

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Carolina Morales Moraes

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO ANESTÉSICOS LOCAIS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Carolina Morales Moraes
Leonardo Fernandes Fraceto
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Co-orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M791p

Moraes, Carolina Moraes

Preparo, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas contendo anestésicos locais / Carolina Moraes Moraes. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Leonardo Fernandes Fraceto, Eneida de Paula.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Nanopartículas. 2. Nanocápsulas. 3. Anestesia local. 4. Benzocaína. 5. Bupivacaína. I. Fraceto, Leonardo Fernandes. II. Paula, Eneida de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Preparation, physicochemical characterization and stability evaluation of polymeric nanoparticles containing local anesthetics.

Palavras-chave em inglês: Nanoparticles; Nanocapsules; Anesthesia, Local; Benzocaine; Bupivacaine.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Leonardo Fernandes Fraceto, Francisco Benedito Pessine, Nelson Eduardo Duran Caballero.

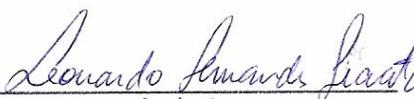
Data da defesa: 20/03/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

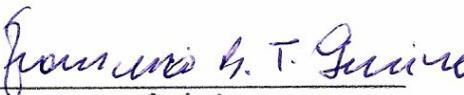
Campinas, 20 de Março de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Francisco Benedito Pessine


Assinatura

Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero

Assinatura

Profa. Dra. Patricia da Silva Melo


Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo

Assinatura

Aos meus pais Sergio e Geni

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de
terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção, um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto e Profa. Dra. Eneida de Paula pela orientação, profissionalismo, oportunidade e por me proporcionar crescimento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres por me receber em seu laboratório e possibilitar aprendizado importante para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero por disponibilizar a infra-estrutura laboratorial (evaporador rotativo, CLAE, zetasizer) indispensável para realização deste trabalho. Em especial às suas alunas Priscyla e Zaine pela colaboração direta com sugestões importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Cláudio Francisco Tormena e Dr. Roberto Rittiner Neto por disponibilizar o CLAE e a seu aluno Francisco pelo auxílio.

Ao Prof. Dr. Fernando Galembeck por disponibilizar o analisador de diâmetro de partículas e potencial zeta durante os estudos preliminares deste trabalho.

Ao Prof. Dr. David Mendes Soares e seus alunos Andreza e Wyllerson pelas análises de Microscopia de Força Atômica.

Ao pessoal do departamento de P&D da EMS (DMA, Validação, FDA, etc), em especial aos amigos do Laboratório Analítico Internacional, (Rodrigo, Regina, Van, Thais, Paty P, Paty B, Gi, Dani, Celso, Reinaldo e Fábio) pela oportunidade de trabalhar ao lado de pessoas que me proporcionaram crescimento profissional, além de agradáveis momentos de descontração.

Ao pessoal do Laboratório de Biomembranas (Bispo, Beth, Roberta, Angélica, Giovana, Cíntia, Cleyton, Daniele, Maribel, Márcio, Dona Cida) pela convivência e todos momentos vividos ao longo desses anos.

Aos amigos Bispo e Roberta pela amizade, conversas, conselhos, almoços, risadas, apoio, ajuda, aprendizado e consideração.

Às amigas Mariana, Keli e Karen pelo apoio, incentivo e amizade que o tempo e a distância não são capazes de atrapalhar.

À minha família, irmão Rodolfo e em especial aos meus pais, Sérgio e Geni pela formação, educação, paciência e amor incondicional, sobretudo por respeitarem as minhas escolhas, estando sempre ao meu lado, incentivando, apoiando, confiando e me ajudando a ter forças para superar as dificuldades.

Ao meu amor Vinícius, pelo companheirismo, paciência, incentivo, confiança, amor e pela ajuda nas análises estatísticas deste trabalho.

A todos meus familiares (tias, tios, primos, primas e vó) pelo carinho, incentivo e momentos de descontração durante os encontros semanais de família.

À Fapesp e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Nanopartículas poliméricas	4
1.1.1. <i>Matérias-primas utilizadas na preparação de nanopartículas poliméricas</i>	6
1.1.2. <i>Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas</i>	11
1.2. Anestésicos locais	13
1.2.1. <i>Bupivacaína</i>	15
1.2.2. <i>Benzocaína</i>	17
1.2.3. <i>Anestésicos locais e sistemas carreadores</i>	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Gerais	21
2.2. Específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Materiais	22
3.2. Metodologia	24
3.2.1. <i>Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação do teor de Benzocaína e de Bupivacaína em nanocápsulas poliméricas</i>	24
3.2.2. <i>Preparo das nanocápsulas poliméricas</i>	31
3.2.3. <i>Otimização do preparo das suspensões de nanocápsulas poliméricas: planejamento fatorial 2^{4-1}</i>	31
3.2.4. <i>Polidispersão e diâmetro</i>	34
3.2.5. <i>Potencial zeta</i>	35
3.2.6. <i>pH</i>	36

3.2.7.	<i>Eficiência de associação de Benzocaína e de Bupivacaína em nanocápsulas poliméricas</i>	37
3.2.8.	<i>Estabilidade</i>	37
3.2.9.	<i>Ensaio de liberação in vitro de Benzocaína e Bupivacaína em nanopartículas poliméricas</i>	38
3.2.10.	<i>Análise estatística</i>	38
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.2.	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do teor de Benzocaína em nanocápsulas poliméricas	39
4.3.	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do teor de Bupivacaína em nanocápsulas poliméricas	49
4.4.	Otimização das condições de preparo das suspensões de nanocápsulas poliméricas: planejamento fatorial 2^{4-1}	59
4.4.1.	<i>Efeito dos fatores sobre o diâmetro, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação de Benzocaína em nanocápsulas poliméricas</i>	63
4.5.	Estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas	82
4.6.	Ensaio de liberação in vitro de Benzocaína e de Bupivacaína em nanocápsulas poliméricas	98
5.	CONCLUSÕES	104
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes tipos de nanocarreadores. (a) nanotubos de carbono, (b) lipossomas de fosfolipídios, (c) nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) de lipídios sólidos, (d) nanoesferas, (e) nanocápsulas, (f) micelas poliméricas, (g) dendrímero formado pela polimerização de várias unidades monoméricas, (h) nanopartícula funcionalizada (RAWAT <i>et al.</i> , 2006).	3
Figura 2: Representação esquemática do corte transversal de nanocápsulas. a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso e b) fármaco adsorvido à parede polimérica.	4
Figura 3: Representação esquemática do corte transversal de nanoesferas. a) fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica. b) fármaco retido na matriz polimérica.	5
Figura 4: a) Estrutura química do poli (ácido glicólico) e b) poli (ácido láctico).	8
Figura 5: Estrutura química do poli (ácido láctico-co-glicólico).	8
Figura 6: Estrutura química do poli(caprolactona).	9
Figura 7: Estrutura química da bupivacaína.	16
Figura 8: Estrutura química da benzocaína.	18
Figura 9: Cromatograma da BZC na concentração de 40µg/mL, obtido sob condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.2.	39
Figura 10: Curva analítica 1 da BZC (n=3) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.	40

Figura 11: Curva analítica 2 da BZC (n=3) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.	41
Figura 12: Curva analítica interdias da BZC (n=6) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica interdias.	41
Figura 13: Histograma de capacidade aplicado aos resultados de exatidão do método de teor de BZC.	48
Figura 14: Cromatograma da BVC na concentração de 200 µg/mL, obtido sob condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.2.	50
Figura 15: Curva analítica 1 da BVC (n=3) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.	51
Figura 16: Curva analítica 2 da BVC (n=3) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.	51
Figura 17: Curva analítica da BVC (n=6) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.	52
Figura 18: Histograma de capacidade aplicado aos resultados de exatidão do método de teor de BVC.	58
Figura 19: Efeito dos fatores sobre o diâmetro das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	63
Figura 20: Efeito dos fatores sobre o diâmetro das NC de PCL contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	65
Figura 21: Efeito dos fatores sobre a polidispersão das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	69
Figura 22: Efeito dos fatores sobre a polidispersão das NC de PCL contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	70

Figura 23: Efeito dos fatores sobre o potencial zeta das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	72
Figura 24: Efeito dos fatores sobre o potencial zeta das NC de PCL contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	73
Figura 25: Efeito dos fatores sobre a eficiência de associação das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	75
Figura 26: Efeito dos fatores sobre a eficiência de associação das NC de PCL contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.	77
Figura 27: Distribuição de diâmetro de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 3 de PLGA com BZC nos tempos zero, 15, 60 e 120 dias.	83
Figura 28: Distribuição de diâmetro de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 8 de PLGA com BZC nos tempos zero, 15, 60 e 120 dias.	83
Figura 29: Distribuição de diâmetro de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 3 de PCL com BZC nos tempos zero, 15, 60 e 120 dias.	84
Figura 30: Distribuição de diâmetro de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 8 de PCL com BZC nos tempos zero, 15, 60 e 120 dias.	84
Figura 31: Distribuição de diâmetro de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 8 de PLGA com BVC nos tempos zero, 15, 60 e 120 dias.	85
Figura 32: Diâmetro (nm) de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.	86

Figura 33: Diâmetro (nm) de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PCL com BZC.	87
Figura 34: Diâmetro (nm) de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para suspensão de NC de PLGA com BVC.	88
Figura 35: Polidispersão de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.	89
Figura 36: Polidispersão de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PCL com BZC.	89
Figura 37: Polidispersão de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para suspensão de NC de PLGA com BVC.	90
Figura 38: Potencial zeta de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.	91
Figura 39: Potencial zeta de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PCL com BZC.	92
Figura 40: Potencial zeta de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para suspensões de NC de PLGA com BVC.	92
Figura 41: Taxa de associação (%) do fármaco nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.	94
Figura 42: Taxa de associação (%) do fármaco nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PCL com BZC.	94
Figura 43: Taxa de associação (%) do fármaco nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para suspensão de NC de PLGA com BVC.	95

Figura 44: Valores de pH nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.	96
Figura 45: Valores de pH nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PCL com BZC.	97
Figura 46: Perfil de liberação da BZC livre e a partir de NC de PLGA em função do tempo.	99
Figura 47: Perfil de liberação da BZC livre e a partir de NC de PCL em função do tempo.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições do método analítico de determinação de teor de BZC em NC poliméricas	26
Tabela 2: Condições do método analítico de determinação de teor de BVC em NC poliméricas	26
Tabela 3: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} aplicado ao preparo de NC poliméricas	33
Tabela 4: Fatores variados em 2 níveis no planejamento fatorial descrito na Tabela 3	33
Tabela 5: ANOVA para os resultados da curva analítica 1 de BZC apresentada na figura 10	43
Tabela 6: ANOVA para os resultados da curva analítica 2 de BZC apresentada na figura 11	43
Tabela 7: ANOVA para os resultados da curva analítica inter-dias de BZC apresentada na figura 12	44
Tabela 8: Resultados de precisão do método intra-dia 1 para o método de teor de BZC	45
Tabela 9: Resultados de precisão do método intra-dia 2 para o método de teor de BZC	45
Tabela 10: Resultados de precisão intermediária para o método de teor de BZC	46
Tabela 11: Resultados de exatidão para o método de teor de BZC	47

Tabela 12: ANOVA para os resultados da curva analítica 1 de BVC apresentada na figura 15	53
Tabela 13: ANOVA para os resultados da curva analítica 2 de BVC apresentada na figura 16	53
Tabela 14: ANOVA para os resultados da curva analítica inter-dias de BVC apresentada na figura 17	54
Tabela 15: Resultados de precisão do método intra-dia 1 para o método de teor de BVC	55
Tabela 16: Resultados de precisão do método intra-dia 2 para o método de teor de BVC	55
Tabela 17: Resultados de precisão intermediária para o método de teor de BVC	56
Tabela 18: Resultados de exatidão para o método de teor de BVC	57
Tabela 19: Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} e resultados de diâmetro, polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de associação, obtidos a partir do planejamento para suspensões de NC de PLGA com BZC	61
Tabela 20: Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} e resultados de diâmetro, polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de associação, obtidos a partir do planejamento para suspensões de NC de PCL com BZC	62
Tabela 21: Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para variação de diâmetro de NC de PLGA com BZC	64
Tabela 22: Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para variação de diâmetro de NC de PCL com BZC	65
Tabela 23: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a polidispersão e	69

valores de p (ANOVA) para variação de polidispersão em NC de PLGA com BZC

Tabela 24: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a polidispersão e valores de p (ANOVA) para variação de polidispersão em NC de PCL com BZC 71

Tabela 25: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre o potencial zeta e valores de p (ANOVA) para variação do potencial zeta em NC de PLGA com BZC 72

Tabela 26: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre o potencial zeta e valores de p (ANOVA) para variação do potencial zeta em NC de PCL com BZC 73

Tabela 27: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a eficiência de associação e valores de p (ANOVA) para variação taxa de associação em NC de PLGA com BZC 76

Tabela 28: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a eficiência de associação e valores de p (ANOVA) para variação taxa de associação em NC de PCL com BZC 77

Tabela 29: Concentrações médias de BZC obtidas a partir dos ensaios de liberação de BZC livre e BZC em NC de PLGA ($n=3$) 101

Tabela 30: Concentrações médias de BZC obtidas a partir dos ensaios de liberação de BZC livre e BZC em NC de PCL ($n=3$) 102

LISTA DE ABREVIACES

ACN: Acetonitrila

AL: Anestésico (s) local (s)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BVC: Bupivacaína

BZC: Benzocaína

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DP: Desvio padrão

DPR: Desvio padrão relativo

HLB: Balanço hidrofílico-lipofílico

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

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

NC: Nanocápsulas

NE: Nanoesferas

NP: Nanoprticulas poliméricas

PCL: Poli(ϵ -caprolactona)

PDLLA: Poli (cido DL-lático)

PEG: Polietilenoglicol

PGA: Poli (cido glicólico)

PHB: Poli(hidroxibutirato)

PHV: Poli(hidroxivalerato)

PLA: Poli (cido lático)

PLGA: Poli (cido lático-co-glicólico)

PLLA: Poli (cido L-lático)

PVA: lcool polivinílico

RESUMO

As principais características desejáveis para um anestésico local incluem longa duração de ação e baixa toxicidade sistêmica. Uma alternativa que tem se mostrado capaz de promover estes efeitos desejáveis é a liberação sustentada de fármacos através da veiculação destes em sistemas carreadores, como as nanopartículas. Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores que apresentam diâmetro inferior a 1 μ m e são classificadas como nanoesferas ou nanocápsulas. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso, enquanto as nanoesferas são formadas somente por uma matriz polimérica. Os estágios iniciais do desenvolvimento de novas formulações contendo nanocarreadores de fármacos envolvem a otimização das condições de preparo, caracterização físico-química, avaliação da estabilidade e determinação do perfil de liberação do fármaco carregado, sendo esta a proposta desse trabalho.

A otimização de formulações de nanocápsulas: a) de poli(ácido-lático-co-ácido-glicólico) contendo o anestésico local benzocaína; b) de poli (ácido lático-co-glicólico) contendo bupivacaína e de c) de poli(ϵ -caprolactona) contendo benzocaína, foi alcançada a partir de um planejamento fatorial, onde as propriedades avaliadas foram diâmetro das partículas, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação do fármaco nas nanocápsulas, em função de variações nas concentrações de polímero, óleo e tensoativos. Propriedades físico-químicas das suspensões de nanocápsulas (das partículas, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação do fármaco) poliméricas foram avaliadas em função do tempo, a fim de determinar a estabilidade das formulações. Nenhuma das formulações estudadas apresentou grandes alterações dessas propriedades em função do tempo, sendo consideradas estáveis por um período de até 120 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Foram obtidas nanocápsulas poliméricas de diâmetro, polidispersão, potencial zeta, eficiência de associação, perfil de liberação *in vitro* e estabilidade adequadas para a finalidade e via de administração infiltrativa. Os resultados apresentados são referentes a

estudos iniciais do desenvolvimento dessas novas formulações visando reduzir a toxicidade, aumentar a solubilidade de anestésicos locais e abrem perspectivas para estudos pré-clínicos e clínicos, uma vez que se mostraram promissores.

Palavras-chave: nanopartículas, nanocápsulas, poli (ácido lático-co-glicólico), poli(ϵ -caprolactona), anestésicos locais, benzocaína, bupivacaína.

ABSTRACT

The desirable characteristics of a local anesthetic include long duration of action and low systemic toxicity. An alternative to reach desirable effects is the sustained drug release through the use of carrier systems, such as nanoparticles. Polymeric nanoparticles are carrier systems of less than 1 μm diameter that are classified as nanospheres or nanocapsules. Nanocapsules are constituted by a polymeric involucre placed around the nucleus and are usually oily, while nanospheres are formed only by a polymeric matrix. The initial developmental stages of new formulations containing drugs nanocarriers involve optimization of the preparation conditions, physical-chemical characterization, stability evaluation and determination of the release profile of the drug carried, which are the proposal of this work.

The optimization of nanocapsules formulation: a) of poly (lactic-acid-co-glycolic- acid) containing the local anesthetic benzocaine; b) of poly (lactic-co-glycolic) containing bupivacaine and c) of poly(ϵ -caprolactone) containing benzocaine was reached using factorial design, the properties being particles size, polydispersion, zeta potential and drug association efficiency in the nanocapsules, in function of variations in the concentrations of the polymer, oil and tensoactives. Physical-chemical properties of polymeric nanocapsules suspensions (size, polydispersion, zeta potential and drug association efficiency) were evaluated in function of time in order to determine the formulations stability. None of the studied formulations presented huge alterations in these properties in function of time, being considered stable for up to 120 days of storage in room temperature. Polymeric nanocapsules of adequate size, polydispersion, zeta potential, association efficiency, *in vitro* release profile and stability for infiltrative administration were obtained. The results presented in this work refer to the initial studies of these new formulations development aiming to reduce the toxicity, increase local anesthetics solubility and they give rise to perspectives of pre-clinical and clinical studies.

Keywords: nanoparticles, nanocapsules, local anesthesia, benzocaine, bupivacaine.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, muitos estudos vem sendo realizados com a intenção de desenvolver novas formulações farmacêuticas baseadas em nanocarreadores, sendo que estas têm demonstrado inúmeras vantagens frente a formulações convencionais, tornando esta linha de pesquisa uma promissora e inovadora área do setor farmacêutico (RAWAT *et al.*, 2006; ANTON *et al.*, 2008).

A evolução histórica dos nanocarreadores começou no início do século 20, quando Paul Ehrlich propôs o modelo conhecido como “bala mágica”, em que o fármaco seria ligado ao transportador e direcionado ao alvo específico, onde exibiria sua atividade farmacológica. Os anos de 1950 e 1960 foram marcados por grande progresso no desenvolvimento de sistemas miniaturizados (nano e micropartículas) como sistemas de liberação, tendo como um dos pioneiros o Dr. Peter Paul Speiser. Mas foi entre os anos entre 1970 e o início de 1980 que é dada atenção especial foi dada ao desenvolvimento de nanopartículas como carreadores para liberação de fármacos, tendo como foco principal promover melhoria nesses sistemas, destacando-se as nanopartículas associadas a cadeias de polietilenoglicol (PEGladas), destinadas a aumentar o tempo de permanência na circulação sanguínea (SANTOS & CASTANHO, 2002; KAYSER *et al.*, 2005; KREUTER, 2007).

O desenvolvimento de novos sistemas transportadores que possibilitam o direcionamento da molécula carregada ao alvo específico (órgão, tecido, célula), a fim de satisfazer as necessidades terapêuticas dos pacientes ao nível exigido, continua a ser o principal desafio para a Biotecnologia farmacêutica. Nesse contexto ocorreu a evolução da Nanobiotecnologia, campo multidisciplinar que envolve a combinação de duas das tecnologias mais promissoras do século 21, a biotecnologia e a nanotecnologia (RAWAT *et al.*, 2006).

A nanotecnologia tem emergido rapidamente como um campo de pesquisa com potencial aplicação em diagnóstico e em terapia, onde a vetorização de moléculas em

nanocarreadores pode levar a inúmeras vantagens frente aos sistemas convencionais, como capacidade em atravessar barreiras biológicas (barreira hematoencefálica, por exemplo), modulação da distribuição do fármaco e diminuição da toxicidade (promissor para a terapia do câncer, entre outras), aumento do tempo de circulação de substâncias lábeis ou rapidamente eliminadas (como proteínas e peptídeos), veiculação de fármacos hidrofóbicos, promovendo sua solubilização, entre outras (KREUTER, 2007; MORALES, 2007).

Nanocarreadores são materiais ou dispositivos nanométricos compostos de diferentes materiais biodegradáveis naturais ou sintéticos, como lipídios, polímeros e até mesmo compostos organometálicos. Existem diversos tipos de nanocarreadores, como esquematizado na Figura 1; dentre eles destacam-se os nanotubos, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), nanoesferas, nanocápsulas, micelas poliméricas e dendrímeros (RAWAT *et al.*, 2006).

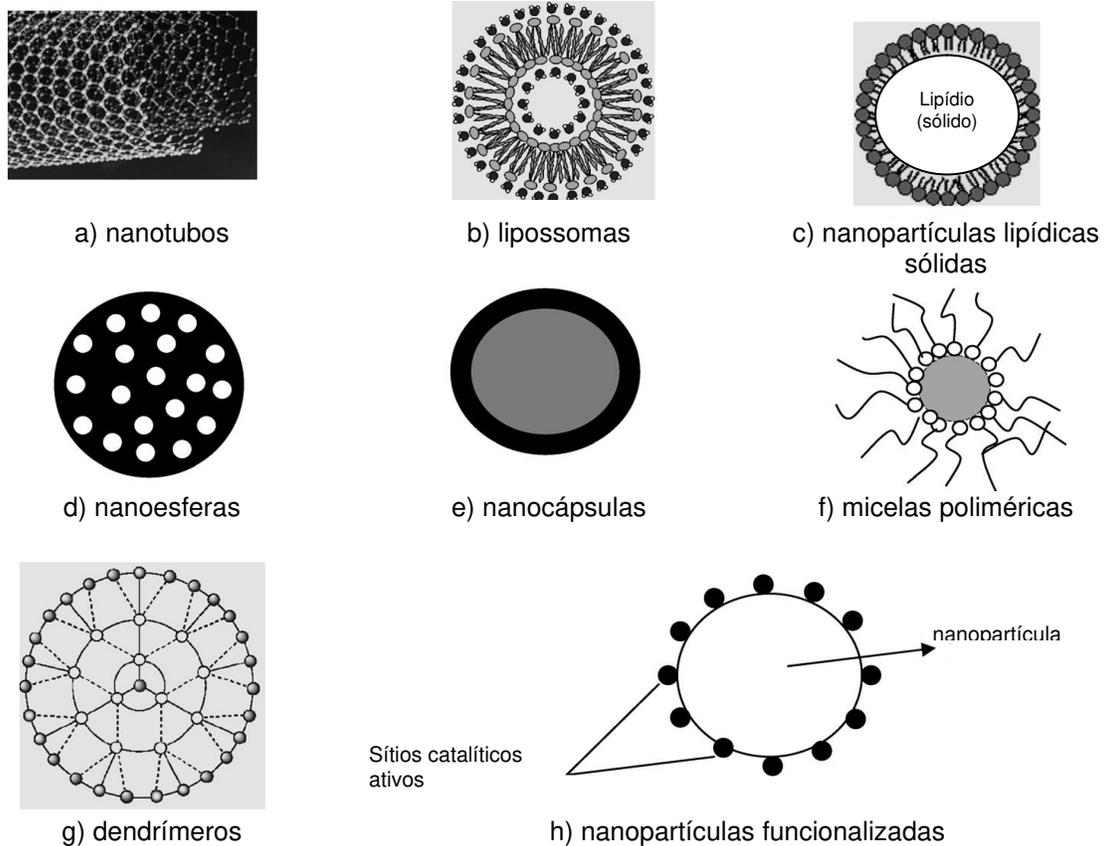


Figura 1: Diferentes tipos de nanocarreadores. (a) nanotubos de carbono, (b) lipossomas de fosfolípidios, (c) nanopartículas lipídicas sólidas, (d e e) nanopartículas poliméricas, (d) nanoesferas, (e) nanocápsulas, (f) micelas poliméricas, (g) dendrímero formado pela polimerização de várias unidades monoméricas, (h) nanopartícula funcionalizada (adaptado de RAWAT *et al.*, 2006).

1.1. Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas (NP) são carreadores de fármacos ou outras moléculas ativas e que apresentam diâmetro compreendido entre 10 e 1000 nm. Dependendo do método de preparo e materiais empregados podem ser obtidas nanoesferas (NE) ou nanocápsulas (NC). As NC (Figura 2) são constituídas por um invólucro polimérico e núcleo (geralmente oleoso). Nestas, o fármaco pode ser encontrado dissolvido no núcleo oleoso ou adsorvido na parede polimérica. Já as NE (Figura 3) são constituídas de matriz polimérica e não apresentam óleo em sua composição. Neste sistema o fármaco pode ser encontrado retido, adsorvido ou disperso na matriz polimérica (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MOHANRAJ & CHEN, 2006; REIS *et al.*, 2006; ANTON *et al.*, 2008).

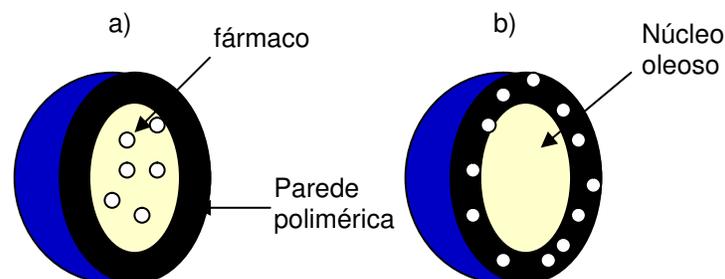


Figura 2: Representação esquemática do corte transversal de nanocápsulas. **a)** fármaco dissolvido no núcleo oleoso e **b)** fármaco adsorvido à parede polimérica.

