



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

GUSTAVO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PARA BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO
(S75:R25)

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NANOSTRUCTURED LIPID
CARRIERS FOR ENANTIOMERIC EXCESS (S75:R25) BUPIVACAINE

CAMPINAS

2017

GUSTAVO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS PARA BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO
(S75:R25)

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NANOSTRUCTURED LIPID
CARRIERS FOR ENANTIOMERIC EXCESS (S75:R25) BUPIVACAINE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na Área de Bioquímica

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in fulfillment of the requirements for the degree of Master in functional and molecular biology, in the area of Biochemistry

Orientadora: Dra. ENEIDA DE PAULA

Co-orientadora: Dra. MÁRCIA CRISTINA BREITKREITZ

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO GUSTAVO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. ENEIDA DA PAULA.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, G.H.R.S.; FAPESP, 2014/14457-5
ORCID: <http://orcid.org/http://orcid.org/00>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

R618p Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique, 1981-
Preparo e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados para bupivacaína em excesso enantiomérico (S75:R25) / Gustavo Henrique Rodrigues da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Eneida de Paula.

Coorientador: Márcia Cristina Breitreitz.

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

1. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 2. Anestésicos locais. 3. Planejamento fatorial. 4. Bupivacaína. I. Paula, Eneida de. II. Breitreitz, Márcia Cristina. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development and characterization of nanostructured lipid carriers for enantiomeric excess (S75:R25) of bupivacaine

Palavras-chave em inglês:

Nanostructured lipidic carriers

Local anesthetics

Experimental design

Bupivacaine

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Eneida de Paula [Orientador]

Adriana Raffin Pohlmann

Juliana Cama Ramacciato

Data de defesa: 17-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 17 de julho de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Eneida de Paula

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Profa. Dra. Juliana Cama Ramacciato

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Aos meus pais, Valdir e Arlete

Um processo educativo, de fato, é realmente válido se consegue colocar o indivíduo nas condições de poder exprimir o melhor de si, afirmar a própria originalidade, auto renovar-se incessantemente, servir-se do próprio pensamento, colocar-se problemas, afrontar situações novas, viver autenticamente os problemas do próprio tempo (...) é um processo nunca realizado definitivamente

Guido Giugni

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Eneida, por me aceitar em seu grupo, pela sua dedicação e amor a ciência - que me encanta - e por me formar em tantas coisas além da bioquímica, através de sua conduta.

À minha coorientadora, professora Márcia, que me acolheu, ensinou e despertou interesses em outras áreas da química. Professora, é muito bom ver você, uma jovem professora, com empenho em ensinar, fazer pesquisa, sempre interessada, disponível e muito capacitada.

À Unicamp por me proporcionar um local de excelência em pesquisa, disponibilidade de meios para minha formação; ao CNPq pela bolsa de estudos e à FAPESP, pelo auxílio financeiro. Agradecimento a empresa farmacêutica Cristália Ltda. Pela doação da bupivacaína em excesso enantiomérico.

Agradeço ao grupo *Biomembranas*: Vivi, Verônica, Simone e Juliana que me ajudam, apoiam e ensinam! Principalmente por dividirem comigo a alegria de fazer ciência mesmo nas dificuldades de nosso país!

Agradeço à Lígia, pós doutoranda, que foi a primeira a me acolher e inserir no grupo. Lígia, muito obrigado por me ensinar e compartilhar sua formação, alegria e capacidade em fazer ciência e principalmente pela paciência!!!

Agradeço aos técnicos do departamento, Márcio, Paulinho e Juliana, sempre disponíveis para ajudar-nos.

Agradeço à Mara, minha querida amiga, por toda ajuda: palavras aqui neste seriam pouco para agradecer tudo o que você me ajuda! Muito obrigado!

Agradeço aos amigos e ex-colegas do IQ, principalmente Micheli e Rinaldo. Obrigado pelas ajudas, partilhas, risadas, é muito bom tê-los em minha história de vida.

Aos amigos “MKY”, Rena, Mônica, Juliana e Prof. Dra. Larissa (rsrs) pela ajuda, amizade, partilhas e risadas. Trazem sempre esperança nas dificuldades! “um amigo leva a gente pra longe, mesmo que a gente se esconde, silêncio e abraço fazem viver, fazem a gente renascer...”

À minha família, meus pais Valdir e Arlete, minha irmã Valéria e meu cunhado Rodrigo. Nestes dois anos de mestrado vi como o AMOR constrói e guia nossas vidas. Muito obrigado pelo apoio sem medidas!

RESUMO

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO (S75:R25)

O baixo tempo de ação e toxicidade sistêmica dos anestésicos locais (AL) limitam sua aplicação clínica. Bupivacaína é o AL mais frequentemente usado em procedimentos cirúrgicos, no mundo. A descoberta que o seu enantiômero S(-) é menos tóxico que o R(+), levou a introdução no mercado de produtos com excesso enantiomérico (bupivacaína S75:R25, aqui representada por BVC_{S75}). Porém, o tempo de ação da bupivacaína ainda é curto; para superar isto, BVC_{S75} foi encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC). Este trabalho apresenta o desenvolvimento de uma formulação usando métodos quimiométricos de planejamento experimental para estudo dos componentes da formulação e espectroscopia Raman de imagem, para estudar a miscibilidade dos lipídios sólidos e líquidos. A formulação selecionada de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo bupivacaína S75:R25 (NLC_{BVC}) mostrou-se físicoquimicamente estável, por 12 meses à temperatura ambiente, em relação ao tamanho de partículas, índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta e eficiência de encapsulação. A caracterização por DSC, XDR e MET confirmou a encapsulação da BVC_{S75} na matriz lipídica, sem mudanças na estrutura das nanopartículas. No estudo de liberação *in vitro* as NLC prolongaram o tempo de liberação do AL para 28 h, e no teste de efeito anestésico *in vivo* o tempo de ação duplicou em relação à BVC_{S75} livre. Além de melhorar o tempo de ação, não foi encontrada diferença estatística significativa no bloqueio do nervo ciático de ratos entre NLC_{BVC} 0,125% e BVC_{S75} 0,5%. Assim, a formulação permite a redução da dose de anestésico, diminuindo a toxicidade sistêmica da bupivacaína, e abrindo novas possibilidades para futuras aplicações clínicas.

Descritores: Carreadores lipídicos nanoestruturados, anestésico local, planejamento fatorial, bupivacaína.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR ENANTIOMERIC EXCESS (S75:R25) BUPIVACAINE

The short time of action and systemic toxicity of local anesthetics limit their clinical application. Bupivacaine is the most frequently used local anesthetic in surgical procedures worldwide. The discovery that its S(-) enantiomeric form is less toxic than the R(+) form led to the introduction of products with enantiomeric excess (S75:R25 bupivacaine) in the market. Nevertheless, the time of action of bupivacaine is still short; to overcome that, S75:R25 bupivacaine (BVC_{S75}) was encapsulated in nanostructured lipid carriers (NLC). In this work, we report the development of a formulation, using Chemometric tools (experimental design) to study the formulation factors, and Raman mapping associated with classical Least Squares (CLS) to study the miscibility of solid and liquid lipids. The selected formulation of nanostructured lipid carriers containing bupivacaine S75:R25 (NLC_{BVC}) was found stable for 12 months under ambient temperature, regarding particle size, polydispersion, Zeta potential and encapsulation efficiency. Its characterization by DSC, XDR and TEM confirmed the encapsulation of BVC_{S75} in the lipid matrix, without changing the nanoparticles structure. Encapsulation of BVC_{S75} in the nanoparticles prolonged its *in vitro* release for up to 28 h. The *in vivo* analgesic effect elicited by NLC_{BVC} was twice that of free BVC_{S75}. Besides improving the time of action, no statistical difference in the blockage of the sciatic nerve of rats was found between 0.125% NLC_{BVC} and 0.5% free BVC_{S75}. Therefore, the formulation allows a reduction in the required anesthesia dose, decreasing the systemic toxicity of bupivacaine, and opening up new possibilities for different clinical applications.

Keywords: nanostructured lipid carriers, local anesthetic, experimental design, bupivacaine, drug-delivery.

LISTA DE ABREVIACOES

AL	ANESTÉSICOS LOCAIS
AUC	ÁREA SOB A CURVA
BVC _{S75}	BUPIVACAÍNA (S75:R25)
CP	PALMITATO DE CETILA (LIPÍDIO SÓLIDO)
CAP	CAPRYOL® 90 (LIPÍDIO LÍQUIDO)
CLAE	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
DDS	SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS (<i>DRUG-DELIVERY SYSTEMS</i>)
DP	DESVIO PADRÃO
DLS	ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ
DSC	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA
XDR	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X
EE	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO
LD	LIMITE DE DETECÇÃO
LL	LIPÍDIO LÍQUIDO
LS	LIPÍDIO SÓLIDO
LQ	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO
MIG	MIGLIOL (LIPÍDIO LIQUIDO)
MPE	MÁXIMO EFEITO POSSÍVEL
NLC	CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS
NLC _{BVC}	CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COM BUPIVACAÍNA S75:R25
NTA	ANÁLISE POR RASTREAMENTO DE PARTÍCULAS
P68	PLURONIC® F-68 (SURFACTANTE)
PDI	ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO
PRE	PRECIROL® ATO 5 (LIPÍDIO SÓLIDO)
PWPT	TESTE DE PRESSÃO NA PATA (<i>PAIN WITHDRAW PAW TEST</i>)
ZP	POTENCIAL ZETA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	CONCEITOS E HISTÓRICO DE ANESTÉSICOS LOCAIS	13
1.2	BUPIVACAÍNA S75:R25 (BVC _{S75}).....	15
1.3	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS	16
1.3.1	Sistemas de liberação sustentada desenvolvidos com bupivacaína	17
1.4	NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS	19
1.4.1	Composição lipídica dos NLC produzidos neste projeto	22
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	MATERIAIS	26
3.1.1	Reagentes	26
3.1.2	Equipamentos.....	26
3.2	MÉTODOS.....	27
3.2.1	Preparação da forma básica da bupivacaína S75:R25.....	27
3.2.2	Quantificação de bupivacaína por CLAE e validação da metodologia.....	27
3.2.3	Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo bupivacaína	29
3.2.4	Espectroscopia Raman de Imagem	29
3.2.5	Otimização dos carreadores lipídicos por análise fatorial.....	31
3.2.6	Caracterização físico-química dos NLC	31
3.2.7	Avaliação da atividade antinociceptiva in vivo	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	QUANTIFICAÇÃO DA BUPIVACAÍNA POR CLAE.....	37
4.2	TESTES PRELIMINARES PARA ESCOLHA DOS LIPÍDIOS	40
4.2.1	Teste Preliminar 1: Formulações com diferentes tipos de lipídios	40
4.2.2	Teste Preliminar 2: Miscibilidade da mistura física dos lipídios, avaliada por Espectroscopia Raman de imagens	41
4.3	OTIMIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	45
4.3.1	Interpretação das respostas obtidas NLC _{BVC}	47
4.4	ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES.....	57
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	58
4.6	ANÁLISES DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	59

4.7	ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (XDR).....	61
4.8	ENSAIOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO IN VITRO.....	62
4.8.1	Análise do mecanismo de liberação do fármaco, a partir dos NLC.....	64
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA IN VIVO	65
5	CONCLUSÕES.....	69
6	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXO 1.....	78
	ANEXO 2.....	79
	ANEXO 3.....	80
	ANEXO 4.....	82
	ANEXO 5	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONCEITOS E HISTÓRICO DE ANESTÉSICOS LOCAIS

Iniciar uma pesquisa com anestésico local, antes de tudo, é estar inserido dentro de uma problemática comum a muitos organismos vivos: a dor. Também é lógico afirmar que, em se tratando de algo essencial do ser humano, este, desde sempre tentou entender tal fenômeno fisiológico. De forma bem simples - através da linguagem – abstraímos, em uma só palavra (dor), algo que se manifesta de diversas formas e maneiras, através de uma única sensação. No entanto, entender o mecanismo da dor, para formar um conceito próprio para a ciência, não é uma tarefa fácil e, portanto, continua ainda em discussão (PERL, 2007).

