade e %DBC entre as amostras avaliadas.  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*). **Diâmetro médio:** a. SLN<sub>MM</sub>/HP: diâmetro antes e depois da extrusão, b. NLC<sub>MM</sub>DBC/HP: diâmetro antes e depois da extrusão. **Fluxo:** c. SLN<sub>MM</sub>/HP vs. SLN<sub>CP</sub>/HP, d. SLN<sub>CP</sub>/HP vs. NLC<sub>MM</sub>/HP. **Elasticidade:** e. SLN<sub>CP</sub>/HP vs. NLC<sub>MM</sub>/HP. **% DBC:** i. SLN<sub>MM</sub>DBC/HP vs. SLN<sub>CP</sub>DBC/HP, j. SLN<sub>CP</sub>DBC/HP vs. NLC<sub>MM</sub>DBC/HP.

Observa-se ainda que a presença de dibucaína nas formulações não interferiu significativamente na elasticidade ou no fluxo das amostras (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Chama a atenção que, embora não significativas, as variações na elasticidade e fluxo foram para menor, o que concorda com as medidas de RPE, que indicaram menor fluidez dos lipídios ( $< \text{razão } h_{+1}/h_0$ ), na presença do anestésico.

Decorridos 10 minutos do experimento de extrusão, as amostras de SLN e NLC (MM e CP com DBC) permeadas foram coletadas e, posteriormente, quantificadas quanto à concentração de DBC. O valor do AL nas amostras extrudadas variou entre 10 e 15%, em relação à quantidade inicial de DBC presente na formulação, tendo sido observado o acúmulo do fármaco no porta-amostra, ou seja, aproximadamente de 85 a 90% do AL ficou retido na membrana de policarbonato. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as amostras  $SLN_{CP}DBC/HP$  e  $NLC_{MM}DBC/HP$ ; e  $SLN_{MM}DBC/HP$  e  $SLN_{CP}DBC/HP$  (ANOVA, ambos com  $p < 0,01$ ) quanto à presença de DBC na amostra permeada, que foi sempre maior nas formulações a base de MM.

A Figura 50 mostra a concentração aproximada das nanopartículas antes e após o ensaio de extrusão verificada pelo NTA (Figuras 58 a 60, Anexo II). Verifica-se, claramente, que ocorreu filtração das amostras nas membranas com poros de 30 nm e sob pressão de  $2,5 \times 10^5$  Pa (utilizados para simular os poros e a pressão osmótica da pele). Desta forma, estes resultados indicam que as SLN e NLC preparadas com MM e CP não seriam capazes de permear através das camadas mais profundas da pele de maneira intacta, por não possuírem a elasticidade necessária, mantendo-se, assim nas camadas mais superficiais da pele (epiderme), local onde a DBC deve ser liberada, de maneira progressiva. Este resultado está de acordo com os descritos por Souto e col. (2004) que apontou as propriedades adesivas das SLN às células e superfícies, com posterior formação de uma fina película sobre a pele promovendo efeitos oclusivos neste órgão e possibilitando a liberação prolongada do clotrimazol, por um grande intervalo de tempo. Assim, em virtude do aumento da hidratação e modificação das propriedades de barreira do estrato córneo (suavização de rugas e aumento da espessura do estrato córneo por alteração do arranjo lamelar dos lipídios), as SLN favorecem a penetração de fármacos na pele, há a possibilidade de maximizar o índice

terapêutico do fármaco que está sendo administrado nas nanopartículas (Jenning et al., 2000; Wissing et al., 2001).

Quando as nanopartículas aderem na pele, uma fina película é formada, que impede a perda de água (Dingler et al., 1999; Wissing et al., 2001; Souto et al., 2004). No entanto, de acordo com Wissing e col. (Wissing et al., 2001), esse efeito depende, fortemente, do volume da amostra, do tamanho das partículas, da concentração e da cristalinidade dos lipídios. Para formulações farmacêuticas que visem à anestesia local e tópica, essa propriedade torna-se interessante, pois prolonga a ação a nível local.

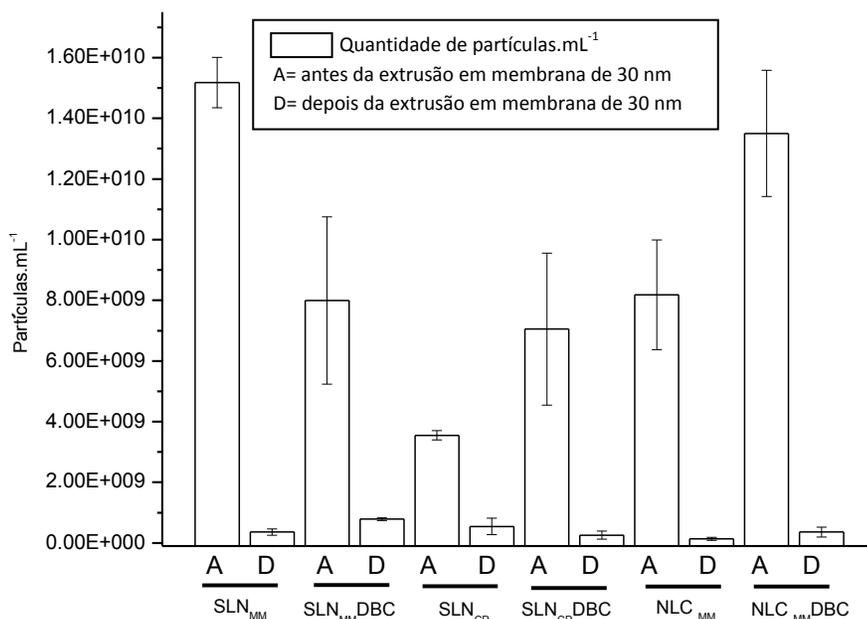


Figura 50. Número de nanopartículas nas amostras avaliadas, antes e depois da extrusão através de membranas de policarbonato com poros nominais de 30 nm, à  $2,5 \times 10^5$  Pa. Medidas feitas por NTA (valores expressos em média  $\pm$  D.P. (n=3)).

## 5.7. Ensaio biológicos

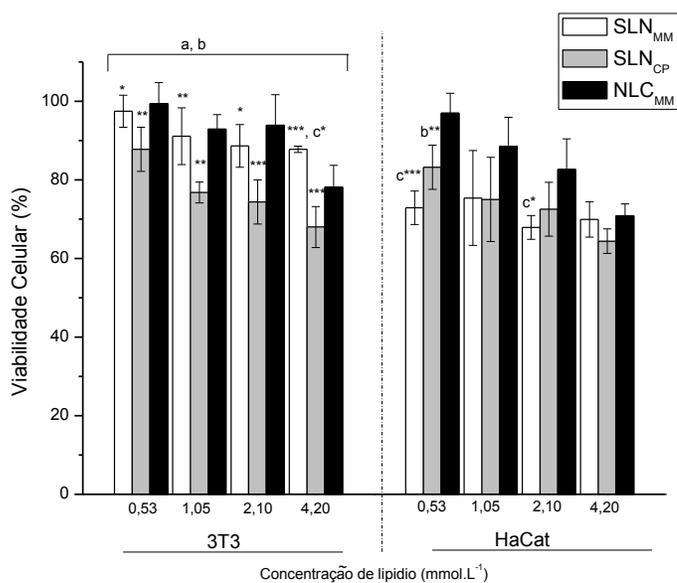
### 5.7.1. Ensaio de viabilidade celular (avaliação da toxicidade *in vitro*)

Células de fibroblastos (3T3) e queratinócitos (HaCat) são considerados importantes modelos celulares na realização de testes de agentes irritantes para pele (Benavides et al., 2004). A Figura 51(A) e (B) ilustra o efeito citotóxico das nanopartículas, na ausência ou presença de DBC, respectivamente, sobre culturas de células BALB/c 3T3 e HaCaT.

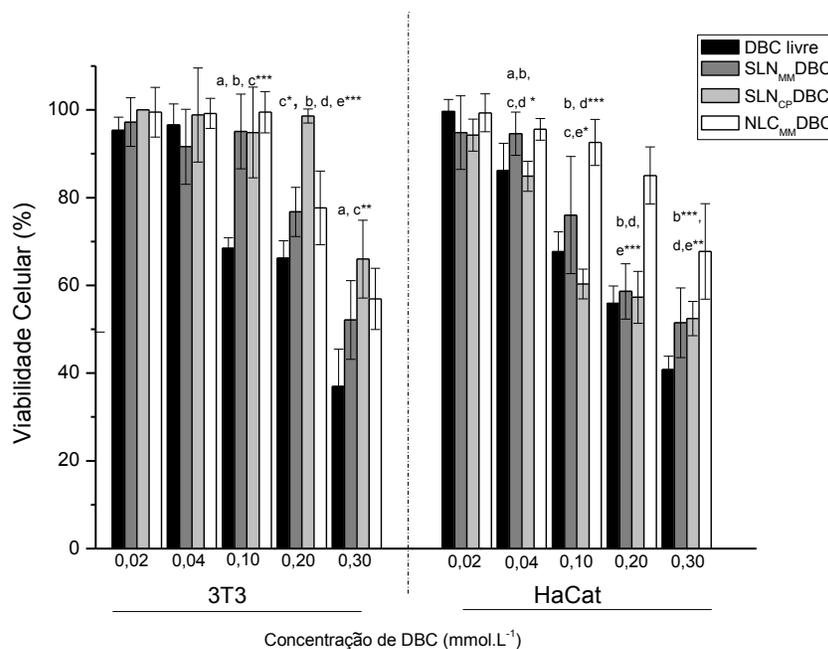
De acordo com a Figura 51(A), nas condições experimentais utilizadas, todas as amostras foram consideradas seguras até a máxima concentração avaliada (intervalo 0,5 - 4,2 mmol.L<sup>-1</sup>). Ambos os tipos celulares apresentaram uma viabilidade maior que 65% após tratamento com as SLN e NLC sem anestésico. Nas concentrações avaliadas, uma maior toxicidade relativa foi observada para as amostras SLN<sub>CP</sub>/HP, em relação às demais (ANOVA e *Turkey-Kramer*, com *p* até < 0,001) (Barbosa et. al., 2013a).

Em concentrações de 4,2 mmol.L<sup>-1</sup> a viabilidade das células 3T3 tratadas com SLN e NLC preparadas com MM diferiu estatisticamente (ANOVA e *Turkey-Kramer*, *p* < 0,05). No entanto, nota-se que em culturas de células HaCat, apesar das viabilidades celulares distintas durante o tratamento com diferentes amostras SLN<sub>MM</sub>, SLN<sub>CP</sub> e NLC<sub>MM</sub> na mesma concentração, no geral, os resultados foram bem mais similares (em concentrações acima de 1,05 mmol.L<sup>-1</sup> apenas as amostras SLN<sub>MM</sub> vs. NLC<sub>MM</sub> na concentração de 2,10 mmol.L<sup>-1</sup> diferiram estatisticamente, ANOVA e *Turkey-Kramer*, *p* < 0,05) (Figura 51 A).

Comparando os resultados obtidos com os dois tipos celulares, observam-se que as amostras SLN<sub>CP</sub> e NLC<sub>MM</sub> apresentaram comportamentos similares em ambas as culturas, e as NLC apresentaram menor toxicidade dentre as amostras avaliadas (Figura 51).



(A)



(B)

Figura 51. Viabilidade celular em fibroblastos, 3T3 e em queratinócitos, HaCat, tratados com SLN e NLC (A), e DBC livre ou encapsulada em SLN e NLC, preparadas por alta pressão de homogeneização (B) (valores expressos em média  $\pm$  D.P. com n=6.).

**Estatística:** ANOVA e Turkey-Kramer.  $p < 0,001$  (\*\*\*) ,  $p < 0,01$ (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*). a. SLN<sub>MM</sub> vs. SLN<sub>CP</sub>, b. SLN<sub>CP</sub> vs. NLC<sub>MM</sub>, c. SLN<sub>MM</sub> vs. NLC<sub>MM</sub>. d. SLN<sub>CP</sub> vs. NLC<sub>MM</sub>. (b) a. dbclivre vs. SLN<sub>MM</sub>DBC, b. DBC livre vs. NLC<sub>MM</sub>DBC , c. SLN<sub>MM</sub>DBC vs. SLN<sub>CP</sub>DBC. d. SLN<sub>CP</sub>DBC vs. NLC<sub>MM</sub>DBC. e. SLN<sub>MM</sub>DBC vs. NLC<sub>MM</sub>DBC.

A Figura 51(B) mostra o efeito citotóxico da DBC sobre ambos os tipos celulares. O  $IC_{50}$  (a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%) para a DBC livre foi de  $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Em contrapartida a dibucaína associada às nanopartículas, principalmente as preparadas com CP, teve seu efeito citotóxico significativamente reduzido quando incubada com as células 3T3 ( $p < 0,05$ , ANOVA, *Turkey-Kramer*). Quando  $SLN_{CP}DBC$  foi incubada com HaCat não apresentou diferença significativa quanto ao efeito citotóxico ( $p > 0,05$ , ANOVA, *Turkey-Kramer*), todavia observa-se uma tendência ao aumento da viabilidade, comparativamente ao fármaco livre, com a encapsulação da DBC nas nanopartículas, principalmente nas maiores concentrações avaliadas. Assim, os resultados de toxicidade *in vitro* revelaram que, embora os carreadores (SLN e NLC) tenham apresentado diferenças na toxicidade intrínseca, nenhum deles atingiu a  $IC_{50}$  da DBC, mostrando que os sistemas carreadores são adequados à veiculação da dibucaína, anestésico pouco utilizado devido a sua alta toxicidade (Dayan et al., 1996; Curtis et al., 2009; Hanzlicek & Van der Merwe, 2010) e cuja encapsulação em SLN e NLC pode ser uma estratégia para contornar esta limitação toxicológica.

De acordo com Dijoux e col. (2006) as células HaCat possuem sensibilidade inferior a xenobióticos quando comparadas com células de fibroblastos. Nos experimentos apresentados nesse trabalho, as células HaCaT mostraram sensibilidade semelhante às células BALB/c 3T3. Portanto, pode-se concluir que a linhagem HaCaT é um bom modelo para avaliação de toxicidade de fármacos, além de se tratar de queratinócitos, isto é, tipo celular componente da derme.

Os resultados obtidos de viabilidade celular utilizando linhagens de 3T3 e HaCat revelaram que as nanopartículas SLN e NLC foram consideradas seguras quanto a sua toxicidade. A encapsulação da DBC nestas nanopartículas reduziu a toxicidade intrínseca do anestésico, o que aponta esses nanocarreadores de fármacos como tendo um grande potencial para aplicação nas áreas farmacêutica e cosmética.

## **5.7.2. Ensaios in vivo: avaliação da atividade antinociceptiva**

### **5.7.2.1. Teste de tail-flick**

A atividade antinociceptiva da dibucaína livre e encapsulada foi avaliada pelo teste de *tail-flick*, sendo as formulações administradas por aplicação tópica, na base da cauda de ratos Wistar. Esse teste requer uma função motora da cauda do animal suficiente para permitir sua movimentação frente a um estímulo doloroso.

As durações do efeito analgésico (tempo de recuperação) das formulações (SLN<sub>MM</sub>DBC, SLN<sub>CP</sub>DBC) preparadas por HP, assim como da DBC livre, dispersas em gel de carbopol para aplicação tópica, estão apresentadas nas Tabela 35 e 36 e Figura 52. Amostras liofilizadas em presença de maltose SLN<sub>MM</sub>DBC, SLN<sub>CP</sub>DBC, NLC<sub>MM</sub>DBC e dispersas no mesmo gel foram também igualmente avaliadas quanto ao referido efeito farmacológico.