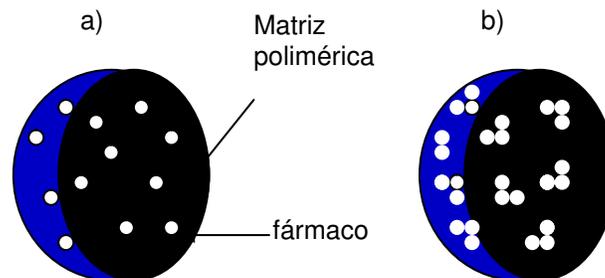


Figura 3: Representação esquemática do corte transversal de nanoesferas. **a)** fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica e **b)** fármaco retido na matriz polimérica.

Os fármacos são liberados através desses sistemas a partir de mecanismos que envolvem a desorção do fármaco das NP, difusão através de poros na matriz ou parede polimérica, difusão através da matriz ou parede polimérica, desintegração, dissolução e erosão da matriz polimérica. Estes fenômenos promovem a liberação modificada dos fármacos incorporados nas NP (GÖPFERICH, 1996; POLAKOVIC *et al.*, 1999; SONAJE *et al.*, 2007).

As vantagens da aplicação de sistemas nanoparticulados poliméricos como carreadores de moléculas incluem: a) a possibilidade de modulação do diâmetro e das características das NP que, por possuírem diâmetro pequeno, permitem a administração intravenosa, ao contrário de muitos outros sistemas coloidais; b) o controle e sustentação da liberação do fármaco no sítio de ação específico, alterando sua distribuição e eliminação do organismo, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo os efeitos colaterais resultantes do acúmulo do fármaco em tecidos não específicos; c) a possibilidade de controlar a degradação da NP e a conseqüente liberação do fármaco podem ser modulados com a escolha dos constituintes da matriz polimérica; d) o direcionamento a sítios específicos através da modificação da superfície de NP, onde podem ser incorporados ligantes, como partículas metálicas ou anticorpos, sendo esta uma boa estratégia, principalmente, para a terapia do câncer; e)

administração por várias vias, incluindo oral, nasal, parenteral, intra-ocular e tópica; f) boa estabilidade física, química e biológica, fácil preparo e boa reprodutibilidade (GÖPFERICH, 1996; SINHA *et al.*, 2004; MOHANRAJ & CHEN, 2006; TORCHILIN, 2006; NAIR & LAURENCIN, 2007).

1.1.1. Matérias-primas utilizadas na preparação de nanopartículas poliméricas

As NP são constituídas basicamente por polímero, tensoativo, óleo (nanocápsulas) e fármaco, além do solvente orgânico que é utilizado no processo de preparação e posteriormente eliminado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MORALES, 2007).

A preparação de NP como carreadores de fármacos impõe algumas restrições físico-químicas e biológicas quanto aos polímeros utilizados. A via de administração é um dos fatores mais importantes na escolha do polímero a ser utilizado na formulação. Em caso de administração parenteral o polímero deve ser biodegradável; já para o caso de administração oral ou local o polímero não precisa necessariamente ser biodegradável, mas sempre deve ser biocompatível. (DURÁN *et al.*, 2006; MORALES, 2007).

Polímeros biocompatíveis são materiais que podem ser implantados/administrados no organismo e que, quando em contato com os tecidos ou órgãos não provocam qualquer reação adversa. Os materiais biocompatíveis bem como seus produtos de degradação não devem provocar resposta inflamatória ou tóxica (NAIR & LAURENCIN, 2007). Já polímeros biodegradáveis são materiais que em contato com elementos do sistema biológico, como tecidos, células, enzimas, etc, sofrem degradação total ou parcial (DURÁN *et al.*, 2006).

Existem vários polímeros utilizados no preparo de NP; entretanto, os poliésteres alifáticos são os mais atrativos para sistemas injetáveis, devido à sua

biodegradabilidade, disponibilidade, biocompatibilidade, ausência de toxicidade e pela facilidade em incorporar uma ampla variedade de fármacos (PICOS *et al.*, 2000). A degradação de poliésteres alifáticos pode ser resultado de ação enzimática e/ou hidrólise da ligação éster e pode ser afetada pelas propriedades desses polímeros, tais como: composição química, massa molar, solubilidade, hidrofobicidade/hidrofilicidade, temperatura de transição, estrutura (cristalina ou amorfa), entre outras (DURÁN *et al.*, 2006; NAIR & LAURENCIN, 2007).

Dentre os poliésteres alifáticos existentes, os mais utilizados são o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(hidroxicaprolato) (PHV) e poli(hidroxibutirato) (PHB) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MORALES, 2007). Existem ainda os polímeros naturais, como quitosana, alginato e gelatina, que podem ser empregados no preparo de NP (REIS *et al.*, 2006). A velocidade de degradação desses polímeros pode ser regulada por variações na composição, na massa molar do polímero e nos métodos de preparo das nanopartículas (DURÁN *et al.*, 2006).

O PGA (Figura 4) é um polímero altamente cristalino, apresenta pouca solubilidade em solventes orgânicos, temperatura de transição entre 35 e 40° C, temperatura de fusão de 200° C, é bastante sensível à hidrólise (entre 1 e 2 meses) e apresenta biodegradação muito rápida, tornando-se inadequado para utilização em sistemas de liberação modificada (NAIR & LAURENCIN, 2007).

O ácido láctico por ser uma molécula quiral apresenta dois isômeros ativos, L e D. A polimerização desses monômeros leva a formação de um polímero semi-cristalino. Já a polimerização da mistura racêmica leva a formação de um polímero amorfo. O poli (ácido L-láctico) (PLLA) é um polímero cristalino, com temperatura de transição entre 60 e 65° C, temperatura de fusão de 175° C, é mais resistente a hidrólise se comparado ao PGA e apresenta biodegradação mais lenta. O poli (ácido DL-láctico) (PDLLA) (Figura 4) é um polímero amorfo com temperatura de transição vítrea entre 55 e 60° C e apresenta biodegradação rápida se comparado ao PLLA, que é o mais indicado para utilização em sistemas de liberação modificada (NAIR & LAURENCIN, 2007).

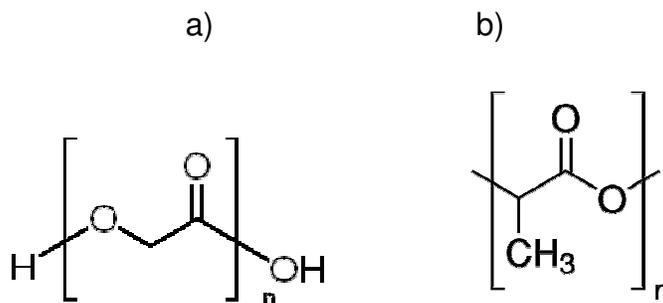


Figura 4: a) Estrutura química do poli (ácido glicólico) e b) poli (ácido láctico).

A associação do PLA ao PGA, formando o copolímero poli-lático-co-glicólico (PLGA) (Figura 5) aumenta a hidrofobicidade, diminuindo a velocidade de biodegradação do polímero, além de seus produtos de degradação não afetarem as funções normais das células do organismo (KILIC *et al.*, 2005; DURÁN *et al.*, 2006). Tanto o PLLA quanto o PDLLA são usados na copolimerização com o PGA, sendo que a estabilidade é influenciada com a variação nas proporções de PLA e PGA, sendo que o PLGA 50/50, 75/25, 85/15 apresenta estabilidade compreendida entre 1-2 meses, 4-5 meses e 5-6 meses, respectivamente (NAIR & LAURENCIN, 2007).

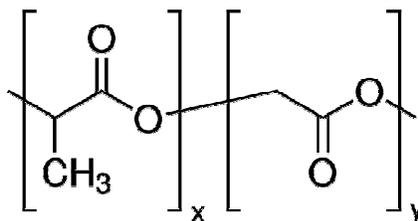


Figura 5: Estrutura química do poli (ácido láctico-co-glicólico).

A PCL (Figura 6) é um polímero semi-cristalino, solúvel em vários solventes orgânicos com temperatura de fusão baixa (entre 55 e 60° C) e temperatura de

transição vítrea em -60°C e apresenta degradação mais lenta se comparado ao PLA, PGA e PLGA (SINHA *et al.*, 2004).

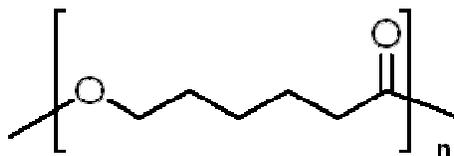


Figura 6: Estrutura química do poli(caprolactona).

Os poliésteres alifáticos apresentam boa aplicabilidade, no entanto, quando administrados intravenosamente são reconhecidos pelo organismo como corpos estranhos e eliminados quase que instantaneamente da circulação sanguínea antes de exercerem sua função, por ação de macrófagos do sistema reticuloendotelial, principalmente pelas células de Kupffer. Para superar essa limitação muitos esforços estão sendo realizados a fim de desenvolver copolímeros anfifílicos na tentativa de reduzir ou minimizar a interação dos polímeros com opsoninas que facilitam o processo de fagocitose (AVGOUSTAKIS *et al.*, 2003; DUAN *et al.*, 2006; BREUNIG *et al.*, 2007; ESMAEILI *et al.* 2008).

O princípio da copolimerização é a estabilização estérica, através da condensação de uma porção hidrofóbica (PLA ou PCL, por exemplo) e uma porção hidrofílica, geralmente polietilenoglicol (PEG), formando os chamados copolímeros bloco (dibloco ou tribloco). A porção hidrofílica causa estabilização estérica e o copolímero não é reconhecido pelas opsoninas, deixando de ser imediatamente fagocitado prolongando, assim, sua circulação na corrente sanguínea (SINHA *et al.*, 2004; DUAN *et al.*, 2006; BREUNIG *et al.*, 2007).

Os copolímeros constituem boa estratégia para incorporação de fármacos para administração intravenosa. No entanto, a incorporação de fármacos com solubilidade em água relativamente elevada nestes copolímeros é baixa, o que promove perda de fármaco na porção aquosa durante a formação da nanopartícula e, portanto, estes

casos requerem o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas de incorporação (GOVENDER *et al.*, 2000; AVGOUSTAKIS *et al.*, 2003).

Existem alguns critérios para a escolha do óleo constituinte das NC, tais como ausência de toxicidade, elevada estabilidade físico-química, incapacidade de solubilizar o polímero e alta afinidade pelo fármaco. Os óleos mais utilizados são os triacilgliceróis de cadeia média ou longa (Miglyol[®], Myritol[®], α -tocoferol, hexil laurato). Algumas propriedades do óleo utilizado no preparo de NC, tais como densidade e viscosidade podem interferir no diâmetro das partículas obtidas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; MORALES, 2007).

Tensoativos são fundamentais para evitar agregação das NP após o preparo e durante o armazenamento por promoverem estabilização física e/ou química das mesmas. Segundo o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), os tensoativos podem ser classificados em tensoativos de alta hidrofilia (hidrofílicos) ou de baixa hidrofilia (lipofílicos), sendo que para o preparo de NP os tensoativos mais utilizados são os de alta hidrofilia não-iônicos como os polissorbatos (Tween[®]) e os poloxamers (Pluronic[®]) (BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

De maneira geral, fármacos lipofílicos possuem maior afinidade com a matriz polimérica e com o núcleo oleoso das nanocápsulas, sendo mais eficientemente incorporados em relação aos hidrofílicos (MORALES, 2007).

Os solventes orgânicos empregados no preparo de NP são classificados segundo a Conferência Internacional de Harmonização (ICH) de acordo com os possíveis riscos a saúde: classe 1 - solventes que devem ser evitados, classe 2 - solventes que devem ser limitados (exemplos: tolueno e clorofórmio), classe 3 - solventes com baixa toxicidade potencial (exemplos: acetato de etila e acetona). A escolha do solvente orgânico deve levar em conta além da menor toxicidade, a capacidade de solubilizar o fármaco, o polímero e o método, já que alguns métodos exigem utilização de solventes orgânicos miscíveis em água e outros não (REIS *et al.*, 2006).

1.1.2. Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas

Os métodos de preparação de NP podem ser baseados na polimerização *in situ* de monômeros ou na precipitação de polímeros pré-formados naturais ou sintéticos (SOPPIMATH *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2006; MORALES, 2007).

Métodos de polimerização *in situ* envolvem formação do polímero no momento da preparação das NP e podem ser obtidos por polimerização em emulsão ou polimerização interfacial. As limitações desses métodos envolvem a exigência de solventes orgânicos tóxicos e a dificuldade de purificação, levando a presença de moléculas residuais tóxicas (monômeros) decorrentes da polimerização deficiente. Devido a estas limitações, foi proposto o uso de polímeros pré-formados para o preparo de NP, sendo estes os mais utilizados atualmente (REIS *et al.*, 2006).

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

No método de nanoprecipitação, descrito inicialmente por Fessi e colaboradores, (1988), onde a fase orgânica constituída de solvente (s) orgânico (s) miscível (s) em água contendo o fármaco e o polímero é adicionada, sob agitação moderada, à fase aquosa contendo o tensoativo e finalmente o solvente orgânico é removido por evaporação (FESSI *et al.*, 1988). É possível obter nanocápsulas por uma adaptação do método de nanoprecipitação (método de deposição interfacial de polímero pré-formado), adicionando-se um óleo e um tensoativo de baixa hidrofília a fase orgânica (FESSI *et al.*, 1989). Esses métodos (nanoprecipitação e deposição interfacial de polímero pré-formado) são vantajosos, pois não requerem homogeneização de alta energia, são relativamente fáceis, rápidos, facilmente escalonáveis e o solvente empregado, geralmente, é a acetona, considerada menos tóxica que solventes como o

diclorometano, comumente empregado em métodos que envolvem emulsificação (BUDHIAN *et al.*, 2007).

No método de emulsificação/evaporação do solvente o polímero e o fármaco são dissolvidos em um solvente imiscível em água e emulsionados em uma solução aquosa contendo tensoativo, formando uma emulsão óleo em água (O/A). O solvente é evaporado e o polímero precipita formando NP (SOPPIMATH *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2006).

O método de emulsificação/difusão do solvente se baseia na formação inicial de uma emulsão óleo em água preparada a partir de uma fase orgânica contendo o polímero, o fármaco e o tensoativo em um solvente parcialmente miscível em água, e de uma solução aquosa contendo o estabilizante. Deve-se pré-saturar o solvente orgânico com água para garantir o equilíbrio termodinâmico. Após formação de emulsão primária o solvente orgânico é deslocado para a fase aquosa externa pela adição de excesso de água, conduzindo a precipitação do polímero, formando NP (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1996).

Os métodos de emulsificação evaporação do solvente e emulsificação difusão do solvente exigem homogeneização de alta energia (sonicador de ponta ou utilizando homogeneização em altas velocidades com ultra-turrax[®]) e o diâmetro da partícula pode ser controlado com a modulação da velocidade e tempo de agitação ou sonicação (REIS *et al.*, 2006; BUDHIAN *et al.*, 2007).

O método de salting-out é uma modificação do método de emulsificação difusão do solvente, onde a fase aquosa apresenta adicionalmente cloreto de sódio ou cálcio. Esse método leva a alta eficiência de incorporação de fármacos, pois a adição de sal favorece a saturação da fase aquosa e assim, o fármaco tende a associar com a NP (ALLÉMANN *et al.*, 1993; GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Os métodos descritos acima, geralmente, não são eficientes para associação de moléculas hidrofílicas. Uma alternativa que vem se mostrando eficiente é a formação de NP pelo método de dupla emulsificação, que consiste na formação de uma emulsão

água em óleo, onde o fármaco e o tensoativo dissolvidos em água são emulsionados em uma fase orgânica contendo solvente imiscível em água e o polímero. Essa primeira emulsão formada é adicionada a uma fase aquosa contendo ou não cloreto de sódio ou cálcio (*salting-out*). Todo processo é realizado sob homogeneização de alta energia e finalmente o solvente é evaporado (ALLÉMANN *et al.*, 1992; MCCARRON *et al.*, 2006).

Outros métodos que podem ser eficientes para a incorporação de fármacos e biomoléculas hidrofílicas são os que utilizam polímeros naturais. Existem muitos métodos descritos para o preparo de NP de quitosana, alginato, gelatina, entre outros (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2006).

A evolução dos métodos de preparo de NP se deve a vários aspectos: a) necessidade do uso de reagentes menos tóxicos; b) simplicidade do processo; c) economia; d) possibilidade de escalonamento; e) otimização para obtenção de propriedades desejáveis. Dependendo das características físico-químicas do fármaco é possível escolher o método de preparo que levará a uma associação eficiente e estabilidade satisfatória. O método escolhido deve minimizar a perda de fármaco e garantir sua atividade farmacológica. Além disso, passos pós-preparação como a avaliação da estabilidade deve ser sempre investigada.

1.2. Anestésicos locais

Anestésicos locais (AL) são moléculas cuja atividade farmacológica primária envolve o bloqueio reversível da condução nervosa (COVINO & VASSALO, 1985; COLLINS, 1993). Embora vários modelos físico-químicos tenham sido propostos para explicar como os AL bloqueiam a condução nervosa, o principal mecanismo envolve sua interação em um ou mais sítios específicos nos canais de sódio voltagem-dependentes presentes nas membranas neurais (GOODMAN & GILMAN, 1996; RANG *et al.*, 2004; FRACETO *et al.*, 2006). Estudos recentes mostram que os AL interagem

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

A cocaína, alcalóide isolado das folhas de *Erithroxylon coca* em 1860, foi o primeiro AL e teve sua ação demonstrada ao ser utilizada como anestésico oftálmico. Após ter sido empregada na clínica durante alguns anos, a cocaína foi substituída por outras substâncias, devido aos seus efeitos tóxicos como dependência física e psíquica. Em 1905, o primeiro substituto sintético da cocaína, a procaína, foi obtida por síntese orgânica dando início à busca de novos compostos com propriedade anestésica (COLLINS, 1993; RANG *et al.*, 2004).

A estrutura dos AL apresenta características distintas: na maioria são moléculas anfifílicas que contém um grupamento aromático (porção hidrofóbica), uma cadeia intermediária e grupamento amino (porção hidrofílica). Aqueles que possuem uma ligação éster entre o grupo aromático e o grupo amino são classificados como aminoésteres (procaína, benzocaína e tetracaína). Já os que possuem uma ligação amida entre tais grupos são classificados como aminoamidas (lidocaína, mepivacaína, ropivacaína e bupivacaína). Os aminoésteres são, em geral, mais potentes que as amino-amidas; no entanto, são hidrolizados pelas esterases plasmáticas. Desde a década de 70 aminoamidas são os anestésicos de escolha para uso clínico, sendo a tendência mundial a de desenvolver aminoamidas mais potentes, pelo fato de serem menos tóxicas e mais resistentes à hidrólise quando comparadas aos amino-ésteres (COVINO & VASSALO, 1985; de JONG, 1994, MALAMED, 2001).

A toxicidade dos AL é proporcional à sua potência (KNUDSEN *et al.*, 1997). A hidrofobicidade aumenta a potência, duração de ação e a toxicidade dos AL, pois a associação destes com as bicamadas lipídicas (hidrofóbicas) aumenta sua distribuição para os locais de ação e reduz a metabolização. Além disso, acredita-se que os sítios de ação de AL nos canais de sódio voltagem-dependente sejam hidrofóbicos

favorecendo, assim, a interação dos AL mais hidrofóbicos e das formas não ionizadas dos mesmos (GOODMAN & GILMAN, 1996; LI *et al.*, 2002).

Os principais efeitos tóxicos dos AL são decorrentes de sua absorção sistêmica, após administração regional, e podem levar à neurotoxicidade e/ou cardiotoxicidade (RANG *et al.*, 2004). A absorção dos AL pela circulação sanguínea é afetada pela hidrofobicidade, pKa e taxa de ligação a proteínas plasmáticas dos compostos (MCLURE & RUBIN, 2005).

A neurotoxicidade causada pelos AL pode ser evidenciada pelo aparecimento de agitação, tremores, convulsões, depressão respiratória e podendo levar ao coma e até morte. A cardiotoxicidade pode causar fibrilações e arritmias (HORLOCKER & WEDEL, 2002; RANG *et al.*, 2004). Os mecanismos moleculares responsáveis por esses efeitos indesejáveis ainda não foram inteiramente estabelecidos. Entretanto, estudos revelaram que os AL modificam o fluxo de íons através de canais de sódio, potássio e cálcio, e afetam processos metabólicos intracelulares ao se ligarem a receptores β -adrenérgicos, resultando na inibição do AMP cíclico e, conseqüentemente, na sinalização deste segundo mensageiro. Um destes mecanismos moleculares ou a associação destes são responsáveis pelos efeitos tóxicos dos AL e, de fato, eles interferem no funcionamento celular e na homeostase (CLARKSON & HONDEGHEM, 1985; CASTLE, 1990; BUTTERWORTH *et al.*, 1993; RENEHAN *et al.*, 2005).

1.2.1. Bupivacaína

A bupivacaína, BVC, (Figura 7) é um AL da classe das aminoamidas, que juntamente com dois outros AL desta classe, a lidocaína e a ropivacaína têm sido os fármacos de escolha na terapia da dor aguda e crônica, sendo encontrada comercialmente em apresentações que variam de 0,25 a 0,75% em massa de BVC (GUPTA, 1991; de ARAÚJO *et al.*, 2005).

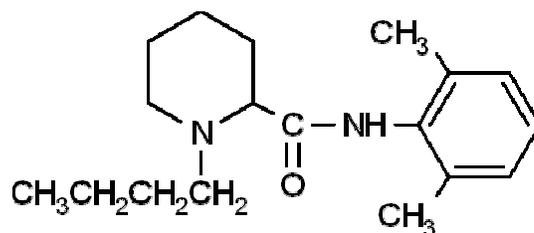


Figura 7: Estrutura química da bupivacaína.

O uso da BVC na clínica se deve à sua potência e capacidade de produzir anestesia prolongada. Sua longa duração de ação, aliada à sua tendência em fornecer um bloqueio mais sensorial que motor, tornou-a de uso popular para promover anestesia prolongada durante o trabalho de parto ou no período pós-operatório (GOODMAN & GILMAN, 1996; MCLURE & RUBIN, 2005; DAVID *et al.*, 2007). Porém, sua supremacia foi questionada devido a relatos de cardiotoxicidade (ALBRIGHT, 1979; MALAMED, 2001; UDELSMANN *et al.*, 2007) que estaria associada a sua lenta dissociação dos canais de sódio, durante a diástole ventricular (CLARKSON & HONDEGHEM, 1985).

A BVC, por possuir estereocentro, apresenta dois isômeros, a dextrobupivacaína (R(+)-BVC) e a levobupivacaína (S(-)-BVC), com comportamentos farmacológicos independentes em decorrência da estereoseletividade. Os efeitos tóxicos associados ao uso da BVC levaram à pesquisa de novos AL (CLARKSON & HONDEGHEM, 1985; CASATI *et al.*, 2002; CANGIANI *et al.*, 2007), sendo a ropivacaína (um isômero com substituinte propila ao invés de butila, como na bupivacaína) lançada no mercado a partir dos anos 80, como alternativa, menos tóxica, que a BVC. Como a síntese da ropivacaína é estereoseletiva, levando ao isômero levógiro, concluiu-se que a estereoseletividade estava relacionada à cardiotoxicidade destes AL (de ARAÚJO *et al.*, 2005; UDELSMANN *et al.*, 2007; DAVID *et al.*, 2007). Comparando-se a BVC racêmica a, S(-)-BVC e a ropivacaína, a primeira é mais cardiotóxica, seguida da S(-) BVC e por

último a ropivacaína que, entretanto, é cerca de 40-60% menos potente que a BVC e a S(-)BVC (CASATI *et al.*, 2002; COX *et al.*, 2003; TORRES, 2006).

Estudos demonstraram que a R(+)BVC é responsável pela cardiotoxicidade da BVC racêmica e pela sua refratariedade à reanimação cardiorespiratória, a partir daí, desenvolveu-se a levobupivacaína, S(-)BVC (ALBRIGHT, 1979; de ARAÚJO *et al.*, 2005; CANGIANI *et al.*, 2007).

1.2.2. Benzocaína

A benzocaína (etil 4-aminobenzoato), BZC, (Figura 8), derivado do ácido para-aminobenzóico, é o mais antigo dos agentes atualmente disponíveis da classe dos aminoésteres. Por apresentar baixa solubilidade em água, sua utilização é limitada para administração injetável. A BZC é eficaz e amplamente utilizada como anestésico tópico para anestesia de superfície das membranas mucosas, onde é absorvida e sofre metabolização hepática através da interação com Citocromo P450 e em seguida é eliminada pelos rins (COVINO & VASSALO, 1985; de JONG, 1994; SO & FARRINGTON, 2008).

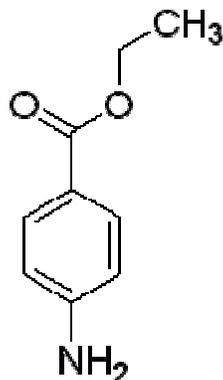


Figura 8: Estrutura química da benzocaína.

As propriedades da anestesia tópica são influenciadas pelo local de aplicação e pela forma farmacêutica de administração. A BZC pode ser preparada sob várias formas farmacêuticas para anestesia tópica e sua concentração/ dosagem varia de acordo com a forma farmacêutica, local de administração e finalidade (COVINO & VASSALO, 1985).

A BZC é comercializada, geralmente, em associação com anti-sépticos ou antibióticos de uso tópico, e pode ser encontrada em diversas formas farmacêuticas e dosagens, como pastilhas (3 mg – 10 mg de BZC por pastilha), solução oral – *spray* (4 – 6 mg/mL de BZC), géis para uso odontológico infantil (6mg/g de BZC), podendo ser encontrada também sem associações como géis, soluções e cremes em concentrações mais altas que chegam até 20% em massa de BZC (COVINO & VASSALO, 1985; SO & FARRINGTON, 2008).

A BZC é recomendada para tratamento de dores na boca e garganta provenientes de processos infecciosos como amidalite, faringite, laringite, gengivite, estomatite e afta, sendo útil também em procedimentos cirúrgicos menores, como pré anestésico em odontologia e para diminuir a sensação de irritação das gengivas durante o nascimento dos dentes em bebês (FDA, 2006; SO & FARRINGTON, 2008). O FDA está ciente das reações adversas da BZC e está revendo seu banco de dados,

mas ainda não há previsões de quando e se este fármaco será retirado do mercado (FDA, 2006).