Indicar as diferentes formas de entender este conceito ao longo do desenvolvimento histórico não é a preocupação deste trabalho, porém apresentamos um conceito contemporâneo dado pela “*International Association for the Study of Pain*” (IASP): “a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada com danos reais ou potenciais aos tecidos, ou assim percebida como dano”. Essa “experiência sensorial e emocional desagradável” justifica que nós, humanos, desde a pré-história, queiramos evitá-la.

O primeiro registro científico para controle da dor data de 7000 anos a.C., quando há descrições de procedimentos como o de trepanações no crânio, a fim de evitar a dor (NETO, 2009). A procura do ser humano em aliviar essa experiência sensorial e emocional resultou na descoberta de substâncias capazes de diminuir ou bloquear estas sensações desagradáveis. Uma importante descoberta humana foi o ópio (extraído da papoula), sendo os egípcios seus grandes comerciantes, em 300 a.C.

Após anos de desenvolvimento chegou-se a um tipo de substância capaz de realizar o bloqueio desta experiência sensorial e emocional desagradável, de forma localizada no corpo humano. Conceituou-se essas substâncias como anestésicos locais, definidos como substâncias capazes de realizar um bloqueio reversível da condução nervosa, determinando a perda das sensações, sem alterar o nível de consciência (CARVALHO, 1994).

Nieman, em 1860, utilizou o primeiro anestésico local na Medicina e Odontologia, a cocaína, isolada da *Erytroxylon coca*. Já no ano de 1880, Von Srep desenvolveu um estudo de suas propriedades farmacológicas. Os benefícios da cocaína foram bastante apreciados e a mesma logo passou a ser administrada com eficácia, em vários procedimentos médicos e odontológicos. A partir daí foram iniciadas pesquisas à procura de substitutos sintéticos para a cocaína, devido aos seus efeitos colaterais, até que Ein Horn, em 1905, sintetizou a procaína,

com a qual se iniciou a descoberta dos anestésicos locais utilizados até hoje. A Figura 1 mostra o histórico da descoberta da cocaína e de agentes anestésicos locais.

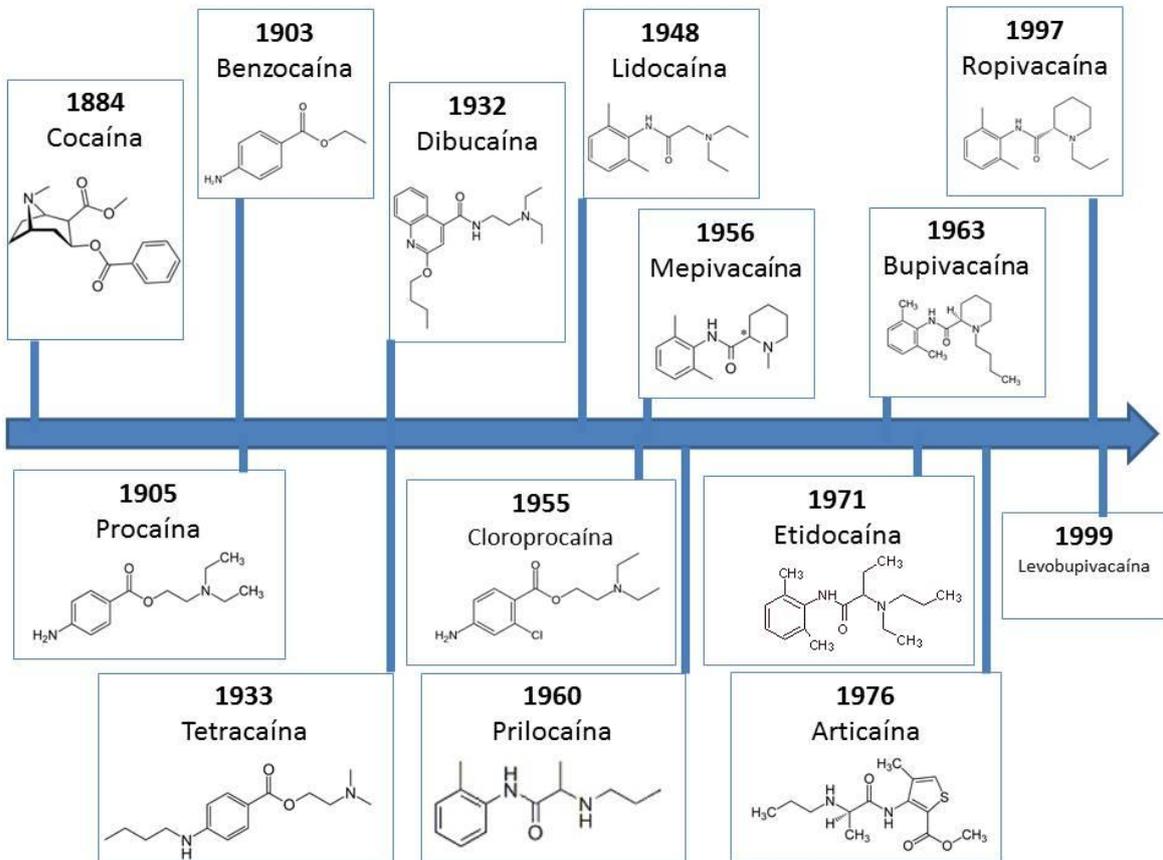


Figura 1: Panorama histórico desde a descoberta da cocaína, e síntese dos principais anestésicos locais disponíveis no mercado.

Anestésicos do grupo das amidas (dibucaína, lidocaína e todos os sintetizados depois da 1956, Figura 1) substituíram com sucesso os anestésicos do grupo éster (benzocaína, procaína, clorprocaína e tetracaína), que foram gradativamente abandonados devido ao seu potencial alergênico. Atualmente os ésteres ainda são utilizados, na anestésica tópica (da pele, mucosa e olhos). Todos os agentes anestésicos locais disponíveis na forma injetável pertencem ao grupo amida, que raramente (menos de 1% dos casos) provocam reações alérgicas (LAGAN; MCLURE, 2004). Anestésicos locais são bases fracas e, no plasma, se ligam às glicoproteínas. Os do tipo éster, sofrem rápida hidrólise no plasma por pseudocolinesterases, tendo baixo potencial de toxicidade sistêmica, mas alto risco alérgico, pela formação do ácido *p*-aminobenzoico (PABA), como metabólico desta hidrólise. Anestésicos do tipo amida possuem metabolismo hepático e, por isso, seu baixo risco a reações alérgicas (MALAMED, 2013).

A bupivacaína foi lançada no mercado em 1963, pela empresa AstraZeneca, tendo como principal característica ser um anestésico de longa duração. Porém, com o passar dos anos, observou-se que ela apresenta toxicidade cardiovascular, causada principalmente por uma de suas formas isoméricas, a dextrógira (Figura 2). Desta forma, em 1999, lançou-se a levobupivacaína, sintetizada com 100% da forma quiral menos tóxica (LYONS et al., 1998). Em 2001 foi lançada a Novabupi[®] pela empresa brasileira Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, que em parceria com a USP, desenvolveu a bupivacaína com excesso enantiomérico do isômero L (75%).

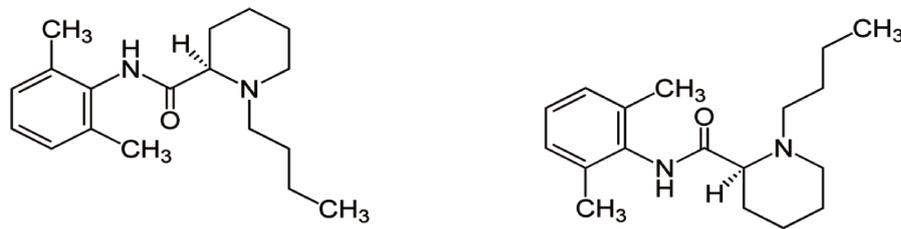


Figura 2: Formas quirais da bupivacaína. Esquerda: Dextrógira R(+) e a Direita: Levógira S(-).

1.2 BUPIVACAÍNA S75:R25 (BVC_{S75})

A bupivacaína é o anestésico local mais utilizado, mundialmente, para procedimentos cirúrgicos, como no trabalho de parto ou no período pós-operatório, sendo capaz de produzir anestesia prolongada, de 4-6 horas (LAGAN; McLURE, 2004). Esta ação duradoura e o bloqueio sensorial seletivo ao bloqueio motor tornou seu uso popular, embora relatos de toxicidade cardíaca não sejam raros (BRUNTO, 2012). Clinicamente, a cardiotoxicidade da bupivacaína manifesta-se por arritmias ventriculares graves e depressão miocárdica, após administração intravascular inadvertida de altas doses. É provável que este efeito seja atribuído aos seguintes fatores: bloqueio rápido dos canais de sódio cardíacos durante a sístole, e dissociação lenta durante a diástole, de forma que, com a bupivacaína, uma fração significativa dos canais de sódio permaneça bloqueada no final da diástole. Por este motivo o bloqueio com bupivacaína é cumulativo e substancialmente maior do que seria previsível por sua potência anestésica local (CLARKSON; HONDEGHEM, 1985).

Os efeitos adversos associados ao uso de bupivacaína levaram à busca de novos agentes com perfil de bloqueio semelhante, mas com menor toxicidade (MATHER; CHANG, 2001). Nesse contexto surgiram os agentes anestésicos locais ropivacaína e levobupivacaína – sintetizados sob a forma enantiomérica S(-), de menor toxicidade sistêmica. Assim, estudos

mostraram redução na capacidade arritmogênica e no risco de convulsões induzidos por levobupivacaína (BARDSLEY et al., 1998; OHMURA et al., 2001; PACELLA et al., 2013; SANTOS; DEARMAS, 2001), com a manutenção de propriedades anestésicas similares à bupivacaína racêmica (CHEN et al., 2016; DUGGAL; KAPOOR; MOYAL, 2015; WHITESIDE; WILDSMITH, 2001). O advento das pesquisas sobre estereoseletividade possibilitou a modificação das proporções dos estereoisômeros R(+) e S(-) da bupivacaína e a síntese de uma nova formulação anestésica local, contendo 25 % do isômero R(+) bupivacaína e 75 % do isômero S(-) bupivacaína, melhorando, assim o perfil anestésico do fármaco e aumentando sua margem de segurança (ARAÚJO et al., 2005), e foi justamente com esta mistura em excesso enantiomérico da forma S da BVC que desenvolvemos este trabalho.