Verifica-se que as formulações com SLN<sub>MM</sub>DBC e SLN<sub>CP</sub>DBC promoveram um aumento no tempo de recuperação (100,0% e 115,4% respectivamente) (Equação 28), quando comparadas ao anestésico não encapsulado e disperso no gel, na mesma concentração (0,05%). Vale ressaltar que o pH 7,0 do gel de carbopol (reservatório hidrofílico) beneficia a forma protonada da DBC, importante para elevar a solubilidade aquosa a qual favorece a distribuição do fármaco mais rapidamente no local de ação.

Pode-se ainda observar que as formulações contendo SLN<sub>MM</sub>DBC/HP e SLN<sub>CP</sub>DBC/HP e NLC<sub>MM</sub>DBC/HP liofilizadas com maltose tiveram um aumento no tempo de recuperação ainda maior (223,1%, 307,7% e 246,1%, respectivamente), quando também comparada à DBC livre e dispersa no gel aplicado (Figura 52 e Tabela 35). Este efeito se deve ao reduzido tamanho das partículas liofilizadas com maltose após a ressuspensão, com valores entre 282 e 425 nm contra 566 e 2986 nm das amostras liofilizadas sem crioprotetor. Estas possuem uma forte tendência à aglomeração, prejudicando a liberação do fármaco e, conseqüentemente, a sua ação terapêutica. A amostra mais efetiva foi SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose com liberação prolongada do AL durante aproximadamente 265 minutos, seguida da NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose e

SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose com os tempos de recuperação de 225 e 210 minutos, respectivamente.

Tabela 35. Tempos de recuperação do efeito analgésico (teste de *tail-flick*, em ratos Wistar) da dibucaína livre e associada em SLN e NLC, preparadas por HP, com e sem crioprotetor.

Formulação em gel	$T_{REC}$ (min)	$\Delta T_{REC}$ (%)
DBC livre	65,0 ± 12,9	-
SLN <sub>MM</sub> DBC	130,0 ± 10,0	100,00
SLN <sub>MM</sub> DBC + maltose	210,0 ± 15,8	223,07
NLC <sub>MM</sub> DBC + maltose	225,0 ± 12,9	246,15
SLN <sub>CP</sub> DBC	140,0 ± 10,0	115,38
SLN <sub>CP</sub> DBC + maltose	265,0 ± 12,9	307,69

Vale ressaltar que o menor tempo de recuperação obtido nas SLN<sub>MM</sub>DBC (com e sem maltose em relação às demais nanopartículas) pode ser justificado pela liberação mais rápida do fármaco encapsulado devido às condições experimentais empregadas no ensaio de *tail-flick* (estímulo térmico, item 4.10.2.2). Todavia, foi verificado um expressivo aumento na temperatura de fusão do lipídio para NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose passando de 39,3 para 49,5 °C resultante da interação da amostra com o crioprotetor, ocasionando um perfil mais prolongado do AL quando comparado com SLN<sub>MM</sub>DBC e SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose (Tabela 28 e 29 e item 5.3.10).

Nanopartículas e gel de carbopol sem o anestésico foram usados como controle e não induziram analgesia nos animais tratados (dados não mostrados). Os resultados obtidos indicam que o efeito analgésico foi prolongado pela encapsulação da dibucaína nas SLN e NLC (com e sem crioprotetor). Esse excelente resultado reafirma o desenvolvimento de um produto farmacêutico com grande potencial de aplicação clínica futura.

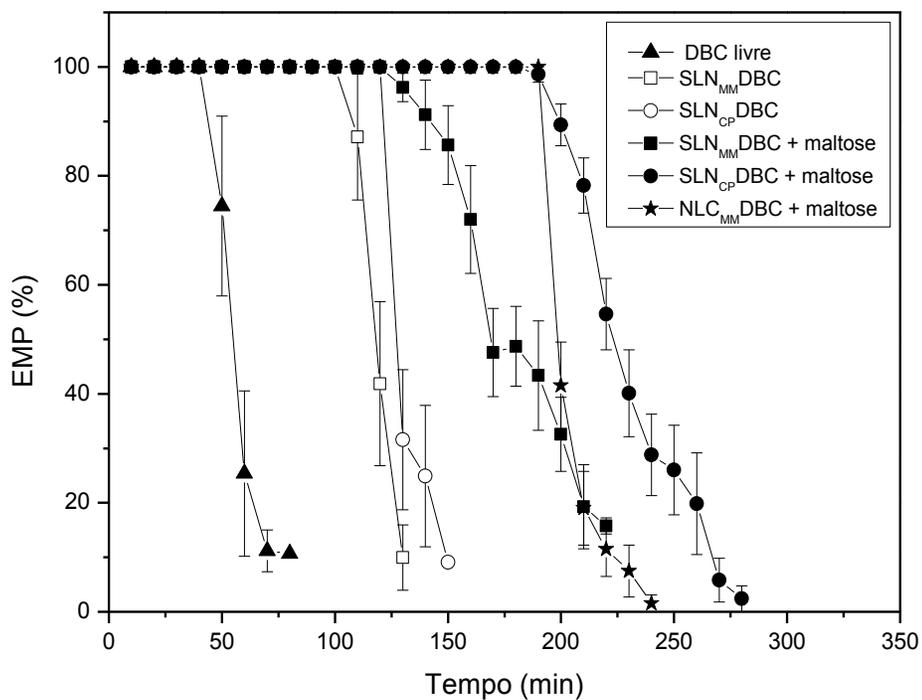


Figura 52. Percentagem dos efeitos (atividade analgésica) máximos possíveis (EMP%), em função do tempo, avaliados pelo teste de *tail-flick* (n = 7 por grupo), após administração da DBC livre e encapsulada em SLN e NLC.

Tabela 36. Porcentagem do Efeito Máximo (EMP, %) atividade analgésica induzida pela DBC livre e associada à nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), preparados por HP liofilizados com e sem crioprotetor.

Tempo (min.)	DBC livre	SLN <sub>MM</sub> DBC	SLN <sub>CP</sub> DBC	SLN <sub>MM</sub> DBC + maltose	SLN <sub>CP</sub> DBC + maltose	NLC <sub>MM</sub> DBC + maltose
40	100 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>j, k, l</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
50	74,44 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>j, k, l</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
60	25,37 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>***</sup>	100 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>j, k, l</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
70	11,16 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>***</sup>	100 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>j, k, l</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
80	10,66 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>***</sup>	100 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>j, k, l</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
90	0 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>***</sup>	100 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>j, k, l</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
100	0 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>***</sup>	100 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>j, k, l</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
110	0 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>***</sup>	87,12 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>j, k, l</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
120	0 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>***</sup>	41,85 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>***</sup>	100 <sub>j, k, l</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
130	0 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>ns, **, ***</sup>	9,93 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns, ***</sup>	31,58 <sub>j, k, l</sub> <sup>***</sup>	96,24 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
140	0 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>ns, **, ***</sup>	0 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns, ***</sup>	24,91 <sub>j, k, l</sub> <sup>***</sup>	91,21 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
150	0 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>ns, ***</sup>	0 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns, ***</sup>	9,09 <sub>j, k, l</sub> <sup>***</sup>	85,65 <sub>m, n</sub> <sup>ns</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
160	0 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>ns, ***</sup>	0 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns, ***</sup>	0 <sub>j, k, l</sub> <sup>***</sup>	71,99 <sub>m, n</sub> <sup>***</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100
170	0 <sub>a, b, c, d, e</sub> <sup>ns, ***</sup>	0 <sub>f, g, h, i</sub> <sup>ns, ***</sup>	0 <sub>j, k, l</sub> <sup>***</sup>	47,58 <sub>m, n</sub> <sup>***</sup>	100 <sub>o</sub> <sup>ns</sup>	100

180	0 <sub>a,b<sup>ns</sup>,c,d,e<sup>***</sup></sub>	0 <sub>f<sup>ns</sup>,g,h,i<sup>***</sup></sub>	0 <sub>j,k,l<sup>***</sup></sub>	48,72 <sub>m,n<sup>***</sup></sub>	100 <sub>o<sup>ns</sup></sub>	100
190	0 <sub>a,b<sup>ns</sup>,c,d,e<sup>***</sup></sub>	0 <sub>f<sup>ns</sup>,g,h,i<sup>***</sup></sub>	0 <sub>j,k,l<sup>***</sup></sub>	43,35 <sub>m,n<sup>***</sup></sub>	98,61 <sub>o<sup>ns</sup></sub>	100
200	0 <sub>a,b<sup>ns</sup>,c,d,e<sup>***</sup></sub>	0 <sub>f<sup>ns</sup>,g,h,i<sup>***</sup></sub>	0 <sub>j,k,l<sup>***</sup></sub>	32,57 <sub>m,n<sup>***ns</sup></sub>	89,35 <sub>o<sup>***</sup></sub>	41,53
210	0 <sub>a,b<sup>ns</sup>,c,e<sup>*</sup>,d<sup>***</sup></sub>	0 <sub>f<sup>ns</sup>,g,i<sup>*</sup>,h<sup>***</sup></sub>	0 <sub>j,l,k<sup>***</sup></sub>	19,29 <sub>m,n<sup>***ns</sup></sub>	78,24 <sub>o<sup>***</sup></sub>	19,01
220	0 <sub>a,b,c,e<sup>ns</sup>,d<sup>***</sup></sub>	0 <sub>f,g,i<sup>ns</sup>,h<sup>***</sup></sub>	0 <sub>j,l,k<sup>ns</sup>,l<sup>***</sup></sub>	15,76 <sub>m,n<sup>***ns</sup></sub>	54,65 <sub>o<sup>***</sup></sub>	11,51
230	0 <sub>a,b,e<sup>ns</sup>,c,d<sup>***</sup></sub>	0 <sub>f,g<sup>**</sup>,h<sup>***</sup>,i<sup>ns</sup></sub>	0 <sub>j,k,l<sup>**</sup>,l<sup>***ns</sup></sub>	0 <sub>m,n<sup>ns</sup></sub>	40,10 <sub>o<sup>***</sup></sub>	7,47
240	0 <sub>a,b,c,e<sup>ns</sup>,d<sup>***</sup></sub>	0 <sub>f,g,i<sup>ns</sup>,h<sup>***</sup></sub>	0 <sub>j,l,k<sup>ns</sup>,l<sup>***</sup></sub>	0 <sub>m,n<sup>***ns</sup></sub>	28,79 <sub>o<sup>***</sup></sub>	1,54
250	0 <sub>a,b,c,e<sup>ns</sup>,d<sup>***</sup></sub>	0 <sub>f,g,i<sup>ns</sup>,h<sup>***</sup></sub>	0 <sub>j,l,k<sup>ns</sup>,l<sup>***</sup></sub>	0 <sub>m,n<sup>***ns</sup></sub>	26,01 <sub>o<sup>***</sup></sub>	0
260	0 <sub>a,b,c,e<sup>ns</sup>,d<sup>***</sup></sub>	0 <sub>f,g,i<sup>ns</sup>,h<sup>***</sup></sub>	0 <sub>j,l,k<sup>ns</sup>,l<sup>***</sup></sub>	0 <sub>m,n<sup>***ns</sup></sub>	19,84 <sub>o<sup>***</sup></sub>	0
270	0 <sub>a,b,c,e<sup>ns</sup>,d<sup>*</sup></sub>	0 <sub>f,g,i<sup>ns</sup>,h<sup>*</sup></sub>	0 <sub>j,l,k<sup>ns</sup>,l<sup>*</sup></sub>	0 <sub>m,n<sup>*ns</sup></sub>	5,82 <sub>o<sup>*</sup></sub>	0
280	0 <sub>a,b,c,d,e<sup>ns</sup></sub>	0 <sub>f,g,h,i<sup>ns</sup></sub>	0 <sub>j,k,l<sup>ns</sup></sub>	0 <sub>m,n<sup>ns</sup></sub>	2,38 <sub>o<sup>ns</sup></sub>	0
290	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0
310	0	0	0	0	0	0
320	0	0	0	0	0	0

**Estatística:** ANOVA e Turkey-Kramer.  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*). a. DBC vs. SLN<sub>MM</sub>DBC, b. DBC vs. SLN<sub>CP</sub>DBC, c. DBC vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose, d. DBC vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose, e. DBC vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose, f. SLN<sub>MM</sub>DBC vs. SLN<sub>CP</sub>DBC, g. SLN<sub>MM</sub>DBC vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose, h. SLN<sub>MM</sub>DBC vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose. i. SLN<sub>MM</sub>DBC vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose, j. SLN<sub>CP</sub>DBC vs. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose, k. SLN<sub>CP</sub>DBC vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose, l. SLN<sub>CP</sub>DBC vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose, m. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose vs. SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose, n. SLN<sub>MM</sub>DBC + maltose vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose, o. SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose vs. NLC<sub>MM</sub>DBC + maltose.



## 6. Conclusões

Neste trabalho foram desenvolvidas nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados associados à dibucaína utilizando palmitato de cetila ou miristato de miristila como matrizes lipídicas sólidas, acrescentados (NLC) ou não (SLN) de uma pequena proporção de lipídios líquidos na temperatura ambiente (mistura de triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico, Liponate GC), objetivando aumentar a tempo de ação da anestesia local, melhorar a disponibilidade na pele e reduzir efeitos tóxicos. Os resultados obtidos nos mostraram que:

- As técnicas de homogeneização a quente, sob alta-pressão e sonicação, foram usadas para preparo das SLN e dos NLC. O tamanho das partículas (ca. 200 nm) produzidas com ambas as metodologias foram similares, porém a homogeneização a alta pressão produziu nanopartículas com maior estabilidade em todos os casos estudados. A homogeneização à alta pressão é um processo mais atrativo para a indústria farmacêutica, uma vez que evita problemas de escalabilidade, visto que os equipamentos estão disponíveis há décadas, fazem parte da rotina de grandes empresas ou podem ser facilmente adquiridos, com baixo custo.
- O NLC<sub>MM</sub>DBC/HP teve maior eficiência de encapsulação do fármaco ( $90,54 \pm 0,95\%$ ), embora as partículas produzidas por sonicação também tenham apresentado alta porcentagem de DBC encapsulada. As formulações SLN<sub>MM</sub>DBC e SLN<sub>CP</sub>DBC produzidas por HP ou Son exibiram alta eficiência de encapsulação (acima de  $69,93 \pm 0,86\%$ ). Este resultado indica elevada lipofília de DBC, que favoreceu a interação do anestésico com os lipídios formadores das partículas. A eficiência de encapsulação e a estabilidade física das nanopartículas, monitoradas por até 240 dias de armazenamento, mostrou resultados mais satisfatórios para os carreadores lipídicos nanoestruturados.
- Os resultados de FTIR mostraram que não ocorreu descolamento das bandas de absorção do AL, corroborando com as análises de DSC que revelaram a DBC está dissolvida (molecularmente dispersa) na matriz lipídica das nanopartículas. Além disso,

análises de DSC forneceram evidências da redução da cristalinidade das matrizes lipídicas sólidas (MM, CP) mediante a produção das SLN e NLC.