O principal efeito adverso proveniente do uso de BZC é a metemoglobinemia (GOODMAN & GILMAN, 1996; SO & FARRINGTON, 2008), causada pela remoção de um elétron do átomo de ferro (Fe^{2+} para Fe^{3+}), formando a metemoglobina, sendo esta, incapaz de ligar ao oxigênio de maneira reversível (SO & FARRINGTON, 2008).

Em circunstâncias normais, a metemoglobina pode ser convertida à hemoglobina por ação da hemoglobina redutase em processo dependente de NADH, portanto, pacientes com deficiência desse co-fator ou da enzima hemoglobina redutase apresenta maior risco de desenvolver metemoglobinemia, que pode ser ainda mais acentuada após administração de BZC (SO & FARRINGTON, 2008).

Os mecanismos da metemoglobinemia induzida por BZC ainda não estão bem elucidados. Alguns pesquisadores propuseram que a BZC causa a oxidação da hemoglobina levando à formação de metemoglobina mais rapidamente que a redução de metemoglobina em hemoglobina (NGUYEN *et al.*, 2000). Outros pesquisadores afirmaram que a BZC é um oxidante indireto, com a teoria de que em sua metabolização há produção de um radical livre que é capaz de oxidar a hemoglobina levando à formação de metemoglobina (WRIGHT *et al.*, 1999).

1.2.3. Anestésicos locais e sistemas carreadores

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

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

A veiculação de anestésicos locais tem sido estudada por muitos grupos de pesquisas e também em nosso laboratório, podendo ser obtida pela formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (DOLLO *et al.*, 1996; IRIE e UEKAMA, 1997; LOFTSSON e MASSON, 2001; PINTO *et al.*, 2005; de ARAÚJO *et al.*, 2005; de ARAÚJO *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007 a, b, c; de ARAÚJO *et al.*, 2008a), encapsulação em lipossomas (SIMONETTI & ANDRADE, 1996; de ARAÚJO *et al.*, 2004; CEREDA *et al.*, 2004, CEREDA *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2005; GRANT *et al.*, 2001; GRANT *et al.*, 2002; ROSE *et al.*, 2005; de ARAÚJO *et al.*, 2008b; CEREDA *et al.*, 2008), associação a micropartículas poliméricas (LE GUÉVELLO *et al.*, 1993; COLOMBO *et al.*, 2005; ROSE *et al.*, 2005; HOLGADO *et al.*, 2008; KRANZ & BODMEIER, 2008;) e associação a sistemas nanoestruturados poliméricos (GÖRNER *et al.*, 1999; GOVENDER *et al.*, 1999; POLAKOVIC *et al.*, 1999; GOVENDER *et al.*, 2000).

Neste sentido, o desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica para a BZC e a BVC reside na dimensão do mercado de anestésicos locais que, no Brasil movimentava cerca de R\$ 30.000.000,00/ano segundo levantamento da Indústria Farmacêutica Nacional. A venda de anestésicos locais tópicos exclusivamente em farmácias, por exemplo, segundo auditoria da IMSHealth-PMB, foi de cerca de R\$ 1.200.000,00 no acumulado de 12 meses (jul/2004), valor que pode ser multiplicado por um fator 4 se considerarmos que o mercado mais forte para esse tipo de produto está concentrado na venda direta a clínicas dermatológicas e de cirurgia plástica. Há, portanto, um mercado potencial expressivo para inovação e desenvolvimento de propriedade intelectual.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Este trabalho teve como objetivo introduzir uma nova abordagem tecnológica de sistemas de liberação modificada para os anestésicos locais bupivacaína (R25-S75) e benzocaína em nosso grupo de pesquisa, através do desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas, utilizando polímeros biodegradáveis (PLGA e PCL), objetivando futura aplicação clínica.

2.2. Específicos

- Otimização das melhores condições de preparo das NC de PLGA e PCL contendo anestésicos locais pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado;
- Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) para quantificação de BZC e BVC em NC poliméricas em estudos de determinação de teor do fármaco nas NC (eficiência de associação) bem como em ensaios de liberação;
- Caracterização físico-química (pH, distribuição de tamanho e potencial zeta) das NC poliméricas contendo anestésicos locais;
- Determinação da eficiência de associação dos anestésicos locais nas NC poliméricas;
- Avaliação da estabilidade das suspensões de NC (pH, distribuição de tamanho, potencial zeta e teor) em função do tempo;
- Determinação do perfil de liberação dos anestésicos locais em NC poliméricas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

- Bupivacaina - doação Cristália Indústria Química e Farmacêutica
- Benzocaína - Sigma[®]
- Poli-(DL-lático-co-glicólico) (PLGA) 50:50, 45.000 – 75.000 Da - Sigma[®]
- Poli-(ε-caprolactona) (PCL), 65.000 Da - Sigma[®]
- Polissorbato 80 (Tween 80) - Sigma[®]
- Monoestearato de sorbitano (Span 60) - Sigma[®]
- Triglicerídios de ácidos cáprico e caprílico (Miglyol 810)
- Acetona grau espectroscópico analítico - Merck[®]
- Acetonitrila grau CLAE – Merck[®]
- Fosfato de sódio monobásico grau espectroscópico analítico – Synth
- Fosfato de sódio dibásico grau espectroscópico analítico – Synth
- Dispositivos de ultrafiltração de celulose regenerada de 30 kDa (Millipore[®])
- Microcentrífuga, MC 12V - Du Pont, Sorvall
- Evaporador rotativo, R-114 - Büchi[®]
- Bomba a vácuo, V-500 - Büchi[®]
- Potenciômetro - Tecnal[®]
- Analisador de partículas Zetasizer Nano ZS– Malvern e *software DTS nano*
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Shimadzu
 - Sistema controlador, CBM 20A
 - Bombas A e B, LC 6 AD
 - Detector UV-VIS, SPD 20 AV
 - Degaseificador, DGU 20 AV
 - Injetor manual
 - Software LC solution

- Coluna cromatográfica Gemini C₁₈ fase reversa, 5μ 110A, 150 x 4,60mm (Phenomenex)

3.2. Metodologia

3.2.1. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação do teor de Benzocaína e de Bupivacaína em nanocápsulas poliméricas

3.2.1.1. Princípio da técnica

O teor de BZC e de BVC em NC poliméricas foi determinado através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa, sendo desenvolvidos dois métodos distintos, um para cada fármaco.

A CLAE é uma importante técnica analítica de separação e, atualmente, seu emprego é considerado indispensável para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas. Dentre as vantagens da técnica estão o tempo reduzido da análise, alta resolução, boa análise qualitativa e quantitativa, excelente sensibilidade, seletividade, versatilidade e mecanização (COLLINS *et al.*, 2007).

Em um equipamento de CLAE, o solvente é bombeado em alta pressão por uma coluna que contém partículas da fase estacionária. Nela, efetua-se a separação dos componentes da mistura de acordo com a fase móvel, fase estacionária e a natureza dos componentes analisados. A fase móvel sai da coluna e passa por um sistema de detecção, onde são detectadas alterações de alguma propriedade física específica. Esta variação é convertida num sinal elétrico que é registrado e tratado matematicamente por um processador, obtendo-se assim, o cromatograma (CIOLA, 1998).

Em geral, a CLAE é um processo dinâmico de adsorção. As moléculas da amostra, ao mover-se através da coluna, tendem a interagir com os locais de superfície de adsorção. Dependendo da modalidade de CLAE, tipos diferentes de forças de adsorção podem estar presentes no processo da retenção. As interações hidrofóbicas

são as principais forças envolvidas nas separações de fase reversa. As interações polares estão presentes na modalidade de fase normal. As interações iônicas são responsáveis pela retenção na cromatografia de troca iônica. Todas estas interações são do tipo competidor, onde as moléculas da amostra competem com as moléculas da fase móvel para os locais de adsorção (KAZAKEVICH & MCNAIR, 2000).

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

3.2.1.2. Metodologia analítica desenvolvida para determinação do teor de Benzocaína e de Bupivacaína em nanocápsulas poliméricas

Durante o desenvolvimento das metodologias analíticas, as condições dos métodos foram ajustadas a fim de obter picos simétricos referente à BZC e à BVC. As condições dos métodos desenvolvidos para quantificação de BZC e de BVC em NC poliméricas estão descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Condições do método analítico de determinação de teor de BZC em NC poliméricas.

Analito	Benzocaína
Fase móvel	Acetonitrila / Água Milli-Q (80:20, v/v)
Diluyente	Acetonitrila
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)
Detector (λ)	Ultravioleta (UV), λ = 285nm
Coluna cromatográfica	Phenomenex, Gemini, C ₁₈ fase reversa, 5µ 110A, 150 x 4,60mm

Tabela 2: Condições do método analítico de determinação de teor de BVC em NC poliméricas.

Amostra	Bupivacaína
Fase móvel	Acetonitrila / tampão fosfato pH 7,4, 5mM (85:15, v/v)
Diluyente	Acetonitrila
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1,2 mL/min
Temperatura	Ambiente (25°C)
Detector (λ)	Ultravioleta (UV), λ = 220nm
Coluna cromatográfica	Phenomenex, Gemini, C ₁₈ fase reversa, 5µ 110A, 150 x 4,60mm

3.2.1.3. Validação

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

Validação é o ato ou efeito de validar, tornar válido, legítimo ou legal. Visa a diminuição e controle dos fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado (LANÇAS, 2004).

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade dos resultados. Os parâmetros avaliados na validação de uma metodologia analítica, geralmente são especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e limites de quantificação e detecção (ICH, 1996; BRASIL, 2003; ERMER & MILLER, 2005).

3.2.1.3.1. Especificidade

Especificidade é a capacidade que o método possui em medir exatamente um composto em presença de outros componentes (ICH, 1996; BRASIL, 2003). A especificidade dos métodos analíticos para determinação do teor de BZC e de BVC em NC poliméricas foi avaliada mediante injeções da fase móvel, diluente e NC sem adição de fármaco. Um método é considerado específico quando nenhum pico (s) correspondente aos componentes da fase móvel, diluente ou do placebo coeluem com o pico correspondente ao ativo (ERMER & MILLER, 2005).

3.2.1.3.2. *Linearidade*

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do composto na amostra, dentro de um intervalo especificado. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $\geq 0,99$ (ICH, 1996; BRASIL, 2003). As linearidades dos métodos foram determinadas a partir de três curvas analíticas em dois dias diferentes, totalizando seis curvas para cada fármaco, apresentando cada uma cinco concentrações compreendidas entre 2,5 e 40 $\mu\text{g/mL}$ para BZC e entre 10 e 200 $\mu\text{g/mL}$ para BVC.

3.2.1.3.3. *Intervalo*

Quando o método é considerado satisfatório para os parâmetros de linearidade, precisão e exatidão dentro da faixa de intervalo escolhida, sendo a concentração mais baixa dessa faixa de concentração deve estar acima do limite de quantificação, o intervalo é considerado adequado para quantificação do ativo dentro da faixa de concentração especificada (ICH, 1996; BRASIL, 2003; LANÇAS, 2004).

3.2.1.3.4. *Precisão*

Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Repetibilidade (precisão intra-dia) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Precisão intermediária reflete a

concordância entre os resultados das mesmas amostras em dias diferentes (BRASIL, 2003).

A repetibilidade ou precisão foi avaliada a partir do cálculo de desvio padrão relativo (DPR) (equação 1).

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

onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

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

3.2.1.3.5. *Exatidão*

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, segundo a equação 2 (BRASIL, 2003).

$$\text{Exatidão} = \frac{CMD}{CT} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

onde, CT é a concentração teórica.

3.2.1.3.6. Limites de detecção e quantificação

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

A estimativa do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizadas a partir de dados obtidos com as regressões lineares das curvas analíticas aplicados às equações 3 e 4, respectivamente (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

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

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (\text{equação 4})$$

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

3.2.2. Preparo das nanocápsulas poliméricas

As preparações das NC de PLGA e PCL foram realizadas segundo o método de deposição interfacial de polímero pré-formado descrito inicialmente por Fessi *et al.* (1989).

O método envolve a mistura de uma fase orgânica em outra aquosa. A fase orgânica foi constituída do polímero, solvente orgânico (acetona), triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (Miglyol 810), monoestearato de sorbitano (Span 60) e o fármaco. A fase aquosa foi composta por solução aquosa de Polissorbato 80 (Tween 80). Após dissolução dos componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi inserida, lentamente, sob a fase aquosa com o auxílio de um funil. A suspensão resultante foi mantida sob agitação por 10 minutos e em seguida o solvente orgânico foi eliminado e a suspensão foi concentrada até o volume final de 10 mL, com auxílio de um evaporador rotativo (FESSI *et al.*, 1989).

3.2.3. Otimização do preparo das suspensões de nanocápsulas poliméricas: planejamento fatorial 2^{4-1}

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

Em um planejamento fatorial, determina-se a influência de fatores sobre as respostas de interesse. Para estudar o efeito de qualquer fator (k) sobre uma dada resposta, precisa-se variar o nível do fator e observar o resultado que essa variação produz sobre a resposta. O número de ensaios necessários para se fazer um planejamento fatorial 2^k completo aumenta rapidamente com k, o número de fatores

investigados. Muitas vezes, a informação desejada pode ser obtida a partir de um número bem menor de ensaios, correspondente a uma fração do número de ensaios do planejamento completo. Isso é possível, pois o número de interações de ordem alta aumenta com o número de fatores, mas na maioria dos casos, essas interações têm valores pequenos e são destituídas de qualquer importância prática. Além disso, quando o número de fatores aumenta, crescem as chances de que um ou mais deles não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, seja por meio de efeitos de interação. Por essas razões são feitos planejamentos fatoriais fracionários (BARROS NETO *et al.*, 2007).

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

As proporções ideais dos componentes das fases orgânica e aquosa das suspensões de NC de PLGA ou PCL contendo BVC ou BZC foram determinadas a partir de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (Tabela 3).

Foram variadas proporções de quatro fatores (polímero, Miglyol, Span 60 e Tween 80) em 2 níveis, segundo a tabela 4. O mesmo planejamento fatorial foi aplicado ao preparo de NC de PLGA e de PCL. Os volumes de fase aquosa e acetona na fase orgânica permaneceram constantes, sendo estes 30 mL cada. As concentrações de fármaco também foram constantes, 40 mg de BZC e 25 mg de BVC, sendo a concentração final após redução do volume das suspensões de NC a 10 mL, 4 mg/mL (0,4%) de BZC e 2,5 mg/mL (0,25%) de BVC.

As respostas obtidas a partir do planejamento fatorial foram avaliadas quanto ao diâmetro, polidispersão, potencial zeta e a eficiência de associação dos AL nas NC de PLGA e de PCL. As formulações referentes a cada ensaio foram preparadas em duplicata, segundo o item 4.2.

Os cálculos realizados para determinação da influência dos fatores variados sob as propriedades das NC foram realizados utilizando o *software Statgraphics Plus 5.1*.

Tabela 3: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} aplicado ao preparo de NC poliméricas.

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

Tabela 4: Fatores variados em 2 níveis no planejamento fatorial descrito na Tabela 3.

Níveis	Polímero	Miglyol	Span 60	Tween 80
-	50 mg	100 mg	20 mg	30 mg
+	100 mg	200 mg	40 mg	60 mg

3.2.4. Polidispersão e diâmetro

3.2.4.1. Princípio da técnica

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi utilizada para determinação do diâmetro médio e da distribuição de tamanho (polidispersão) das NC.

Quando um feixe de luz incide sobre amostra constituída de partículas, a intensidade da luz espalhada oscila a um ritmo dependente do diâmetro das partículas. Essas flutuações ocorrem, em consequência do movimento Browniano, que ocorre em partículas quando suspensas em algum líquido. A partir da equação de Stokes-Einstein (equação 5) é possível obter o raio hidrodinâmico da partícula e consequentemente o diâmetro da partícula (PATTY & FRISKEN, 2006).

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

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

3.2.4.2. Determinação da polidispersão e diâmetro

A avaliação do tamanho (diâmetro) e polidispersão das NC foram realizadas diluindo as suspensões de NC com água (Milli-Q) 50 vezes e utilizando um analisador de partículas Zetasizer (Malvern) à 25°C. A distribuição de tamanho foi dada pelo índice de polidispersão.

3.2.5. Potencial zeta

3.2.5.1. Princípio da técnica

O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento. Em geral, partículas em suspensão possuem carga na superfície, criando uma camada ao redor da partícula que difere do meio dispersante. Com o movimento Browniano das partículas, essa camada se move com elas até o eletrodo de carga oposta à carga da camada que recobre as partículas. Portanto, o potencial zeta é a medida do potencial elétrico entre a superfície externa da camada compacta que se desenvolve ao redor da partícula e o meio dispersante.

O potencial zeta reflete a carga na superfície das nanopartículas. Esse parâmetro pode ser influenciado pela composição da partícula e meio dispersante (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Nanopartículas devem apresentar valor de potencial zeta relativamente alto para garantir a estabilidade físico-química da suspensão, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar agregação em função de colisões ocasionais entre NP adjacentes (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Essas colisões podem ser minimizadas através de

repulsão estérica ou eletrostática. Na ausência de mecanismos estéricos, a estabilidade de nanopartículas é determinada pelo balanço de forças repulsivas e atrativas que as partículas apresentam ao se aproximarem umas das outras. Assim, quanto maior o valor do potencial zeta, independente da carga, maior as chances das partículas não se agregarem. Nanopartículas com potencial zeta de aproximadamente (\pm) 30 são mais estáveis em suspensão (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

O potencial zeta é determinado por eletroforese e pode ser obtido também em um equipamento de espalhamento de luz, pois a variação na frequência da luz espalhada é proporcional à mobilidade eletroforética.

3.2.5.2. Determinação do potencial zeta

O valor de potencial zeta, dado em mV foi determinado através de um analisador de potencial zeta e diâmetro de partículas, Zetasizer (Malvern). As análises foram realizadas diluindo as suspensões de NC em água (Milli-Q) 50 vezes.

3.2.6. pH

É importante avaliar possíveis alterações de pH, em função do tempo para assegurar a estabilidade das suspensões de nanoesferas, pois alteração no pH pode ser indicativo de degradação do polímero. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O monitoramento do pH das suspensões de NC poliméricas foi realizado em função do tempo, utilizando um potenciômetro calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0.

3.2.7. Eficiência de associação de Benzocaína e de Bupivacaína em nanocápsulas poliméricas

O total (100%) de fármaco (BZC e BVC) presente na suspensão de NC poliméricas foi determinado diluindo as suspensões em acetonitrila (ACN). A suspensão de NC de BZC foi diluída até a concentração de 20 µg/mL de BZC e a suspensão de NC de BVC foi diluída até a concentração de 100 µg/mL de BVC. A ACN extrai esses fármacos das NC, solubilizando-os totalmente. Esta solução foi filtrada em membrana Millipore® de 0,22 µm e quantificada por CLAE segundo metodologias descritas no item 4.1.2.

O teor de fármaco associado às NC foi determinado pelo método de ultrafiltração/centrifugação, que consiste em submeter a suspensão de NC à centrifugação a 280 g por 10 minutos em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 30 kDa (Microcon – Millipore®) e quantificar o ultrafiltrado em CLAE. Só atravessa a membrana de 30 kDa o fármaco livre, sendo assim, por diferença entre 100% de fármaco e fármaco não associado as NC, determina-se a taxa de fármaco associado as nanopartículas. A quantificação do total de fármaco presente na suspensão de NC (100%) e do fármaco não associado às NC foi realizada por CLAE a partir da equação da reta da curva analítica previamente validada. Diversos trabalhos empregam essa técnica para determinar a eficiência de associação de fármacos em NP (GAMISANS *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; KILIC *et al.*, 2005).

3.2.8. Estabilidade

A estabilidade das suspensões de NC de PLGA e de PCL contendo BZC e de PLGA contendo BVC foi avaliada a partir de determinações de diâmetro, polidispersão,

potencial zeta, taxa de associação e pH, em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias), sendo as suspensões armazenadas em frascos âmbar, à temperatura ambiente.

3.2.9. Ensaio de liberação *in vitro* de Benzocaína e Bupivacaína em nanopartículas poliméricas

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados utilizando sistemas de dois compartimentos para observar a liberação dos fármacos livres e quando associados às NC poliméricas. Nesse sistema, utilizou-se uma membrana de celulose (Spectrapore, com poro para exclusão molecular de 1000 Da) presa a extremidade de um suporte onde 1,5 mL da amostra foi inserida (compartimento doador). Este suporte foi colocado em contato com 150 mL de água contida em um béquer (compartimento acceptor) sob agitação leve constante (PAAVOLA *et al.*, 1995). O ensaio foi realizado em triplicata e sob condição *sink*.

Amostras foram coletadas do compartimento acceptor (em intervalos de 15, 30 e 60 min., durante 24 h) e analisadas por CLAE segundo metodologias descritas no item 3.2.1.2.

3.2.10. Análise estatística

Todos os cálculos estatísticos e representações gráficas aplicadas aos resultados de validação e otimização de formulação (planejamento fatorial, ANOVA) foram realizados no software *Statgraphics Plus 5.1*[®]. Os cálculos estatísticos e representações gráficas aplicadas aos resultados de ensaio de liberação foram obtidos com o software *Origin 6.0*[®].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do teor de Benzocaína em nanocápsulas poliméricas

As condições cromatográficas escolhidas durante o desenvolvimento da metodologia analítica para determinação do teor de BZC em NC poliméricas foram consideradas adequadas, já que foi obtido um pico simétrico e bem resolvido correspondente a BZC (Figura 9).

Sabendo que o tempo de volume morto da coluna é de 1,25 min para este método, o tempo de retenção do pico correspondente a BZC teria que apresentar tempo de retenção superior a 1,25 minutos para ser aceitável, e este apresentou aproximadamente 1,5 minutos, tempo viável para a análise, possibilitando corrida cromatográfica de apenas 2,5 minutos.

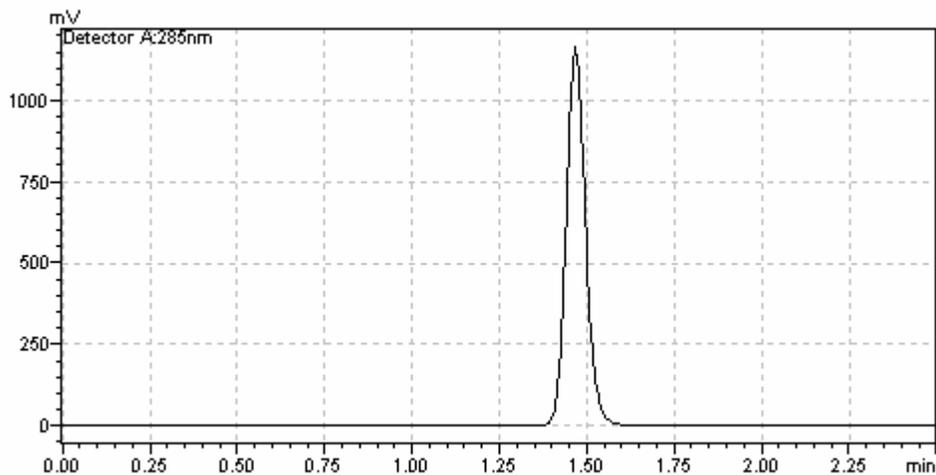


Figura 9: Cromatograma da BZC na concentração de 40 μ g/mL, obtido sob condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.2.

O método foi considerado específico, pois nenhum pico correspondente a componentes da fase móvel, diluente ou do placebo coeluíram com o pico correspondente ao ativo.

A linearidade do método foi avaliada a partir de três curvas analíticas em dois dias diferentes (Figuras 10 e 11), com concentrações de BZC compreendidas entre 2,5 e 40 µg/mL, totalizando seis curvas analíticas (Figura 12).

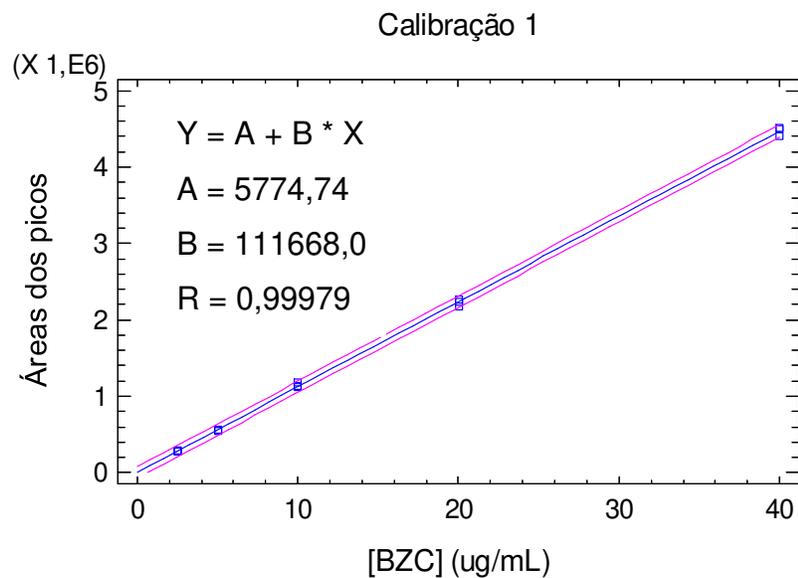


Figura 10: Curva analítica 1 da BZC (n=3) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.