1.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS

Quando da administração de fármacos, apenas uma pequena dose chega ao tecido alvo, sendo que a maior parte é inutilizada, pela sua biodistribuição e metabolização antes de atingir o tecido alvo. Além disso, alguns fármacos possuem meia vida terapêutica pequena, devendo ser administrados várias vezes. Outros fármacos possuem propriedades físico-químicas que dificultam sua administração.

Sistemas de liberação de fármacos (DDS, do inglês *drug-delivery systems*) têm como objetivo principal o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração do fármaco *in situ*, para que o benefício clínico da administração seja maximizado e os efeitos adversos minimizados (UCHEGBU; SCHATZLEIN, 2006). DDS implicam na associação, química ou física, de fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham capacidade de modular a taxa de liberação/entrega do fármaco e/ou conduzir o ativo até o sítio específico (*targeting*) em que este deve atuar. Materiais de natureza lipídica (MÜLLER; RÜHL; RUNGE, 1996a), inorgânica (GHOSH et al., 2008; SLOWING et al., 2008) e polimérica (GRILLO et al., 2010; OH et al., 2010) têm sido utilizados como suportes de DDS.

Um sistema de liberação ideal deve apresentar características mínimas, tais como: rápido alcance e manutenção da concentração terapêutica (COLLETT, 2005), deve ter capacidade de aumentar ou manter a estabilidade física e química do fármaco, e acima de tudo ser um sistema otimizado, ou seja, que garanta a eficiência, segurança e confiabilidade máximas ao medicamento (ARAÚJO et al., 2003).

1.3.1 Sistemas de liberação sustentada desenvolvidos com bupivacaína

A fim de prolongar a duração anestésica, evitar dor pós-operatória, controlar dor crônica e diminuir a toxicidade associada ao uso da bupivacaína, vários sistemas de liberação prolongada foram estudados para este anestésico local (Tabela 1).

Tabela 1: Sistemas de liberação sustentada descritos na literatura com o anestésico bupivacaína. Busca realizada no site *Science Direct* em 23/02/2016, descritores: “Bupivacaine” and “liposomal”, “hydrogel”, “polymer” em artigos de pesquisa ou revisão.

Sistema carregador	Resultados da busca	Artigos relevantes (número de citações)
Lipossoma	Artigos encontrados: 29 Ano dos artigos: 1994 - 2016	<ol style="list-style-type: none"> GRANT, Gilbert J. et al. Prolonged analgesia with liposomal bupivacaine in a mouse model. <i>Regional anesthesia</i>, v. 19, n. 4, p. 264-269, 1993. GRANT, Gilbert J. et al. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. <i>Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists</i>, v. 101, n. 1, p. 133-137, 2004. BRAMLETT, Kenneth et al. A randomized, double-blind, dose-ranging study comparing wound infiltration of DepoFoam bupivacaine, an extended-release liposomal bupivacaine, to bupivacaine HCl for postsurgical analgesia in total knee arthroplasty. <i>The Knee</i>, v. 19, n. 5, p. 530-536, 2012. CHAHAR, Praveen; CUMMINGS III, Kenneth C. Liposomal bupivacaine: a review of a new bupivacaine formulation. <i>Journal of pain research</i>, v. 5, p. 257, 2012.
Ciclodextrina	Artigos encontrados: 09 Ano dos artigos: 1996 - 2014	<ol style="list-style-type: none"> MORAES, Carolina Morales et al. Study of the interaction between S (-) bupivacaine and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin. <i>International journal of pharmaceuticals</i>, v. 331, n. 1, p. 99-106, 2007. FRÉVILLE, Jean Christophe et al. Controlled systemic absorption and increased anesthetic effect of bupivacaine following epidural administration of bupivacaine-hydroxypropyl-β-cyclodextrin complex. <i>Pharmaceutical research</i>, v. 13, n. 10, p. 1576-1580, 1996. SERPE, L. et al. Anaesthetic efficacy of bupivacaine 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin for dental anaesthesia after inferior alveolar nerve

Gel, nanogel e Hydrogel	Artigos encontrados: 09 Ano dos artigos: 2010 - 2012	<p>block in rats. 2014.</p> <ol style="list-style-type: none"> SOLIMAN, Mahmoud M.; MACKY, Tamer A.; SAMIR, M. Khaled. Comparative clinical trial of topical anesthetic agents in cataract surgery: lidocaine 2% gel, bupivacaine 0.5% drops, and benoxinate 0.4% drops. <i>Journal of Cataract & Refractive Surgery</i>, v. 30, n. 8, p. 1716-1720, 2004. COHEN, Rivka et al. Prolonged analgesia from Bupisome and Bupigel formulations: from design and fabrication to improved stability. <i>Journal of controlled release</i>, v. 160, n. 2, p. 346-352, 2012.
Microesfera	Artigos encontrados: 08 Ano dos artigos: 1994 - 2012	<ol style="list-style-type: none"> CASTILLO, Jenny et al. Glucocorticoids prolong rat sciatic nerve blockade in vivo from bupivacaine microspheres. <i>Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists</i>, v. 85, n. 5, p. 1157-1166, 1996. LE CORRE, P., et al. Preparation and characterization of bupivacaine-loaded polylactide and polylactide-co-glycolide microspheres. <i>Int. J. Pharm.</i> 107, 41–49 (1994). Zhang, H. et al. Bupivacaine-loaded biodegradable poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix and modelling of drug release. <i>Int. J. Pharm.</i> 351, 244–9 (2008).
Outros sistemas Poliméricos	Artigos encontrados: 23 Ano dos artigos: 1993 - 2014	<ol style="list-style-type: none"> GRILLO, R. et al. Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. <i>J. Drug Target.</i> 18, 688–699 (2010). Bernardo, M. V. et al. Sustained release of bupivacaine from devices based on chitosan. <i>Farmaco</i> 58, 1187-1191 (2003). JIA, X. et al. Prolongation of sciatic nerve blockade by in situ cross-linked hyaluronic acid. <i>Biomaterials</i> 25, 4797-4804 (2004). SIMAVLI, S. et al. Bupivacaine-soaked absorbable gelatin sponges in caesarean section wounds: effect on postoperative pain, analgesic requirement and haemodynamic profile. <i>Int J Obstet Anesth</i> 23, 302-308 (2014).
Liposferas e emulsões lipídicas	Artigos encontrados: 07 Ano dos artigos: 2002 - 2014	<ol style="list-style-type: none"> MASTERS, David B.; DOMB, Abraham J. Liposphere local anesthetic timed-release for perineural site application. <i>Pharmaceutical research</i>, v. 15, n. 7, p. 1038-1045,

-
1998. Toongsuwan, S., *et al.* Formulation and characterization of bupivacaine lipospheres. *Int. J. Pharm.* 280, 57–65 (2004).
2. SHI, Kejian *et al.* The effect of lipid emulsion on pharmacokinetics and tissue distribution of bupivacaine in rats. *Anesthesia & Analgesia*, v. 116, n. 4, p. 804-809, 2013.
-

Pelos dados da Tabela 1 os sistemas de liberação para bupivacaína mais estudados são o lipossomal e o polimérico. O sistema lipossomal já está no mercado, sendo utilizado principalmente onde há necessidade de controle de dor pós-operatória, além de artroscopia. Porém, o aumento do tempo da anestesia conferido pelo sistema lipossomal, não vem acompanhado da diminuição na toxicidade sistêmica causada pela bupivacaína. Em (2014), McAlvin e colaboradores, compararam uma formulação lipossomal existente no mercado (Exparel™) com uma formulação de bupivacaína não encapsulada através do bloqueio do nervo ciático em ratos, com posterior histologia dos tecidos que sofreram injeção. Esses autores chegaram à conclusão que, em relação à miotoxicidade e neurotoxicidade não foi encontrada diferença significativa entre os grupos tratados.

Desta forma, a busca por um sistema que possa, além de aumentar o tempo de anestesia, também proporcionar outros ganhos como diminuição da dose, da inflamação e da toxicidade local e sistêmica devem ser incentivada (FERLAS, 2015), reforçando a importância do presente trabalho. É interessante notar que, até a esta data, não há nenhum artigo publicado com o anestésico bupivacaína veiculado em carreadores lipídicos nanoestruturados.

1.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

Nanopartículas lipídicas constituem novos carreadores para DDS e foram desenvolvidas no começo dos anos 90 como alternativa aos sistemas de carregamento como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). Em pouco mais de 20 anos, as Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN) atraíram a atenção de muitos grupos de pesquisa com crescente número de publicações (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012; BRUGÈ *et al.*, 2015; DOKTOROVOVÁ *et al.*, 2016; PUGLIA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2017b). SLN com diâmetros médios em torno de 50 a 1000 nm, representam grande avanço nas áreas farmacêutica e cosmética (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012; ZUR MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998). Este tipo de sistema carreador une as vantagens dos sistemas

tradicionais, sem as desvantagens como a presença de solvente orgânico residual e problemas com escalabilidade (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). Elas são versáteis, usadas por várias vias de administração (oral, tópica/transdérmica, intravenosa, intramuscular, intra-ocular, intranasal, retal, intraperitoneal), utilizam excipientes seguros, são biocompatíveis e de citotoxicidade reduzida (MÜLLER; RÜHL; RUNGE, 1996a), possuem grande potencial para liberação sustentada de fármacos, boa estabilidade física, principalmente após liofilização (que garante 12–24 meses de estabilidade, na temperatura ambiente), além de serem de baixo custo e facilmente escalonáveis, o que as torna bastante atrativas para as indústrias farmacêutica e cosmética (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012; BELOQUI et al., 2016; PUGLIA et al., 2011).

SLN são a primeira geração de nanopartículas lipídicas descritas e derivadas da substituição da fase oleosa das nanoemulsões (líquida) por um lipídio sólido, à temperatura ambiente ou corporal; as partículas são estabilizadas estericamente, com uso de surfatante não iônico como copolímeros de bloco (Figura 3). Apesar das características vantajosas, SLN mostram algumas limitações, como a expulsão de fármacos durante armazenamento e eficiência de encapsulação limitada, dependente da solubilidade do fármaco no lipídio sólido (FREITAS; MÜLLER, 1998). A fim de superar essas limitações, uma segunda geração de nanopartículas lipídicas foi desenvolvida: os chamados carreadores lipídicos nanoestruturados, NLC (MULLER; SHEGOKAR; KECK, 2011).

A inovação dos NLC consiste na adição de um lipídio no estado líquido para formar a mistura de lipídios (sólidos e líquidos) que compõem o interior da partícula. A presença do óleo (lipídio líquido à temperatura ambiente) nestes carreadores favorece principalmente a eficiência de encapsulação e impede a expulsão do fármaco das partículas durante estocagem, pela redução da cristalinidade da matriz lipídica. A matriz lipídica dos NLC se caracteriza por imperfeições (em comparação com as SLN) proporcionando espaço para armazenar uma quantidade elevada de substâncias ativas (SAUPE; GORDON; RADES, 2006). Dentre as vantagens desse sistema em relação às SLN têm-se: aumento de carga e retenção de fármaco nas estruturas (devido à redução de compressão), melhor estabilidade física e liberação prolongada das moléculas ativas encapsuladas (SAUPE et al, 2005).