- As medidas de RPE revelaram que a dibucaína particiona nas formulações de SLN e NLC avaliadas, promovendo maior organização molecular dos lipídios na região do interior das partículas monitorada pelos marcadores de spin nítróxico usados (5-SASL e 5-MeSL). Resultados de SAXS indicam um arranjo lipídico tipo lamelar para SLN e NLC, este maior empacotamento ocorre pela inserção da DBC entre os lipídios que compõem a bicamada, numa profundidade compatível com o posicionamento dos marcadores.
- Ensaios *in vitro* confirmaram a liberação sustentada da dibucaína, a partir de todas as formulações de SLN e NLC com os parâmetros  $n$  ( $\leq 0,43$ ) e  $\beta$  ( $\leq 0,75$ ), determinados após a modelagem matemática de Korsmeyer - Peppas e Weibull, respectivamente, revelaram que o principal mecanismo de liberação é a difusão de Fick.
- Estudos de permeação através de membranas sintéticas com poros de 30 nm (para mimetizar a pele) revelaram baixa capacidade de permeação das SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub>, com ou sem dibucaína, indicando que estes carreadores tem baixa elasticidade e não atravessam as camadas da pele, sendo benéfico, pois favorece a formação do filme lipídico de nanopartículas na epiderme, promove efeitos oclusivos e direciona à liberação prolongada.
- Testes de toxicidade *in vitro* mostraram que a encapsulação da DBC em ambos os tipos de nanopartículas causou redução da toxicidade intrínseca do anestésico, avaliada sobre cultura de células 3T3 e HaCat.
- A avaliação do efeito analgésico *in vivo* mostrou prolongamento do bloqueio sensorial da dor pela DBC nas formulações dispersas em gel de carbopol. Dentre as nanopartículas testadas, a SLN<sub>CP</sub>DBC + maltose foi mais eficiente, resultando em um maior efeito analgésico (300% em relação ao fármaco livre, no gel). Assim, formulações contendo SLN ou NLC preparadas com MM ou CP, e contendo DBC na concentração de 0,05% mostraram significativo efeito analgésico, mostrando-se promissoras como bases para produtos farmacêuticos de liberação prolongada para anestesia dérmica.

## **7. Sugestões para trabalhos futuros**

Algumas sugestões que se pode apontar para trabalhos futuros:

- Preparação e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados para encapsulação de DBC utilizando como matriz lipídica sólida palmitato de cetila e mistura de triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico,
- Caracterização físico-química e estudos de estabilidade dos géis de carbopol contendo SLN e NLC com e sem DBC liofilizadas com diferentes agentes crioprotetores,
- Estudos de ampliação de escala da produção das nanopartículas (SLN e NLC) contendo DBC,
- Preparo e caracterização de SLN e NLC destinados a encapsulação de anti-inflamatórios ou diferentes anestésicos locais que necessitem da redução de efeitos tóxicos e aumento de disponibilidade.
- Avaliação da atividade antinociceptiva *in vivo* em humanos (voluntários sadios) das formulações contendo SLN ou NLC dispersas em gel.



## **8. Referências bibliográficas**

- Aji Alex, M. R., Chacko, A. J., Jose, S. & Souto, E. B., Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 42 (1-2): 11-18.
- Alba-Delgado, C., Mico, J. A., Sánchez-Blázquez, P. & Berrocoso, E., Analgesic antidepressants promote the responsiveness of locus coeruleus neurons to noxious stimulation: implications for neuropathic pain, *Pain*, 2012, 153 (7): 1438-1449.
- Anantachaisilp, S., Smith, S. M., Treetong, A., Pratontep, S., Puttipipatkachorn, S. & Ruktanonchai, U. R., Chemical and structural investigation of lipid nanoparticles: drug-lipid interaction and molecular distribution, *Nanotechnology*, 2010, 21 (12): 125102.
- ANVISA, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, In: Saúde, M. d. (ed), resolução RE nº 899, Brasil, 2003.
- Araújo, J., Gonzalez-Mira, E., Egea, M. A., Garcia, M. L. & Souto, E. B., Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications, *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 393 (1-2): 167-175.
- Asakawa, T. & Matsushita, S., Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides, *Lipids*, 1980, 15 (3): 137-140.
- Attama, A. A., SLN, NLC, LDC: state of the art in drug and active delivery, *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2011, 5 (3): 178-187.
- Attama, A. A., Momoh, M. A. & Builders, P. F., Lipid nanoparticulate drug delivery systems: a revolution in dosage form design and development, In: Sezer, A. D. (ed), *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, 2012.

- Attama, A. A. & Mueller-Goymann, C. C., Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, 315 (1-3): 189-195.
- Attwood, D. & Florence, A. T., *Surfactant Systems-Their Chemistry, Pharmacy and Biology*, London, *UK* : Chapman & Hall, 1983.
- Aulton, M. E., *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, New York: Churchill Livingstone, 2001.
- Aydın, A. A. & Okutan, H., High-chain fatty acid esters of myristyl alcohol with even carbon number: Novel organic phase change materials for thermal energy storage - 1, *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 2011, 95 (10): 2752-2762.
- Barbosa, R. M., da Silva, C. M. G., Bella T. S., de Araújo D. R., Marcato P. D., Durán N., de Paula E., Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing the local anesthetic dibucaine designed for topical application, *Journal of Physics: Conference Series*, 2013a, 429 (012035): 1-8.
- Barbosa, R. M., Luna Finkler, C. L., Bentley, M. V. & Santana, M. H., Physicochemical characterization of surfactant incorporating vesicles that incorporate colloidal magnetite, *Journal of Liposome Research*, 2013b, 23 (1): 47-53.
- Barbosa R. M., Klassen, A., Marcato, P. D., Franz-Montan M., Grillo, R., Fraceto, L. F., de Paula, E., Validation of an HPLC method for the determination of Dibucaine encapsulated in Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. *Latin American Journal of Pharmacy*, 2013c, 32 (9): 1362-1369.
- Battaglia, L. & Gallarate, M., Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2012, 9 (5): 497-508.

- Battaglia, L., Gallarate, M., Cavalli, R. & Trotta, M., Solid lipid nanoparticles produced through a coacervation method, *Journal of Microencapsulation*, 2010, 27 (1): 78-85.
- Battaglia, L., Serpe, L., Muntoni, E., Zara, G., Trotta, M. & Gallarate, M., Methotrexate-loaded SLN prepared by coacervation technique: *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* pharmacokinetics and biodistribution, *Nanomedicine (Lond)*, 2011, 6 (9): 1561-1573.
- Becker, D. E. & Reed, K. L., Local anesthetics: review of pharmacological considerations, *Anesthesia Progress*, 2012, 59 (2): 90-101; quiz 102-103.
- Benavides, T., Martínez, V., Mitjans, M., Infante, M. R., Moran, C., Clapés, P., Clothier, R., et al., Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by *in vitro* methods as alternative to the animal tests, *Toxicology*, 2004, 201 (1-3): 87-93.
- Bender, E. A., Adorne, M. D., Colomé, L. M., Abdalla, D. S., Guterres, S. S. & Pohlmann, A. R., Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan, *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 426 (1-2): 271-279.
- Bhaskar, K., Mohan, C. K., Lingam, M. Reddy, V. P., Venkateswarlu, V. & Rao, Y. M., Development of nitrendipine controlled release formulations based on SLN and NLC for topical delivery: *in vitro* and *ex vivo* characterization, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2008, 34: 719-725.
- Bhaskar, K., Anbu, J., Ravichandiran, V., Venkateswarlu, V. & Rao, Y. M., Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies, *Lipids in Health and Disease*, 2009, 8(6): 1-15.
- Bozzola, J. J. & Russell, L. D., *Electron microscopy*, Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1999.

- Bras, M., Dordević, V., Gregurek, R. & Bulajić, M., Neurobiological and clinical relationship between psychiatric disorders and chronic pain, *Psychiatria Danubina*, 2010, 22 (2): 221-226.
- Brasil, Resolução RDC 67, de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre as boas práticas de manipulação de medicamentos para uso humanos em farmácia e seus anexos, ANVISA, Diário Oficial da União de 09/10/2007, 29-58.
- Bruxel, F., Laux, M., Wild, L. B., Fraga, M., Koester, L. S. & Teixeira, H. F., Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos, *Química Nova*, 2012, 35 (9): 1827-1840.
- Bunjes, H., Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2011, 16: 405-411.
- Butterworth, J. F. & Strichartz, G. R., Molecular mechanisms of local anesthesia: a review, *Anesthesiology*, 1990, 72(4): 711-734.
- Carvalho, J. C. A., Farmacologia dos anestésicos locais, *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 1994, 44: 75-82.
- Castel, A., Pérez, M., Sala, J., Padrol, A. & Rull, M., Effect of hypnotic suggestion on fibromyalgic pain: comparison between hypnosis and relaxation, *European Journal of Pain*, 2007, 11 (4): 463-468.
- Castro, G. A., Coelho, A. L., Oliveira, C. A., Mahecha, G. A., Oréfice, R. L. & Ferreira, L. A., Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 381 (1): 77-83.
- Catterall, W. & Mackie, K., Local anesthetics, In: Brunton, L., Chabner, B. and Knollma, B. (eds), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, New York: McGraw-Hill, 2010.

- Cavalcanti, I. L. Gozzani, J. L.; Sampaio Filho, A. A.; Alves Neto, O. & Garcia, J. B. S., Dor pós-operatória. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de anestesiologia/SBA, 2004.
- Cereda, C. M., Brunetto, G. B., de Araújo, D. R. & de Paula, E., Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration, *Canadian Journal of Anesthesia*, 2006, 53 (11): 1092-1097.
- Cereda, C. M. S., Franz-Montan, M., Silva, C. M. G., Casadei, B. R., Domingues, C. C., Tofoli, G. R., Araújo, D. R., Paula, E., Transdermal Delivery of Butamben using Elastic and Conventional Liposomes. *Journal of Liposome Research*, 2013, 23: 228-234.
- Cevc, G., Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery, *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1996, 13 (3-4): 257-388.
- Charcosset, C., El-Harati, A. & Fessi, H., Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor, *Journal of Controlled Release*, 2005, 108 (1): 112-120.
- Chattopadhyay, P., Shekunov, B. Y., Yim, D., Cipolla, D., Boyd, B. & Farr, S., Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59 (6): 444-453.
- Chen, H., Chang, X., Du, D., Liu, W., Liu, J., Weng, T., Yang, Y. Xu, H., Yang, X., Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting, *Journal of Controlled Release*, 2006, 110 (2): 296-306.
- Corrias, F. & Lai, F., New methods for lipid nanoparticles preparation., *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2011, 5: 201-213.

- Costa, P. & Lobo, J. M. S., Modeling and comparison of dissolution profiles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 13 (2): 123-133.
- Covino, B. G., Pharmacology of local anaesthetic agents, *British Journal of Anaesthesia*, 1986, 58 (7): 701-716.
- Crystal, C. S., McArthur, T. J. & Harrison, B., Anesthetic and procedural sedation techniques for wound management, *Emergency Medicine Clinics of North America*, 2007, 25 (1): 41-71.
- Curtis, L. A., Dolan, T. S. & Seibert, H. E., Are one or two dangerous? Lidocaine and topical anesthetic exposures in children, *The Journal of Emergency Medicine*, 2009, 37 (1): 32-39.
- da Costa, P. J. C., *In vitro* evaluation of the lyoequivalence of pharmaceutical formulations, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, 38 (2):141-153.
- Dailey, D. L., Rakel, B. A., Vance, C. G. T., Liebano, R., E., Amrit, A. S., Bush, H. M., Lee, K. S., Lee, J. E., Sluka, K. A., Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) reduces pain, fatigue, and hyperalgesia while restoring central inhibition in primary fibromyalgia, *Pain*, 2013.
- Dailey, D., Rakel, B., Vance, C., Lee, J., Liebano, R., Anand, A., Sluka, K., Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) reduces pain and improves function in people with Fibromyalgia, *The Journal of Pain*, 2011, 12 (4): P23.
- Dayan, P. S., Litovitz, T. L., Crouch, B. I., Scalzo, A. J. & Klein, B. L., Fatal accidental dibucaine poisoning in children, *Annals of Emergency Medicine*, 1996, 28 (4): 442-445.

- de Araújo, D. R., Desenvolvimento e avaliação farmacológica de formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-amidas cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína, *Biologia Funcional e molecular, área de bioquímica*, Campinas, SP: UNICAMP, 2005, p. 142.
- de Araújo, D. R., da Silva, D. C., Barbosa, R. M., Franz-Montan, M., Cereda, C. M., Padula, C, Santi, P., de Paula, E.; Strategies for delivering local anesthetics to the skin: focus on liposomes, solid lipid nanoparticles, hydrogels and patches, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2013, 10 (11): 1-13.
- de Jesus, M. B., Radaic, A., Zuhorn, I. S., de Paula, E., Microemulsion extrusion technique: a new method to produce lipid nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research*, 2013, 15 (1960): 1-15.
- de Leon-Casasola, O. A., Opioids for chronic pain: new evidence, new strategies, safe prescribing, *The American Journal of Medicine*, 2013, 126 (3 Suppl 1): S 3-11.
- de Melo, N. F. S., Grillo, R., Guilherme, V. A., de Araújo, D. R., de 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, 28: 1984-1994.
- de Paula, E., Cereda, C. M., Fraceto, L. F., de Araújo, D. R., Franz-Montan, M., Tofoli, G. R., Ranali, J., Volpato, M. C, Groppo, F. C., Micro and nanosystems for delivering local anesthetics, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2012, 9 (12): 1505-1524.
- de Paula, E. & Schreier, S., Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1240 (1): 25-33.
- de Paula, E. & Schreier, S., Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1996, 29 (7): 877-894.

- de Paula, E., Schreier, S., Jarrell, H. C. & Fraceto, L. F., Preferential location of lidocaine and etidocaine in lecithin bilayers as determined by EPR, fluorescence and <sup>2</sup>H NMR, *Biophysical Chemistry*, 2008, 132 (1): 47-54.
- de Souza, A. L. R., Andreani, T., Nunes, M. F., Cassimiro, D. L., de Almeida, A. E., Ribeiro, C. A., Sarmiento, V. H. V., et al., Loading of praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2012, 108 (1): 353-360.
- De Vringer, T., Topical preparation containing a suspension of solid lipid particles, US, 1997, p. 14.
- Dijoux, N., Guingand, Y., Bourgeois, C., Durand, S., Fromageot, C., Combe, C. & Ferret, P. J., Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay, *Toxicology in vitro*, 2006, 20 (4): 480-489.
- Dingler, A., Blum, R. P., Niehus, H., Müller, R. H. & Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls)--a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products, *Journal of Microencapsulation*, 1999, 16 (6): 751-767.
- Dingler, A. & Gohla, S., Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities, *Journal of Microencapsulation*, 2002, 19 (1): 11-16.
- Dippenaar, J. M., Local anaesthetic toxicity, *Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia*, 2007, 13 (3): 23-28.
- Doktorovova, S., Araújo, J., Garcia, M. L., Rakovsky, E. & Souto, E. B., Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured lipid carriers (PEG-NLC), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 75 (2): 538-542.
- Dorsher, P. T., Acupuncture for chronic pain Original Research Article, *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management*, 2011, 15 (2): 55-63.

- Duarte, E. L., Síntese e Caracterização de nanopartículas baseadas em óxido de ferro, Instituto de Física, Departamento de Física Aplicada, São Paulo: USP, 2005.
- Dworkin, R. H., O'Connor, A. B., Backonja, M., Farrar, J. T., Finnerup, N. B., Jensen, T. S., Kalso, E. A., Loeser, J. D., Miaskowski, C., Nurmikko, T. J., Portenoy, R. K., Rice, A. S., Stacey, B. R., Treede, R. D., Turk, D. C., Wallace, M. S., Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations, *Pain*, 2007, 132 (3): 237-251.
- D'Amour, F. E. & Smith, D. I., A method for determining loss of pain sensation, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1941, 72: 74-79.
- Eftink, M. R., Puri, R. K. & Ghahramani, M. D., Local anesthetic-phospholipid interactions. The pH dependence of the binding of dibucaine to dimyristoylphosphatidylcholine vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985, 813 (1): 137-140.
- El-Harati, A. A., Charcosset, C. & Fessi, H., Influence of the formulation for solid lipid nanoparticles prepared with a membrane contactor, *Pharmaceutical Development and Technology*, 2006, 11 (2): 153-157.
- Elnaggar, Y. S., El-Massik, M. A. & Abdallah, O. Y., Fabrication, appraisal, and transdermal permeation of sildenafil citrate-loaded nanostructured lipid carriers versus solid lipid nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6: 3195-3205.
- Elsayed, M. M., Rapid determination of cinchocaine in skin by high-performance liquid chromatography, *Biomedical Chromatography*, 2007, 21 (5): 491-496.
- Elsayed, M. M., Abdallah, O. Y., Naggar, V. F. & Khalafallah, N. M., PG-liposomes: novel lipid vesicles for skin delivery of drugs, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2007, 59 (10): 1447-1450.