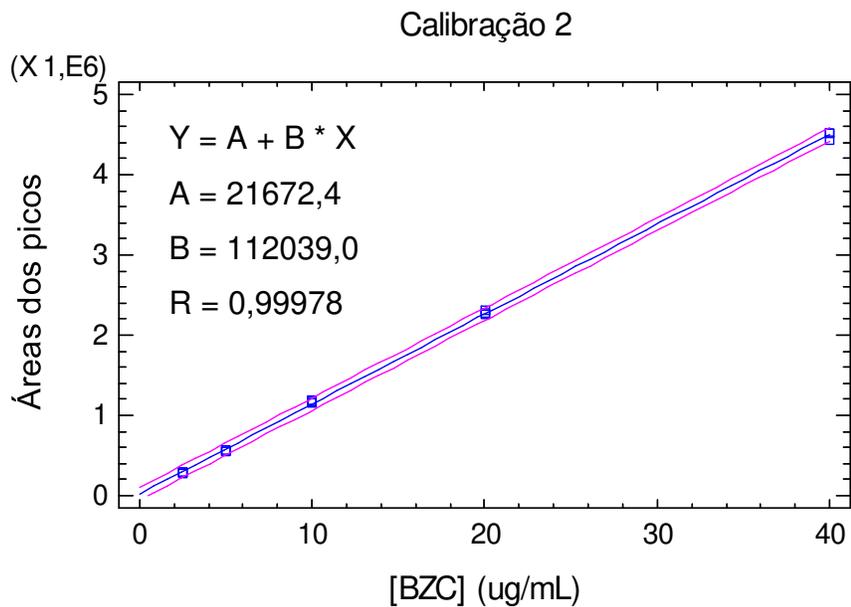


Figura 11: Curva analítica 2 da BZC (n=3) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.

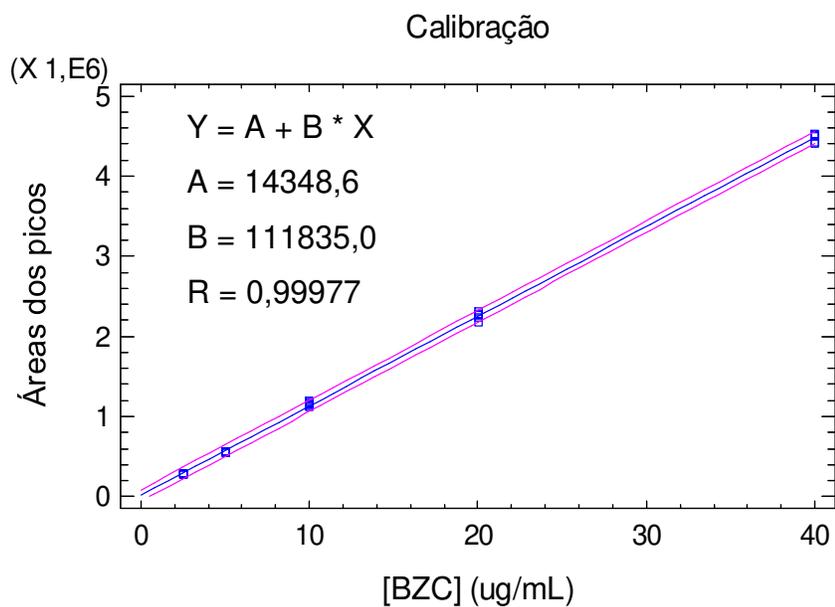


Figura 12: Curva analítica inter-dias da BZC (n=6) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica inter-dias.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) das 3 curvas analíticas descritos nas tabelas 5, 6 e 7 demonstraram, através do teste F, que o modelo linear é adequado para descrever a relação significativa entre área do pico de BZC e concentração de BZC. As condições para que o modelo seja adequado para expressar os resultados são: $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ para o modelo e $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ para a falta de ajuste.

A falta de ajuste foi concebida a fim de determinar se o modelo linear é adequado para descrever os resultados obtidos. Esse teste é realizado através da comparação da variabilidade residual do modelo atual com a variabilidade entre os valores observados da replicata independente da variável x. Os valores de $p < 0,01$ na tabela ANOVA, indicam que os resultados são suficientes para serem usados na observação dos dados.

O R^2 indica que a variação de área no modelo linear é 99,9593% explicada na curva analítica 1, 99,9566% na curva analítica 2 e 99,953 % na curva analítica interdias. Os coeficientes de correlação (R) maiores que 0,999 indicam que existe forte relação entre as variáveis concentração e área do pico de BZC. Os valores de R e as respectivas equações obtidas com as regressões lineares podem ser observados nas figuras 10, 11 e 12.

Tabela 5: ANOVA para os resultados da curva analítica 1 de BZC apresentada na figura 10.

Varição	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	p	F tabelado
Modelo	$3,47906 \cdot 10^{13}$	1	$3,47906 \cdot 10^{13}$	31925,21	0,0000	4,67*
Resíduos	$1,41668 \cdot 10^{10}$	13	$1,41668 \cdot 10^9$			
Falta de ajuste	$1,91104 \cdot 10^9$	3	$6,37012 \cdot 10^8$	0,52	0,6782	3,71*
Erro puro	$1,22558 \cdot 10^{10}$	10	$1,22558 \cdot 10^9$			
Total	$3,48048 \cdot 10^{13}$	14				

* F tabelado para nível de 95% de confiança.

Tabela 6: ANOVA para os resultados da curva analítica 2 de BZC apresentada na figura 11.

Varição	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	p	F tabelado
Modelo	$3,50223 \cdot 10^{13}$	1	$3,50223 \cdot 10^{13}$	31925,21	0,0000	4,67*
Resíduos	$1,52038 \cdot 10^{10}$	13	$1,16952 \cdot 10^9$			
Falta de ajuste	$6,82289 \cdot 10^9$	3	$2,2743 \cdot 10^9$	2,71	0,1011	3,71*
Erro puro	$8,38087 \cdot 10^9$	10	$8,38087 \cdot 10^8$			
Total	$3,50375 \cdot 10^{13}$	14				

* F tabelado para nível de 95% de confiança.

Tabela 7: ANOVA para os resultados da curva analítica inter-dias de BZC apresentada na figura 12.

Varição	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	p	F tabelado
Modelo	$6,97892 \cdot 10^{13}$	1	$6,97892 \cdot 10^{13}$	59487,40	0,0000	4,2*
Resíduos	$3,28489 \cdot 10^{10}$	28	$1,17318 \cdot 10^9$			
Falta de ajuste	$5,60706 \cdot 10^9$	3	$1,86902 \cdot 10^9$	1,72	0,1895	2,99*
Erro puro	$2,72419 \cdot 10^{10}$	25	$1,08967 \cdot 10^9$			
Total	$6,9822 \cdot 10^{13}$	29				

* F tabelado para nível de 95% de confiança.

Com base nos resultados obtidos, comprovou-se estatisticamente a linearidade do método, sendo este modelo (linear) ideal para expressar a relação entre área e concentração de BZC.

A precisão do método (repetibilidade) foi avaliada mediante determinações das concentrações de BZC, em 3 níveis de concentrações realizadas em triplicata, em 2 dias diferentes. As concentrações obtidas na precisão intra-dia 1 foram determinadas a partir da curva analítica 1 (tabela 8) e as concentrações obtidas na precisão intra-dia 2 foram determinadas a partir da curva analítica 2 (tabela 9).

A precisão intermediária do método (inter-dias) foi avaliada mediante determinações das concentrações de BZC em 3 níveis de concentrações obtidas a partir da curva analítica inter-dias. Esses resultados podem ser observados na tabela 10.

A precisão foi avaliada a partir do cálculo de desvio padrão relativo (DPR) dos resultados de concentração de BZC obtidos.

Tabela 8: Resultados de precisão do método intra-dia 1 para o método de teor de BZC.

Área do pico de BZC	[BZC] obtida (µg/mL)	Média	DP	DPR (%)
1739664	15,53	15,56	0,04	0,23
1742584	15,55			
1747698	15,60			
3340187	29,86	30,18	0,28	0,92
3395939	30,36			
3391766	30,32			
6453541	58,64	58,91	0,47	0,79
6553936	58,64			
6644005	59,45			

Tabela 9: Resultados de precisão do método intra-dia 2 para o método de teor de BZC.

Área do pico de BZC	[BZC] obtida (µg/mL)	Média	DP	DPR (%)
1759507	15,51	15,50	0,05	0,30
1762154	15,53			
1752153	15,45			
3347762	29,69	30,01	0,28	0,93
3403097	30,18			
3400558	30,16			
6468317	57,54	58,41	0,86	1,47
6568215	58,43			
6660709	59,26			

Tabela 10: Resultados de precisão intermediária para o método de teor de BZC.

Área do pico de BZC	[BZC] obtida (µg/mL)	Média	DP	DPR (%)
15,43	15,60	15,53	0,08	0,52
15,45	15,63			
15,50	15,54			
29,74	29,81	30,09	0,25	0,84
30,24	30,30			
30,20	30,28			
58,47	57,71	58,66	0,93	1,07
58,48	58,60			
59,28	59,43			

Todos os valores de DPR obtidos foram inferiores a 5%, que é o valor máximo preconizado pela ANVISA e ICH para que um método seja preciso. Portanto, as variações obtidas em cada triplicata são consideradas aceitáveis e com isso o método desenvolvido para determinação do teor de BZC em NC poliméricas pode ser considerado preciso (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

A exatidão do método foi determinada a partir da análise de 3 níveis de concentração de BZC em triplicata e em 2 dias diferentes, totalizando 18 determinações. Calculou-se a porcentagem de recuperação de BZC que o método foi capaz de obter com base na relação entre concentração teórica de BZC com a concentração experimental obtida. A quantificação foi realizada utilizando a curva analítica inter-dias. Esses resultados podem ser observados na tabela 11.

Tabela 11: Resultados de exatidão para o método de teor de BZC.

[BZC] teórica ($\mu\text{g/mL}$)	[BZC] obtida ($\mu\text{g/mL}$)	% de Recuperação	[BZC] obtida ($\mu\text{g/mL}$)	% de Recuperação
15,00	15,43	102,85	15,60	104,03
15,00	15,45	103,02	15,63	104,19
15,00	15,50	103,33	15,54	103,59
30,00	29,74	99,13	29,81	99,36
30,00	30,24	100,79	30,30	101,00
30,00	30,20	100,67	30,28	100,93
60,00	58,47	97,45	57,71	96,18
60,00	58,48	97,46	58,60	97,67
60,00	59,28	98,80	59,43	99,05
Média	—	100,39	—	100,67
DP	—	2,32	—	2,87
DPR	—	2,31	—	2,85
Média (n=18)	100,53			
DPR (n=18)	2,52			

Todos os resultados obtidos (individuais e médios), encontram-se dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para as concentrações analisadas (de 95,0 a 105%), o que torna o método exato. A fim de aumentar a confiabilidade dos resultados construiu-se um histograma de capacidade (figura 13), que é uma ferramenta estatística designada a comparar todo conjunto de resultados com as especificações a partir da avaliação da aleatoriedade e rigor do processo, e estabelecimento de limites nos quais o processo pode operar (ERMER & MILLER, 2005).

O histograma de capacidade faz uma estimativa dos resultados que estão fora dos limites de especificação e indica a porcentagem de dados que apresentam distribuição normal. O 3σ representa que 99,7% dos dados se encontram a uma

distância do valor médio a 3 vezes o desvio padrão. Neste caso, somente 5,4% dos dados estão fora dos limites 3σ , ou seja, os desvios encontrados estão dentro da normalidade, indicando que o conjunto de 18 observações na variável recuperação apresenta distribuição normal e que os erros experimentais ou falhas no processo não são significativos. Assim, o processo está estatisticamente controlado (BARROS NETO *et al.*, 2007).

O índice de capacidade (Cpk) foi concebido com a finalidade de comparar a distribuição dos resultados com a especificação. Valores de Cpk > 2 são considerados ideais, mas índices próximos a 1 são considerados aceitáveis. Neste caso o valor de Cpk foi 0,9.

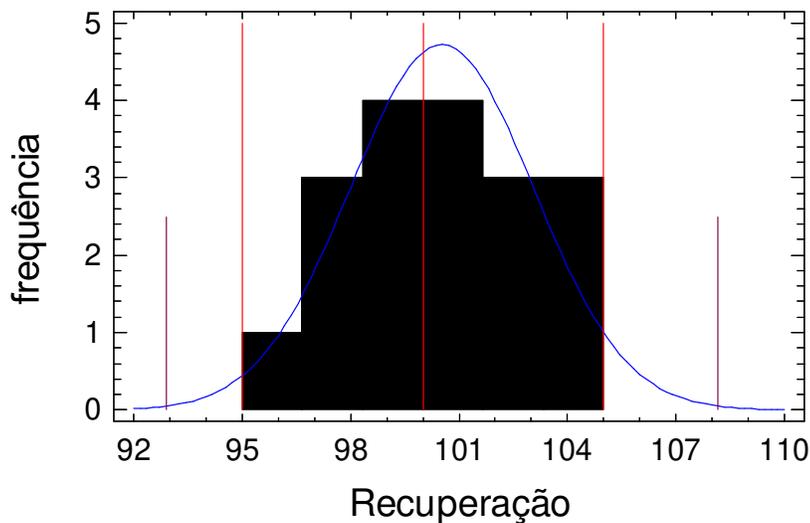


Figura 13: Histograma de capacidade aplicado aos resultados de exatidão do método de determinação do teor de BZC.

Os resultados obtidos com o histograma de capacidade complementam e comprovam os resultados da tabela 11, confirmando a exatidão do método.

Os valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados para o método de determinação de teor de BZC em NC poliméricas foram 0,25 µg/mL e 0,85 µg/mL, respectivamente. Esses resultados foram obtidos a partir da regressão linear da curva analítica inter-dias.

Todos os parâmetros de validação obtidos para o método analítico proposto foram considerados satisfatórios por atenderem as especificações estabelecidas pela ANVISA (2003) e ICH (1996). O método, portanto, pode ser considerado específico, linear, preciso e exato, dentro do intervalo de concentração compreendido entre 2,5 e 40 µg/mL de BZC, sendo aplicável a ensaios de determinação de teor de BZC em NC poliméricas e ensaios *in vitro* de liberação de BZC em NC poliméricas, podendo o fármaco ser quantificado até a concentração mínima de 0,85 µg/mL.

4.3. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do teor de Bupivacaina em nanocápsulas poliméricas

As condições cromatográficas escolhidas durante o desenvolvimento da metodologia analítica para determinação do teor de BVC em NC poliméricas foram consideradas adequadas, já que foi obtido um pico simétrico e bem resolvido correspondente a BVC (Figura 14).

O pico correspondente a BVC apresentou tempo de retenção de aproximadamente 2,8 minutos, estando acima do tempo de volume morto da coluna, que para este método é de 1,04 minutos, possibilitando corrida cromatográfica de apenas 4,0 minutos.

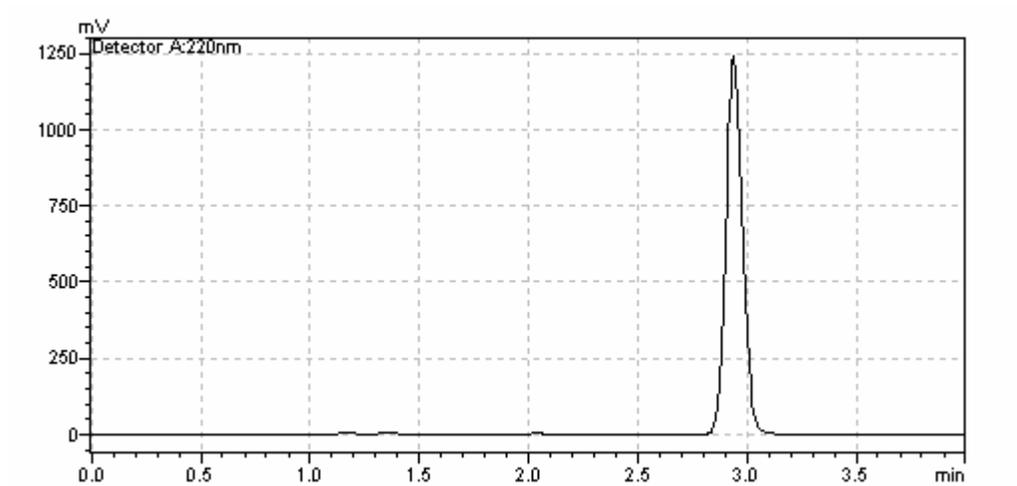


Figura 14: Cromatograma da BVC na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, obtido sob condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.2.

O método foi considerado específico, pois nenhum pico correspondente a componentes da fase móvel, diluente ou do placebo coeluíram com o pico correspondente ao ativo.

A linearidade do método foi avaliada a partir de três curvas analíticas em dois dias diferentes (Figuras 15 e 16), com concentrações de BVC compreendidas entre 10 e 200 $\mu\text{g/mL}$, totalizando seis curvas analíticas (Figura 17).

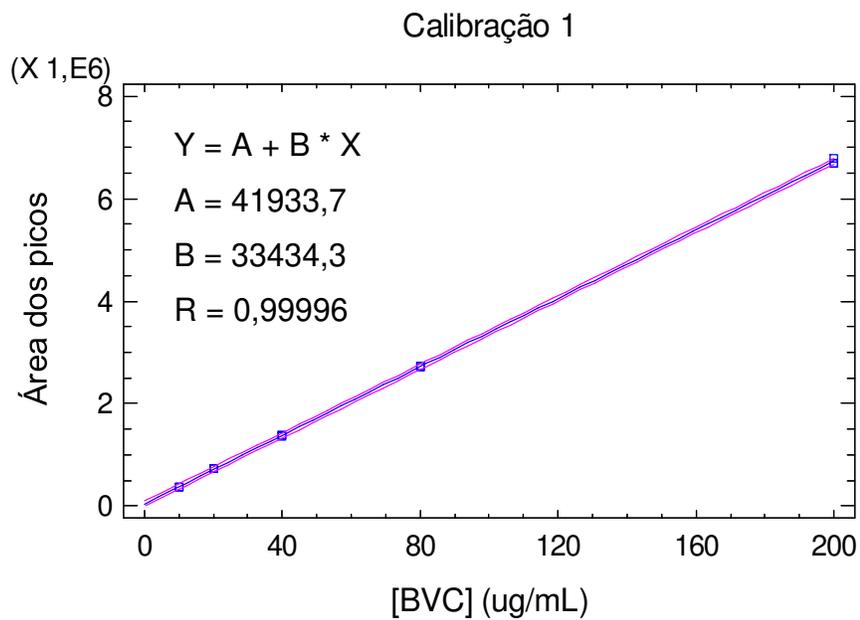


Figura 15: Curva analítica 1 da BVC (n=3) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.

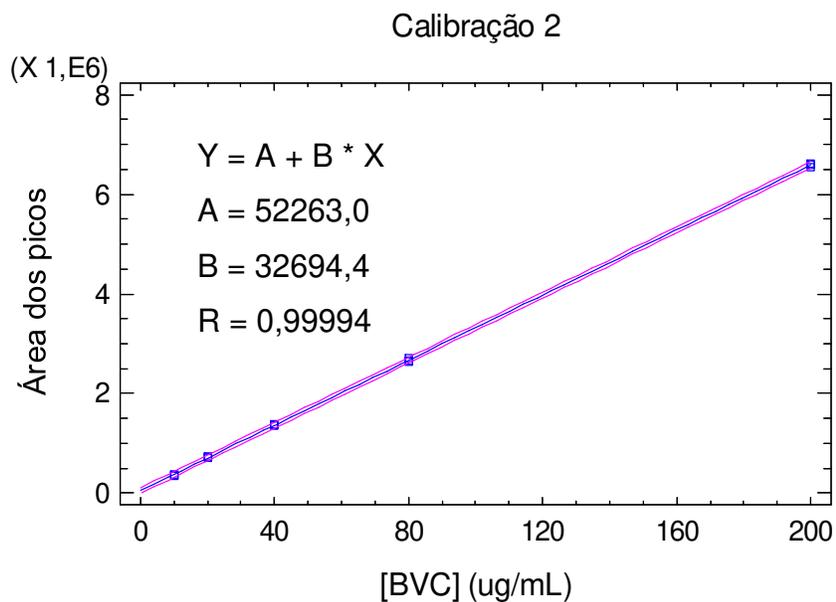


Figura 16: Curva analítica 2 da BVC (n=3) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.

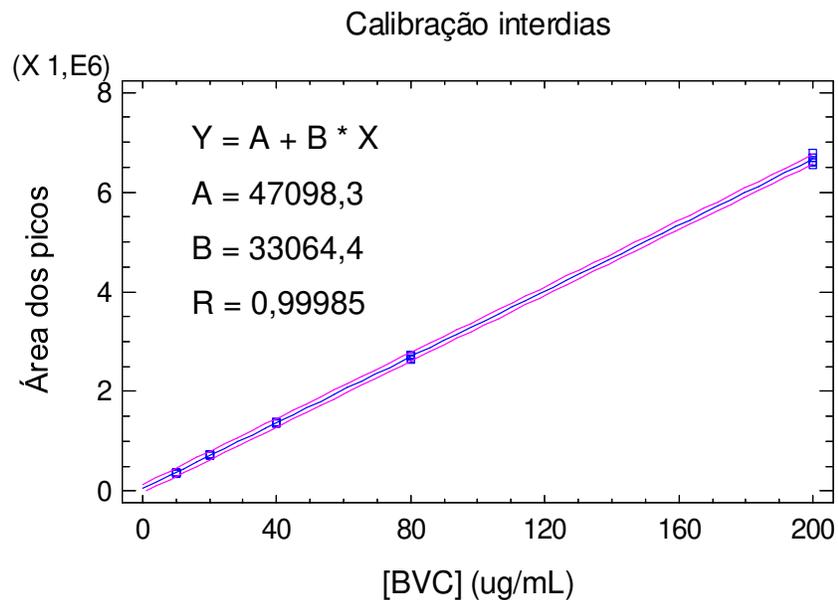


Figura 17: Curva analítica da BVC (n=6) e parâmetros obtidos com a regressão linear da curva analítica.

Assim como os resultados apresentados para validação da metodologia analítica para quantificação de BZC em NC poliméricas, os resultados obtidos com as regressões lineares mostradas nas figuras 15, 16 e 17 indicam que existe forte relação entre as variáveis ($R > 0,99$), sendo que a variação de área no modelo é 99,9914% explicada na curva analítica 1, 99,9885% na curva analítica 2 e 99,9693 % na curva analítica inter-dias. Além disso, os resultados de análise de variância (ANOVA) mostrados nas tabelas 12, 13 e 14 indicam que o modelo linear é significativo para descrever a relação entre área do pico de BVC e concentração de BVC.

Tabela 12: ANOVA para os resultados da curva analítica 1 de BVC apresentada na figura 15.

Varição	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	<i>p</i>	F-tabelado
Modelo	8,04852.10 ¹³	1	8,04852.10 ¹³	150969	0,000	4,67*
Resíduos	6,93063.10 ⁹	13	5,33126.10 ⁸			
Falta de ajuste	1,64154.10 ⁹	3	5,4718.10 ⁸	1,03	0,419	3,71*
Erro puro	5,28909.10 ⁹	10	5,28909.10 ⁸			
Total	8,04921.10 ¹³	14				

* F tabelado para nível de 95% de confiança.

Tabela 13: ANOVA para os resultados da curva analítica 2 de BVC apresentada na figura 16.

Varição	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	<i>p</i>	F-tabelado
Modelo	7,69627.10 ¹³	1	7,69627.10 ¹³	113290	0,000	4,67*
Resíduos	8,8315.10 ⁹	13	6,79346.10 ⁸			
Falta de ajuste	2,06686.10 ⁹	3	6,88953.10 ⁸	1,02	0,425	3,71*
Erro puro	6,76464.10 ⁹	10	676464.10 ⁸			
Total	7,69716.10 ¹³	14				

* F tabelado para nível de 95% de confiança.

Tabela 14: ANOVA para os resultados da curva analítica inter-dias de BVC apresentada na figura 17.

Varição	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	p	F-tabelado
Modelo	$1,57428 \cdot 10^{14}$	1	$1,57428 \cdot 10^{14}$	91157	0,000	4,2*
Resíduos	$4,83558 \cdot 10^{10}$	28	$1,72699 \cdot 10^9$			
Falta de ajuste	$3,6025 \cdot 10^9$	3	$1,20083 \cdot 10^9$	0,67	0,578	2,99*
Erro puro	$4,47533 \cdot 10^{10}$	25	$1,79013 \cdot 10^9$			
Total	$1,57477 \cdot 10^{14}$	29				

* F tabelado para nível de 95% de confiança.

A precisão do método (repetibilidade) foi avaliada mediante determinações das concentrações de BVC em 3 níveis de concentrações realizadas em triplicata em 2 dias diferentes. As concentrações obtidas na precisão intra-dia 1 foram determinadas a partir da equação obtida com a regressão da curva analítica 1 (tabela 15) e as concentrações obtidas na precisão intra-dia 2 foram determinadas a partir da curva analítica 2 (tabela 16).

A precisão intermediária do método (inter-dias) foi avaliada mediante determinações das concentrações de BVC em 3 níveis de concentrações obtidas a partir da curva analítica inter-dias. Esses resultados podem ser observados na tabela 17.

A precisão foi avaliada a partir do cálculo de desvio padrão relativo (DPR) dos resultados de concentrações de BVC obtidos.

Tabela 15: Resultados de precisão do método intra-dia 1 para o método de teor de BVC.

Área do pico de BVC	[BVC] obtida (µg/mL)	Média	DP	DPR (%)
1019048	29,22	28,89	0,33	1,16
1007559	28,88			
996702	28,56			
2073060	60,75	61,34	0,52	0,85
2098867	61,52			
2106288	61,74			
4075855	120,65	120,72	0,22	0,18
4086379	120,97			
4072050	120,54			

Tabela 16: Resultados de precisão do método intra-dia 2 para o método de teor de BVC.

Área do pico de BVC	[BVC] obtida (µg/mL)	Média	DP	DPR (%)
1016280	29,49	30,56	0,93	3,05
1067269	31,05			
1070717	31,15			
1966824	58,56	59,84	1,12	1,87
2024101	60,31			
2034982	60,64			
3981967	120,20	121,35	1,00	0,83
4034698	121,81			
4042170	122,04			

Tabela 17: Resultados de precisão intermediária para o método de teor de BVC.

Área do pico de BVC	[BVC] obtida (µg/mL)	Média	DP	DPR (%)
29,40	29,31	29,71	0,95	3,21
29,05	30,85			
28,72	30,96			
61,27	58,06	60,60	1,59	2,63
62,05	59,79			
62,28	60,12			
121,85	119,01	121,03	1,16	0,96
122,16	120,60			
121,73	120,83			

Todos os valores de DPR obtidos foram inferiores a 5%, que é o valor máximo preconizado pela ANVISA (2003) e ICH (1996) para que um método seja considerado preciso, portanto as variações obtidas em cada triplicata são consideradas aceitáveis, com isso o método desenvolvido para determinação do teor de BVC em NC poliméricas é preciso.