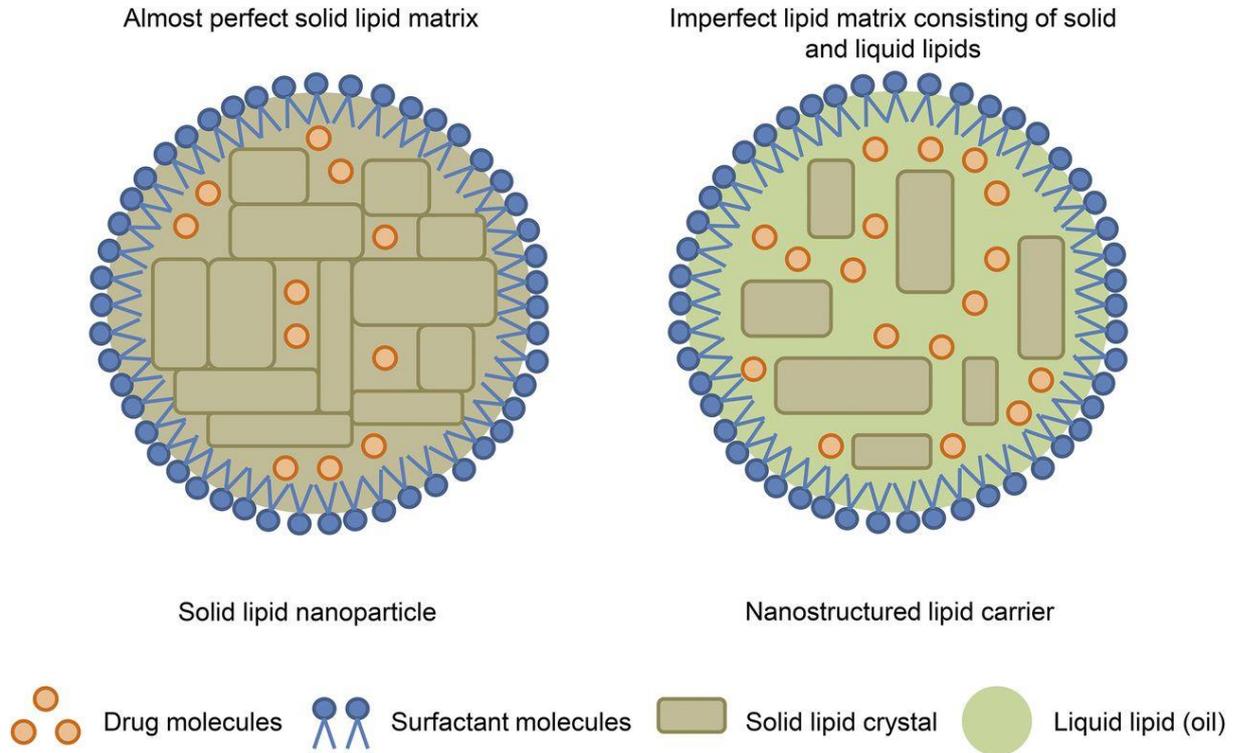


Figura 3: Representação esquemática de uma nanopartícula lipídica sólida (Solid lipid nanoparticle) e carreadores lipídicos nanoestruturados (Nanostructured lipid carrier). Fonte: *Pharmacological Reviews*, 68 (3) 701-787, 2016.

Pathak e Nagarsenker (2009) descreveram o uso de NLC (com lipídios Compritol, Precirol ATO5 e Miglyol) para encapsulação de lidocaína e Puglia e col. (2011) avaliaram os anestésicos locais benzocaína e lidocaína encapsulados em NLC (Lipídios compritol e lutrol). Em ambos os casos as nanopartículas lipídicas exibiram elevada eficiência de encapsulação, para ambos ALs, com redução da taxa de liberação *in vitro* em relação aos AL em solução aquosa. Além disso, no teste de analgesia de *Tail flick*, Puglia e colaboradores mostraram aumento no tempo de anestesia tópica da lidocaína e benzocaína, em camundongos (PUGLIA et al., 2011). Em nosso laboratório, Barbosa e colaboradores (2013) e Castro e colaboradores (2016) realizaram testes de analgesia (*tail flick*) com formulações de NLC (a base de MM/CP e Mygliol) contendo dibuicaína e tetracaína, respectivamente; em ambos os casos houve aumento significativo do tempo de anestesia, em comparação ao anestésico livre, em solução. Ribeiro e colaboradores (2017) encapsularam lidocaína em NLC produzidos com lipídios naturais e obtiveram um aumento do tempo da anestesia em relação a lidocaína livre no teste *in vivo* de *PWPT* indicando serem as NLC carreadores promissores para entrega de anestésicos locais.

1.4.1 Composição lipídica dos NLC produzidos neste projeto

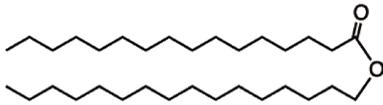
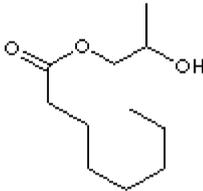
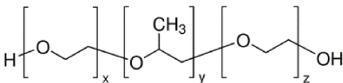
Para preparar os NLC, muitos tipos de lipídios e tensoativos podem ser utilizados. Neste projeto foi desenvolvida uma formulação com o lipídio sólido (palmitato de cetila), o lipídio líquido (Capryol[®] 90) e o tensoativo (Pluronic[®] F-68).

1.4.1.1 Palmitato de cetila (CP)

Palmitato de cetila é um composto pertencente à classe dos cetil ésteres, que são ceras sintéticas compostas de uma mistura de ésteres de ácidos graxos saturados e álcoois com cadeia carbônica de 14 a 18 carbonos. Cetil ésteres possuem composição e propriedades idênticas às ceras naturais presentes no espermacete de baleia (WENNINGER; MCEWEN; COSMETIC, 1995), sendo usados como agente emoliente/condicionante em mais de 200 formulações cosméticas e farmacêuticas, em concentrações acima de 7% (*Food and Drug Administration*, FDA, 1995). Os ésteres mais comuns nestas ceras são palmitato de cetila, estearato de cetila, miristato de miristila, miristato de cetila e o estearil estearato. Nenhum deles apresenta toxicidade sistêmica, sensibilização ou fotosensibilização, sendo seu uso indicado em formulações farmacêuticas (ELDER, 1982).

Palmitato de cetila é frequentemente utilizado como componente das nanopartículas lipídicas. Em 2000, Müller demonstrou a eficiência do CP na encapsulação e estabilidade de SLN, utilizando como fármaco modelo o anestésico tetracaína. As características deste composto estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades dos compostos empregados neste trabalho.

Estrutura Química	Nomes usuais	Fórmula Química	Massa molar (g/mol)	Temperatura de fusão
	Palmitil palmitato			
	Hexadecil hexadecanoato			
	n-Hexadecil palmitato	$C_{32}H_{64}O_2$	480,85	54°C
	Ácido palmítico n-hexadecil éster			
	Propilenoglicol monocaprilato tipo II, >90%			
	Propanodiol monocaprilato	$C_{11}H_{22}O_3$	202,29	-
	Capryol® 90			
	Copolímero bloco polioxi-etileno-polioxi-propileno	$(C_3H_6O.C_2H_4O)_x$	± 8350	54-57°C
	Pluronic® F-68			

1.4.1.2 Capryol® 90 (CAP)

Capryol 90 (Tabela 2) é o nome comercial utilizado pela empresa Gatefossé para o propileno glicol monocaprilato, um monoéster do ácido caprílico (C8) com propileno glicol (RAO et al., 2014). É utilizado principalmente em formulações auto emulsionáveis (SEDDS), melhorando a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água (BALAKRISHNAN et al., 2009; DATE; NAGARSENKER, 2007). Em NLC, Capryol 90 é um dos lipídios líquidos que pode ser utilizado, tendo o poder de solubilizar grande quantidade de fármaco. Joshi (2008) foi capaz de solubilizar oito vezes mais celecoxib em Capryol 90, em relação a uma mistura de ácidos cáprico e caprílico. Semelhantemente, Patil-Gadhe (2014) descreveu que o Capryol 90 foi um dos lipídios que mais solubilizou o fármaco Telmisartan.

1.4.1.3 Pluronic® F-68 (P68)

Pluronic®-F68 (Tabela 2) é a marca comercial utilizada pela empresa Sigma para

descrever uma classe de polímeros denominada “poloxamers” que são copolímeros tribloco, não iônicos. São compostos por uma cadeia central hidrofóbica de polioxipropileno ligados a duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno. A palavra poloxamer foi dada por seu inventor, Irving Schmolka (1973), que recebeu a patente por este material. Poloxamers são também conhecidos pelos nomes comerciais de Synperonics (Croda) ou Kolliphor (BASF). Devido a sua estrutura anfifílica, poloxamers tem propriedade surfactante, sendo úteis em várias aplicações industriais. Podem ser utilizados para aumentar a solubilidade de substâncias hidrofóbicas ou aumentar a miscibilidade de duas substâncias com diferentes hidrofobicidades. Por esta razão, são utilizados em aplicações cosméticas e farmacêuticas, sendo seu uso aprovado pelo FDA (CHIAPPETTA; SOSNIK, 2007).

Nos NLC, poloxamers são utilizados como surfactantes. Göppert e Müller, (2005), descreveram que poloxamers quando usados como agentes modificadores de superfície podem, além de promover a estabilização do sistema, aumentar o tempo de circulação das NLC *in vivo* devido à redução da ação de lipases sanguíneas, impedidas estericamente de agir sobre os lipídios, promovendo acúmulo em tecidos alvos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver (através da correta seleção da misturas e composição lipídica, utilizando ferramentas quimiométricas) e caracterizar físico-quimicamente uma formulação anestésica contendo bupivacaína com excesso enantiomérico (BVC_{S75}), encapsulada em NLC, a fim de prolongar a ação terapêutica e diminuir sua toxicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de atingir o objetivo geral, objetivos específicos para cada parte do projeto foram desenvolvidos (Figura 4).

- Pré-formulação: Escolher a mistura e composição lipídica ótima para a formulação desejada, de forma a apresentar uma alta estabilidade físico-química
- Caracterização: Caracterizar a formulação otimizada e estudar a matriz lipídica e sua encapsulação
- Estudo *in vitro*: avaliar a capacidade de liberação prolongada e a cinética de liberação
- Estudo *in vivo*: avaliar a eficiência anestésica da formulação e a diminuição da toxicidade.