- Ferreira, P. M. & Martini, R., Cocaína: lendas, história e abuso, *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2001, 26: 96-99.
- Filipe, V., Hawe, A. & Jiskoot, W., Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates, *Pharmaceutical Research*, 2010, 27 (5): 796-810.
- Foldvari, M., A., G. & Mezei, M., Topical liposomal local-anesthetics – design optimization and evaluation of formulations, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1993, 19 (19): 2499-2517.
- Fonte, P., Andrade, F., Araújo, F., C., A., J., d. N. & Sarmiento, B., Chitosan-Coated Solid Lipid Nanoparticles for Insulin Delivery, *Methods in Enzymology*, 2012, 508: 295-314.
- Fotakis, G. & Timbrell, J. A., *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 2006, 160 (2): 171-177.
- Fraceto, L. F., Oyama, S., 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, *Biophysical Chemistry*, 2006, 123 (1): 29-39.
- Fraceto, L. F., Pinto, L. e. M., Franzoni, L., Braga, A. A., Spisni, A., Schreier, S. & de Paula, E., Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers, *Biophysical Chemistry*, 2002, 99 (3): 229-243.
- Freitas, C. & Müller, R. H., Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>), *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, 46 (2): 145-151.
- Freitas, C. & Müller, R. H., Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1999, 47 (2): 125-132.

- Frezzatti, W. A., Toselli, W. R. & Schreier, S., Spin label study of local anesthetic-lipid membrane interactions. Phase separation of the uncharged form and bilayer micellization by the charged form of tetracaine, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, 860 (3): 531-538.
- Gallarate, M., Trotta, M., Battaglia, L. & Chirio D., Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: preliminary studies on insulin encapsulation, *Journal of Microencapsulation*, 2009, 26 (5): 394-402.
- Garte, N. & Sato, K., *Crystallization processes in fat and lipid systems*, New York: Marcel Dekker, 2001.
- Gasco, M. R., Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, US Patent 5 250 236 (1993).
- Gaskin, D. J. & Richard, P., The economic costs of pain in the United States, *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, 2012, 13 (8): 715-724.
- Gifani, A., Taghizadeh, M., Seifkordi, A. A. & Ardjmand, M., Preparation and investigation the release behaviour of wax microspheres loaded with salicylic acid, *Journal of Microencapsulation*, 2009, 26 (6): 485-492.
- Gohla, S. H. & Dingler, A., Scaling up feasibility of the production of solid lipid nanoparticles (SLN), *Pharmazie*, 2001, 56 (1): 61-63.
- Goldberg, D. S. & McGee, S. J., Pain as a global public health priority, *BMC Public Health*, 2011, 11: 770.
- Grant, G. J., Vermeulen, K., Langerman, L., Zakowski, M. & Turndorf, H., Prolonged analgesia with liposomal bupivacaine in a mouse model, *Regional Anesthesia*, 1994, 19 (4): 264-269.

- Grillo, R., de 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*, 2009, 28 (3): 393-399.
- Gupta, S. P., QSAR (quantitative structure-activity relationship) studies on local anesthetics, *Chemical Reviews*, 1991, 91 (6): 1109-1119.
- Guterres, S. S., Poletto, F. S., Colomé, L. M., Raffin, R. P. & Pohlmann, A. R., Polymeric nanocapsules for drug delivery: an overview, In: Fanun, M. (ed), *Colloids in Drug Delivery, Israel: CRC Press*, 2010, pp. 71-98.
- Hall, G. C., Carroll, D., Parry, D. & McQuay, H. J., Epidemiology and treatment of neuropathic pain: the UK primary care perspective, *Pain*, 2006, 122 (1-2): 156-162.
- Hamdani, J., Moës, A. J. & Amighi, K., Physical and thermal characterisation of Precirol and Compritol as lipophilic glycerides used for the preparation of controlled-release matrix pellets, *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, 260 (1): 47-57.
- Hanzlicek, A. S. & Van der Merwe, D., Dibucaine toxicosis in a dog, *Journal of medical toxicology*, 2010, 6 (1): 44-49.
- Harde H & Das M, J. S., Solid lipid nanoparticles: an oral bioavailability enhancer vehicle, *Expert Opinion Drug Delivery*, 2011, 8: 1407-1424.
- Hass, D. A., *Drugs in Dentistry*, In: Association, C. P. (ed), *Compendium of pharmaceuticals and specialties (CPS)*, Canada, 2002.
- Heiati, H., Phillips, N. C. & Tawashi, R., Evidence for phospholipid bilayer formation in solid lipid nanoparticles formulated with phospholipid and triglyceride, *Pharmaceutical Research*, 1996, 13 (9): 1406-1410.

- Helgason, T., Awad, T. S., Kristbergsson, K., McClements, D. J. & Weiss, J., Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN), *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, 334 (1): 75-81.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. E. & Benoit, J. P., Physico-chemical stability of colloidal lipid particles, *Biomaterials*, 2003, 24 (23): 4283-4300.
- Hoffmeister, C. R., Durli, T. L., Schaffazick, S. R., Raffin, R. P., Bender, E. A., Beck, R. C., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery, *Nanoscale Research Letters*, 2012, 7 (1): 251.
- ICH, Validation of Analytical Procedures: Text and methodology (Q2(R1)): Internal Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2005.
- Jain, R. & Jain, S., Anti-depressants in the Treatment of Chronic Pain, *Practical Pain Management*, 2011, 3: 44-50.
- Jenning, V. & Gohla, S., Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN), *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 196 (2): 219-222.
- Jenning, V., Gysler, A., Schäfer-Korting, M. & Gohla, S. H., Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000 a, 49 (3): 211-218.
- Jenning, V., Schäfer-Korting, M. & Gohla, S., Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties, *Journal of Controlled Release*, 2000 b, 66 (2-3): 115-126.
- Jensen, L. B., Magnusson, E., Gunnarsson, L., Vermehren, C., Nielsen, H. M. & Petersson, K., Corticosteroid solubility and lipid polarity control release from solid lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 390 (1): 53-60.

- Joshi, M. & Patravale, V., Formulation and evaluation of Nanostructured Lipid Carrier (NLC)-based gel of Valdecoxib, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2006, 32 (8): 911-918.
- Jost, P., Libertini, L. J., Hebert, V. C. & Griffith, O. H., Lipid spin labels in lecithin multilayers. A study of motion along fatty acid chains, *Journal of Molecular Biology*, 1971, 59 (1): 77-98.
- Kang, C. & Shin, S. C., Preparation and evaluation of bioadhesive dibucaine gels for enhanced local anesthetic action, *Archives of Pharmacal Research*, 2010, 33 (8): 1277-1283.
- Kasongo, K. W., Jansch, M., Müller, R. H. & Walker, R. B., Evaluation of the *in vitro* differential protein adsorption patterns of didanosine-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for potential targeting to the brain, *Journal of Liposome Research*, 2011, 21 (3): 245-254.
- Katzung, B. G., Masters, S. & Trevor, A., *Basic & Clinical Pharmacology*: McGraw Hill, Lange, 2009.
- Khojainova, N., Santiago-Palma, J., Kornick, C., Breitbart, W. & Gonzales, G. R., Olanzapine in the management of cancer pain, *Journal of Pain and Symptom Management*, 2002, 23 (4): 346-350.
- Kim, B. D., Na, K. & Choi, H. K., Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 24 (2-3): 199-205.
- Knowles, P. F., Marsh, D. & Rattle, H. W. E., *Magnetic resonance of biomolecules : an introduction to the theory and practice of NMR and ESR in biological systems*, London: Wiley & Sons, Incorporated, John, 1976.

- Korsmeyer, R. W. & Peppas, N. A., Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems, In: Roseman, T. J. and Mansdorf, S. Z. (eds), Controlled Release Delivery Systems, New York: Marcel Dekker Inc., 1981, pp. 77-90.
- Krzic, M., Sentjurc, M. & Kristl, J., Improved skin oxygenation after benzyl nicotinate application in different carriers as measured by EPR oximetry *in vivo*, Journal of Controlled Release, 2001, 70 (1-2): 203-211.
- Kumar, V. V., Chandrasekar, D., Ramakrishna, S., Kishan, V., Rao, Y. M. & Diwan, P. V., Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics, International Journal of Pharmaceutics, 2007, 335 (1-2): 167-175.
- Kuroda, Y., Ogawa, M., Nasu, H., Terashima, M., Kasahara, M., Kiyama, Y., Wakita, M., Fujiwara, Y., Fujii, N., & Nakagawa, T., Locations of local anesthetic dibucaine in model membranes and the interaction between dibucaine and a Na<sup>+</sup> channel inactivation gate peptide as studied by 2H- and 1H-NMR spectroscopies, Biophysical Journal, 1996, 71(3): 1191-1207.
- Kuroda, Y. & Fujiwara, Y., Locations and dynamical perturbations for lipids of cationic forms of procaine, tetracaine, and dibucaine in small unilamellar phosphatidylcholine vesicles as studied by nuclear Overhauser effects in 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1987, 903 (3): 395-410.
- Lai, F., Sinico, C., De Logu, A., Zaru, M., Müller, R. H. & Fadda, A. M., SLN as a topical delivery system for *Artemisia arborescens* essential oil: *in vitro* antiviral activity and skin permeation study, International Journal of Nanomedicine, 2007, 2 (3): 419-425.
- Lanças, F. M., Validação de Métodos Cromatográficos de Análise - Métodos Cromatográficos de Análise, Rima: São Paulo, 2004.

- Langenbucher, F., Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1972, 24 (12): 979-981.
- Larsson, K., Classification of glyceride crystal forms, *Acta Chemica Scandinavica*, 1966, 20 (8): 2255-2260.
- Lasic, D. D., *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier: Amsterdam, 1993.
- Li, H. L., Galue, A., Meadows, L. & Ragsdale, D. S., A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel, *Molecular Pharmacology*, 1999, 55 (1): 134-141.
- Liedtke, S., Wissing, S., Müller, R. H. & Mäder, K., Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics, *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 196 (2): 183-185.
- Liu, J., Hu, W., Chen, H., Ni, Q., Xu, H. & Yang, X., Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 328 (2): 191-195.
- Lorite, G. S., Nobre, T. M., Zaniquelli, M. E., de Paula, E. & Cotta, M. A., Dibucaine effects on structural and elastic properties of lipid bilayers, *Biophysical Chemistry*, 2009, 139 (2-3): 75-83.
- Lukowski, G., Kasbohm, J., Pfliegel, P., Illing, A. & Wulff, H., Crystallographic investigation of cetylpalmitate solid lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 196 (2): 201-205.
- Macedo, J. P., Fernandes, L. L., Formiga, F. R., Reis, M. F., Júnior, T. N., Soares, L. A. & Egito, E. S., Micro-emultocrit technique: a valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions, *The American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2006, 7 (1): E21.

- Maia, C. S., Mehnert, W. & Schafer-Korting, M., Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids, *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 196 (2): 165-167.
- Malamed, S. F., *Manual de anestesia local*, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001.
- Malheiros, S. V., Pinto, L. M., Gottardo, L., Yokaichiya, D. K., Fraceto, L. F., Meirelles, N. C. & de Paula, E., A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4, *Biophysical Chemistry*, 2004, 110 (3): 213-221.
- Marcato, P. D., *Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas*, *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2009, 6 (2): 1-37.
- Marcato, P. D., Adami, L. F., Carverza, J., Huber, S. C., Misset, T., den Hertog, J., Ferreira, C. V., & Durán, N., Solid Lipid Nanoparticles as Sunscreen Carrier System and its Toxicity in Zebrafish Embryos, In: Calgary (ed), *The IASTED International Conference on Nanotechnology and Applications*, Creta: Acta Press: A Scientific and Technical Publishing Company, 2008, 615.
- Marcato, P. D., Caverzan, J., Rossi-Bergmann, B., Pinto, E. F., Machado, D., Silva, R. A., Justo, G. Z., Ferreira, C. V. & Durán, N., Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2011, 11 (3): 1880-1886.
- Marsh, D., *Electron Spin Resonance: Spin Labels*, In: Grell, E. (ed), *Membrane Spectroscopy*, New York: Springer Berlin Heidelberg, 1981, pp. 51-142.
- Mclure, H. A. & Rubin, A. P., Review of local anaesthetic agents, *Minerva Anesthesiology*, 2005, 71: 59-74.
- Mehnert, W. & Mäder, K., Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64: 83–101.

- Mehnert, W. & Mäder, K., Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 47 (2–3): 165-196.
- Mei, Z., Wu, Q., Hu, S., Li, X. & Yang, X., Triptolide loaded solid lipid nanoparticle hydrogel for topical application, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2005, 31 (2): 161-168.
- Mercado, P. & Weinberg, G. L., Local anesthetic systemic toxicity: prevention and treatment, *Anesthesiology Clinics*, 2011, 29 (2): 233-242.
- Merskey, H. & Bogduk, N., Classification of chronic pain – descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms, Seattle: International Association for the Study of Pain Press, 1994.
- Mertins, O., Estudos Físico-químicos e estruturais compósitos de fosfatidilcolina e quitosana., Departamento de Química, Rio Grande do Sul: UFRGS, 2008, 186p.
- Mishra, P. R., Al Shaal, L., Müller, R. H. & Keck, C. M., Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 371 (1-2): 182-189.
- Mitri, K., Shegokar, R., Gohla, S., Anselmi, C. & Müller, R. H., Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance, *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 414 (1-2): 267-275.
- Moraes, C. M., de Paula, E., Rosa, A. H. & Fraceto, F. L., Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de bupivacaína (S75-R25) em nanoesferas de poli(lactídeo-co-glicolídeo), *Química Nova*, 2008, 31 (8): 2152-2155.
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65 (1-2): 55-63.

- Müller, R. H., Maaßen, S., Weyhers, H., Specht, F. & Lucks, J. S., Cytotoxicity of magnetite loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles (SLN), *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 138: 85-94.
- Müller, R. H., Maassen, S., Weyhers, H. & Mehnert, W., Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407, *Journal of Drug Targeting*, 1996, 4(3): 161-170.
- Müller, R. H., Mader, K. & Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, 50 (1): 161-177.
- Müller, R. H., Radtke, M. & Wissing, S. A., Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54 Suppl 1: S131-S155.
- Müller, R. H., Schwarz, C., zur Mühlen, A. & Mehnert, W., Incorporation of lipophilic drugs and drug release profiles of solid lipid nanoparticles (SLN), *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, 1994, 21: 146-147.
- Müller, R. H., Shegokar, R. & Keck, C. M., 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications, *Current Drug Discovery Technologies*, 2011, 8 (3): 207-227.
- Müller, R. H., Mehnert, W. & Souto, E. B., Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for dermal delivery, In: Bronaugh, R. L. and Maibach, H. I. (eds), *Percutaneous Absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methods*: CRC Press, 2005, pp. 719–738.
- Nair, B., Final report on the safety assesment of cetyl esters., *International Journal of Toxicology*, 1997, 16 (1): 123-130.

NanoSight, <http://www.nanosight.com/technology/nanoparticle-tracking-analysis-nta>,  
Copyright© NanoSight. Acesso em: 30 de dezembro de 2013.

Narahashi, T., Frazier, T. & Yamada, M., The site of action and active form of local anesthetics. I. Theory and pH experiments with tertiary compounds, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1970, 171 (1): 32-44.

Neal, J. M., Bernards, C. M., Butterworth, J. F., Di Gregorio, G., Drasner, K., Hejtmanek, M. R., Mulroy, M. F., et al., ASRA practice advisory on local anesthetic systemic toxicity, *Regional Anesthesia & Pain Medicine*, 2010, 35 (2): 152-161.

New, R. R. C., *Liposomes: a practical approach*, New York: IRL Press, 1990.

Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 1979, 95 (2): 351-358.

Olbrich, C. & Müller, R. H., Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures, *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 180 (1): 31-39.

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, *Química Nova*, 2004, 27 (1): 131-138.

Ozyazici, M., Gökçe, E. H. & Ertan, G., Release and diffusional modeling of metronidazole lipid matrices, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, 63 (3): 331-339.

Padmanabhan, G. R., Dibucaine and dibucaine hydrochloride, In: Florey, K. (ed), *Analytical profiles of drugs substances*, New York: Academic press, Inc, 1983, pp. 106-133.

Paliwal, R., Rai, S., Vaidya, B., Khatri, K., Goyal, A. K., Mishra, N., Mehta, A., et al., Effect of lipid core material on characteristics of solid lipid nanoparticles designed for oral lymphatic delivery, *Nanomedicine*, 2009, 5(2):184-191.

- Pardeike, J., Hommoss, A. & Mueller, R. H., Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 366 (1-2): 170-184.
- Pastor, M. F., Díaz, J. J., Huarte, V. I, Campos, M.J. C., Fernández, M.D. R., Gómez-Ferrer Sapiña, R., Mesoterapia como opción terapéutica en patología dolorosa del aparato locomotor, *Rehabilitación*, 2010, 44 (4): 311-316.
- Patel, P. A. & Patravale, V. B., AmbiOnp: solid lipid nanoparticles of amphotericin B for oral administration, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2011, 7 (5): 632-639.
- Patel, P. M., Patel, H. H. & Roth, D. M., General Anesthetics and Therapeutic Gases, In: Brunton, L. L., Lazo, J. S. and Parker, K. L. (eds), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, New York: McGraw-Hill, 2010.
- Pathak, P. & Nagarsenker, M., Formulation and evaluation of lidocaine lipid nanosystems for dermal delivery, *AAPS PharmSciTech*, 2009, 10 (3): 985-992.
- Paul, D. R., Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 418: 13-17.
- Pawar, K. R. & Babu, R. J., Polymeric and lipid-based materials for topical nanoparticle delivery systems, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2010, 27 (5): 419-459.
- Peppas, N. A., Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 1985, 60 (4): 110-111.
- Pereira, F. V., Comportamento mesomorfo, estrutura e ordenação de cristais líquidos poliméricos em massa e em solução: um estudo através de espalhamento de luz e Raios-X, Programa de Pós-graduação em Química: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

- Pérez, S., Vale, C., Alonso, E., Alfonso, C., Rodríguez, P., Otero, P., Alfonso, A., Vale, P., Hiram, M., Vieytes, M. R. & Botana, L. M., A comparative study of the effect of ciguatoxins on voltage-dependent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in cerebellar neurons, *Chemical Research in Toxicology*, 2011, 24 (4): 587-596.
- Pietkiewicz, J., Sznitowska, M. & Placzek, M., The expulsion of lipophilic drugs from the cores of solid lipid microspheres in diluted suspensions and in concentrates, *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 310 (1-2): 64-71.
- Puglia, C. & Bonina, F., Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals., *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2012, 9 (4): 429-441.
- Puglia, C., Blasi, P., Rizza, L., Schoubben, A., Bonina, F., Rossi, C. & Ricci, M., Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an *in vitro* and *in vivo* investigation, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 357 (1-2): 295-304.
- Puglia, C., Sarpietro, M. G., Bonina, F., Castelli, F., Zammataro, M. & Chiechio, S., Development, characterization, and *in vitro* and *in vivo* evaluation of benzocaine- and lidocaine-loaded nanostructured lipid carriers, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 100 (5): 1892-1899.
- Radaic, A., de Paula, E., de Jesus, M. B., Factorial Design and Development of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Gene Delivery, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2014, 14: 1-8.
- Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T. & Catterall, W. A., Molecular determinants of state-dependent block of Na<sup>+</sup> channels by local anesthetics, *Science*, 1994, 265 (5179): 1724-1728.
- Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T. & Catterall, W. A., Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1996, 93 (17): 9270-9275.

- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. & Moore, P., Rang & Dale's Pharmacology: Elsevier Health Sciences, 2011.
- Remington, J. P., Remington: The Science And Practice Of Pharmacy: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- Ribani, M., Bottoli, K. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F. & Melo, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, Química Nova, 2004, 27 (5): 771-780.
- Ridolfi, D. M., Nanopartículas lipídicas sólidas: encapsulação de tretinoína para aplicação tópica, Instituto de Química, Campinas: UNICAMP, 2011, p. 70.
- Ridolfi, D. M., Marcato, P. D., Justo, G. Z., Cordi, L., Machado, D. & Durán, N., Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 93: 36-40.
- Ruetsch, Y. A., Böni, T. & Borgeat, A., From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2001, 1 (3): 175-182.
- Ruktanonchai, U., Limpakdee, S., Meejoo, S., Sakulkhu, U., Bunyapraphatsara, N., Junyaprasert, V. & Puttipipatkachorn, S., The effect of cetyl palmitate crystallinity on physical properties of gamma-oryzanol encapsulated in solid lipid nanoparticles, Nanotechnology, 2008, 19 (095701): 1-10.
- Saastamoinen, P., Leino-Arjas, P., Laaksonen, M. & Lahelma, E., Socio-economic differences in the prevalence of acute, chronic and disabling chronic pain among ageing employees, Pain, 2005, 114 (3): 364-371.
- Salas, S., Talero, B., Rabasco, A. M. & Gonzalez-Rodriguez, M. L., Development and validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the assay of lidocaine hydrochloride in alginate-Gantrez<sup>®</sup> microspheres, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 47: 501-507.

- Salmaso, S., Elvassore, N., Bertucco, A. & Caliceti, P., Production of solid lipid submicron particles for protein delivery using a novel supercritical gas-assisted melting atomization process, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 98 (2): 640-650.
- Sarmiento, B., Martins, S., Ferreira, D. & Souto, E. B., Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 2007, 2 (4): 743-749.
- Sato, K., Crystallization behaviour of fats and lipids- a review, *Chemical Engineering Science*, 2001, 56: 2255-2265.
- Sato, K., Ueno, S. & Yano, J., Molecular interactions and kinetic properties of fats, *Progress in Lipid Research*, 1999, 38 (1): 91-116.
- Saupe, A., Wissing, S. A., Lenk, A., Schmidt, C. & Müller, R. H., Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) - structural investigations on two different carrier systems, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2005, 15 (5): 393-402.
- Schreier, S., Frezzatti, W. A., Araújo, P. S., Chaimovich, H. & Cuccovia, I. M., Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine. Spin label and titration studies, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, 769 (1): 231-237.
- Schreier, S., Polnaszek, C. F. & Smith, I. C. P., Spin label in membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1978, 155: 375-436.
- Schubert, M. A. & Müller-Goymann, C. C., Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles-evaluation of the method and process parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003, 55 (1): 125-131.
- Schubert, M. A. & Muller-Goymann, C. C., Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2005, 61 (1-2): 77-86.

- Schwarz, C. & Mehnert, W., Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN), *International Journal of Pharmaceutics*, 1997, 157 (2): 171-179.
- Schwarz, C. & Mehnert, W., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization, *Journal of Microencapsulation*, 1999, 16 (2): 205-213.
- Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J. S. & Muller, R. H., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization, *Journal of Controlled Release*, 1994, 30: 83-96.
- Seo, M., Gorelikov, I., Williams, R. & Matsuura, N., Microfluidic assembly of monodisperse, nanoparticle-incorporated perfluorocarbon microbubbles for medical imaging and therapy, *Langmuir*, 2010, 26 (17): 13855-13860.
- Severino, P., Andreani, T., Macedo, A. S., Fangueiro, J. F., Santana, M. H., Silva, A. M. & Souto, E. B., Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery, *Journal of Drug Delivery*, 2012a, 2012 (750891): 1-10.
- Severino, P., Pinho, S. C., Souto, E. B. & Santana, M. H. A., Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles, *Colloids and Surfaces - B: Biointerfaces*, 2011, 86: 125-130.
- Severino, P., Santana, M. H. A. & Souto, E. B. Optimizing SLN and NLC by 2<sup>2</sup> full factorial design: effect of homogenization technique, *Materials Science and Engineering C*, 2012, 32 (6): 1375-1379.
- Shegokar, R., Singh, K. K. & Müller, R. H., Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles-from lab to industrial scale, *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 416 (2): 461-470.

- Siekmann, B. & Westesen, K., Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. Preparation and particle size determination., *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 1994, 3: 194-197.
- Silva, A. C., Gonzalez-Mira, E., Garcia, M. L., Egea, M. A., Fonseca, J., Silva, R., Santos, D., Souto, E. B. & Ferreira D., Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone - loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound, *Colloids and Surfaces B -Biointerfaces*, 2011, 86 (1): 158-165.
- Silva, M. S., Cocenza, D. S., de Melo, N. F. S., Grillo, R., Rosa, L. F. & Fraceto, L. F., Alginate nanoparticles as a controlled release system for clomazone herbicide, *Química Nova*, 2010, 33 (9): 1868-1873.
- Souto, E. B., Almeida, A. J. & Muller, R. H., Lipid nanoparticles (SLN (R), NLC (R)) for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effects, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2007, 3 (4): 317-331.
- Souto, E. B., Mehnert, W. & Müller, R. H., Polymorphic behaviour of Compritol (R) 888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC, *Journal of Microencapsulation*, 2006, 23 (4): 417-433.
- Souto, E. B. & Müller, R. H., Lipid Nanoparticles (Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers) for Cosmetic, Dermal, and Transdermal Applications, In: Thassu, D., Deleers, M. and Pathak, Y. (eds), *Drugs and pharmaceutical Science. Nanoparticulate drug delivery systems*, New York: Informa Healthcare EUA, Inc., 2007, pp. 213-233.
- Souto, E. B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M. & Müller, R. H., Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 278 (1): 71-77.

Strichartz, G. R., Local Anesthetics, Handbook of experimental pharmacology, 1987, 81.

Teeranachaideekul, V., Boonme, P., Souto, E. B., Müller, R. H. & Junyaprasert, V. B., Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC, Journal of Controlled Release, 2008, 128 (2): 134-141.

Teeranachaideekul, V., Souto, E. B., Junyaprasert, V. B. & Müller, Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10) - Development, physicochemical characterization and *in vitro* release studies, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007, 67 (1): 141-148.

Teixeira, Z., Zanchetta, B., Melo, B. A., Oliveira, L. L., Santana, M. H., Paredes-Gamero, E. J., Justo, G. Z., et al., Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: characterization and permeation studies, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 81 (1): 374-380.

Torchilin, V. P. & Weissig, V., Liposomes: a practical approach, New York: Oxford University Press, 2003.

Torchilin, V. P., Multifunctional nanocarriers, Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64, Supplement (2012): 302-315.

Tremont-Lukats, I. W., Megeff, C. & Backonja, M. M., Anticonvulsants for neuropathic pain syndromes: mechanisms of action and place in therapy, Drugs, 2000, 60 (5): 1029-1052.

Trotta, M., Debernardi, F. & Caputo, O., Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique, International Journal of Pharmaceutics, 2003, 257 (1-2): 153-160.

Tscharnutter, W., Photon correlation spectroscopy in particle sizing, Encyclopedia of Analytical Chemistry: John Wiley & Sons Ltda, 2006.

- Üner, M., Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems, *Pharmazie*, 2006, 61 (5): 375-386.
- Üner, M. & Yener, G., Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International Journal of Nanomedicine* 2007, 2 (3): 289–300.
- UNITED States Pharmacopeia, U., In: ed (ed), Rockville: United States Pharmacopeial convention, 2009, p. 2118.
- van den Bergh, B. A., Bouwstra, J. A., Junginger, H. E. & Wertz, P. W., Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability, *Journal of Controlled Release*, 1999, 62 (3): 367-379.
- van den Bergh, B. A. I., Wertz, P. W., Junginger, H. E. & Bouwstra, J. A., Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements, *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 217 (1–2): 13-24.
- Venturella, V. S., *Natural Products*, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed), Mack Publishing Easton, 1990, pp. 385–410.
- Vergheese, S. T. & Hannallah, R. S., Acute pain management in children, *Journal of Pain Research*, 2010, 3: 105-123.
- Weiniger, C. F., Golovanevski, M., Sokolsky-Papkov, M. & Domb, A. J., Review of prolonged local anesthetic action, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010, 7 (6): 737-752.
- Welder, A. A., A primary culture system of adult rat heart cells for the evaluation of cocaine toxicity, *Toxicology*, 1992, 72 (2): 175-187.

- Westesen, K. & Siekmann, B., Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction, *International Journal of Pharmaceutics*, 1993, 93 (1-3): 189-199.
- Weyhers, H., Ehlers, S., Hahn, H., Sout, E. B. & Muller, R. H., Solid lipid nanoparticles (SLN) - Effects of lipid composition on *in vitro* degradation and *in vivo* toxicity, *Pharmazie*, 2006, 61 (6): 539-544.
- Wissing, S. A., Kayser, O. & Müller, R. H., Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56 (9): 1257-1272.
- Wissing, S., Lippacher, A. & Müller, R., Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN), *Journal of Cosmetic Science*, 2001, 52 (5): 313-324.
- Wolf, N. B., Kuchler, S., Radowski, M. R., Blaschke, T., Kramer, K. D., Weindl, G., Kleuser, B., Haag, R., & Schäfer-Kortinga, M., Influences of opioids and nanoparticles on *in vitro* wound healing models, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 73 (1): 34-42.
- Wouden, J. & Miller, K. W., General Anesthetic Pharmacology., In: Golan, D. E., Tashjian, A. H., Armstrong, J., E., Armstrong and W., A. (eds), *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012, pp. 240-263.
- Yaksh, T. L. & Wallace, M. S., Opioid analgesics and pain management., In: Brunton, L., Chabner, B. and Knollman, B. (eds), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 2010.
- Yu, H. Y., Li, S. D. & Sun, P., Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2002, 54 (9): 1221-1227.

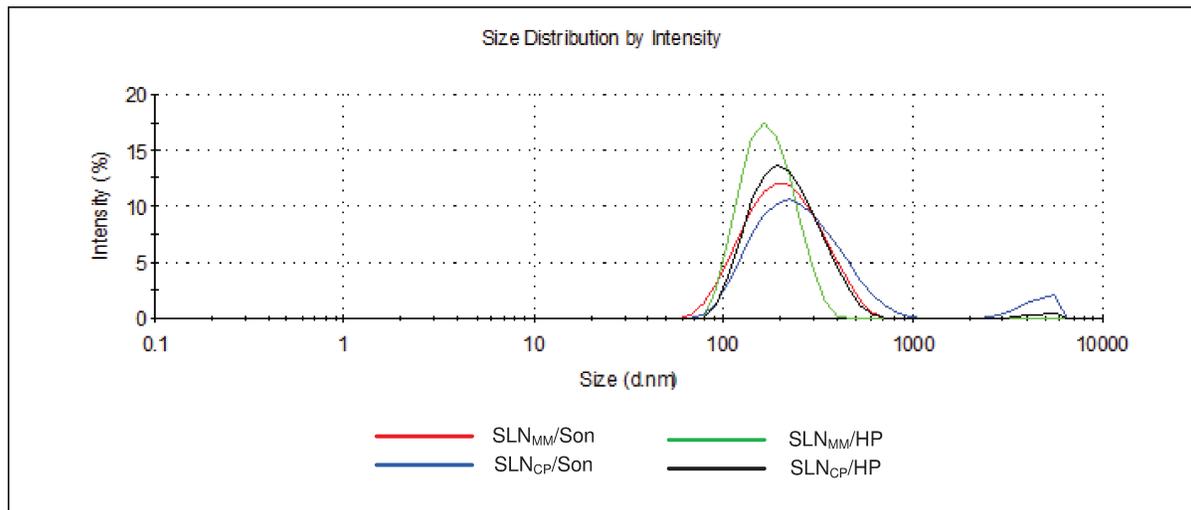
Zhang, L., Liu, L. Qian, Y., Chen, Y., The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM), *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 69: 750-759.