A exatidão do método foi determinada a partir da análise de 3 níveis de concentração de BVC em triplicada e em 2 dias diferentes, totalizando 18 determinações. Verificou-se a capacidade do método em recuperar o ativo através da relação entre concentração teórica de BVC com a concentração experimental obtida. A quantificação foi realizada utilizando a equação obtida com a curva analítica inter dias. Esses resultados podem ser observados na tabela 18.

Tabela 18: Resultados de exatidão para o método de teor de BVC.

[BVC] teórica (µg/mL)	[BVC] obtida (µg/mL)	% de Recuperação	[BVC] obtida (µg/mL)	% de Recuperação
30,00	29,40	97,99	29,31	97,71
30,00	29,05	96,83	30,85	102,85
30,00	28,72	95,73	30,96	103,19
60,00	61,27	102,12	58,06	96,77
60,00	62,05	103,42	59,79	99,65
60,00	62,28	103,80	60,12	100,20
120,00	121,85	101,54	119,01	99,17
120,00	122,16	101,80	120,60	100,50
120,00	121,73	101,44	120,83	100,69
Média	—	100,52	—	100,08
DP	—	2,92	—	2,11
DPR	—	2,91	—	2,10
Média (n=18)	100,30			
DPR (n=18)	2,47			

Todos os resultados obtidos (individuais e médios) ficaram dentro da especificação de 95,0 a 105%, o que torna o método exato. A fim de aumentar a confiabilidade dos resultados construiu-se um histograma de capacidade (figura 18), que é uma ferramenta estatística designada a comparar todo conjunto de resultados com as especificações.

Assim como para os resultados de exatidão do método de quantificação de BZC em NC poliméricas, o histograma de capacidade obtido com os resultados de exatidão do método de quantificação de BVC em NC poliméricas, indicou que o processo pode ser considerado estatisticamente controlado, pois apresentou distribuição normal com o

conjunto de 18 observações na variável recuperação, sendo que somente 4,5% dos dados estão fora dos limites 3σ e o valor Cpk obtido foi de 0,9.

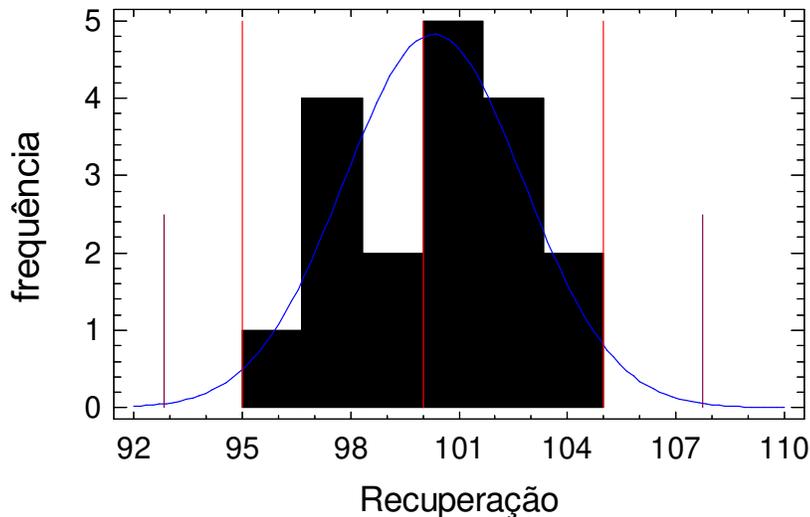


Figura 18: Histograma de capacidade aplicado aos resultados de exatidão do método de teor de BVC.

Os valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados para o método de determinação de teor de BVC em NC poliméricas foram 0,98 $\mu\text{g/mL}$ e 3,26 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses resultados foram obtidos a partir da curva analítica inter-dias.

Todos os parâmetros de validação obtidos para o método analítico em questão foram considerados satisfatórios por atenderem as especificações estabelecidas pela ANVISA (2003) e ICH (1996). O método, portanto, pode ser considerado específico, linear, preciso e exato, dentro do intervalo de concentração compreendido entre 10 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de BVC, sendo aplicável a ensaios de determinação de teor de BVC em NC poliméricas, podendo o fármaco ser quantificado até a concentração mínima de 3,26 $\mu\text{g/mL}$ (LQ).

4.4. Otimização das condições de preparo das suspensões de nanocápsulas poliméricas: planejamento fatorial 2^{4-1}

As NC poliméricas foram preparadas segundo o método de deposição interfacial de polímeros pré-formados, como descrito no item 3.2.2.

Os fenômenos que regem a formação de NP pelos métodos de nanoprecipitação e de deposição interfacial de polímeros pré-formados são turbulência interfacial, difusão e efeitos de superfície (efeito Marangoni). Quando a fase orgânica contendo o polímero é vertida sobre a fase aquosa contendo agentes estabilizantes a turbulência interfacial é causada pela diminuição da tensão interfacial entre as fases. O solvente orgânico difunde pela fase aquosa levando cadeias poliméricas, formando gotículas que se agregam em NP espontaneamente, devido à contínua difusão do solvente orgânico na presença de água (MURAKAMI *et al.*, 1999; GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004; DERAKHSHANDEH *et al.*, 2007). As NC são obtidas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados pelos mesmos princípios com os quais NE são formadas, mas durante a difusão do solvente orgânico contendo polímero e óleo na fase aquosa, ocorre emulsificação espontânea, onde nanogotículas de óleo são formadas e o polímero se deposita ao redor dessas nanogotículas, originando um invólucro polimérico contendo núcleo oleoso denominado NC (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

Durante o preparo de NP, diversos fatores são importantes para determinar as propriedades das partículas, tais como concentração, composição e massa molar do polímero; tipo e volume do solvente orgânico; tipo e concentração do tensoativo/estabilizante; volume de fase aquosa; temperatura; velocidade, tempo e tipo de agitação (em métodos que envolvem emulsificação) (DUAN *et al.*, 2006).

A composição quali e quantitativa de formulações com nano ou micropartículas poliméricas são fatores determinantes para garantir propriedades adequadas e estabilidade das formulações. Por isso, planejar o preparo de formulações contendo

nano ou micropartículas através de planejamentos fatoriais tem sido uma estratégia muito utilizada atualmente a fim de estimar os contrastes dos parâmetros envolvidos no preparo dessas formulações sobre determinadas propriedades, como diâmetro, eficiência de associação do fármaco, entre outras (VANDERVOORT & LUDWIG, 2002; BHAVSAR *et al.*, 2006; DERAKHSHANDEH *et al.*, 2007; MONDAL *et al.*, 2008).

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

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

Os resultados absolutos obtidos com o planejamento aplicado ao preparo de suspensões de NC de PLGA com BZC e NC de PCL com BZC estão descritos nas tabelas 19 e 20, respectivamente.

Tabela 19: Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} e resultados de diâmetro, polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de associação, obtidos a partir do planejamento para suspensões de NC de PLGA com BZC.

Formulação	A	B	C	D	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Eficiência de associação (%)
1.1	-	-	-	-	100,7	0,093	-33,6	62,21
1.2	-	-	-	-	110,8	0,087	-27,9	61,36
2.1	+	-	-	+	93,9	0,066	-30,5	66,32
2.2	+	-	-	+	102,6	0,094	-31,5	65,81
3.1	-	+	-	+	133,7	0,143	-30,5	68,73
3.2	-	+	-	+	129,1	0,128	-36,8	71,42
4.1	+	+	-	-	122,1	0,136	-39,9	46,34
4.2	+	+	-	-	117,3	0,133	-30,9	53,18
5.1	-	-	+	+	99,4	0,126	-25,2	52,09
5.2	-	-	+	+	94,0	0,174	-31,2	53,44
6.1	+	-	+	-	115,7	0,096	-12,9	43,53
6.2	+	-	+	-	100,2	0,107	-34,0	41,90
7.1	-	+	+	-	157,9	0,154	-37,7	63,35
7.2	-	+	+	-	132,5	0,144	-35,1	62,94
8.1	+	+	+	+	179,9	0,166	-14,9	73,37
8.2	+	+	+	+	138,7	0,111	-22,9	73,79

A: PLGA; B: Miglyol; C: Span 60; D: Tween 80

Tabela 20: Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} e resultados de diâmetro, polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de associação, obtidos a partir do planejamento para suspensões de NC de PCL com BZC.

Formulação	A	B	C	D	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Eficiência de associação (%)
1.1	-	-	-	-	150,3	0,058	-30,0	55,12
1.2	-	-	-	-	161,3	0,096	-23,0	56,19
2.1	+	-	-	+	209,2	0,229	-29,0	74,15
2.2	+	-	-	+	200,3	0,207	-31,0	63,22
3.1	-	+	-	+	186,1	0,118	-40,3	74,06
3.2	-	+	-	+	190,7	0,128	-39,4	74,09
4.1	+	+	-	-	216,9	0,134	-41,0	68,88
4.2	+	+	-	-	208,2	0,102	-42,3	69,24
5.1	-	-	+	+	135,6	0,112	-29,0	74,15
5.2	-	-	+	+	132,3	0,110	-33,8	74,05
6.1	+	-	+	-	150,0	0,222	-33,7	68,75
6.2	+	-	+	-	156,0	0,202	-30,2	68,70
7.1	-	+	+	-	156,1	0,101	-35,2	70,72
7.2	-	+	+	-	149,4	0,093	-34,2	70,75
8.1	+	+	+	+	183,6	0,071	-32,7	87,75
8.2	+	+	+	+	193,0	0,070	-32,1	87,94

A: PCL; B: Miglyol; C: Span 60; D: Tween 80

Algumas análises para os resultados mostrados nas tabelas 19 e 20 serão mostrados a seguir.

4.4.1. Efeito dos fatores sobre o diâmetro, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação de Benzocaína em nanocápsulas poliméricas

Os diâmetros das NC de PLGA e de PCL contendo BZC foram determinados pela técnica de espalhamento de luz, como descrito no item 3.2.4.2.

Para avaliar a influência da variação dos fatores em 2 níveis sobre o diâmetro de partícula de NC de PLGA e PCL contendo BZC, foram construídos gráficos de Pareto, a partir dos resultados de diâmetro obtidos com o planejamento fatorial 2^{4-1} , descritos nas tabelas 19 e 20, respectivamente.

A figura 19 apresenta os contrastes dos fatores concentração de PLGA, Miglyol, Span 60 e Tween 80 sobre o diâmetro das NC de PLGA.

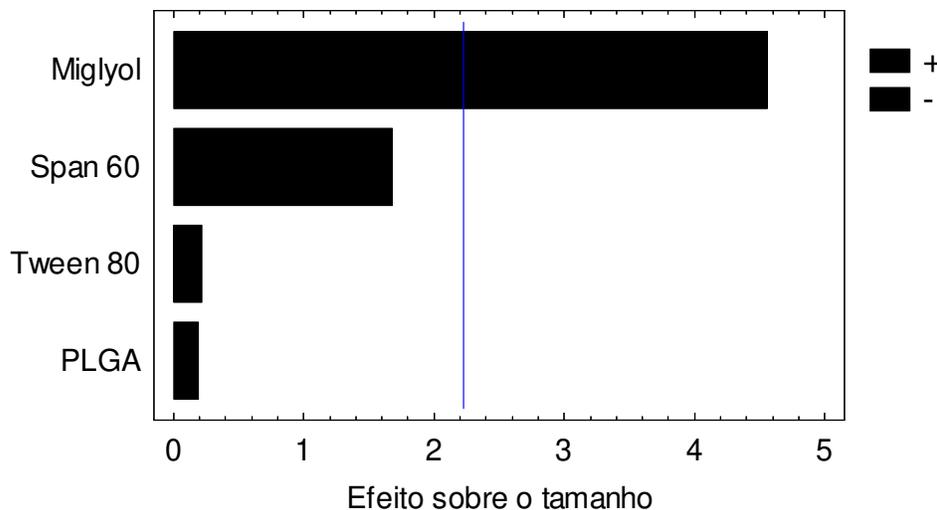


Figura 19: Efeito dos fatores sobre o diâmetro das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

Na tabela 21 estão descritos os valores estimados dos efeitos sobre o diâmetro das NC de PLGA. Para testar a significância estatística dos efeitos causados pelas variações nos fatores estudados, realizou-se análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos, estes resultados estão descritos na tabela 21.

Tabela 21: Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para variação de diâmetro de NC de PLGA com BZC.

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	p *
PLGA	+ 1,54	0,8524
Miglyol	+ 36,74	0,0010
Span 60	+ 13,51	0,1242
Tween 80	+ 1,76	0,8311

* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Segundo os resultados observados na figura 19 e tabela 21, somente o efeito causado pela variação de Miglyol obteve $p < 0,05$, indicando que este efeito é significativamente diferente de zero, com nível de confiança de 95,0%. O valor numérico estimado de efeito do Miglyol sobre o diâmetro das NC (+ 36,74) apresenta sinal positivo, o que representa que quanto maior a concentração de Miglyol, maior o diâmetro de partícula. As variações na concentração de PLGA, Span 60 e Tween 80 não causaram alterações estatisticamente significativas sobre o diâmetro de partícula.

Resultados diferentes foram encontrados a partir do planejamento fatorial 2^{4-1} aplicado ao preparo de NC de PCL contendo BZC.

A figura 20 apresenta um gráfico de Pareto com os contrastes dos fatores concentração de PCL, Miglyol, Span 60 e Tween 80. Esses resultados foram obtidos a partir dos resultados de diâmetro NC de PCL descritos na tabela 20.

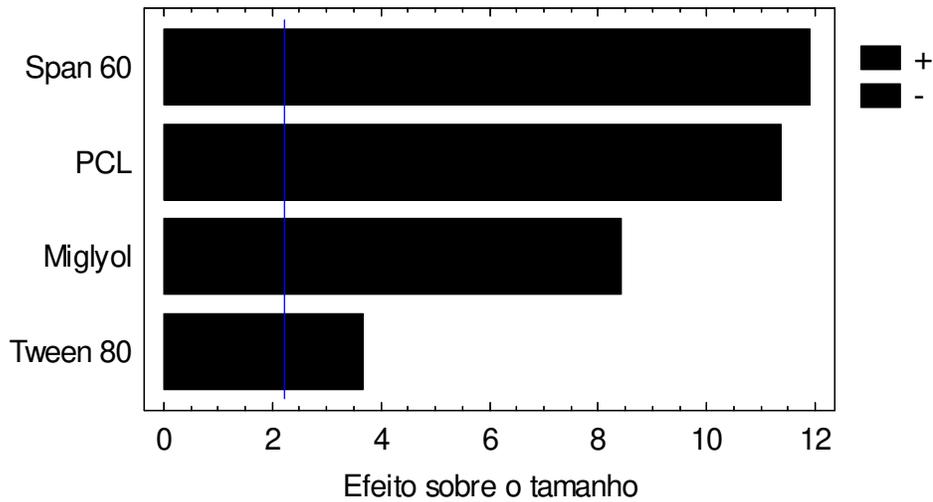


Figura 20: Efeito dos fatores sobre o diâmetro das NC de PCL contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

Tabela 22: Estimativa dos efeitos e valores de p (ANOVA) para variação de diâmetro de NC de PCL com BZC.

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	p^*
PCL	+ 31,93	0,0000
Miglyol	+ 23,63	0,0000
Span 60	- 33,38	0,0000
Tween 80	+ 10,33	0,0043

* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Segundo os resultados obtidos com a ANOVA (tabela 22) e observados na figura 20, as variações de todos os fatores estudados são capazes de causar alterações estatisticamente significativas sobre o diâmetro de NC de PCL contendo BZC.

O fator que exerce maior influência significativa sobre o diâmetro das NC de PCL com BZC é a concentração de Span 60, sendo que o aumento da concentração de Span favorece a diminuição no diâmetro das partículas.

O segundo fator a mais influenciar o diâmetro de partícula significativamente é a concentração de PCL, em seguida concentrações de Miglyol e Tween, sendo que, quanto maior a concentração destes fatores, maior o diâmetro de partícula.

O aumento do diâmetro de partícula em função do aumento da concentração de polímero pode ser explicado por dois motivos: a) com o aumento da concentração de polímero, há maior número de unidades de cadeias poliméricas se agregando por volume de solvente, assim, interações polímero-polímero são favorecidas e mais cadeias poliméricas permanecem associadas durante o processo de difusão, levando à formação de partículas maiores; b) o aumento da concentração de polímero aumenta a viscosidade da fase orgânica, proporcionando maior resistência para a transferência de massa, com isso, a difusão do polímero da fase orgânica para a fase aquosa é reduzida e nanopartículas maiores são formadas (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Galindo-Rodriguez e colaboradores (2004) avaliaram a influência de fatores como concentração de polímero, tensoativos e volume e tipo de solvente orgânico sobre as propriedades de nanopartículas obtidas pelos métodos de salting-out, emulsificação-difusão do solvente e nanoprecipitação. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de polímero favoreceu o aumento do diâmetro de partícula em todos os casos.

Além da concentração de polímero, a natureza do polímero também é fator importante sobre o diâmetro de partícula e eficiência de associação (MUNDARGI *et al.*, 2008).

Blanco & Alonso (1997) estudaram o efeito do tipo de polímero sobre as propriedades de nanopartículas. Os polímeros utilizados foram PLGA de massa molar 12, 34 e 80 kDa. Os resultados demonstraram que com aumento de massa molar, observou-se aumento tanto no diâmetro de partícula quanto na eficiência de associação do ativo na nanopartícula.

Outros fatores importantes sobre as propriedades de nanopartículas são natureza e concentração do tensoativo/ estabilizante e do óleo. O aumento da concentração de tensoativo pode favorecer tanto aumento, quanto diminuição do diâmetro das nanopartículas, dependendo da natureza do tensoativo. A natureza do óleo também exerce influência sobre as propriedades de nanopartículas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004).

Bouchemal e colaboradores (2004) avaliaram o diâmetro de partículas em nanoemulsões em função de diferentes tipos de óleos, tensoativos e solventes. A viscosidade do óleo e HLB de tensoativos são determinantes para o diâmetro de nanopartículas. Os resultados demonstraram que quanto mais viscoso o óleo, menor o diâmetro de partícula, assim, partículas menores foram obtidas com α -tocoferol e hexil-laurato se comparadas às partículas preparadas com Myritol e Miglyol. Quanto ao tipo de tensoativo, quanto maior o HLB, ou seja, maior a hidrofiliicidade, menor o diâmetro de partícula. Partículas menores foram obtidas com a combinação dos tensoativos Lipoid S75 e Pluronic F68 e maiores com os tensoativos Span 85 e Tween 20. Os resultados também demonstraram que a mistura de acetona (miscível em água) com um solvente imiscível em água produz nanopartículas menores e menos polidispersas.

Esses resultados ajudam a explicar os resultados obtidos na figura 20. Embora o gráfico indique que o aumento da concentração de Span 60, que é um tensoativo lipofílico, favorece a diminuição do diâmetro de nanopartículas de PCL, enquanto o aumento da concentração de Tween 80, tensoativo hidrofílico, favorece a formação de partículas maiores, o correto não é avaliar a influência de cada tensoativo individualmente e sim o efeito do uso associado desses dois tensoativos através do balanço hidrofílico/ lipofílico (HLB). Em nosso estudo, a maior concentração de Span empregada foi 40 mg, contra 60 mg de Tween; portanto, o aumento da concentração de Span para 40 mg se associado ao uso concomitante de 60 mg de Tween continua apresentando HLB alto, favorecendo a obtenção de partículas menores.

No caso tanto das NC de PLGA quanto de PCL, o aumento da concentração de Miglyol favoreceu aumento do diâmetro das partículas (Figuras 19 e 20) e aumento de

polidispersidade em NC de PLGA (Figura 21). O Miglyol em concentrações maiores pode agir dificultando a difusão da acetona para a água, gerando nanopartículas maiores. Além disso, com aumento da concentração de Miglyol há favorecimento da associação de fármaco, como pode ser observado para NC de PCL na figura 26, pois maior quantidade de fármaco permanece disperso no componente oleoso, levando ao aumento do diâmetro de NC de PCL.

Duan e colaboradores (2006) avaliaram a influência do tipo de solvente orgânico, tipo e concentração de polímero, concentração de tensoativo e volume de fase orgânica e aquosa sobre propriedades de nanopartículas poliméricas preparadas pelo método de dupla emulsificação. Os resultados demonstraram que, quando a fase orgânica é composta por um solvente miscível em água, como a acetona, e um solvente imiscível em água, como o diclorometano, a dispersão do solvente miscível em água resulta na redução da tensão superficial e partículas menores são formadas. Em relação ao tipo e concentração de polímero, aumentos na concentração e massa molar do PLGA favorecem a obtenção de partículas maiores. Quanto ao tensoativo (Dextran 70), o aumento da concentração de tensoativo favoreceu a diminuição do diâmetro de partícula. Finalmente, observou-se que quando a taxa de fase aquosa/ orgânica diminui, ou seja, aumenta a proporção de água de 1/3 para 1/8, o diâmetro de partícula diminui, pois a dispersão no meio e a mudança de viscosidade do meio são mais lentas, gerando nanopartículas mais homogêneas e estáveis.

Ainda no trabalho de Duan e colaboradores (2006) foram descritos outros fatores que podem ser importantes para determinar o diâmetro de nanopartículas poliméricas. A evaporação muito rápida do solvente pode causar explosão das gotículas e conseqüente formação de nanopartículas com poros nas superfícies. O período de agitação muito prolongado pode desfavorecer a estabilidade das nanopartículas.

Os índices de polidispersão das NC de PLGA e de PCL contendo BZC foram determinados pela técnica de espalhamento de luz, como descrito no item 3.2.4.

A fim de avaliar a influência da variação dos fatores em 2 níveis sobre a polidispersão de NC de PLGA e PCL contendo BZC, foram construídos gráficos de

Pareto a partir dos resultados de polidispersão descritos nas tabelas 19 e 20, respectivamente.

Na figura 21, têm-se os efeitos das variações dos fatores estudados sobre a polidispersão das NC de PLGA contendo BZC. A estimativa dos efeitos e ANOVA para os resultados de polidispersão obtidos estão descritas na tabela 23.

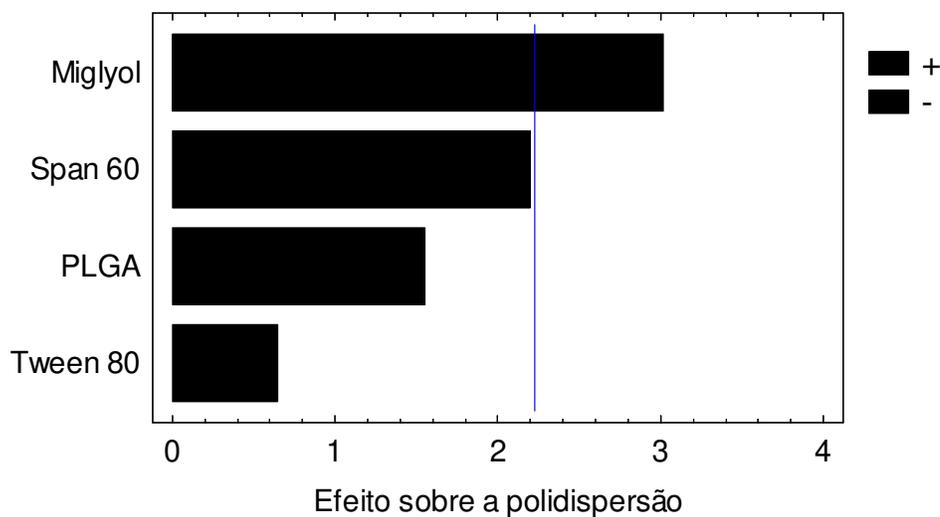


Figura 21: Efeito dos fatores sobre a polidispersão das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

Tabela 23: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a polidispersão e valores de p (ANOVA) para variação de polidispersão em NC de PLGA com BZC.

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	p^*
PLGA	- 0,0175	0,1513
Miglyol	+ 0,034	0,0129
Span 60	+ 0,025	0,0527
Tween 80	+ 0,007	0,5342

* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Segundo os resultados observados na figura 21 e tabela 23, assim como para o diâmetro de partículas de PLGA, somente a variação de Miglyol obteve $p < 0,05$ sobre a polidispersão, indicado que variações na concentração de Miglyol são capazes de causar alterações estatisticamente significativas na polidispersão. Observou-se que quanto maior a concentração de Miglyol, maior o índice de polidispersão das NC de PLGA com BZC. As variações na concentração de PLGA, Span 60 e Tween 80 não causaram alterações estatisticamente significativas sobre a polidispersão das NC.

Para as NC de PCL contendo BZC, embora seja observado efeito importante na polidispersão com a variação na concentração de PCL e Miglyol, a variação de nenhum dos fatores foi capaz de causar alterações significativas na polidispersão das NC, como pode ser observado na figura 22 e tabela 24.

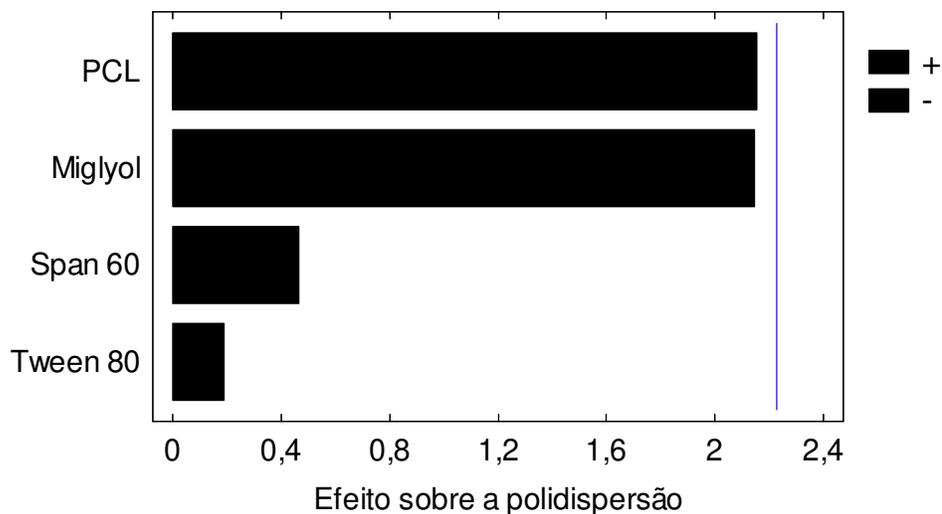


Figura 22: Efeito dos fatores sobre a polidispersão das NC de PCL contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

Tabela 24: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a polidispersão e valores de p (ANOVA) para variação de polidispersão em NC de PCL com BZC.