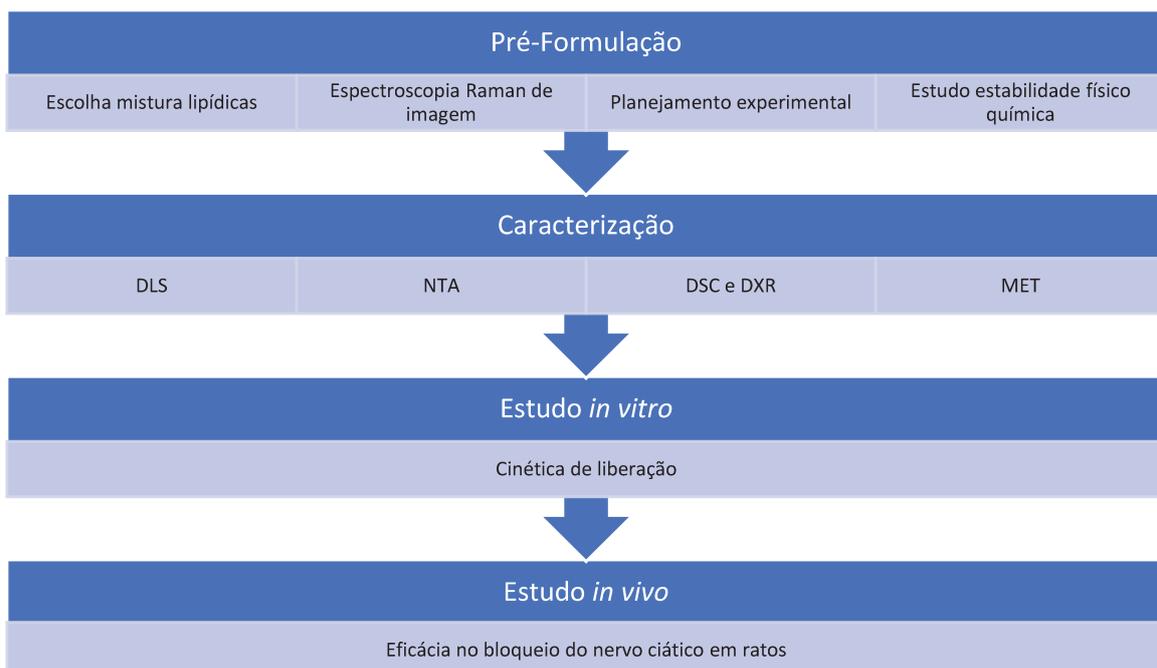


Figura 4: Fluxograma dos estudos realizados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

- Palmitato de cetila (Dhaymers Química Fina, Brasil),
- Miglyol (Dhaymers Química Fina, Brasil)
- Precirol ATO 5 (Gattefossé, França)
- Capryol 90 (Gattefossé, França)
- Compritol (Gattefossé, França)
- Bupivacaína R25:S75 (Cristália Ind. Farm. Ltda)
- Pluronic F-68 (Sigma Chem. Co., EUA)
- Acetato de uranila (Sigma-Aldrich, EUA)
- Ácido fosfórico (Labsynth Ltda, Brasil)
- Acetonitrila P.A. (Merck Millipore, Alemanha)
- Diclorometano (Labsynth Ltda, Brasil)
- Sulfato de sódio (Labsynth Ltda, Brasil)

3.1.2 Equipamentos

- Ultraturrax (T18 Basic, IKA Work, Brasil)
- Ultra-sonicador de ponta (Vibracell, Sonics Materials Inc, EUA), 20kHz
- Analisador de tamanho de partículas modelo ZetaSizer (Malvern Instruments, Reino Unido)
- Analisador de tamanho de partículas modelo NanoSight (NanoSight, Reino Unido)
- Analgesímetro (Ugo Basile, Itália)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian® Pro Star, EUA)
- Centrífuga (MC 12 V, Thermo Scientific, EUA)
- Centrífuga de tubos Falcon (Quimis, Brasil)
- Microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss – LEO 906, Alemanha)
- Banho de ultrassom (Thornton T14, Brasil),
- Medidor de pH (Modelo 300M, Analyser Instrumentação Analítica, Brasil)

- Liofilizador (Labconco, Freeze Dry System/Freezone 4,5, EUA)
- Calorímetro Diferencial de Varredura (Modelo 2910, TA Instruments, EUA)
- Espectrofotômetro de Infravermelho RAMAN (Raman Analyser Station 400, Perkin Elmer, USA)
- Difratorômetro (XRD7000, Shimadzu, Japão)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação da forma básica da bupivacaína S75:R25

10 gramas de cloridrato de bupivacaína S75:R25 foram dissolvidos em 1 litro de água e adicionados gota a gota 0,2 M NaOH, sob agitação, até pH 10,9. O precipitado formado foi lavado com água desionizada e suspenso em 200 mL de diclorometano. A fase orgânica foi lavada 2 vezes, com 40 mL de água desionizada, em funil de separação, filtrada e secada com Na₂SO₄. O diclorometano foi evaporado em rotaevaporador, obtendo-se a forma básica da bupivacaína S75:R25 (forma neutra).

3.2.2 Quantificação de bupivacaína por CLAE e validação da metodologia

A bupivacaína foi quantificada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). As condições adotadas na metodologia analítica para quantificação são dadas na Tabela 3, e foram adaptadas de Cho e col., 2012 e Moraes e col., 2008.

Tabela 3: Condições cromatográficas para quantificação da bupivacaína

Coluna	C18 Gemini-NX 5 μ 150 x 4.60 mm
Fase móvel	Acetonitrila:H ₂ O 30:70 (v/v) com 0,1% de H ₃ PO ₄
Fluxo	1 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	30 μ L
Comprimento de onda	210 nm

A validação do método analítico foi realizada pela análise dos parâmetros: precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção, especificidade, linearidade e sensibilidade.

A linearidade do método foi determinada com intuito de demonstrar que os resultados

obtidos eram proporcionais à concentração do analito na amostra, no intervalo especificado. Cinco concentrações distintas, realizadas em triplicata e em três dias consecutivos, foram utilizadas para construção da curva analítica sendo o cálculo de regressão linear feito pelo método dos mínimos quadrados (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

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

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

A precisão de um método analítico pode ser expressa como desvio padrão (coeficiente de variação, CV) de várias medidas, onde DP é o desvio padrão e CMD, a Concentração Média Determinada. Não se admitem valores de DP superiores a 5%, os quais são definidos de acordo com a metodologia empregada, com a concentração do analito na amostra, com o tipo de matriz e pela finalidade do método. A concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação é conhecida como repetibilidade (ou precisão intra-corrída). A concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, é referida como precisão intermediária (ou precisão inter-corrídas) (ANVISA, 2003).

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

$$E = \frac{CMD}{CT} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados utilizando as equações 3 e 4, respectivamente. LD refere-se à menor quantidade do analito que pode ser detectado em uma amostra, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad \text{Equação 3}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad \text{Equação 4}$$

onde DP é o desvio padrão (intercepto com o eixo y) e IC é a inclinação da curva analítica média. Através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, pode-se mensurar o limite de detecção. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra a ser determinada com precisão e exatidão admissíveis sob as condições experimentais já determinadas.

3.2.3 Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo bupivacaína

A preparação dos NLC utilizou a técnica de homogeneização por ultrasonicação. Nessa técnica, o lipídio sólido é aquecido 10°C acima de sua temperatura de fusão (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007), seguida da adição do lipídio líquido. Logo após, uma quantidade pré-determinada do fármaco BVC_{S75} é adicionada e misturada (em agitador magnético) até completa solubilização na fase oleosa. Posteriormente, para formação da pré-emulsão (O/A), a fase oleosa é adicionada a um volume adequado da solução aquosa do surfactante P68, na mesma temperatura do lipídio, sob agitação de 10000 rpm durante 3 minutos em Ultra-Turrax. A pré-emulsão, formada e mantida sob aquecimento, é rapidamente levada ao sonificador de ponta, com potência de 50 W, 20 kHz de frequência nominal em ciclos de 30 segundos (ligado/desligado) durante 30 minutos. A amostra é mantida sob aquecimento (10°C acima da temperatura de fusão dos respectivos lipídios) durante todo o processo. Passados os 30 minutos, a nanoemulsão é rapidamente resfriada em banho de gelo até atingir 25°C. Ao final das preparações, todas as amostras foram armazenadas para caracterizações posteriores.

3.2.4 Espectroscopia Raman de Imagem

A espectroscopia Raman se baseia no espalhamento inelástico da radiação (PATNAIK, 2004), com incidência de fótons na região do visível ou do infravermelho próximo (NIR). Enquanto na espectroscopia pontual se obtém um espectro por amostra, na espectroscopia de imagem são obtidos vários espectros por amostra, permitindo a obtenção de informações sobre a distribuição espacial dos constituintes da mesma. A superfície da amostra é dividida em várias sub-unidades, denominadas pixels. É realizada então uma varredura na amostra, coletando-se

um espectro em cada pixel, gerando o hipercubo espectral (Figura 5), onde x e y representam as dimensões espaciais (“posição da amostra”), enquanto λ reflete as variáveis (espectros Raman).

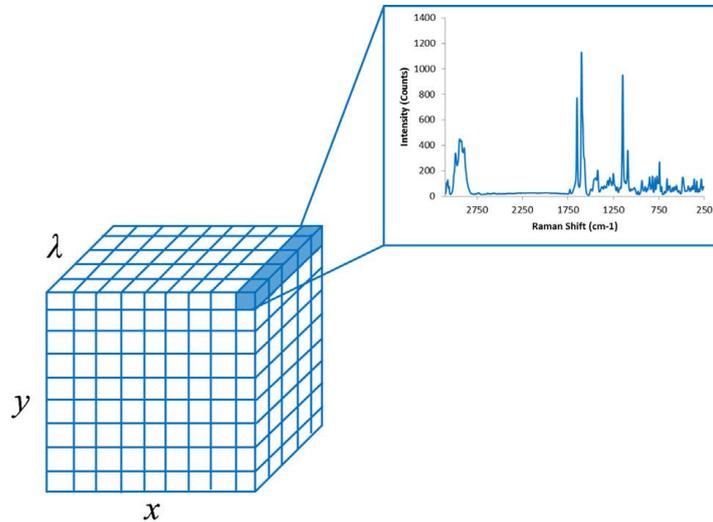


Figura 5. Hipercubo de dados da imagem Raman. Fonte: SACRÉ et al., 2014

As imagens Raman foram obtidas tanto para as amostras quanto para os excipientes. As misturas foram fundidas a 10°C acima da temperatura de fusão do excipiente sólido e homogeneizadas. Estas misturas fundidas foram colocadas em uma cela de alumínio, e deixadas para resfriar por aproximadamente 30 minutos antes da análise.

Condições das análises Raman:

- Equipamento: Raman Station 400 (Perkin Elmer)
- Comprimento de onda do laser: 785 nm
- Detector: CCD
- Tempo de exposição: 3 s
- Quantidade de exposições: 2
- Tamanho do pixel: 0,05 (mm²)
- Faixa espectral: 600-3200 cm⁻¹
- Resolução: 4 cm⁻¹

Foram obtidos os espectros dos excipientes puros em uma área de 0,2x0,2 mm² (25 espectros/ excipiente), enquanto para as amostras a área foi de 1,95 x 1,95 mm² (1600 espectros/

amostra). As medidas dos excipientes puros demoravam cerca de 5 minutos, enquanto das amostras levavam cerca de 4 horas. Os *spikes*, sinais intensos e estreitos que aparecem nos espectros, oriundos dos raios cósmicos e detectados pelo detector CCD foram retirados antes do início do tratamento dos espectros. A região escolhida para a construção dos modelos foi de 1804-724 cm^{-1} ou 2964-724 cm^{-1} .