Zimmermann, E., Müller, R.H., Mäder, K., Influence of different parameters on reconstitution of lyophilized SLN. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 196: 211-213.

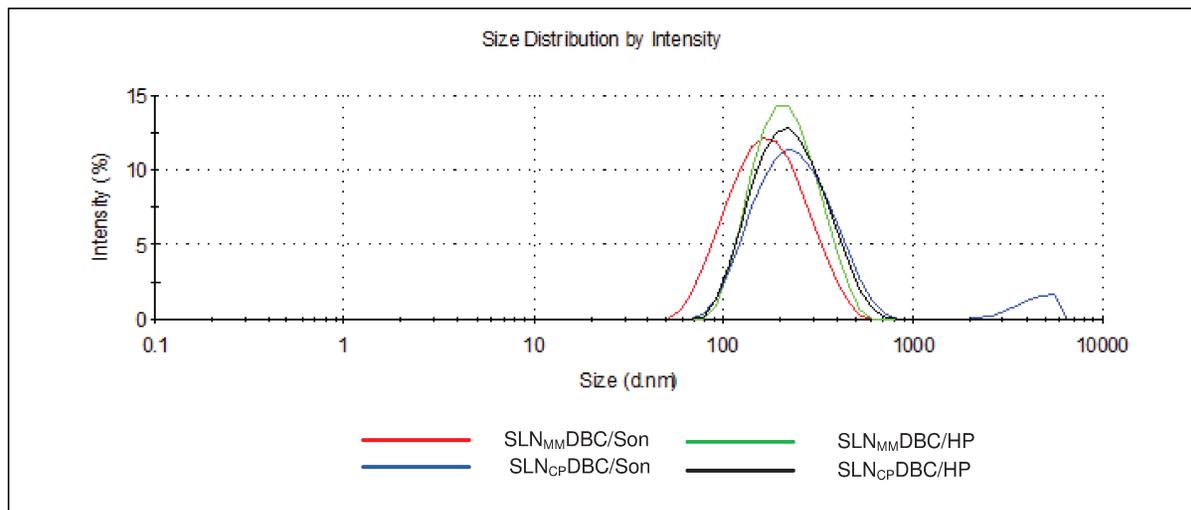
zur Mühlen, A., Schwarz, C., Mehnert, W., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, 45: 149-155.

## ANEXOS

### Anexo I: Distribuição de tamanho e potencial zeta das nanopartículas obtidos por PCS

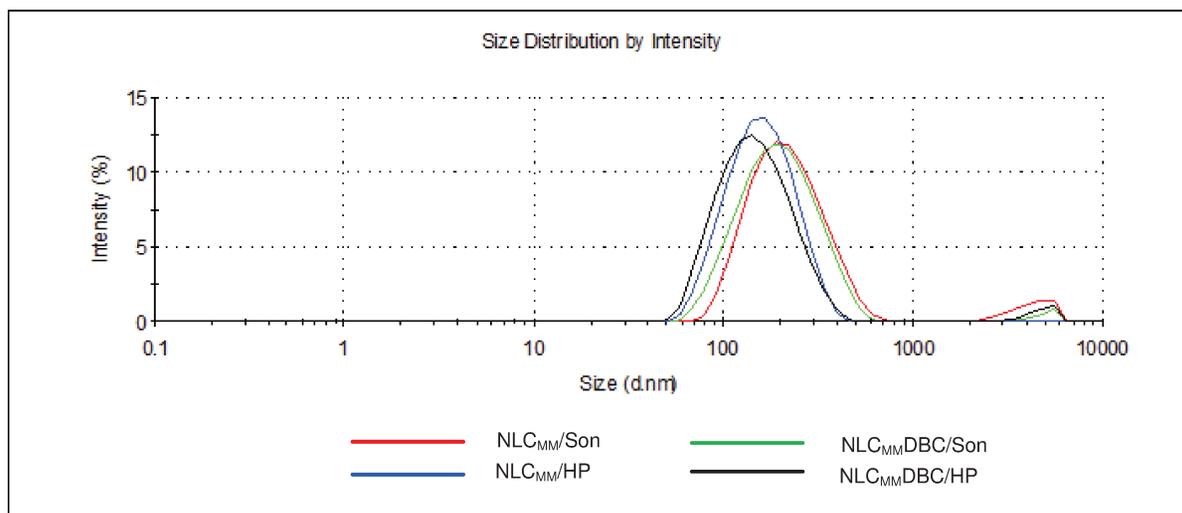


(A)



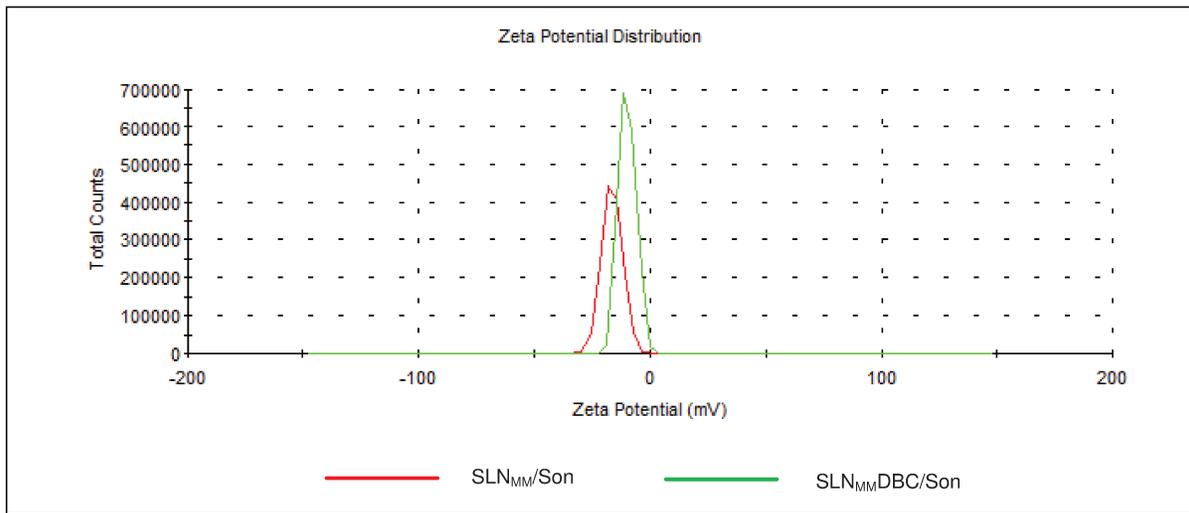
(B)

Figura 53. Gráfico de distribuição das nanopartículas lipídicas sólidas com e sem dibucaína preparadas por sonicação e homogeneização alta pressão dada por intensidade em função do diâmetro. (A). SLN<sub>MM</sub> e SLN<sub>CP</sub> preparadas por Son e HP e (B). SLN<sub>MM</sub>DBC e SLN<sub>CP</sub>DBC preparadas por Son e HP.

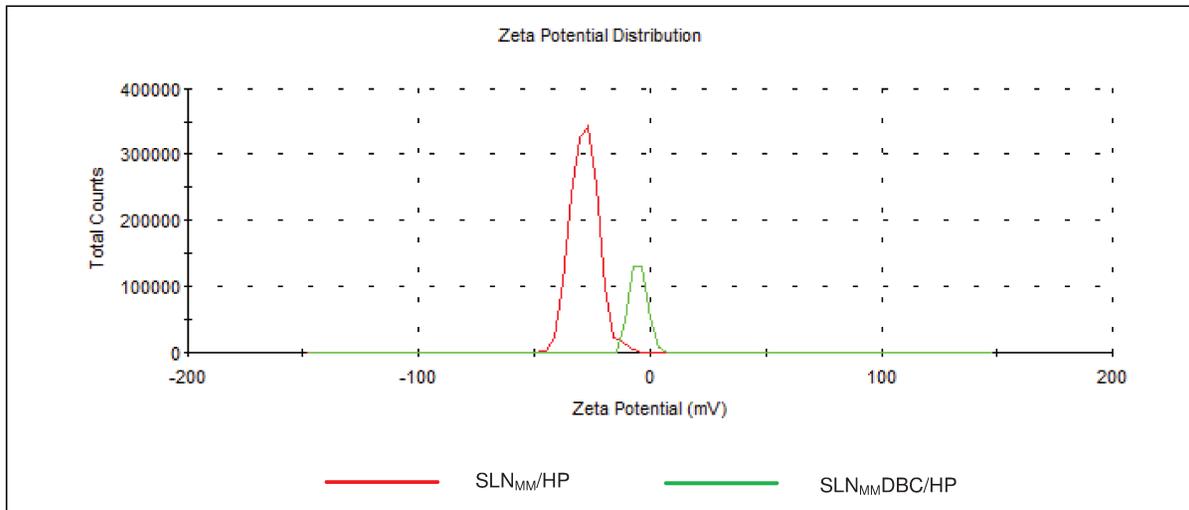


(A)

Figura 54. Gráfico de distribuição dos carreadores lipídicos nanoestruturados com e sem dibucaína preparadas por sonicação e homogeização alta pressão dada por intensidade em função do diâmetro. (A). SLN<sub>MM</sub> com e sem DBC preparadas por Son e HP.

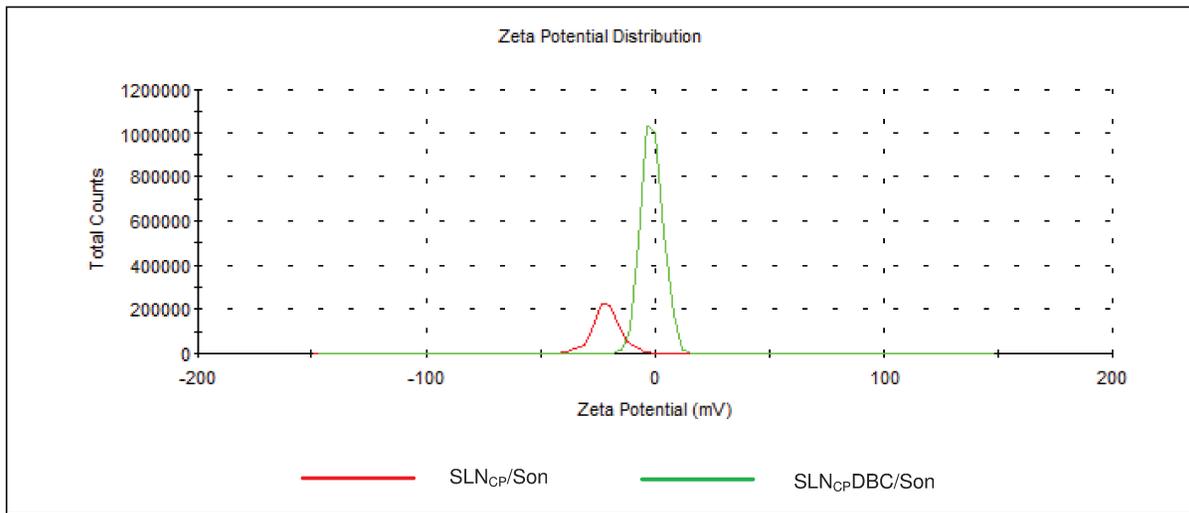


(A)

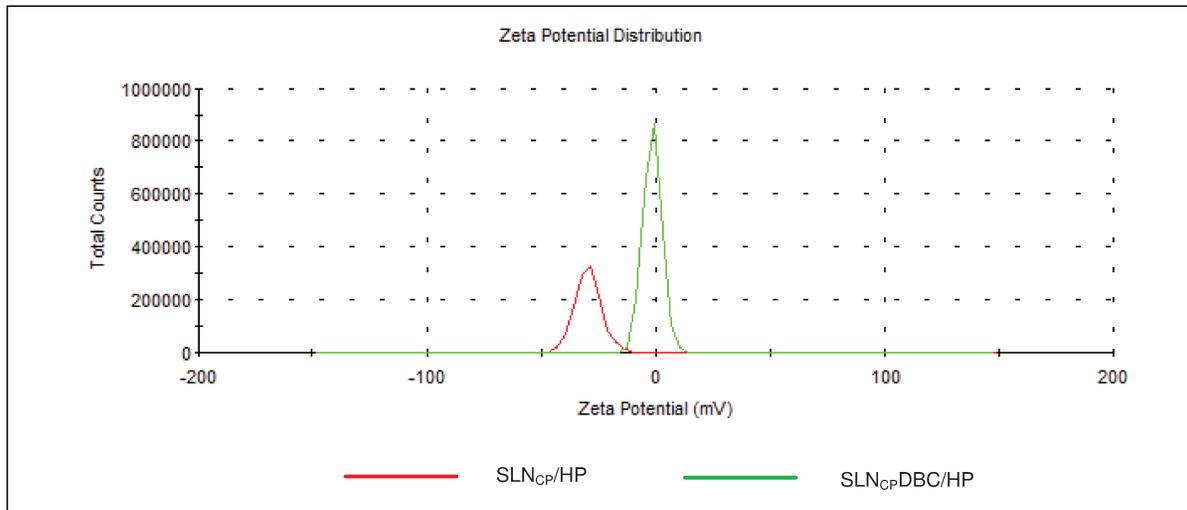


(B)

Figura 55. Gráfico de potencial zeta das Nanopartículas lipídicas (SLN) de MM com e sem dibucaína preparadas por sonicação (A) e homogeneização alta pressão (B) dada por intensidade em função do diâmetro.

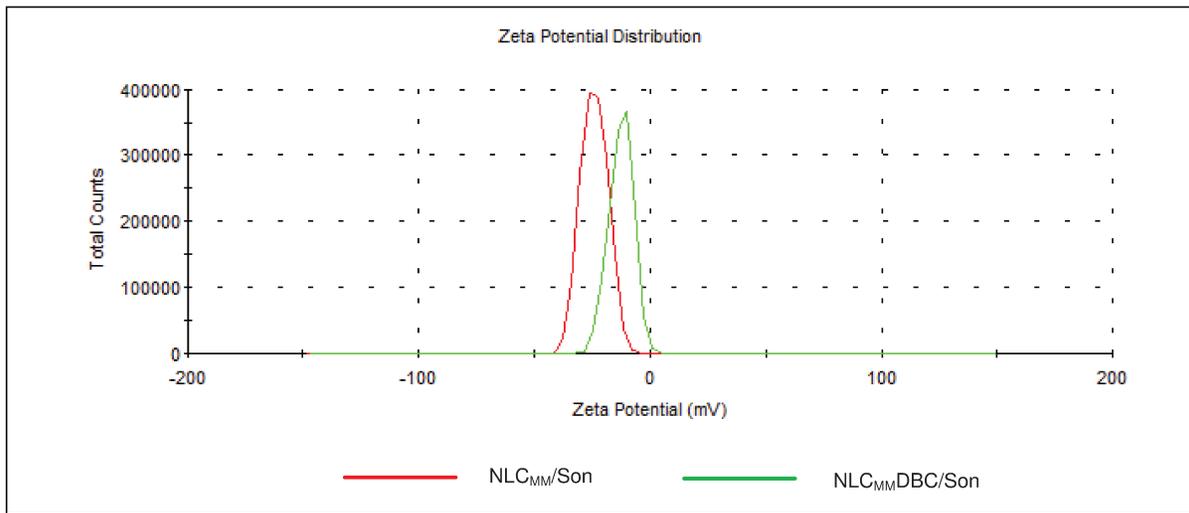


(A)

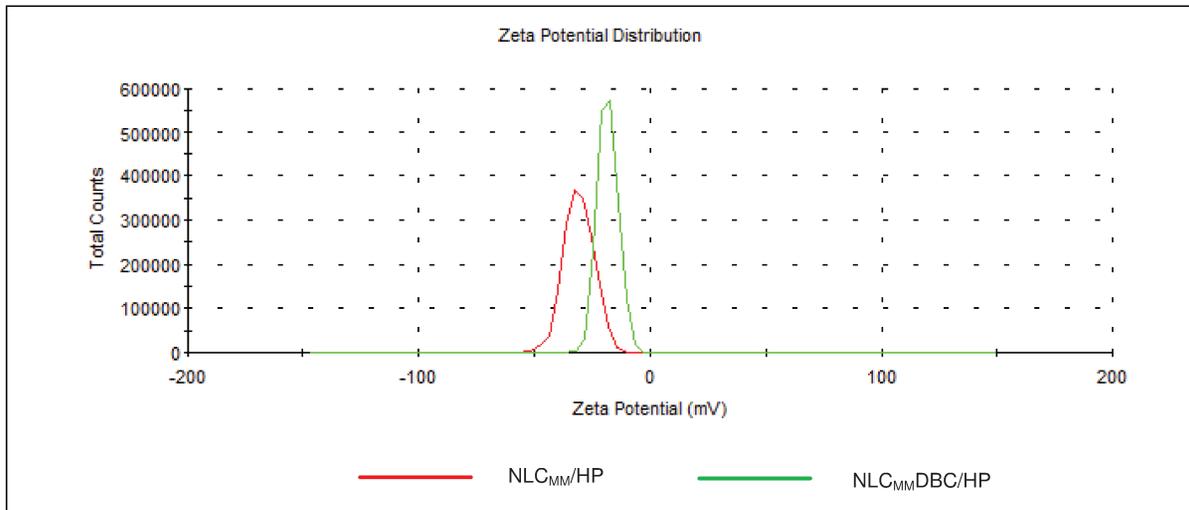


(B)

Figura 56. Gráfico de potencial zeta das Nanopartículas lipídicas de CP com e sem dibucaína preparadas por sonicação (A) e homogeneização alta pressão (B) dada por intensidade em função do diâmetro.