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	p^*
PCL	+ 0,053	0,0566
Miglyol	+ 0,052	0,0576
Span 60	- 0,011	0,6514
Tween 80	+ 0,005	0,8536

* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Os valores de potencial zeta das NC de PLGA e de PCL contendo BZC foram determinados pela técnica de espalhamento de luz, pois a variação na frequência da luz espalhada é proporcional à mobilidade eletroforética refletindo, assim, a carga superficial das partículas.

Para avaliar a influência da variação dos fatores em 2 níveis sobre o potencial zeta de NC de PLGA e PCL contendo BZC, foram construídos gráficos de Pareto a partir dos resultados de potencial zeta descritos nas tabelas 19 e 20, respectivamente.

Na figura 23 estão demonstrados os efeitos das variações nos fatores estudados sobre o potencial zeta das NC de PLGA contendo BZC. A estimativa dos efeitos dos fatores sobre o potencial zeta e ANOVA para estes resultados estão descritos na tabela 25.

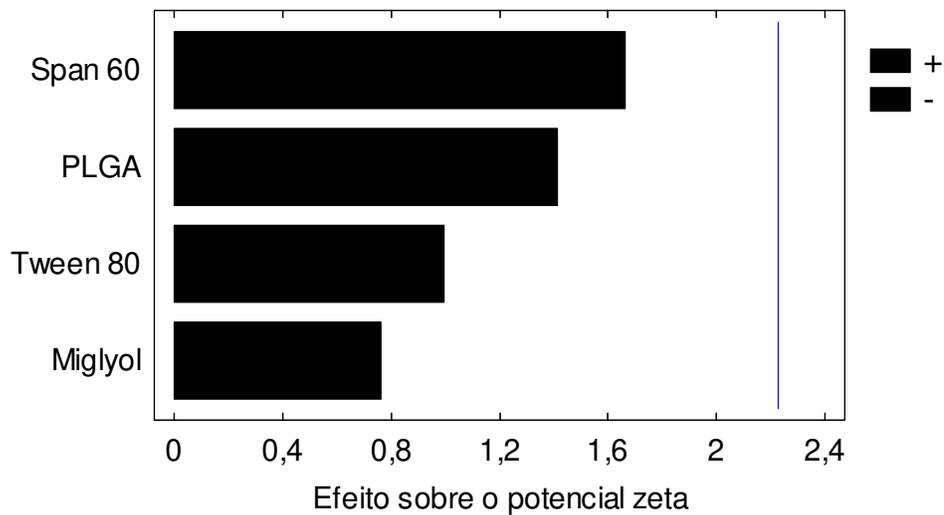


Figura 23: Efeito dos fatores sobre o potencial zeta das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

Tabela 25: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre o potencial zeta e valores de p (ANOVA) para variação do potencial zeta em NC de PLGA com BZC.

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	p^*
PLGA	+ 5,063	0,1883
Miglyol	- 2,738	0,4628
Span 60	+ 5,963	0,1273
Tween 80	+ 3,563	0,3438

* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

A partir dos resultados demonstrados na figura 23 e tabela 25 é possível afirmar que a variação de nenhum dos fatores é capaz de causar alterações significativas no potencial zeta das NC de PLGA com BZC.

Resultados distintos foram encontrados na avaliação da influência dos fatores sobre o potencial zeta de NC de PCL com BVC, como podem ser observados na figura 24 e tabela 26.

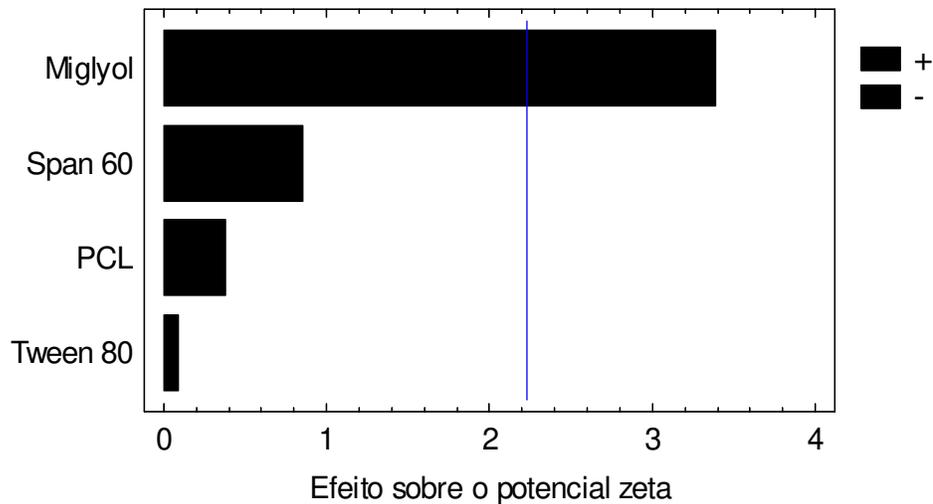


Figura 24: Efeito dos fatores sobre o potencial zeta das NC de PCL contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

Tabela 26: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre o potencial zeta e valores de p (ANOVA) para variação do potencial zeta em NC de PCL com BZC.

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	p^*
PCL	- 0,788	0,7148
Miglyol	- 7,088	0,0070
Span 60	+ 1,79	0,4133
Tween 80	+ 0,188	0,9304

* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Segundo os resultados observados na figura 24 e tabela 26, o aumento da concentração de Miglyol causa decréscimo estatisticamente significativo do potencial zeta de NC de PCL contendo BZC. Variações na concentração dos demais fatores estudados não foram capazes de causar alterações estatisticamente significativas no potencial zeta.

Poucos trabalhos relatam a influência dos componentes de formulações de nanopartículas sobre o potencial zeta, pois é uma propriedade pouco afetada. Nossos resultados mostram que para NC de PLGA (Figura 23) a alteração de nenhum dos fatores foi capaz de produzir variações significativas sobre o valor de potencial zeta e, somente para NC de PCL observou-se que o aumento de Miglyol favorece a diminuição do potencial zeta (Figura 24).

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

No trabalho de Vandervoort & Ludwig (2002) uma série de estabilizantes foram comparados ao PVA a partir de um planejamento fatorial 2^2 e avaliou-se diâmetro e potencial zeta de nanopartículas de PLGA obtidas pelo método de dupla emulsificação. Variando a natureza dos estabilizantes, foram obtidas nanopartículas de diâmetro que variaram de 300 à 3000nm. Os valores de potencial zeta variaram de 0 à -50 mV em função de alterações na natureza dos estabilizantes. A maioria das partículas apresentou potencial zeta negativo, sendo que as produzidas com carbopol e poloxamer apresentaram potencial zeta negativo mais pronunciado.

Gorner e colaboradores (1999) avaliaram a influência da concentração de polímero e fármaco sobre o diâmetro, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação de lidocaína em nanopartículas produzidas pelo método de emulsificação-
evaporação do solvente. Resultados demonstraram que o aumento da concentração de

PLA 90 associado ao aumento da concentração de fármaco levou a obtenção de partículas maiores, aumento de eficiência de associação e potencial zeta mais negativo, enquanto não foram observadas alterações na polidispersão.

Além dos demais parâmetros descritos acima, a eficiência de associação de BZC em NC de PLGA e de PCL foi avaliada através do método de ultrafiltração-centrifugação, descrito no item 3.2.7, utilizando metodologia analítica descrita no item 3.2.1.2.

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

Na figura 25 estão demonstrados os efeitos das variações nos fatores estudados sobre a eficiência de associação de BZC em NC de PLGA. A estimativa dos efeitos dos fatores sobre o potencial zeta e ANOVA para os resultados de taxa de associação

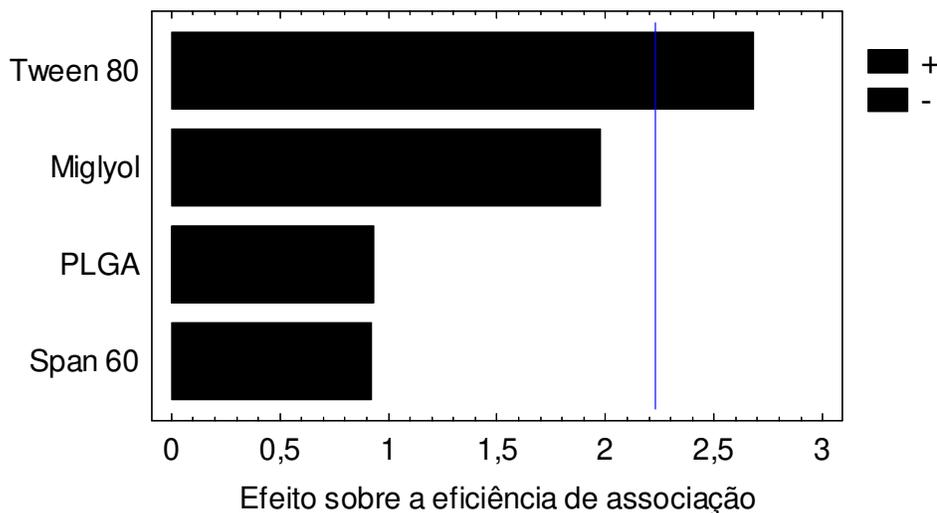


Figura 25: Efeito dos fatores sobre a eficiência de associação das NC de PLGA contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

Tabela 27: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a eficiência de associação e valores de p (ANOVA) para variação taxa de associação em NC de PLGA com BZC.

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	p^*
PLGA	- 3,913	0,3736
Miglyol	+ 8,308	0,0762
Span 60	- 3,87	0,3786
Tween 80	+ 11,27	0,0230

* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Embora variações na concentração de Miglyol causem algum efeito sobre a eficiência de associação, segundo os resultados obtidos com a ANOVA (tabela 27) e visualizados na figura 25, somente variações na concentração de Tween são capazes de causar alterações estatisticamente significativas sobre a eficiência de associação, sendo que o aumento da concentração de Tween aumenta a eficiência de associação de BZC em NC de PLGA.

Resultados diferentes foram encontrados com as variações dos fatores sobre a eficiência de associação de NC de PCL contendo BZC, como mostram os resultados apresentados na figura 26 e tabela 28.

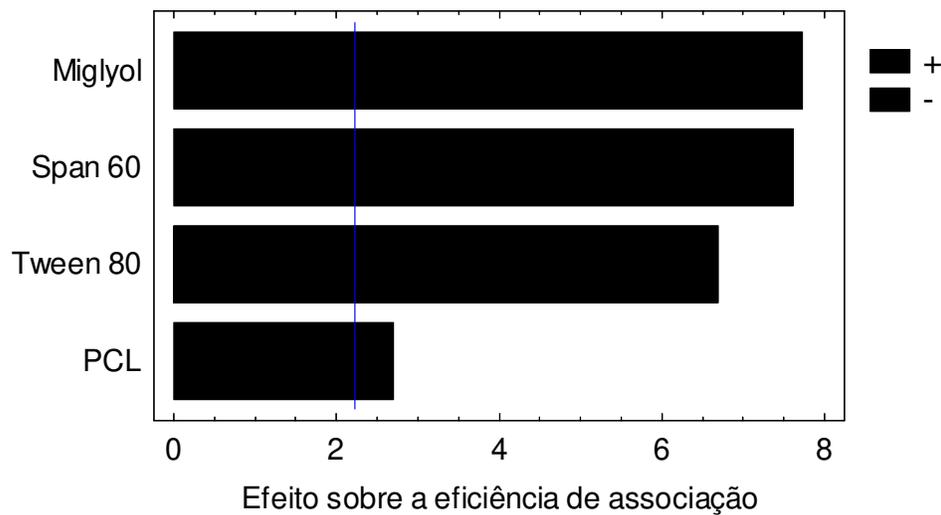


Figura 26: Efeito dos fatores sobre a eficiência de associação das NC de PCL contendo BZC. Resultados obtidos com 95,0% de confiança.

Tabela 28: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a eficiência de associação e valores de p (ANOVA) para variação taxa de associação em NC de PCL com BZC

Fontes de variação	Estimativa dos efeitos	p^*
PCL	+ 3,51	0,0225
Miglyol	+ 10,07	0,0000
Span 60	+ 9,91	0,0000
Tween 80	+ 8,71	0,0001

* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Para NC de PCL contendo BZC, variações de todos os fatores promovem alterações estatisticamente significativas na eficiência de associação de BZC nas NC. O fator que exerce maior influência é a concentração de Miglyol, em seguida Span, Tween

e PCL, sendo que o aumento da concentração desses fatores promove aumento na eficiência de associação.

Os resultados de eficiência de associação de BZC em NC de PLGA (Figura 25) e PCL (Figura 26) mostraram que para NC de PCL o aumento da concentração de polímero aumentou a eficiência de associação do fármaco; entretanto, o fator mais influente foi o aumento da concentração de Miglyol, isso ocorreu, pois devido à natureza lipofílica do fármaco, provavelmente grande parte dele está disperso no Miglyol, assim, o aumento da concentração de Miglyol, favorece aumento da concentração de fármaco presente nas nanocápsulas (no núcleo oleoso).

Tanto para a formação de NC de PLGA quanto de PCL, o aumento da concentração de Tween favoreceu aumento da eficiência de associação da BZC nas nanopartículas, sendo que para as NC de PCL, o aumento da concentração de Span também favoreceu aumento da eficiência de associação do fármaco. Os tensoativos estabilizam as nanopartículas, evitando formação de agregados através de impedimento estérico ou estabilização por carga. Essas moléculas ficam localizadas na interface entre a fase orgânica e aquosa e, com isso, podem dificultar a difusão do fármaco da fase orgânica para fase aquosa e o fármaco tende a ficar associado na nanopartícula. Devido a esse efeito interfacial, quanto maior a concentração de tensoativo, maior a eficiência de associação do fármaco na nanopartícula polimérica (SAHOO *et al.*, 2002).

Budhian e colaboradores (2007) avaliaram a influência da concentração de polímero, volume de solvente e concentração de tensoativo sobre o diâmetro de partícula e eficiência de associação de haloperidol em nanopartículas poliméricas preparadas pelos métodos de emulsificação por processos de homogeneização-evaporação do solvente ou sonicação-evaporação do solvente e nanoprecipitação. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de polímero levou ao aumento tanto do diâmetro de partícula quanto da eficiência de associação do fármaco na nanopartícula. O aumento da concentração do polímero aumenta a viscosidade da fase orgânica e, com isso, as forças de viscosidade se opõem ao estresse de

cisalhamento causado pela homogeneização ou sonicação, estresses esses, necessários, para quebrar as gotículas, formando nanopartículas. O aumento da eficiência de associação do fármaco nas nanopartículas causado pelo aumento da concentração de polímero se deve ao aumento da viscosidade da fase orgânica que aumenta a resistência de difusão das moléculas do fármaco da fase orgânica para a fase aquosa, permitindo maior associação do fármaco nas nanopartículas.

Foi constatado no estudo de Budhian e colaboradores (2007) que a variação no volume de solvente orgânico não causou alterações significativas no diâmetro de partículas obtidas por sonicação; entretanto, quanto menor o volume de solvente orgânico, maior a eficiência de associação do fármaco nas nanopartículas. Este aumento de eficiência pode ser devido à diminuição do tempo de evaporação, que diminui o tempo no qual as nanopartículas ainda estão no estado líquido e, com isso, há menos tempo para o fármaco difundir para a fase externa, aumentando seu teor nas nanopartículas.

O aumento da concentração de PVA causou aumento no diâmetro de partícula nos resultados obtidos por Budhian e colaboradores (2007). Esse fato, muito provavelmente se deve ao aumento da área interfacial provocado pelas cadeias de PVA.

Ainda no estudo de Budhian e colaboradores (2007), demonstrou-se que o aumento do volume de fase aquosa favorece a obtenção de nanopartículas maiores pelos métodos que envolvem homogeneização e sonicação, pois nesses casos a energia de estresse é a mesma, enquanto o volume do sistema é maior. Com isso, obtém-se partículas maiores. Pelo método de nanoprecitação, resultados diferentes foram encontrados, pois os mecanismos que regem a formação das nanopartículas são diferentes. Prevaecem mecanismos de difusão; assim, quanto maior o volume da fase aquosa, menor o diâmetro das partículas. O aumento do volume de fase aquosa também pode influenciar a eficiência de associação do fármaco nas nanopartículas, sendo que o aumento de volume da fase aquosa aumenta o teor de fármaco nas nanopartículas obtidas pelos métodos de homogeneização e sonicação. Em

contrapartida, o aumento de volume da fase aquosa, diminui o teor de fármaco em nanopartículas obtidas por nanoprecipitação, provavelmente devido à perda de fármaco para a fase aquosa.

A partir dos resultados obtidos com o planejamento fatorial, observou-se que a composição quantitativa das nanocápsulas poliméricas é importante para determinar propriedades de nanopartículas, como diâmetro, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação. Além da composição qualitativa, a composição quantitativa também é determinante sobre as propriedades de nanopartículas, visto que resultados diferentes foram obtidos com diferentes polímeros (PLGA e PCL). Neste sentido, diversos trabalhos descrevem a influência da composição quali e quantitativa de nanopartículas sobre suas propriedades, sendo que a principal propriedade a ser avaliada é sempre o diâmetro de partícula (BLANCO & ALONSO, 1997; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; GORNER et al., 1999; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; DUAN et al., 2006; BUDHIAN et al., 2007; MUNDARGI *et al.*, 2008).

Diversos trabalhos usam planejamentos fatoriais a fim de estimar os contrastes dos parâmetros envolvidos no preparo de formulações de nanopartículas sobre determinadas propriedades, como diâmetro, eficiência de associação do fármaco, entre outras (VANDERVOORT & LUDWIG, 2002; BHAVSAR *et al.*, 2006; DERAKHSHANDEH *et al.*, 2007; MONDAL *et al.*, 2008).

Mondal e colaboradores (2007) avaliaram o efeito de variações na concentração de polímero, tensoativo (Span 20) e proporção de fase orgânica e aquosa sobre o diâmetro de nanopartículas de PLGA. Tal estudo foi realizado a partir de um planejamento fatorial 2^3 . Os resultados demonstraram que há diminuição significativa no diâmetro das nanopartículas em 3 casos: quando há aumento simultâneo da concentração de tensoativo e volume da fase orgânica ou diminuição da concentração de polímero associada ao aumento de volume de fase orgânica, ou ainda, quando há diminuição da concentração de polímero associada ao aumento da concentração de tensoativo.

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

Uma vez que a indústria farmacêutica visa produzir formulações de baixo custo, a etapa de desenvolvimento de formulação é importante para garantir a obtenção de formulações com propriedades adequadas, sem que haja gasto excessivo de material. Como formulações contendo nanopartículas poliméricas apresentam custo relativamente elevado se comparado a formulações farmacêuticas convencionais, o parâmetro escolhido como determinante para a escolha das formulações adequadas neste estudo foi a eficiência de associação, já que todas as demais propriedades, embora tenham apresentado algumas variações em função de alterações na proporção dos componentes da formulação, apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade esperados para estes sistemas. Com isso, foram escolhidas como formulações adequadas as correspondentes aos números 3 e 8 do planejamento fatorial, tanto para as NC de PLGA quanto de PCL contendo BZC, pois estas apresentaram maior eficiência de associação do fármaco nas nanopartículas e diâmetro adequado para a via de administração.

Nanocápsulas de PLGA contendo BVC foram formuladas de acordo com a formulação 8 do planejamento fatorial. Embora, esta formulação tenha apresentado maior eficiência de associação para NC de PLGA e PCL com BZC, não se pode garantir que esta seja a melhor formulação para as NC de PLGA com BVC, pois como mostrado nos resultados do planejamento fatorial, a alteração de apenas 1 fator, como o fármaco, pode causar alterações significativas nas propriedades das NC. Uma vez que os

resultados iniciais do desenvolvimento de NC de PLGA com BVC se mostraram promissores, futuramente, otimizar as condições de preparo através de planejamento fatorial se faz necessário.

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

4.5. Estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas

Para avaliação da estabilidade das suspensões de NC poliméricas foram determinadas algumas propriedades físico-químicas como diâmetro, polidispersão, potencial zeta, pH e eficiência de associação em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias), sendo todas amostras armazenadas em frascos âmbar e à temperatura ambiente.

Foram preparadas suspensões de NC de PLGA e PCL contendo BZC e PLGA contendo BVC, empregando-se os níveis de concentração de matérias-primas descritas no planejamento fatorial para as formulações identificadas como 3 e 8 para NC de PLGA e PCL com BZC e somente a formulação 8 para NC de PLGA contendo BVC. Assim, nas formulações identificadas como 3 foram empregados 50 mg de polímero (PLGA ou PCL), 40 mg de BZC, 200 mg de Miglyol e 20 mg de Span 60 dissolvidos em 30 mL de acetona, e 60 mg de Tween 80 dissolvidos em 30 mL de água. Já nas formulações identificadas como 8 foram empregados 100 mg de polímero (PLGA ou PCL), 40 mg de BZC ou 25 mg de BVC, 200 mg de Miglyol e 40 mg de Span 60 dissolvidos em 30 mL de acetona e 60 mg de Tween 80 dissolvidos em 30 mL de água. Todas as formulações tiveram como etapa final do processo a redução do volume até 10 mL.

Nas figuras de 27 a 31 são observados gráficos de distribuição de diâmetro de partículas por intensidade obtidos pelo *software DTS nano* a partir de medidas de

espalhamento de luz para NC de PLGA contendo BZC (formulações 3 e 8), NC de PCL contendo BZC (formulações 3 e 8) e NC de PLGA contendo BVC (formulação 8), respectivamente.

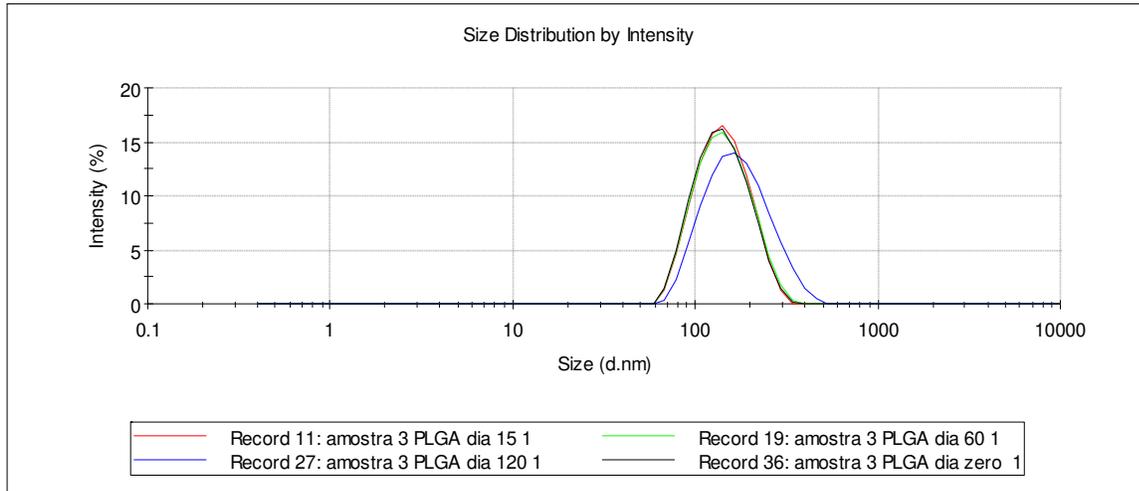


Figura 27: Distribuição de tamanho de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 3 de PLGA com BZC nos tempos zero, 15, 60 e 120 dias.

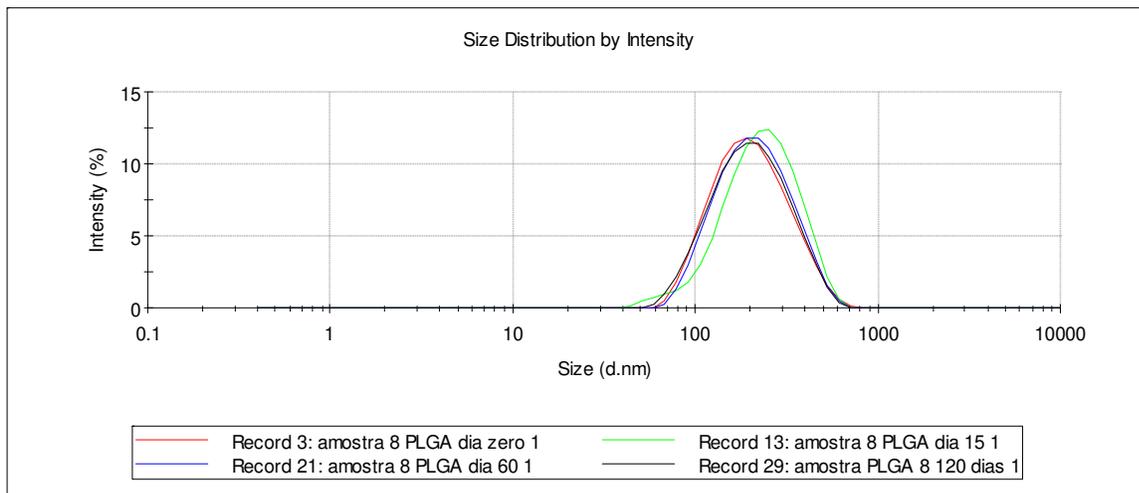


Figura 28: Distribuição de tamanho de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 8 de PLGA com BZC nos tempos zero, 15, 60 e 120 dias.