As imagens foram geradas empregando o método de Regressão em Mínimos Quadrados (*Classical Least Squares*, CLS). Os espectros dos excipientes puros e das amostras mostram a necessidade de aplicar pré-processamento antes da construção do modelo CLS: um para a correção da linha de base (as regiões sem sinal devem estar em zero) e outro para normalizar os dados (devido às diferenças/irregularidades na superfície da amostra). Em alguns casos, foi necessário ainda aplicar a suavização dos espectros (*smoothing*) devido à quantidade de ruído presente nos mesmos.

3.2.5 Otimização dos carreadores lipídicos por análise fatorial

A fim de otimizar uma formulação de NLC, realizou-se um planejamento experimental 2^4 com triplicata no ponto central empregando o software Design Expert® (versão 9.0.6.2, Stat-Ease Inc., USA). As variáveis, níveis e propriedades de interesse são mostrados junto com os resultados na Tabela 9. A significância da regressão foi determinada por análise de variância (ANOVA, 95% de nível de confiança).

3.2.6 Caracterização físico-química dos NLC

3.2.6.1 Medida de Tamanho e índice de polidispersão (PDI)

O tamanho médio das partículas e índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz dinâmico - DLS (*dynamic light scattering*). As medidas foram realizadas em triplicata, diluindo 100 vezes a dispersão de nanopartículas em água desionizada, à temperatura de 25°C, em cubetas de poliestireno (10 mm de caminho óptico). Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.2.6.2 Medida do potencial Zeta (ZP)

O ZP foi determinado por Microeletroforese Doppler a laser, utilizando o equipamento Zetasizer NanoSeries. Nessa técnica um campo elétrico é aplicado a uma dispersão de partículas, que passarão a se mover com velocidade relacionada ao seu potencial elétrico de sua

superfície (LOWRY et al., 2016). Essa velocidade é medida por uma técnica interferométrica a laser, chamada M3 PALS (espalhamento de luz com análise de fases). Com ela, é possível fazer o cálculo da mobilidade eletroforética e, a partir desta, inferir o potencial Zeta e sua distribuição. As medidas de ZP foram feitas em triplicata, após diluição das suspensões de NLC com água desionizada (2 μ L da formulação para 1998 μ L de água desionizada) em cubetas apropriadas, de poliestireno, à temperatura de 25°C. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.2.6.3 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

As medidas de NTA foram realizadas no equipamento NanoSight NS300 com software NTA 3.1 Analytical o qual é utilizado para caracterizar o tamanho, distribuição, intensidade e concentração das nanopartículas, além de fornecer informações visuais das mesmas (Filipe et al., 2010). As medidas foram realizadas em triplicata, após diluição das amostras em água Milli-Q (1:5.000, v/v). As amostras foram introduzidas no interior do porta-amostras por meio de uma seringa esterilizada, até seu total preenchimento (0,5 mL), utilizou-se um feixe de laser de diodo ($\lambda = 532$ nm), e os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.2.6.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

Alterações de pH das formulações durante estocagem foram avaliadas utilizando-se o pHmetro previamente calibrado com os padrões de pH 7,0 e 4,0. As medidas foram realizadas em triplicata e os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

3.2.6.5 Determinação do teor de BVC S75:R25 nos NLC

Para avaliação do teor de BVC nas formulações, retirou-se 50 μ L da amostra, dissolveu-se em 1950 μ L de fase móvel e colocou-se em banho ultrassônico por 20 minutos, realizando, posteriormente centrifugação a 4100g, por 20 min. Dos sobrenadantes obtidos coletou-se alíquotas de 200 μ L diluídas em 1800 μ L de fase móvel e analisou-se por CLAE, segundo o método validado.

3.2.6.6 Eficiência de encapsulação da BVC_{S75} nos NLC (% EE)

A eficiência de encapsulação da bupivacaína S75:R25 nas formulações de NLC foi determinada pelo método de ultrafiltração-centrifugação (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Inicialmente diluiu-se 50 μ L das amostras de NLC em 1950 μ L de água deionizada e homogeneizou-se; em seguida, alíquotas de 0,4 mL da amostra foram transferidas para uma

unidade de filtração de 10 kDa (Millex, Millipore) acoplada a tubos tipo eppendorf e centrifugadas por 20 min a 4100 g. A solução filtrada foi coletada e a BVC S75:R25 livre foi quantificada por CLAE, de acordo com o método validado. A porcentagem de eficiência de encapsulação (% EE) da forma básica do anestésico foi calculada, conforme a equação 5.

$$\%EE = \frac{BVC\ total - BVC\ livre}{BVC\ total} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

onde: BVC total: corresponde a quantidade total de bupivacaína quantificada na suspensão de NLC. BVC livre ou não encapsulada: corresponde aos valores obtidos de bupivacaína no filtrado, através do método de ultrafiltração-centrifugação.

3.2.6.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As análises morfológicas dos NLC foram feitas utilizando microscópio eletrônico de transmissão. Uma gota de cada amostra de NLC, contendo ou não bupivacaína S75:R25, foi adicionada no grid de cobre com 200 Mesh. O excesso da amostra foi retirado e, em seguida, uma gota de solução aquosa de acetato de uranila a 2% (m/m) foi adicionada sobre a mesma com intuito de melhorar o contraste das imagens. O excesso foi novamente retirado e, na sequência, uma gota de água Milli-Q foi adicionada à grade, seguindo-se o mesmo procedimento para a retirada do excesso, 5 s depois. Após o preparo das amostras nas grades, as mesmas permaneceram em repouso por 4 horas, à temperatura ambiente, até que estivessem totalmente secas.

3.2.6.8 Ensaio de cinética de liberação, *in vitro*, da BVC S75:R25

Para os ensaios de cinética de liberação *in vitro* foram utilizadas células de difusão vertical do tipo Franz (área de permeação 0,6 cm²). Uma célula de Franz é composta, principalmente, por duas partes: o compartimento doador e o receptor, conforme Figura 6. No compartimento doador, a formulação é adicionada e por difusão, somente o fármaco passa através da membrana e chega ao compartimento receptor que está preenchido com tampão PBS pH 7,4. Nesse sistema foi utilizado uma membrana de policarbonato (diâmetro 19 mm, poro de exclusão molecular de 100 nanômetros, Nuclepore Track-Etch Membrane, Whatman[®]) como modelo de barreira, a qual separava a amostra (0,2 mL no compartimento doador) do compartimento acceptor, contendo aproximadamente 4 mL de uma solução de tampão fosfato-salino (PBS) 5mM pH 7,4. A solução do compartimento acceptor foi mantida sob leve agitação (300 rpm) à 37°C, durante todo período do experimento. Em intervalos padronizados, 0,2 mL

de amostra foram retirados do compartimento acceptor (volume total recuperado com adição da solução tampão PBS) até completa liberação, sendo a BVC, quantificada por CLAE.

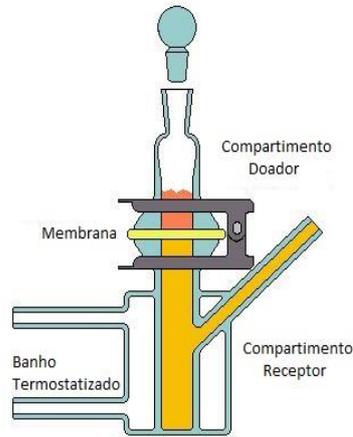


Figura 6. Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz.

O software KinetDS 3.0 foi utilizado para analisar as curvas de liberação. Diversos modelos matemáticos foram testados e o melhor modelo para prever a curva de liberação foi selecionada a partir do coeficiente de determinação (r^2). Os modelos testados estão descritos nas equações 6 a 10.

Modelo de ordem zero:

$$Q = k \cdot t + Q_0 \quad \text{Equação 6}$$

onde Q é a quantidade de droga liberada, t é o tempo e Q_0 é o valor inicial de Q e k é a constante de liberação.

Modelo de primeira ordem:

$$Q = 100(1 - e^{-kt}) \quad \text{Equação 7}$$

onde Q é a quantidade de droga liberada, t é o tempo e k é a constante de liberação.

Modelo de Higushi:

$$Q = k \cdot t^{0,5} \quad \text{Equação 8}$$

onde Q é a quantidade de droga liberada, t é o tempo e k é a constante de liberação.

Modelo de Hiscon-Crowell:

$$Q = 100[1 - (1 - k \cdot t)^3] \quad \text{Equação 9}$$

Onde Q é a quantidade de droga liberada, t é o tempo e k é a constante de liberação

Modelo de Korsmeyer-Peppas:

$$Q=K.t^n \quad \text{Equação 10}$$

onde Q é a quantidade de droga liberada, k é a constante da taxa de liberação, t é o tempo de liberação e n = expoente de difusão que indica qual é o mecanismo de liberação.

3.2.6.9 Avaliação da estabilidade das formulações

O estudo de estabilidade das formulações foi realizado durante o período de estocagem (12 meses), avaliando diâmetro médio das partículas, sua distribuição de tamanho, potencial Zeta, pH e %EE do anestésico. As formulações foram armazenadas à temperatura ambiente.

3.2.6.10 Calorimetria exploratória de varredura (DSC)

Os termogramas de DSC foram obtidos em um Calorímetro Diferencial de Varredura em porta-amostra padrão, seladas, de alumínio e analisadas com o programa *Thermal Solutions v.1.25*. As amostras de NLC com e sem bupivacaína foram liofilizadas antes da realização das análises. A taxa de aquecimento foi $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, de 20 a 150°C . O índice de cristalinidade, outro parâmetro que se pode retirar das análises de DSC, permite avaliar o efeito da adição de componentes à matriz lipídica foi determinado. Geralmente a cristalinidade é comparada com aquela do sistema livre de fármaco (controle) que, neste caso, continha somente o lipídio sólido (CP). O índice de cristalinidade (IC, %) foi calculado usando a equação 11 (NAHAK et al., 2015):

$$IC (\%) = \frac{\text{entalpia (NLCs)} \times 100}{\text{entalpia (SLN)} \times \text{concentração fase lipídica} (\%)} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

3.2.6.11 Difração de Raios X (XDR)

As análises de difração de raios-X (XDR) foram realizadas com as amostras liofilizadas em um difratômetro Shimadzu XRD7000, utilizando uma fonte de $\text{Cu-K}\alpha$, varredura de $2^{\circ}\cdot\text{min}^{-1}$, entre valores de 2θ de 5 e 50° .

3.2.7 Avaliação da atividade antinociceptiva *in vivo*

Para a realização deste teste foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) do tipo

Wistar adultos (250-350 g), obtidos do CEMIB-UNICAMP (Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, aprovados pelo Comitê de Ética em experimentação da UNICAMP (n° 4155-1; ANEXO 1). Os animais foram selecionados randomicamente e separados em grupos de 5. Em cada animal foram aplicados 0,2 mL das formulações, no espaço popliteo (fase posterior do joelho), na área do nervo ciático (DE MELO et al., 2011). Amostras foram compostas de BVC_{S75} livre e encapsulada nas concentrações de 0,5 e 0,125%.

Foi avaliado o bloqueio sensorial através do teste de pressão na pata (PWPT) utilizando analgesímetro. O limiar nociceptivo foi definido como a força em gramas aplicada à pata do animal no momento em que este exibia o reflexo de retirada da pata. Antes da injeção, cada animal foi avaliado conforme seu limiar basal de dor, sendo aceitos animais que apresentaram limiar entre 30-50 g; o valor máximo de peso aplicado sobre a pata foi de 180 g (*cutoff*). Os valores obtidos foram transformados em dados de máximo efeito possível (% EMP) conforme equação 12 (PENNING; YAKSH, 1992).