(A)

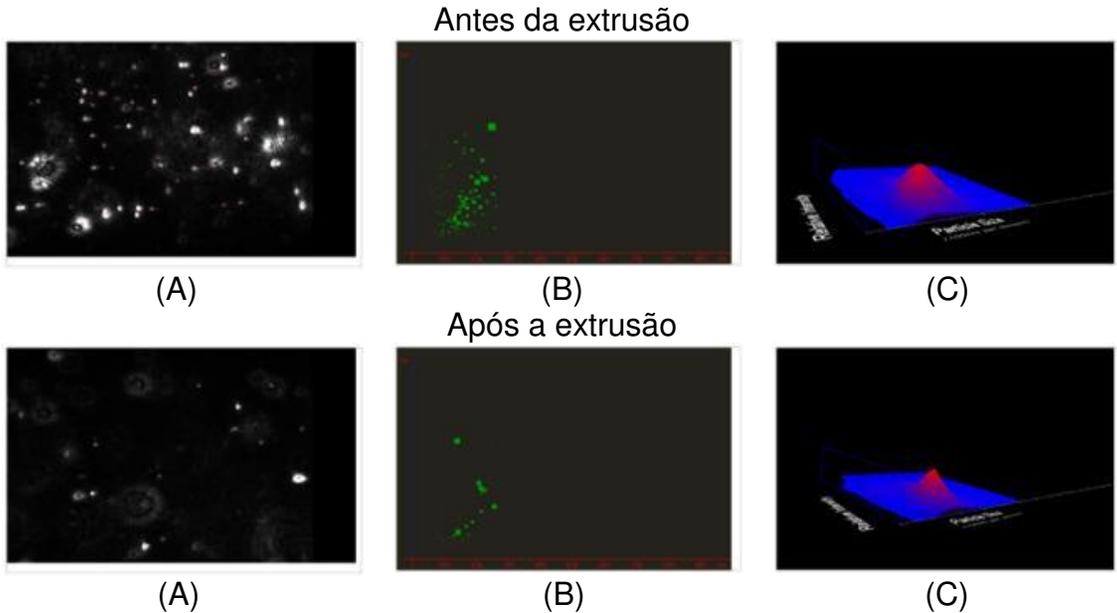


(B)

Figura 57. Gráfico de potencial zeta dos carreadores lipídicos nanoestruturados com e sem dibucaína preparadas por sonicação (A) e homogeneização alta pressão (B) dada por intensidade em função do diâmetro.

**Anexo II: Tamanho e distribuição das nanopartículas realizadas por NTA antes e após extrusão em membranas sintéticas**

SLN<sub>MM</sub>/HP



SLN<sub>MM</sub>DBC/HP

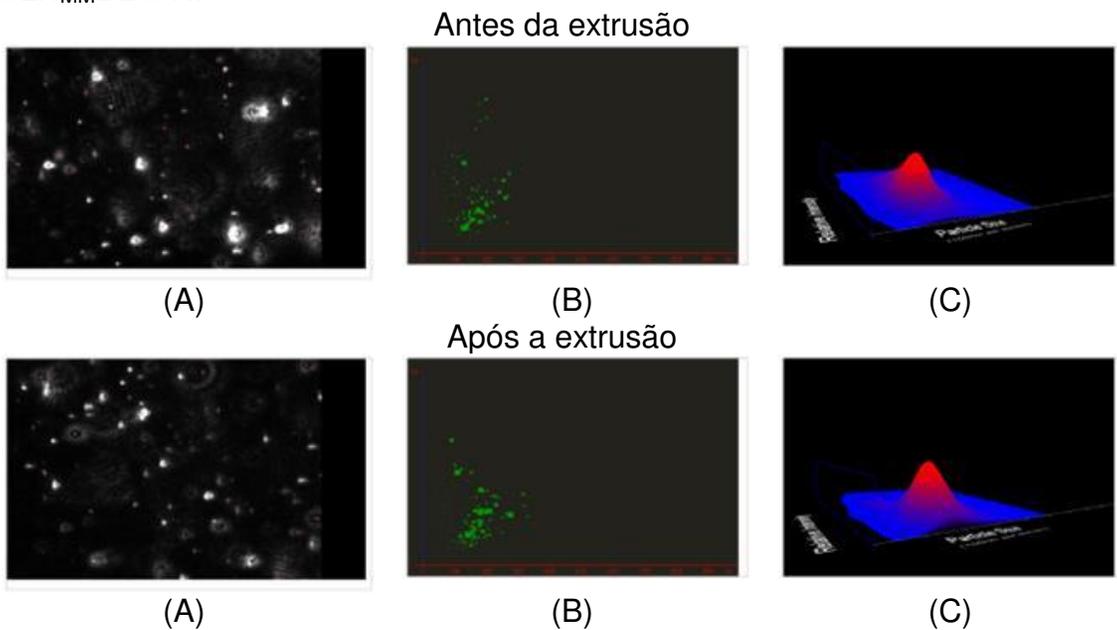
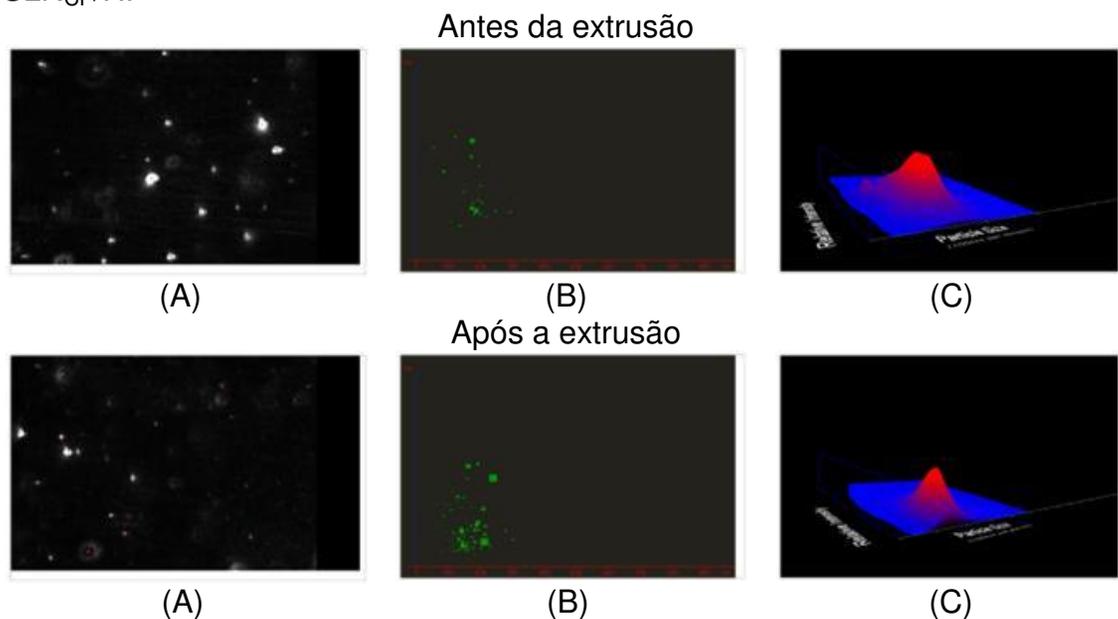


Figura 58. Distribuição de tamanhos das SLN<sub>MM</sub>/HP e SLN<sub>MM</sub>DBC/HP obtidas por NTA, antes e após a extrusão ( $2,5 \times 10^5$  Pa) através de membranas de policarbonato de 30 nm (A) Vídeo da análise de dados, (B) Gráfico 2D (intensidade vs. intensidade) (C) Gráfico em 3D (tamanho vs. intensidade vs. concentração de partículas).

SLN<sub>CP</sub>/HP



SLN<sub>CP</sub>DBC/HP

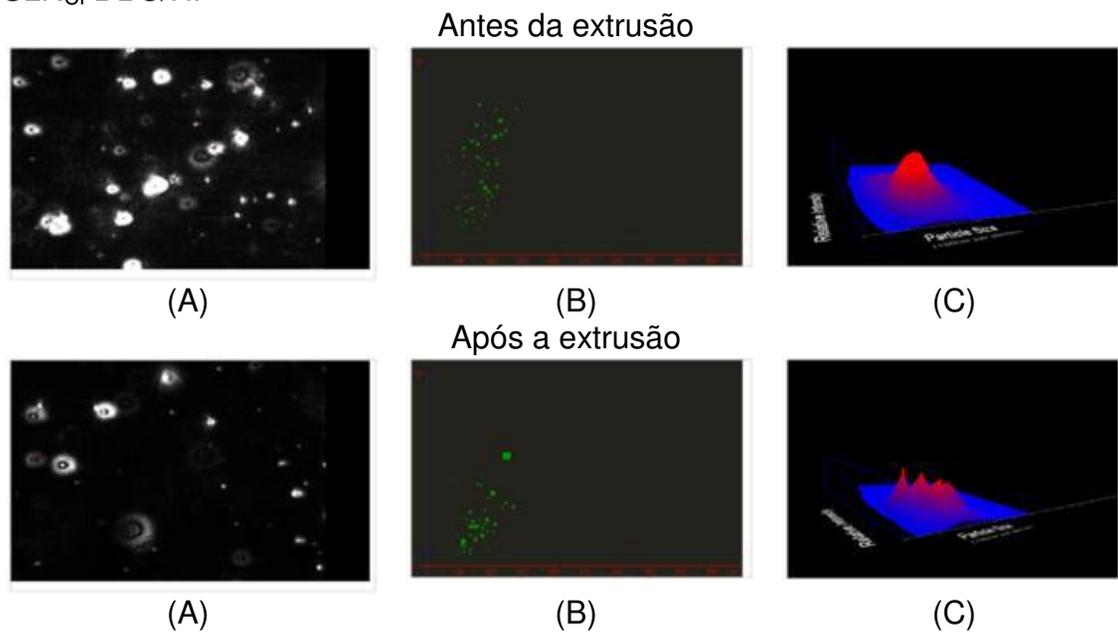


Figura 59. Distribuição de tamanhos das nanopartículas (SLN<sub>CP</sub>/HP e SLN<sub>CP</sub>DBC/HP) obtidas por NTA, antes e após a extrusão ( $2,5 \times 10^5$  Pa) através de membranas de policarbonato de 30 nm (A) Vídeo obtido para análise de dados, (B) Gráfico 2D (intensidade vs. intensidade) (C) Gráfico em 3D (tamanho vs. intensidade vs. concentração de partículas).

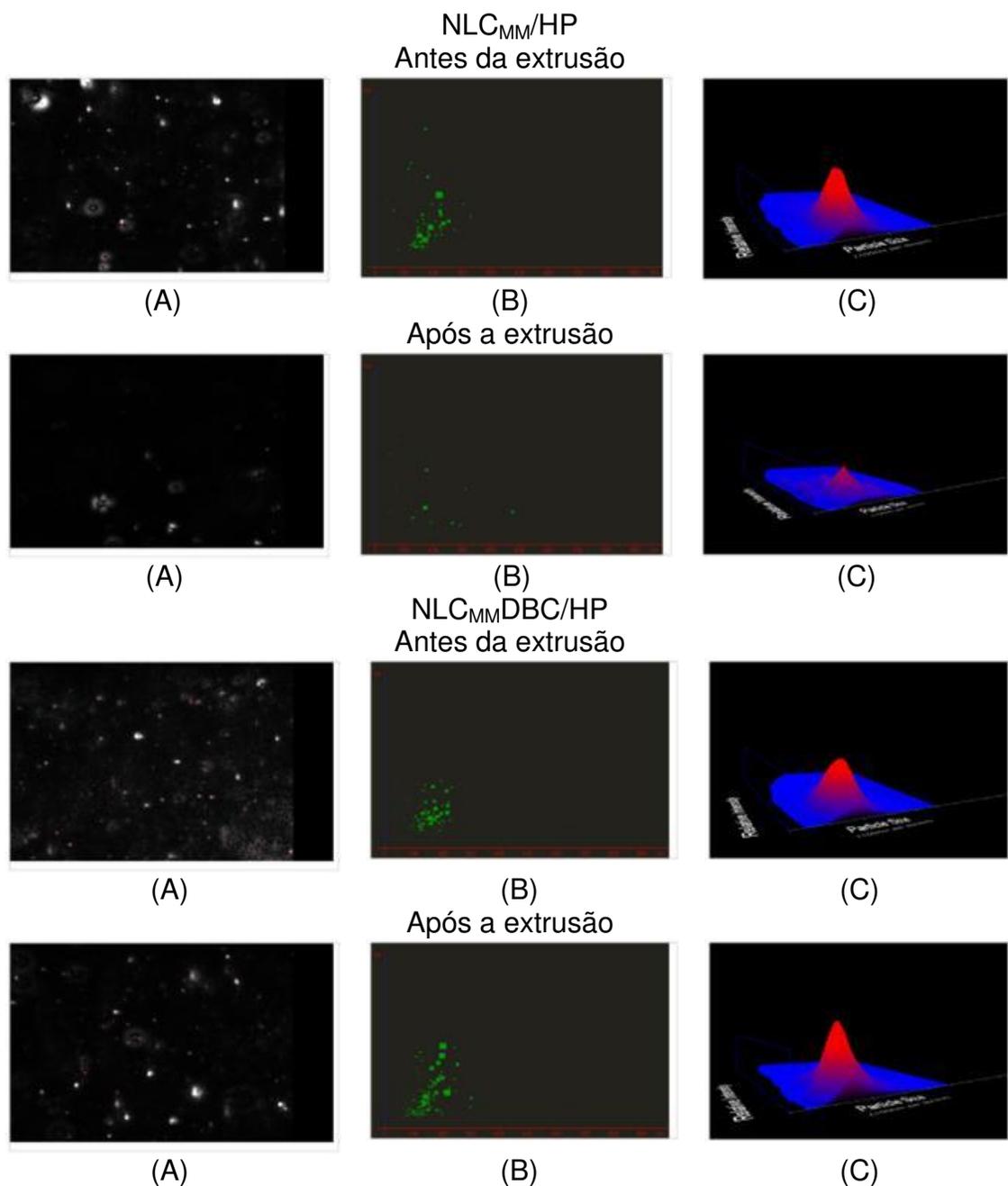


Figura 60. Distribuição de tamanhos das nanopartículas (NLC<sub>MM</sub>/HP e NLC<sub>MM</sub>DBC/HP) obtidas por NTA, antes e após a extrusão ( $2,5 \times 10^5$  Pa) através de membranas de policarbonato de 30 nm (A) Vídeo obtido para análise de dados, (B) Gráfico 2D (intensidade vs. intensidade) (C) Gráfico em 3D (tamanho vs. intensidade vs. concentração de partículas).