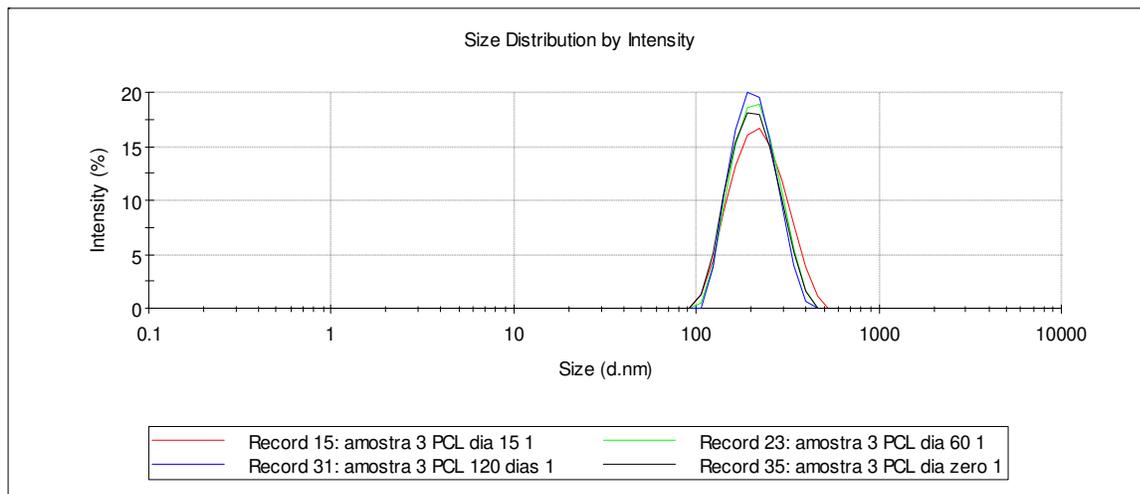


Figura 29: Distribuição de tamanho de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 3 de PCL com BZC nos tempos zero, 15, 60 e 120 dias.

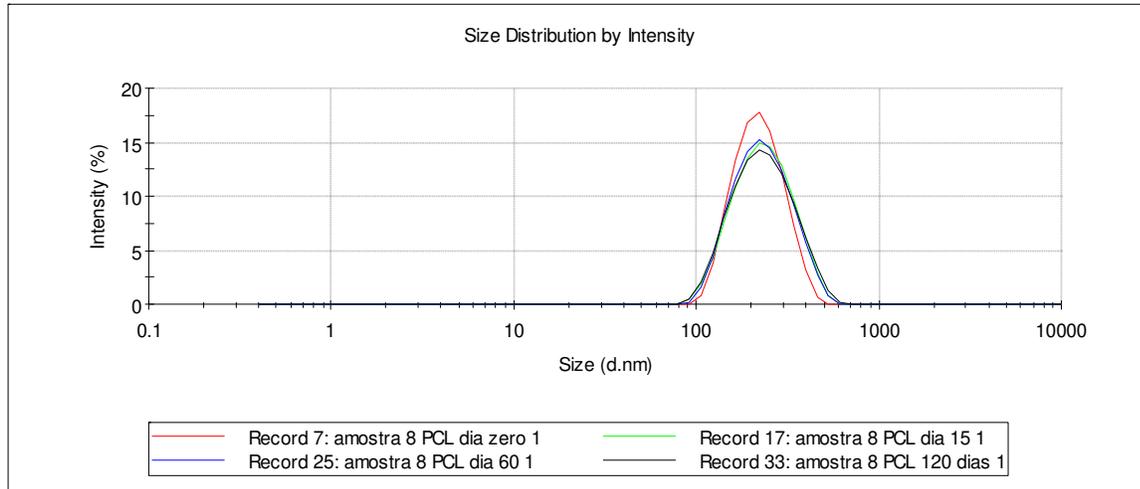


Figura 30: Distribuição de tamanho de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 8 de PCL com BZC nos tempos zero, 15, 60 e 120 dias.

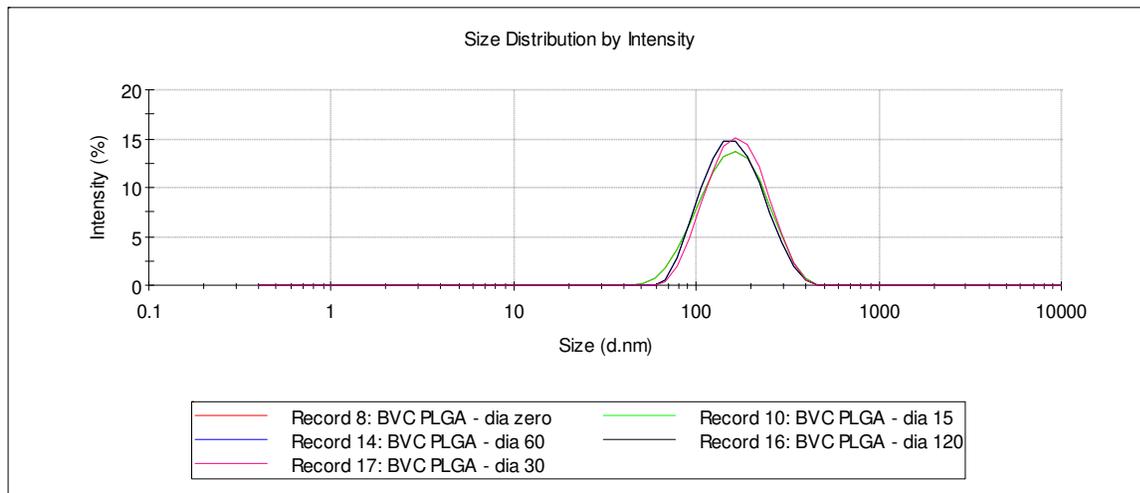


Figura 31: Distribuição de tamanho de partícula (nm) por intensidade (%) da formulação 8 de PLGA com BVC nos tempos zero, 15, 60 e 120 dias.

A partir dos resultados apresentados nas figuras de 27 a 31 observou-se que para todas as formulações a distribuição de tamanho manteve-se constante e unimodal no período de até 120 dias, indicando boa estabilidade das suspensões de NC.

A partir dos dados acima, foram construídos gráficos de diâmetro de partícula em função do tempo, sendo estes apresentados nas figuras 32, 33 e 34.

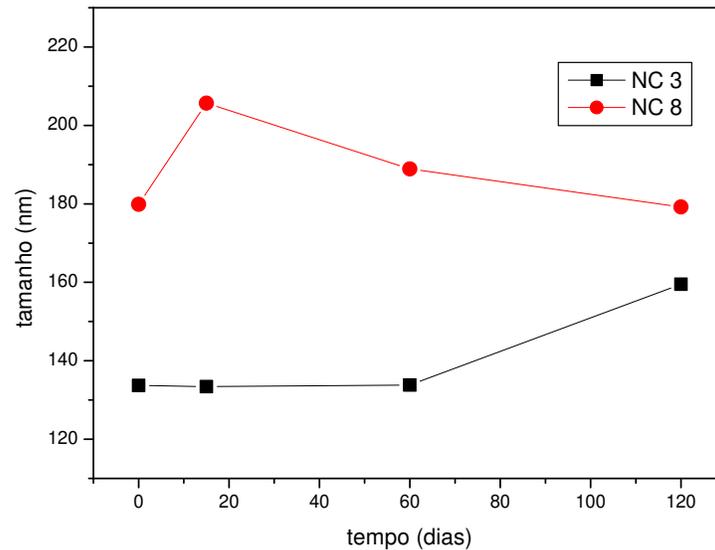


Figura 32: Diâmetro (nm) de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.

Segundo a figura 32, observou-se que o diâmetro das partículas da formulação 3 permaneceram constante até 60 dias e em 120 dias, um aumento no diâmetro das partículas foi observado, o diâmetro variou de 133 nm para 159 nm após 120 dias de armazenamento. O aumento do diâmetro de partícula pode estar associado a possível formação de agregados indicando, assim, que quanto ao diâmetro, essa formulação só é estável em um período de até 60 dias. Em contrapartida, também pode ser observado na figura 32 que o diâmetro de partícula na formulação 8 apresentou pequeno aumento até 15 dias que em seguida diminuiu, tendendo a permanecer constante em até 120 dias. As diferenças na composição dessas duas formulações é a maior concentração de polímero e de Span na formulação 8. A menor estabilidade da formulação 3 pode estar relacionada à baixa concentração de Span, que provavelmente não está sendo suficiente para estabilizar as nanopartículas.

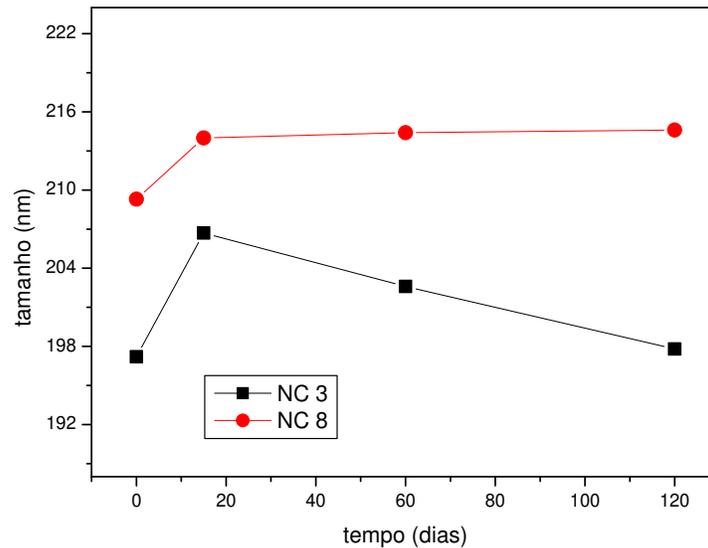


Figura 33: Diâmetro (nm) de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PCL com BZC.

Na figura 33, observou-se que tanto a formulação 3 quanto 8 de NC de PCL com BZC apresentaram aumento no diâmetro das partículas em até 15 dias, sendo este mais pronunciado na formulação 3. No entanto após 15 dias houve diminuição no diâmetro das partículas na formulação 3, que variou de 197 nm, chegando a 206 nm em 15 dias e decaindo para 198 nm em 120 dias. Já na formulação 8 o diâmetro variou de 209 nm chegando a 214 em 15 dias e permanecendo constante até 120 dias. As variações de diâmetro nas duas formulações foram muito pequenas, não sendo significativas; portanto, ambas podem ser consideradas estáveis quanto ao diâmetro em função do tempo de armazenamento.

A mesma análise foi realizada para a formulação de NC de PLGA contendo BVC, sendo os resultados apresentados na figura 34.

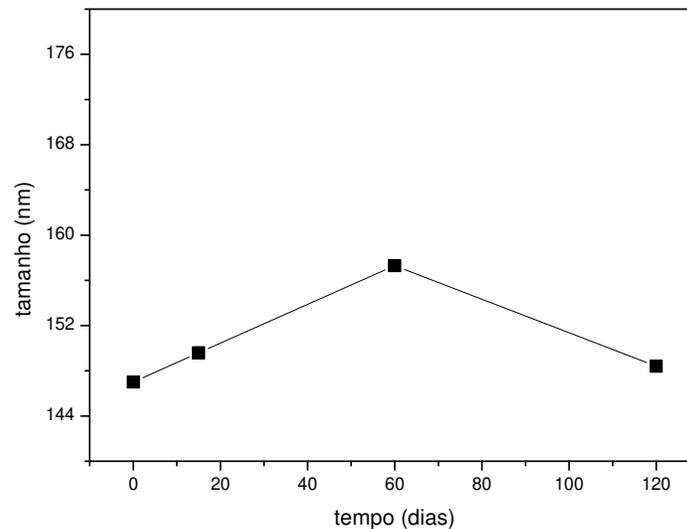


Figura 34: Diâmetro (nm) de partícula em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para suspensão de NC de PLGA com BVC.

A figura 34 demonstrou que o diâmetro de partículas em NC de PLGA com BVC que apresentava diâmetro inicial de 147 nm, sofreu aumento até 60 dias e, após esse tempo foi observada diminuição no diâmetro de partícula.

Resultados semelhantes foram encontrados na literatura para diâmetro de nanopartículas poliméricas (GUTERRES *et al.*, 1995; POHLMANN *et al.*, 2002; MÜLLER *et al.*, 2004)

Outro parâmetro investigado foi a polidispersão, índice que pode ser indicativo de estabilidade uma vez que representa a faixa de distribuição de diâmetro de partícula. Valores altos de índice de polidispersão indicam heterogeneidade do diâmetro de partículas em suspensão, variações nos valores de polidispersão em função do tempo indicam formação de populações de partículas com diâmetros que não existiam inicialmente, podendo ser decorrente de agregação ou quebra/ degradação de partículas. Índices de polidispersão menores que 0,2 são ideais por representarem que a distribuição do diâmetro de partículas se encontra em uma estreita faixa de diâmetros.

Nas figuras de 35 a 37 têm-se os gráficos de polidispersão das partículas em função do tempo.

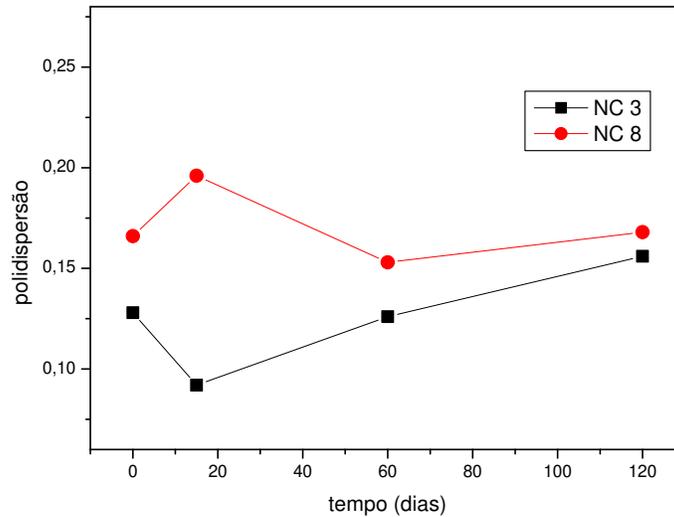


Figura 35: Polidispersão de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.

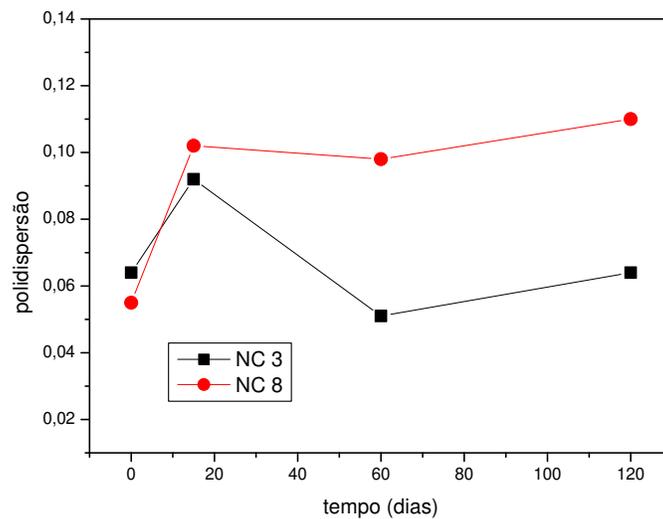


Figura 36: Polidispersão de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PCL com BZC.

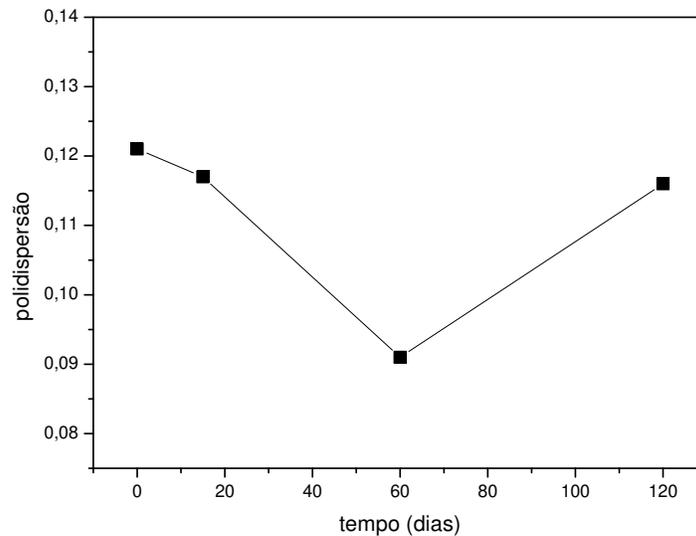


Figura 37: Polidispersão de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para suspensão de NC de PLGA com BVC.

Como demonstrado na figura 35, comportamentos distintos foram observados entre as formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC com relação a polidispersão em função do tempo de armazenamento. Para a formulação 3 o valor inicial de polidispersão foi de 0,128, diminuindo para 0,092 até 15 dias e aumentando gradualmente em seguida, chegando a 0,126 em 60 dias e 0,156 em 120 dias. Já para a formulação 8, o índice de polidispersão aumentou de 0,166 para 0,196 em 15 dias, decaindo para 0,153 em 60 dias e apresentando discreto aumento até 120 dias, chegando a 0,168.

Na figura 36, o índice de polidispersão da formulação 3 de NC de PCL apresentou aumento até 15 dias de armazenamento, passando de 0,064 para 0,092 em 15 dias e decaindo para 0,051 até 60 dias, tendo pequeno aumento até 120 dias, chegando a 0,064. Já na formulação 8 de NC de PCL com BZC, houve aumento da

polidispersão em 15 dias passando de 0,055 para 0,102 em 15 dias e permanecendo praticamente constante em até 120 dias.

A polidispersão da suspensão de NC com BVC diminui após 15 dias, passando de 0,121 para 0,117, diminuição esta gradual até 60 dias, chegando a 0,091 e em seguida aumentou até 0,116 em 120 dias, como pode ser observado na figura 37.

Todos os resultados demonstrados nas figuras 35, 36 e 37 indicaram bons índices de polidispersão, estando todos abaixo de 0,2.

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

Nas figuras de 38 a 40, têm-se os gráficos de potencial zeta das partículas em função do tempo.

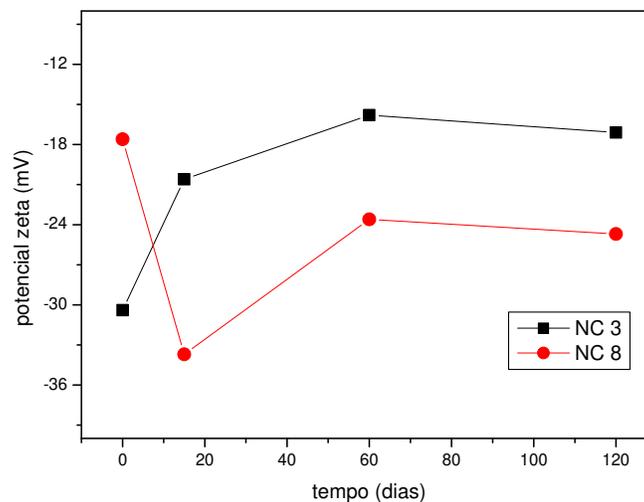


Figura 38: Potencial zeta de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.

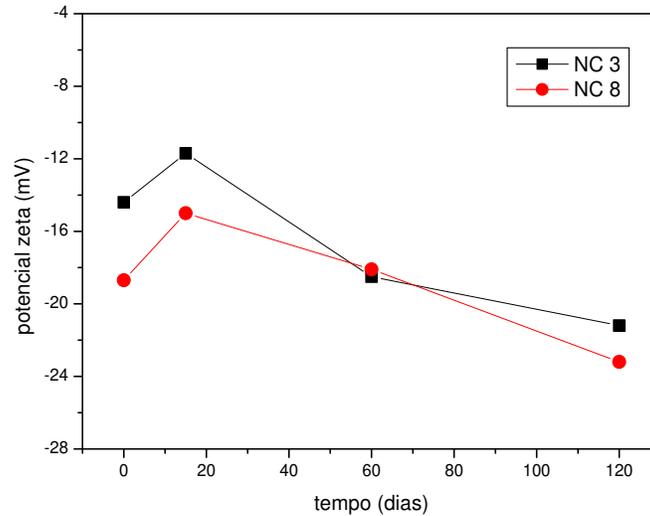


Figura 39: Potencial zeta de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PCL com BZC.

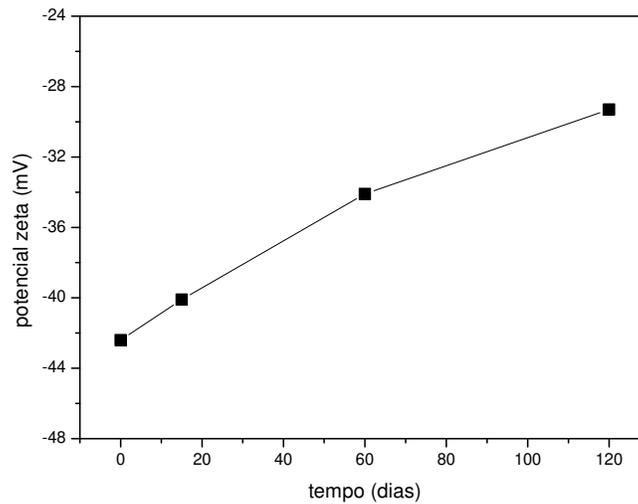


Figura 40: Potencial zeta de partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para suspensões de NC de PLGA com BVC.

A figura 38 mostra que para a formulação 3 de NC de PLGA com BZC, o valor inicial de potencial zeta foi -30,4 mV, passando para -20,6 mV até 15 dias, -15,8 mV em 60 dias, mantendo-se constante em até 120 dias. Já para a formulação 8, o valor inicial de potencial zeta foi de -17,6 mV, mudando para -33,7 mV em 15 dias e para -18,5 mV em 60 dias, mantendo-se constante em até 120 dias. Em módulo, quanto maior o valor de potencial zeta, mais estável a suspensão de nanopartículas.

A figura 39 indica que em ambas formulações de NC de PCL com BZC, observou-se melhora dos valores de potencial zeta em função do tempo, como pode ser observado na figura 39. Os valores de potencial zeta variaram de -14,4 mV iniciais para -21,2 mV em 120 dias para a formulação 3 de NC de PCL com BZC e de -18,7 mV para -23,2 mV em 120 dias.

A suspensão de NC de PLGA com BVC apresentou valor de potencial zeta inicial de -40,1 mV que mudou progressivamente, chegando a -29,3 mV em 120 dias (Figura 40). Dentre todas as formulações analisadas, esta foi a que apresentou melhor valor de potencial zeta em 120 dias de armazenamento, podendo ser considerada a mais estável das formulações estudadas.

As taxas de associação de fármaco nas nanopartículas foram avaliadas em função do tempo, como se pode observar nas figuras de 41 a 43.

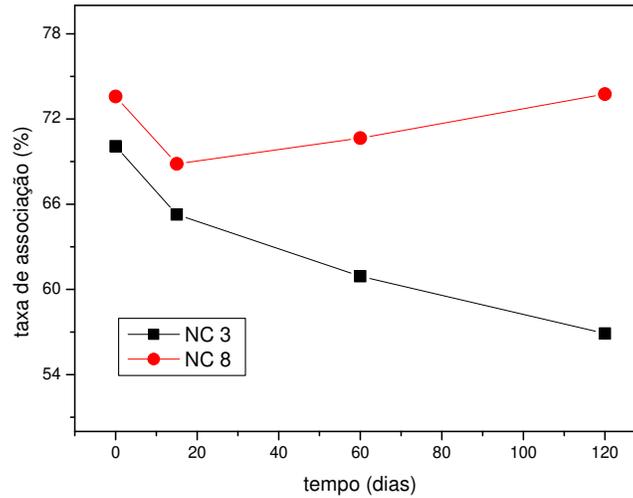


Figura 41: Taxa de associação (%) do fármaco nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.

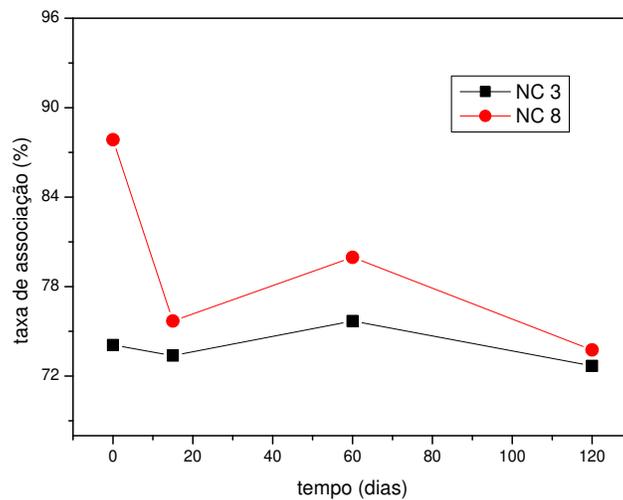


Figura 42: Taxa de associação (%) do fármaco nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PCL com BZC.

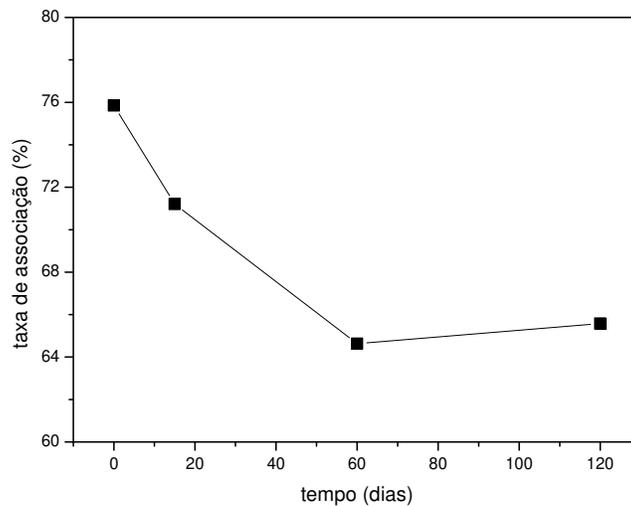


Figura 43: Taxa de associação (%) do fármaco nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para suspensão de NC de PLGA com BVC.