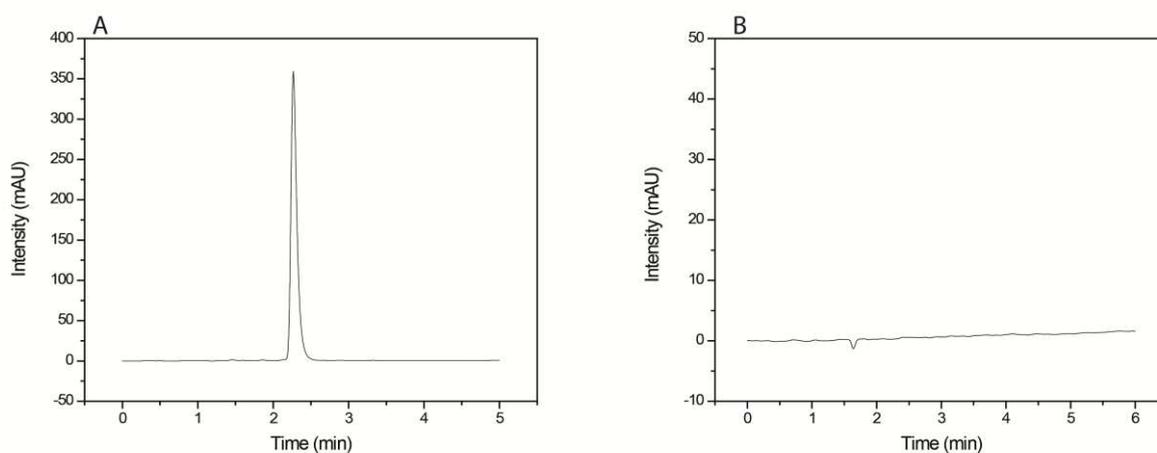
$$\%EMP = \frac{(\text{Valor pós fármaco} - \text{valor basal})}{(\text{cutoff} - \text{valor basal})} \cdot 100 \quad \text{Equação 12}$$

Através do cálculo da área sob a curva, extraída dos gráficos de %EMP versus tempo em minutos, foram feitas as análises estatísticas por One-Way ANOVA com pós teste de Tukey-Kramer utilizando o programa GraphPad Prism, versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUANTIFICAÇÃO DA BUPIVACAÍNA POR CLAE

Utilizando as condições cromatográficas descritas, obteve-se a separação cromatográfica da bupivacaína S75:R25 em um tempo de retenção de 2,28 min, conforme cromatograma (Figura 7A). Não foram encontrados outros picos no mesmo tempo de retenção quando injetadas amostras de nanopartículas lipídicas sem bupivacaína (Figura 7B). Também não foi observada qualquer impureza dos componentes, demonstrando, assim, especificidade na técnica estabelecida.



Figuras 7. A) Cromatograma da bupivacaína S75:R25, tempo retenção 2,28min. B) Cromatograma nanopartículas sem Bupivacaína.

As soluções de bupivacaína foram preparadas dissolvendo sua forma básica na fase móvel. As concentrações usadas para a construção da curva de calibração variaram de 0,16 a 54,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com oito pontos. A linearidade do método foi avaliada a partir da curva analítica média, utilizando as nove curvas individuais, medidas em três dias consecutivos (3 por dia), como mostra a Figura 8.

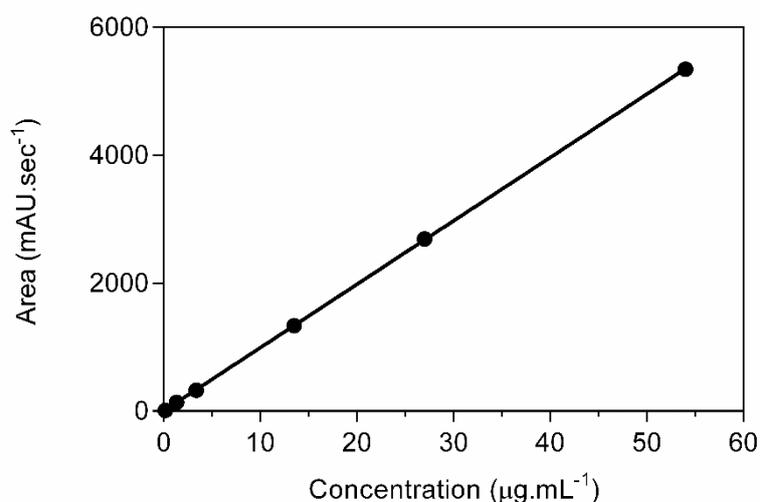


Figura 8: Curva analítica média, na faixa de concentração de 0,16 a 54,00 µg.mL⁻¹. Equação da reta: $y = 99,11x + 1,104$ e $r^2 = 0,9999$.

Os coeficientes de correlação (r^2), foram superiores a 0,999, nos 3 dias avaliados, de acordo com as recomendações da RE 889 da ANVISA (ANVISA, 2003), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Equações da reta e coeficientes de correlação obtidos através das curvas analíticas, construídas em três dias consecutivas.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Regressão Linear	$y = 90,0x - 11,60$	$y = 99,2x - 3,30$	$y = 99,6x - 0,58$
r^2	0,9998	0,9999	0,9998

O limite de Detecção (LD) e quantificação (LQ) da bupivacaína S75:R25, foram calculados de acordo com as equações 3 e 4, e determinados a partir do intercepto e da inclinação da curva analítica. Segundo estas análises, o limite de detecção foi 0,03 µg.mL⁻¹ e o de quantificação 0,10 µg.mL⁻¹.

A Tabela 5, apresenta os dados de precisão intra-dia e da precisão inter-dias, determinados a partir dos desvios padrão relativos (DPR). Em todos os casos a DPR foi $\leq 3\%$ estando, assim, de acordo com as orientações (ANVISA, 2003).

Tabela 5. Resultados dos testes de precisão: intra-dia (DPR1, DPR2 e DPR3) e inter-dias, obtidos com medidas de três concentrações diferentes de bupivacaína.

[BVC] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR 1 (%)	DPR 2 (%)	DPR 3 (%)	DPR Inter-dia (%)
0,20	1,99	1,50	0,80	2,95
6,80	0,32	0,40	0,96	1,19
40,00	0,48	0,14	0,45	0,32

Os valores obtidos experimentalmente de bupivacaína S75:R25 foram comparados com os valores teóricos. Os resultados estão mostrados na Tabela 6. A partir destes dados, montou-se a Tabela 7, de recuperação média em três dias consecutivos, os quais apresentaram recuperações entre 97,0 a 101,9%, estando de acordo com os limites especificados de 97 – 102% (USP, 2009), demonstrando boa exatidão do método. A partir desta curva analítica média obtida, realizou-se todas as dosagens do fármaco, ao longo do projeto.

Tabela 6. Resultados do teste de precisão. Comparação entre a concentração teórica e as obtidas experimentalmente para BVC_{S75} em três dias de experimentos.

[BVC*] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	[BVC**] \pm DP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Dia 1	[BVC**] \pm DP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Dia 2	[BVC**] \pm DP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Dia 3	[BVC**] \pm DP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Inter-dias
0,20	0,195 \pm 0,02	0,194 \pm 0,01	0,199 \pm 0,01	0,196 \pm 0,05
6,80	6,80 \pm 0,20	6,87 \pm 0,31	6,93 \pm 0,66	6,87 \pm 0,03
40,00	39,70 \pm 0,17	39,70 \pm 0,55	39,74 \pm 0,18	39,72 \pm 0,02

*Concentração teórica de BVC S75:R25; **Concentração dosada de BVC S75:R25.

Tabela 7. Resultados de exatidão do método quantitativo para determinação da BVC_{S75} por CLAE.

[BVC teórica] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% recuperado			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter-dias
0,20	97,5	97,0	99,5	98,0
6,80	100,0	101,0	101,9	101,0
40,00	99,3	99,3	99,4	99,3

4.2 TESTES PRELIMINARES PARA ESCOLHA DOS LIPÍDIOS

4.2.1 Teste Preliminar 1: Formulações com diferentes tipos de lipídios

Antes de escolher os lipídios que seriam utilizados como componentes da formulação, foram feitos testes para determinar qual formulação atenderia três critérios. O primeiro seria o tamanho adequado (1), pois era desejado uma formulação para uso parenteral onde partículas com menor tamanho são preferidas, o que não acontece para aplicações tópicas e orais, onde o tamanho não é critério importante (DOKTOROVÁ et al., 2016). Além de partículas de menor tamanho, a formulação deveria se apresentar líquida (2) para uso injetável e conservar-se líquida por uma semana, pelo menos nesta fase inicial do projeto. Também o índice de polidispersão (PDI) que indica o grau de homogeneidade do sistema, deveria estar na faixa de 0,1 a 0,2 (3), indicando distribuição monodispersa de partículas (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). Desta forma foram avaliados nos testes iniciais três lipídios sólidos (palmitato de cetila (CP), Compritol® (CO) e Precirol® (PRE) e dois lipídios líquidos Mygliol® (MY) e Capryol® 90 (CA). A escolha da quantidade de lipídios foi baseada em experiência prévia do grupo, sendo aquela capaz de encapsular a quantidade de anestésico desejada na formulação final (1%). Foi também verificado previamente se essa quantidade lipídica era o suficiente para a solubilização da BVC_{S75}, nas diferentes misturas lipídicas. Como surfactante escolheu-se o Pluronic F-68 a 5%. A Tabela 8 mostra os resultados encontrados.

Tabela 8. Resultados preliminares das formulações com diferentes tipos de lipídios.

Formulação	A	B	C	D	E	F
Lipídio						
Palmitato de cetila	7%	7%	-	-	-	-
Precirol Ato 5	-	-	7%	7%	-	-
Compritol	-	-	-	-	7%	7%
Miglyol	3%	-	3%	-	3%	-
Capryol 90	-	3%	-	3%	-	3%
Respostas						
Tamanho (nm)	244,9 ±1,202	170,4±0,965	-	164,5±0,85	-	-
PDI	0,192±0,035	0,142±0,015	-	0,195±0,089	-	-
Zeta (mV)	-39,4±0,78	-30,9±1,12	-	-22,9±0,95	-	-
Aspecto Visual	Líquido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Sólido

Após estes testes preliminares, as formulações foram estocadas por uma semana a fim de analisar sua estabilidade física.

4.2.2 Teste Preliminar 2: Miscibilidade da mistura física dos lipídios, avaliada por Espectroscopia Raman de imagens

Outro teste prévio para a escolha da mistura lipídica a ser utilizada foi a espectroscopia Raman de imagem. Esta metodologia vem ganhando destaque dentro das áreas química e farmacêutica pois, enquanto a espectroscopia vibracional tradicional, já bem estabelecida, permite a análise somente do *bulk* da amostra e a determinação da composição média da amostra, a espectroscopia de imagem permite obter a distribuição espacial dos constituintes da amostra, permitindo avaliar a homogeneidade entre os componentes, através de imagens geradas pelas diferenças espectrais em cada ponto (pixel) da amostra (BREITKREITZ et al., 2013).