### Anexo III: Curva analítica da formação de endoperóxidos

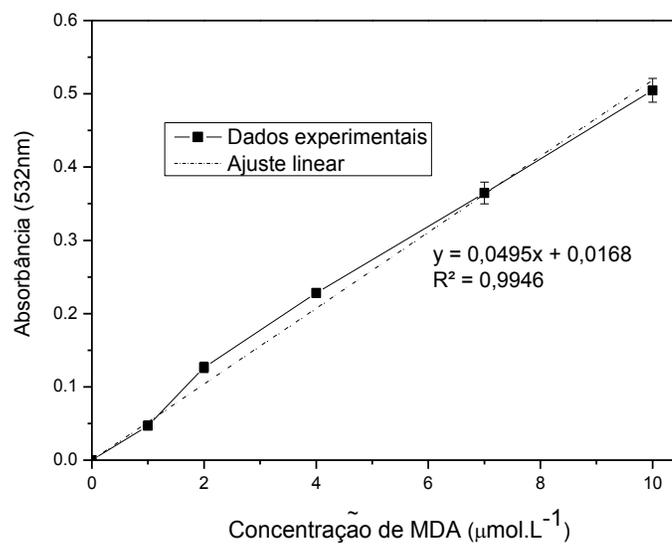


Figura 61. Curva analítica da formação de endoperóxidos (MDA) (coeficiente angular = 0,0495, coeficiente linear = 0,0168 e coeficiente de correlação da reta = 0,995).

## Anexo IV: Termogramas

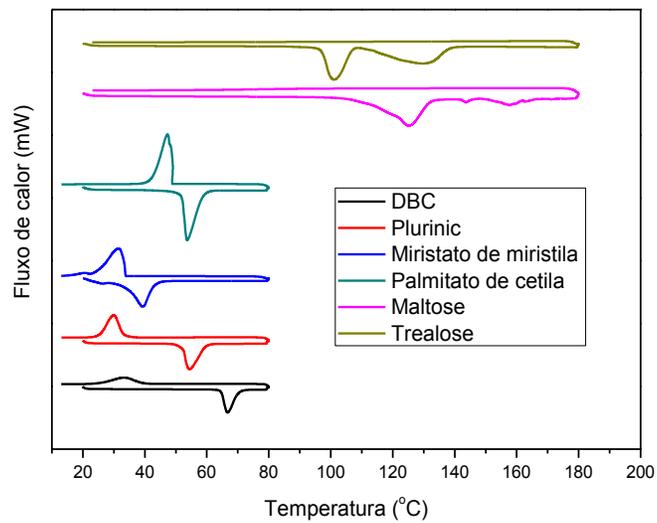


Figura 62. Termogramas dos componentes das SLN e NLC.

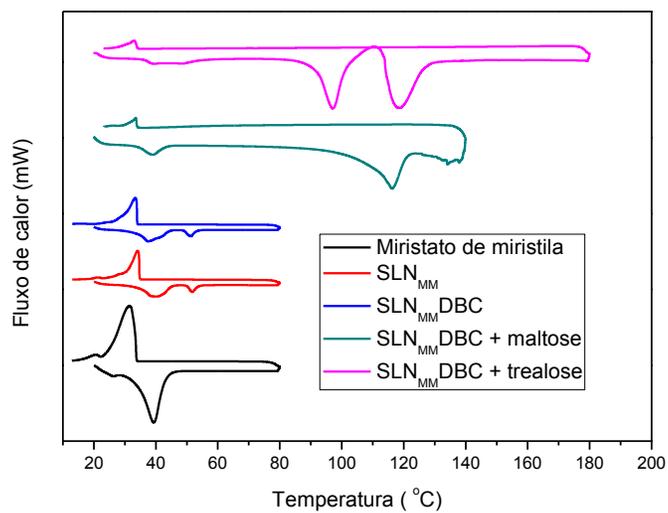


Figura 63. Termogramas das SLN<sub>MM</sub> com e sem DBC e com e sem crioprotetor (maltose ou trealose).

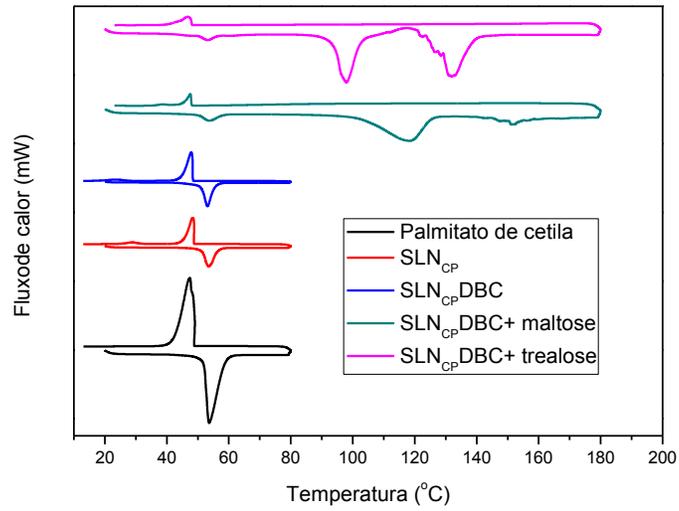


Figura 64. Termogramas das  $SLN_{CP}$  com e sem DBC e com e sem crioprotetor (maltose ou trealose).

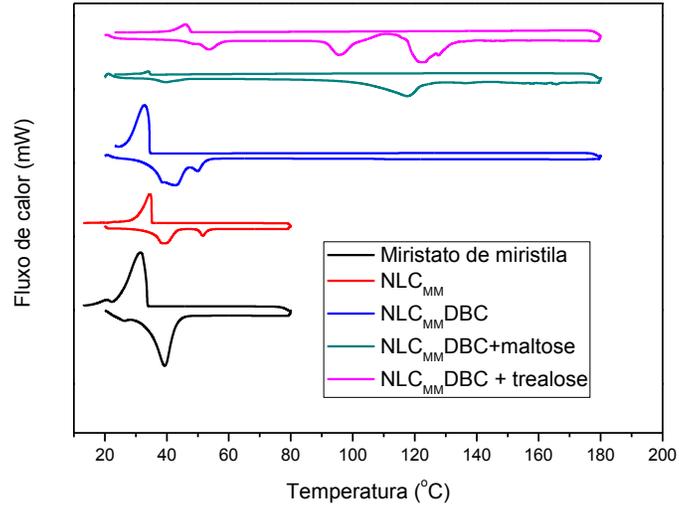


Figura 65. Termogramas das  $NLC_{MM}$  com e sem DBC e com e sem crioprotetor (maltose ou trealose).

**Anexo V: Certificado da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/Unicamp**



CEUA/Unicamp

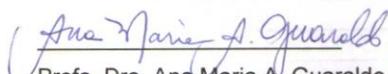
**Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp**

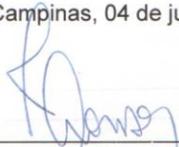
**CERTIFICADO,**

Certificamos que o projeto "**Nanopartículas lipídicas sólidas destinadas a liberação prolongada de anestésicos locais na pele**" (protocolo nº **2464-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Eneida de Paula / Viviane Aparecida Queiroz**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **04 de julho de 2011**.

Campinas, 04 de julho de 2011.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/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/>

## **Anexo VI: Outras atividades e produção científica no período do doutorado**

### **I. Capítulos de livro**

1. Barbosa, R. M., Severino, P., Transporte transdérmico de moléculas bioativas (aceito para publicação). In: Souto, EB; Figueiro, J. (Org.). **Vetores lipídicos para uso tópico, dérmico e transdérmico: da produção às aplicações em dermofarmácia e cosmética**. 1ed. Porto, Portugal: Universidade Fernando Pessoa, 2012.
2. Severino, P., Basso, R., Barbosa, R. M., **Vetores lipídicos empregues no tratamento e prevenção das rugas** (aceito para publicação). In: Souto, E.B.; Figueiro, J. (Org.). Vetores lipídicos para uso tópico, dérmico e transdérmico: Da produção às aplicações em dermofarmácia e cosmética. 1ed. Porto - Portugal: Universidade Fernando Pessoa, 2012.

### **II. Publicação de artigos em Periódicos**

1. Barbosa, R. M., Klassen, A., Marcato, P. D., Franz-Montan, M., Grillo, R., Fraceto, L. F., de Paula, E., **Validation of an HPLC method for the determination of Dibucaine encapsulated in Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers**. Latin American Journal of Pharmacy, v.32 (9), p. 1362-1369, 2013.
2. de Araújo, D. R., da Silva, D. C., Barbosa, R. M., Franz-Montan, M., Cereda, C. M., Padula, C., Santi, P., de Paula, E., **Strategies for delivering local anesthetics to the skin: focus on liposomes, solid lipid nanoparticles, hydrogels and patches**. Expert Opinion on Drug Delivery, v.10 (11), p. 1-13, 2013.

3. Marcato, P. D., Adami, L. F., Barbosa, R. M., Melo, P. S., Ferreira, I. R., Durán, N., Seabra, A. B., ***Development of a sustained-release system for nitric oxide delivery using alginate/chitosan nanoparticles.*** Current Nanoscience, v. 9, p. 1-7, 2013.
4. Barbosa, R. M.; Luna-Finkler, C. L.; Bentley, M. V. L. B.; Santana, M. H. A., ***Physicochemical characterization of surfactant incorporating vesicles which incorporate colloidal magnetite.*** Journal of Liposome Research, v. 23, p. 47-53, 2013.
5. Barbosa, R. M., Silva, C. M. G.; Bella, T. S., de Araújo, D. R., Marcato, P. D.; Durán, N., de Paula, E., ***Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles & nanostructured lipid carriers containing the local anesthetic dibucaine designed for topical application.*** Journal of Physics: Conference Series, v. 429, p. 012035, 2013.
6. Huber, S. C., Marcato, P. D., Barbosa, R. M., Duran, N., Annichino-Bizzacchi, J M., ***In vivo toxicity of enoxaparin encapsulated in mucoadhesive nanoparticles: topical application in a wound healing model.*** Journal of Physics: Conference Series v. 429, p. 012031, 2013.

### III. Publicação de artigos em Periódicos com ISSN (submetidas)

1. Barbosa, R. M., Luna-Finkler, C. L., Severino, P., Santana, M. H. A., ***Comparison of the physicochemical characteristics of conventional and elastic liposomes used for transdermal drug delivery.*** African Journal of Pharmacy and Pharmacology, novembro, 2013.

### IV. Resumos publicados em anais de congressos Internacionais

1. Barbosa, R. M., Casadei, B. R., da Silva, C. M. G., Itri, R., Barbosa, L., de Paula, E., ***Spin label & SAXS study of cetylpalmitate solid lipid nanoparticle loaded with dibucaine.*** 57th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, v. 104, p. 344a, 2013.

2. Casadei, B. R., Barbosa, R. M., Marcato, P. D., Duran, N., de Paula, E., ***Structural effects of dibucaine encapsulation into solid lipid nanoparticle & nanostructured lipid carriers***. 57th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, v. 104, p. 344a, 2013.
3. Berni, E., Nakasato, G., Barbosa, R. M., Dúran, N., ***Violacein Release using charge surface modification of Poly-epsilon-prolactone Nanoparticle Against Bovine Mastitis***. In: Colloids & Nanomedicine, 2012, Amsterdam. Colloids & Nanomedicine, 2012.
4. Barbosa, R. M., da Silva, C. M. G., Bella, T. S., de Araújo, D. R., Marcato, P. D., Durán, N., de Paula, E., ***Cytotoxicity of solid lipid nanoparticle & nanostructured lipid carriers***. In: International Conference on Safe production & use of nanomaterials, Grenoble. Book of Abstract, Nanosafe 2012.
5. Barbosa, R. M., Queiroz, V., Marcato, P. D., Duran, N., Araújo, D., de Paula, E., ***Evaluation of dibucaine -loaded cetyl palmitate lipid nanosystems for prolonged drug delivery***. In: 8th International congress of pharmaceutical sciences, 2011, Ribeirão Preto. 8th International congress of pharmaceutical sciences, 2011.
6. Bella, T., Barbosa, R. M., Marcato, P. D., de Paula, E., ***Preparation & characterization of lipid carriers nanostructured, containing dibucaine***. In: 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011, João Pessoa. 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011.
7. Barbosa, R. M., Marcato, P. D., Duran, N., de Araújo, D. R., de Paula, E., ***Development & characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) to improve local anesthetic activity***. In: 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011, João Pessoa. 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011.

8. Barbosa, R. M., Marcato, P. D., Franz-Montan, M., Bella, T., de Paula, E., ***Validation of HPLC for the quantification of dibucaine in solution & encapsulated in solid lipid nanoparticles or nanostructured lipid carriers.*** In: II International Symposium of Pharmaceutical Science, 2011, Natal. II International Symposium of Pharmaceutical Science, 2011.

#### V. Resumos publicados em anais de congressos Regionais

1. Barbosa, R. M., Marcato, P. D., Duran, N., de Araújo, D. R., de Paula, E., ***Solid Lipid Nanoparticles to Improve Topic Local Anesthetic Activity.*** In: I Workshop da Biologia Funcional e Molecular, 2011, Campinas. I Workshop da Biologia Funcional e Molecular, 2011.

2. Barbosa, R. M., Bella, T., Marcato, P. D., de Araújo, D. R., de Paula, E., ***Nanopartículas Lipídicas sólidas destinadas a liberação prolongada de anestésicos locais na pele.*** In: III Workshop Temático: Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de ação prolongada: do desenvolvimento ao teste clínico odontológico, 2011, Campinas.

3. Barbosa, R. M., de Araújo, D. R., de Paula, E., ***Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) como carreadoras de anestésicos locais destinados a aplicação tópica.*** Em: II Workshop Temático – Novas Formulações Farmacêuticas de anestésicos locais de ação prolongada: do desenvolvimento ao teste clínico odontológico. 2010, Campinas.

4. Santos, R. M. G., da Silva, D. C., Franz-Montan, M., de melo, N. F. S., Barbosa, R. M., Cereda, C. M. S., Fraceto, L. F., de Paula, E., ***Estudo de permeação de fármacos através pele: métodos, modelos e avaliação de resultados.*** In: III Workshop Temático: Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de ação prolongada: do desenvolvimento ao teste clínico odontológico, 2011, Campinas.

## VI. Prêmios de mérito acadêmico

- **Abstract selected as a recipient of a 2013 International Travel Award in the Biophysical Society 57th Annual Meeting**, February 2 – 6, Philadelphia, Pennsylvania, *EUA* (\$1025.00 + Student Housing during congress).

## VII. Co-orientação concluída de trabalho de Iniciação científica

- Taciani dos Santos Bella (bolsista FAPESP Proc. 10/18755), projeto: “Preparação e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo dibucaína” no período de 07/2010 a 01/2012.

## VIII. Aprovação em concurso público em Instituição de ensino superior

- Cargo de professor substituto na área de **Tecnologia Farmacêutica**, departamento de Farmácia na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Dezembro de 2012.
- Cargo de professor substituto na área de **controle de qualidade de medicamentos**, departamento de Farmácia na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Disciplinas ministradas: métodos instrumentais de análise de medicamentos, controle físico-químico de medicamentos, controle biológico de medicamentos, estágio I farmacêutico, 2013.