Segundo a figura 41, as formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC apresentaram pouca diferença na eficiência de associação de BZC nas NC, entretanto até 120 dias houve grande decréscimo na taxa de associação do fármaco na formulação 3, enquanto que na formulação 8 a taxa de associação aumentou. As variações na taxa de associação do fármaco na formulação 3 foram de 70,08% iniciais para 56,9% em 120 dias, enquanto para formulação 8 foram de 73,58% iniciais para 73,75% em 120 dias.

A partir dos resultados da figura 42, observou-se que na formulação 8 houve queda da eficiência de associação do fármaco nas NC de PCL em 120 dias, enquanto que na formulação 3 a eficiência de associação se manteve constante em até 120 dias. A taxa de associação inicial de BZC nas NC de PCL variou de 74,08 % iniciais para 72,68 % em 120 dias na formulação 3, já na formulação 8 a variação foi de 87,85 % inicial para 73,75 % em 120 dias.

Na suspensão de NC de PLGA com BVC, observou-se constante queda na taxa de associação em até 60 dias e a partir desse período houve estabilização da taxa de

associação em até 120 dias (Figura 43). A variação na taxa de associação foi de 75,85 % iniciais até 65,58% em 120 dias.

Segundo Müller e colaboradores, 2004, a queda na eficiência de associação de fármacos nas NC pode estar associada à precipitação de nanocristais de fármaco durante a formação das NC estabilizados pelos tensoativos. Estes nanocristais apresentam a mesma distribuição de diâmetro das NC e por isso não passam pela membrana utilizada no método de ultrafiltração-centrifugação. Com o tempo, esses nanocristais se agregam e precipitam e com isso a taxa de fármaco nas NC diminui.

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

Nas figuras 44 e 45, têm-se os gráficos de taxa de pH em função do tempo.

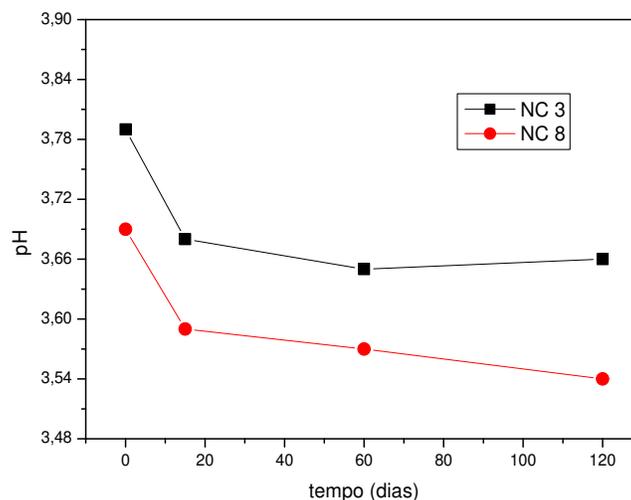


Figura 44: Valores de pH nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PLGA com BZC.

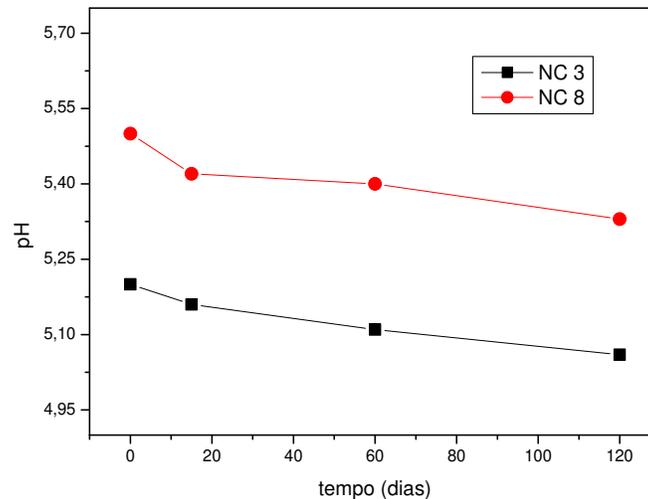


Figura 45: Valores de pH nas partículas em função do tempo (zero, 15, 60 e 120 dias) para formulações 3 e 8 de NC de PCL com BZC.

Em todas as formulações (Figuras 44 e 45), observou-se declínio nos valores de pH suspensões de NC em função do tempo. A diminuição no valor do pH pode estar associada à degradação do polímero. No caso de NC de PLGA, por exemplo, a degradação do polímero produz ácido lático livre, causando diminuição do pH (GUTERRES *et al.*, 1995). Resultados semelhantes também foram encontrados na literatura para NC de PCL, demonstrando que a hidrólise de PCL em função do tempo aumenta a concentração de grupos carboxílicos, diminuindo o pH (POHLMANN *et al.*, 2002).

4.6. Ensaio de liberação in vitro de Benzocaína e de Bupivacaína em nanocápsulas poliméricas

A liberação de fármacos a partir de NP depende de vários fenômenos, como desorção da superfície das partículas, difusão através de poros da matriz ou parede polimérica, difusão através da matriz ou parede polimérica, desintegração, dissolução e erosão da matriz ou parede polimérica (POLAKOVIC *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SONAJE *et al.*, 2007).

A investigação do perfil de liberação de fármacos de NP pode fornecer informações importantes a respeito dos mecanismos que governam a liberação de fármacos através de NP (POLAKOVIC *et al.*, 1999).

O perfil de liberação de fármacos a partir de NP depende da natureza do sistema. No caso de sistemas matriciais como as NE, onde o fármaco se encontra uniformemente distribuído na matriz polimérica, a liberação ocorre, por difusão ou erosão da matriz, seguindo cinética de primeira ordem. A rápida liberação inicial que ocorre nestes casos pode ser atribuída à porção de fármaco adsorvida na superfície das partículas. Já a liberação de fármacos através de sistemas reservatórios, como as NC é governada, preferencialmente, por difusão através da parede polimérica (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

O método de difusão do fármaco através de membrana de diálise, utilizado neste trabalho, pode ser empregado a fim de determinar o perfil de liberação do fármaco em NP. Diversos trabalhos empregam este método para este fim (VERGER *et al.*, 1998; YONCHEVA *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2005; VENKATRAMAN *et al.*, 2005; DILLEN *et al.*, 2006; SONAJE *et al.*, 2007).

Durante os estudos de eficiência de associação, a concentração total (100%) de BZC encontrada nas suspensões de NC foi de aproximadamente 3,5 mg/mL, podendo a perda de massa de fármaco ser atribuída ao processo de preparo das formulações.

Assumindo que nas suspensões de NC a concentração de BZC era de 3,5 mg/mL e, adicionou-se 1,5 mL dessas suspensões ao compartimento doador, após total liberação do fármaco em 150 mL de água (compartimento receptor), a concentração máxima esperada seria de 35 µg/mL de BZC. Sendo esta a concentração correspondente a 100% de fármaco liberado, os valores de concentração determinados a partir da curva analítica validada da BZC durante os ensaios de liberação, foram convertidos em % de BZC liberada. Os perfis de liberação da BZC a partir de NC de PLGA e PCL podem ser observados nas figuras 46 e 47, respectivamente. Em ambas figuras, são observados também, os perfis de liberação da BZC livre. Para possibilitar a solubilização da BZC livre utilizada neste ensaio, utilizou-se solução aquosa contendo 5% de etanol.

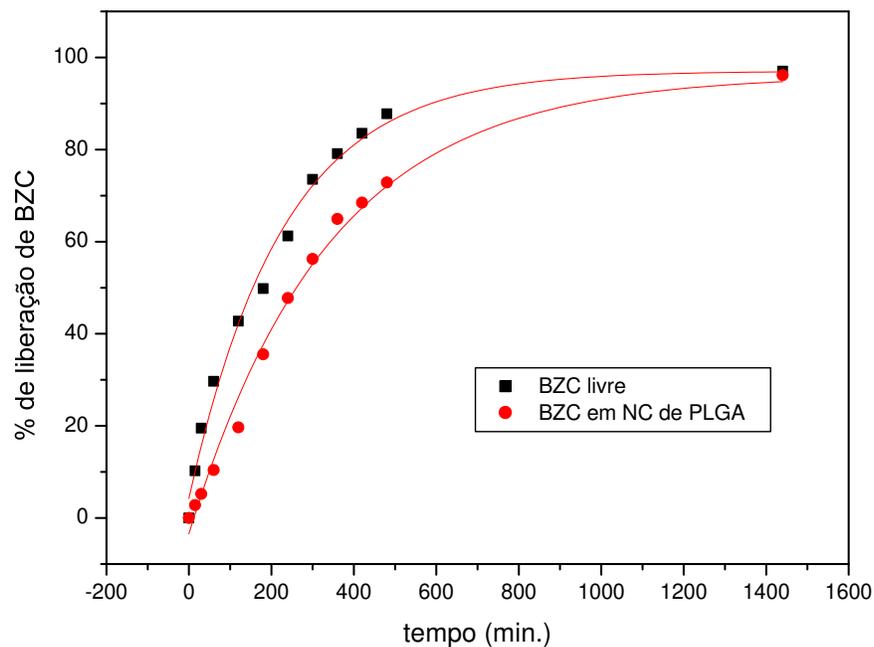


Figura 46: Perfil de liberação da BZC livre e a partir de NC de PLGA em função do tempo.

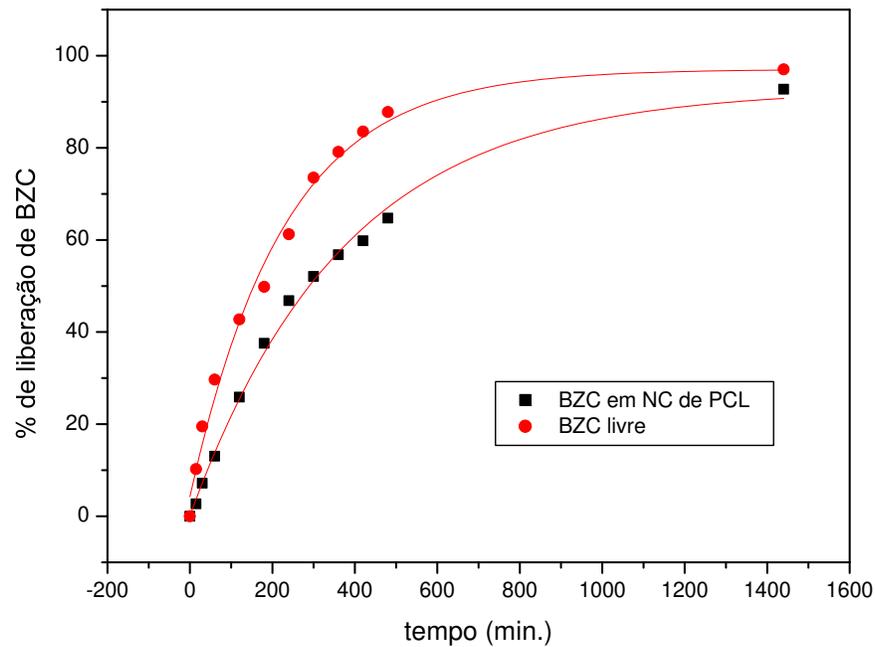


Figura 47: Perfil de liberação da BZC livre e a partir de NC de PCL em função do tempo.

Os perfis de liberação da BZC livre e BZC em NC poliméricas seguiram cinética de primeira ordem. Este modelo mostrou-se adequado, uma vez que os perfis de liberação de BZC em NC de PLGA e BZC livre ajustados à cinética de primeira ordem apresentaram R^2 de 0,9926 e 0,9918, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos para a liberação de BZC a partir de NC de PCL que apresentou R^2 de 0,9965.

A fim de verificar se as diferenças entre as concentrações de BZC em todos os tempos dos ensaios de liberação de BZC livre e BZC em NC de PLGA e PCL, são estatisticamente significativas, realizou-se ANOVA. Esses resultados podem ser observados nas tabelas 29 e 30.

Tabela 29: Concentrações médias de BZC obtidas a partir dos ensaios de liberação de BZC livre e BZC em NC de PLGA (n=3)

Tempo (min.)	[BZC] livre ($\mu\text{g/mL}$)	[BZC] em NC de PLGA ($\mu\text{g/mL}$)	p^*
15	3,59 \pm 1,45	0,98 \pm 0,05	0,02104
30	6,83 \pm 1,25	1,83 \pm 0,02	0,00155
60	10,39 \pm 0,33	3,64 \pm 0,03	0,00004
120	14,96 \pm 0,01	6,88 \pm 0,79	0,00005
180	17,43 \pm 0,20	12,44 \pm 0,03	0,00005
240	21,43 \pm 0,33	16,72 \pm 0,20	0,00036
300	25,74 \pm 1,23	19,68 \pm 0,34	0,00112
360	27,69 \pm 0,74	22,73 \pm 0,25	0,00099
420	29,23 \pm 0,78	23,97 \pm 0,09	0,00061
480	30,72 \pm 0,26	25,50 \pm 0,87	0,00105
1440	33,97 \pm 0,31	33,65 \pm 0,59	0,60121

* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

A partir dos resultados apresentados na tabela 29, observou-se que as concentrações médias de BZC liberadas a partir de NC de PLGA são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) das concentrações de BZC obtidas com o ensaio de BZC livre entre o período de 15 a 480 minutos. Resultados semelhantes foram obtidos para a liberação de BZC a partir de NC de PCL (Figura 30).

Tabela 30: Concentrações médias de BZC obtidas a partir dos ensaios de liberação de BZC livre e BZC em NC de PCL (n=3)

Tempo (min.)	[BZC] livre (µg/mL)	[BZC] em NC de PCL (µg/mL)	p *
15	3,59 ± 1,45	0,95 ± 0,04	0,01998
30	6,83 ± 1,25	2,51 ± 0,02	0,00269
60	10,39 ± 0,33	4,56 ± 0,03	0,00007
120	14,96 ± 0,01	9,05 ± 0,03	0,00000
180	17,43 ± 0,20	13,15 ± 0,03	0,00010
240	21,43 ± 0,33	16,39 ± 0,23	0,00030
300	25,74 ± 1,23	18,23 ± 1,05	0,00099
360	27,69 ± 0,74	19,87 ± 0,20	0,00015
420	29,23 ± 0,78	20,94 ± 0,30	0,00016
480	30,72 ± 0,26	22,66 ± 0,07	0,00002
1440	33,97 ± 0,31	32,45 ± 0,64	0,05463

* Resultados obtidos com 95,0% de confiança

Os resultados apresentados nas figuras 46 e 47 e tabelas 29 e 30 mostram que a liberação de BZC a partir de NC de PLGA e de PCL ocorre de maneira mais lenta se comparada à liberação da BZC livre. Essa diferença no perfil de liberação pode ser atribuída aos mecanismos de liberação das NC, que inicialmente, provavelmente, está ocorrendo por desorção do fármaco da superfície da nanopartícula polimérica e em seguida é mantida por difusão do fármaco através da parede polimérica (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A liberação de BZC a partir de NC de PLGA e de PCL apresentou perfil semelhante, entretanto, a liberação a partir de NC de PCL ocorreu mais lentamente. Isso ocorreu, pois a natureza do polímero pode influenciar na liberação do fármaco.

Sabendo-se que a PCL apresenta degradação mais lenta que o PLGA, este pode ser um importante fator responsável por tornar a liberação de fármacos a partir de NC de PCL mais lenta (SONAJE *et al.*, 2007). Além disso, a PCL apresenta caráter mais hidrofóbico que o PLGA, favorecendo maior interação com o fármaco, também hidrofóbico, diminuindo a velocidade de liberação.

Não foi possível realizar ensaios de liberação *in vitro* para a suspensão de NC de PLGA contendo BVC devido à sensibilidade da metodologia analítica que não permitiu a quantificação da BVC em ensaios sob condições *sink*.

Conhecer o perfil de liberação de fármacos é importante para direcionar o desenvolvimento de formulações objetivando obtenção de propriedades desejáveis. No caso de anestésicos locais, buscam-se perfis de liberação lentos e continuados, capazes de aumentar o tempo de atividade anestésica e diminuir os efeitos tóxicos.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu a obtenção de diversas informações importantes a respeito do desenvolvimento de formulações contendo NC de PLGA e PCL com os anestésicos locais BZC e BVC a partir do método de deposição interfacial de polímeros pré-formados.

A partir do planejamento fatorial 2^{4-1} foi possível otimizar as condições de preparo das NC poliméricas, estimando as concentrações ideais de polímero, óleo e tensoativo para obtenção de NC com propriedades satisfatórias de diâmetro, polidispersão, potencial zeta e eficiência de associação, bem como avaliar a influência de cada um desses fatores sobre as propriedades das NC.

As suspensões de NC poliméricas contendo anestésicos locais apresentaram boa estabilidade físico-química em função do tempo quanto ao diâmetro, polidispersão, potencial zeta, pH e eficiência de associação.

A cinética de liberação de BZC a partir de NC poliméricas se mostrou mais lenta e sustentada se comparada à cinética de liberação da BZC livre, podendo esta característica favorecer o aumento do tempo da atividade anestésica e diminuição da toxicidade, que são as principais características desejáveis para os anestésicos locais.

Os resultados apresentados neste trabalho são referentes a etapas iniciais do desenvolvimento de novas formulações nanotecnológicas que visam à obtenção de sistemas carreadores com propriedades adequadas, estabilidade físico-química, segurança (baixa toxicidade) e que promovam a melhora das propriedades terapêuticas dos anestésicos locais. Os resultados abrem perspectivas para estudos pré-clínicos e clínicos, uma vez que os resultados mostraram-se bastante promissores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. **J. Control. Release**, v. 100, p. 5-28, 2004.

ALBRIGHT, G. A. Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine and bupivacaine. **Anesthesiol.**, v. 51, p. 285-287, 1979.

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

ALLÉMANN, E.; LEUROUX, J-C.; GURNY, R.; DOELKER, E. In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. **Pharm. Res.**, v. 10, p. 1732-1737, 1993.

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

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

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Editora da Unicamp, Campinas, 2007.

BHAVSAR, D. M.; TIWARI, S. B.; AMIJI, M. M. Formulation optimization for the nanoparticles-in-microsphere hybrid oral delivery system using factorial design. **J. Control. Release**, v. 110, p. 422-430, 2006.

BLANCO, M. D.; ALONSO, M. J. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 43, p.287-294, 1997.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **Int. J. Pharm.**, v. 280, p. 241-25, 2004.

BRASIL, Anvisa, Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003.

BREUNIG, M.; BAUER, S.; GOEPFERICH, A. Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting? **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 68, p. 112-128, 2008.

BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. **Int. J. Pharm.**, v. 336, p. 367-375, 2007.

BUTTERWORTH, J. F.; BROWNLOW, R. C.; LEITH, J. P.; PRIELIPP, R. C.; COLE, L. R. Bupivacaine inhibits cyclic-3',5'-adenosine monophosphate production: A possible contributing factor to cardiovascular toxicity. **Anesthesiol.**, v. 79, p. 88-95, 1993.

CANGIANI, L. H.; CANGIANI, L. M.; PEREIRA, A. M. S. A. Bupivacaína com Excesso Enantiomérico (S75-R25) a 0,5%, bupivacaína racêmica a 0,5% e lidocaína a 2% no bloqueio do nervo facial pela técnica de O'Brien: estudo comparativo. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 57, p. 136-146, 2007.

CASATI, A.; SANTORSOLA, R.; ALDEGHERI, G.; RAVASI, F.; FANELLI, G.; BERTI, M.; FRANCHINI, G.; TORRI, G. Intraoperative epidural anesthesia and postoperative analgesia with levobupivacaine for major orthopedic surgery: a double-blind, randomized comparison of racemic bupivacaine and ropivacaine. **J. Clin. Anesth.**, v. 15, p. 126 – 131, 2002.

CASTLE, N. A. Bupivacaine inhibits the transient outward K^+ current but not the inward rectifier in rat ventricular myocytes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 255, p. 1038-1046, 1990.

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

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

CEREDA, C. M. S., TÓFOLI, G. R., DE ARAUJO, D. R., ARANA, S., de PAULA, E. Local Neurotoxicity Evaluation of Bupivacaine-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex In the rat sciatic Nerve. **Reg. Anesth. Pain Méd.**, v.33, p.62-62, 2008.

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

CLARKSON, C. W.; HONDEGHEM, L. M. Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: Fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. **Anesthesiol.**, v. 62, p. 396-405, 1985.

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

COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**, Campinas: Ed. Unicamp, 2007.

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

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

COX, B; DURIEUX, M. E.; MARCUS, M. A. E. Toxicity of local anesthetics. **Best Pract. Res. Clin. Anesthesiol.**, v. 17, p. 111-136, 2003.

DAVID, J. S.; FERRETI, C.; AMOUR, J.; VIVIEN, B.; EVE, O.; PETIT, P.; RIOU, B.; GUEUGNIAUD, P. Y. Effects of bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine on myocardial relaxation. **Can. J. Anesth.**, v. 54, p. 208-217, 2007.

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

de ARAÚJO, D. R.; CEREDA, C. M. S.; BRUNETTO, G. B.; PINTO, L. M. A.; SANTANA, M. H. A.; de PAULA, E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. **Can. J. Anesth.**, v. 51, 566-572, 2004.

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

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

ARAÚJO, D. R.; TSUNEDA, S. S.; CEREDA, C. M. S.; CARVALHO, F. G. F.; PRETÉ, P. S. C.; FERNANDES, S. A.; YOKAICHIYA, F.; FRANCO, M. K. K. D.; MAZZARO, I.; FRACETO, L. F.; BRAGA, A. F. A.; DE PAULA, E. Development and pharmacological

evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 33, p. 60-71, 2008.

de ARAÚJO, D. R.; CEREDA, C. M. S.; BRUNETTO, G. B.; VOMERO, V. U.; PIERUCCI, A.; SANTO NETO, H.; DE OLIVEIRA, A. L. R.; FRACETO, L. F.; BRAGA, A. F. A.; de PAULA, E. Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the local anesthetic Ropivacaine. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 60, p.1449-1457, 2008.

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

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

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

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

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

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

ERMER, J. ; MILLER, H. M. **Method validation in pharmaceutical analysis**. Wiley-VCH, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

GOODMAN, A. G.; GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9.ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996.

GÖRNER, T.; GREF, R.; MICHENOT, D.; SOMMER, F.; TRAN, M. N.; DELLACHERIE, E. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix. **J. Control. Release**, v. 57, p. 259–268, 1999.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **J. Control. Release**, v. 57, p. 171–185, 1999.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA–PEG Nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 199, p. 95–110, 2000.

GRANT, G. J.; BANSINATH, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Reg. Anesth. Pain Med.**, v. 26, p. 61-63, 2001.

GRANT, S. A. The Holy Grail: long-acting local anaesthetics and liposomes. **Best Pract. Res. Clin. Anaesth.**, v. 16, p. 345-352, 2002.

GUPTA, S. P. Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. **Chem. Rev.**, v. 91, p. 1109-1119, 1991.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac : I. Formulation and stability study. **Int. J. Pharm.**, v. 113, p. 57-63, 1995.

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

HORLOCKER, T. T.; WEDEL, D. J. Local Anesthetic Toxicity—Does Product Labeling Reflect Actual Risk? **Reg. Anesth. Pain Med.**, v. 27, p. 562-567, 2002.

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

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

KAYSER, O. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. **Curr. Pharm. Biotechnol.** v. 6, p. 3-5, 2005.

KAZAKEVICH, Y.; MCNAIR, H. Textbook on high performance liquid chromatography (HPLC), 2000. Disponível em http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/index.html. Acesso em 05 jun. 2008.

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

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

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

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

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

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. Rima Editora, São Carlos, SP, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MUNDARGI, R. C.; BABU, V. R.; RANGASWAMY, V.; PATEL, P.; AMINABHAVI, T. M. Nano/micro Technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and derivatives. **J. Control. Release**, v. 125, p. 193-209, 2008.

MURAKAMI, H.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. **Int. J. Pharm.**, v. 187, p. 143-152, 1999.

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

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

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P.; Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quím. Nova**, v. 27, p. 131-138, 2004.

PATTY, P. J.; FRISKEN, B. Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data. **Appl. Optics**, v. 45, p. 2209-2216, 2006.

PAAVOLA A.; YLIRUUSI, J.; KAJIMOTO, Y.; KALSO, E.; WAHLSTRÖM, T.; ROSENBERG, P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 1997-2002, 1995.

PICOS, D. R.; CARRIL, M. G.; MENA, D. F.; FUENTE, L. N. Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. **Rev. Cubana Farm.**, v. 34, p. 70-77, 2000.

PINTO, L. M.; FRACETO, L. F.; SANTANA, M. H. A.; PERTINHEZ, T. A.; JUNIOR, S. O.; de PAULA, E. Physicochemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes. **J. Pharm. Biomed. Analysis**, v. 39, p. 956–963, 2005.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Sprayed-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability and nanostructure models. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 16, p. 305-312, 2002.

POLAKOVIC, M.; GORNER, T.; GREF, R.; DELLACHERIE, E. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres II. Modelling of drug release. **J. Control. Release**, v. 60, p. 169-177, 1999.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; FESSI, H.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D-L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. **Int. J. Pharm.**, v. 143, p.133-141, 1996.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**, 5.ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, SW. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

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

RENEHAN, E. M.; ENNEKING, K.; VARSHNEY, M.; PARTCH, R.; DENNIS, D. M.; MOREY, T. E. Scavenging nanoparticles: an emerging treatment for local anesthetic toxicity. **Reg. Anesth. Pain Med.**, v. 30, p. 380-384, 2005.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

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

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

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: A bala mágica acertou? **Quím. Nova**. v. 25, p. 1181-1185, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

TORRES, M. L. A. Toxicidade dos anestésicos locais: o debate continua! **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 56, p. 339-342, 2006.

UDELSMANN, A; LORENA, S. E. R. S.; GIRIOLI, S. U.; SILVA, W. A.; MORAES, A. C. Efeitos hemodinâmicos da intoxicação aguda com bupivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50%. estudo experimental em suínos. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 57, p. 63-73, 2007.

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

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

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

YONCHEVA, K.; VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Influence of process parameters of high-pressure emulsification method on the properties of pilocarpine-loaded nanoparticles. **J. Microencaps.** v. 20, p. 449-458, 2003

WRIGHT, R. O.; LEWANDER, W. J.; WOOLF, A. D. Methemoglobinemia: Etiology, pharmacology, and clinical management. **Ann. Emerg. Med.**, v. 34, p. 646-656, 1999.