O objetivo com este estudo foi determinar qual mistura será mais homogênea, projetando o preparo de um sistema possivelmente mais estável. As misturas analisadas foram as mesmas utilizadas no teste preliminar (item 4.2.1), que levaram à formulação final líquida.

Os resultados apresentados nas Figuras 9 a 11, são os mapas de distribuição dos lipídios estudados, na área analisada. Após o tratamento quimiométrico dos espectros, conforme descrito em métodos, uma imagem é gerada, indicando qual a concentração de cada componente na área analisada. Um histograma que mostra a distribuição de frequências das concentrações na área amostrada é útil para auxiliar a interpretação da miscibilidade entre os dois lipídios.

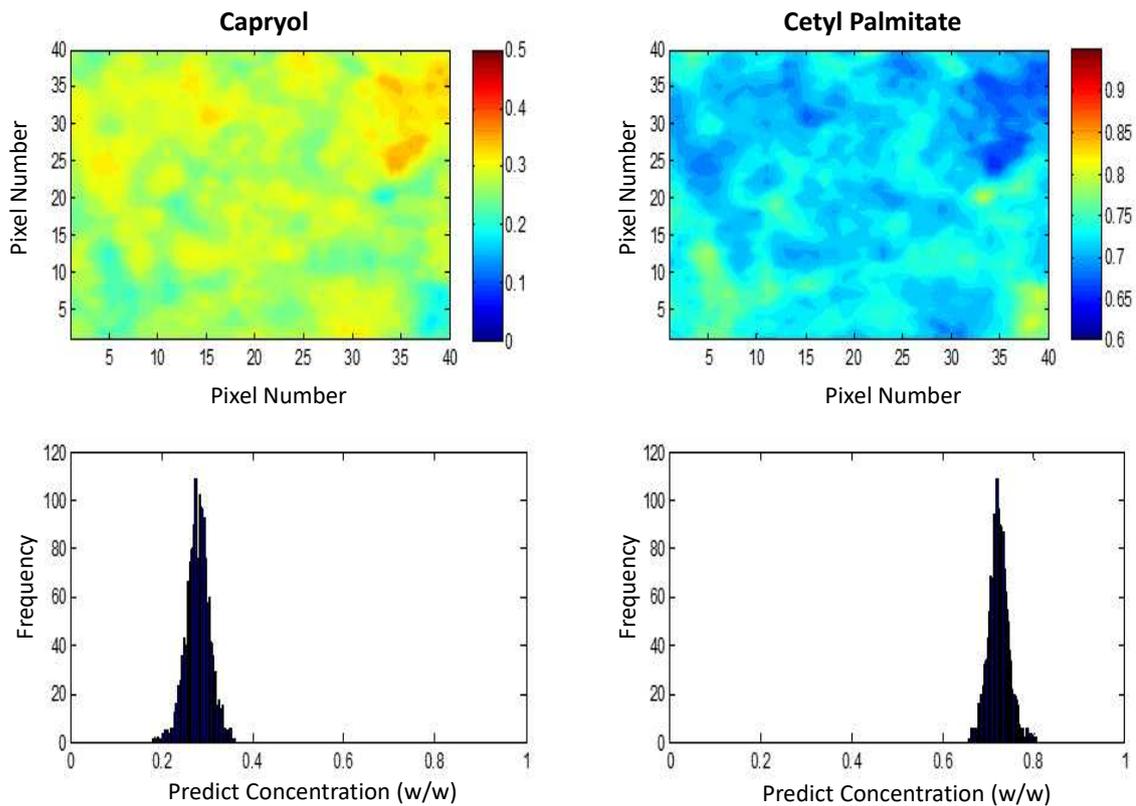


Figura 9. Mapas de distribuição obtidos por espectroscopia Raman para a mistura física palmitato de cetila e Capryol (70:30% m:m).

Foi encontrado uma concentração média de Capryol (CAP) de 28,01% (erro de -1,99) e de CP de 72,46% (erro de 2,46). As concentrações previstas nos pixels variaram de 3,39 – 43,10% para o CAP e de 56,81 a 92,80% do CP, valores que correspondem a concentração prevista de CP e CAP na mistura física destes compostos. De acordo com o gráfico de distribuição, a maior quantidade de pixels está distribuída na faixa de concentração esperada, ou seja, de 70:30% CP-CAP.

Para a mistura de CP e Miglyol (MIG) os resultados encontrados são apresentados na Figura 10.

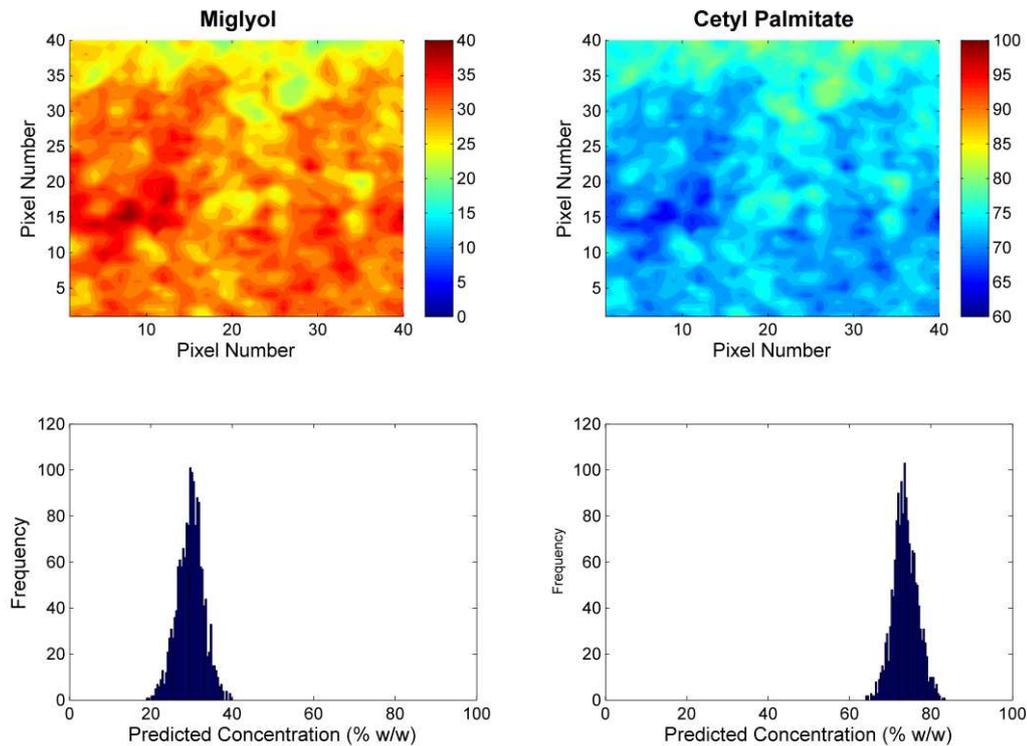


Figura 10. Mapas de distribuição obtidos por espectroscopia Raman para a mistura física de Palmitato de Cetila e Miglyol (70:30% m:m).

Os resultados mostraram que a concentração prevista para cada componente analisado foi de 26,45% de MIG (erro de -3,55) e 72,60% de CP (erro de 2,60%). Porém, como vemos no histograma da Figura 10, em comparação com a mistura CP-CAP, esta apresentou-se menos homogênea, pois se nota que as concentrações nos pixels variaram mais em relação à média esperada (70:30%).

A terceira mistura física analisada foi a de Precirol (PRE) e Capryol, cujo mapa de distribuição gerado é mostrado na Figura 11.

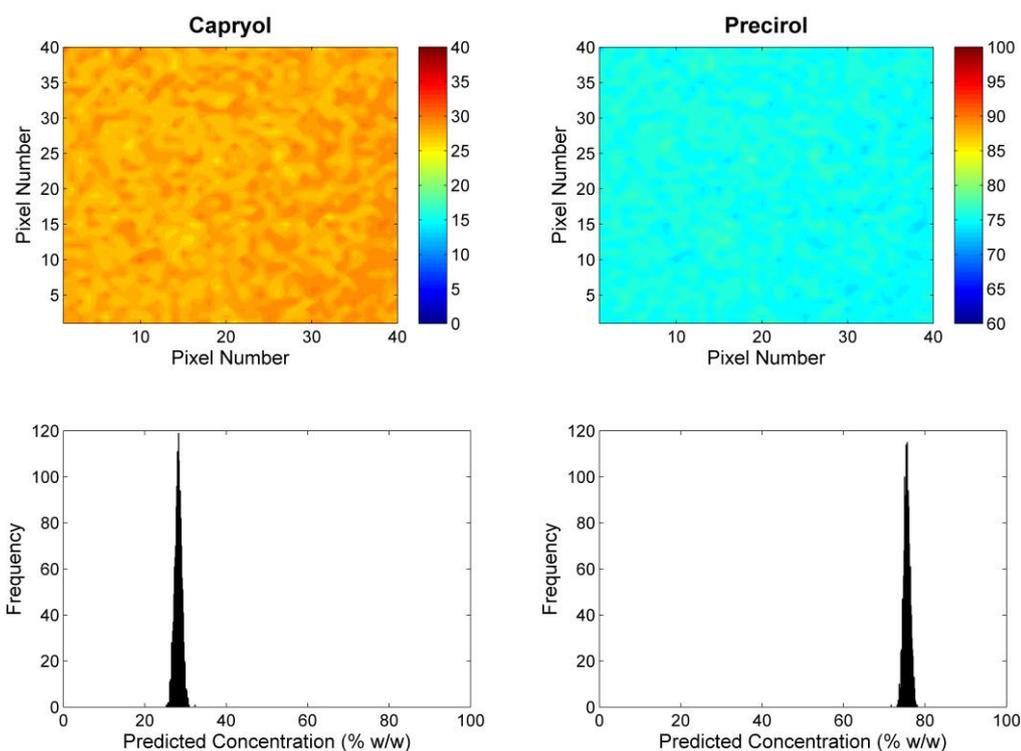


Figura 11. Mapas de distribuição obtidos por espectroscopia Raman para a mistura física de Precirol – Capryol (70:30% m:m).

Na mistura física de PRE-CAP foi encontrada uma concentração média de Capryol de 28,23% (erro de -1,70%) e de PRE de 75,56% (erro de 5,49%), com faixa de variação de 25,22 a 32,42% de CAP e de 71,66-78,18% de PRE. Como mostra o histograma, a variação em torno da média foi extremamente pequena, se compararmos com as outras duas amostras realizadas, indicando que esta mistura apresenta maior homogeneidade em relação às outras duas.

Apesar das três misturas apresentarem miscibilidade razoável entre os excipientes, o perfil de homogeneidade encontrado foi: mistura física PRE-CAP > CP-CAP > CP-MIG. É interessante notar que esta classificação reflete o tamanho de partículas encontrado, tal que a formulação PRE-CAP apresentou o menor diâmetro médio de partículas, enquanto a CP-MIG apresentou o maior tamanho. Esta relação, que talvez possa ser arbitrária, e que deve ser passível de mais estudos, poderia ser critério para a escolha de misturas lipídicas futuras. Também é interessante notar que o fabricante do CAP, Gatefossé, o descreve como um surfactante água-óleo, que já é usado em sistemas auto emulsionáveis para obter uma dispersão mais fina, assim como já foi relatado em vários artigos, que o CAP age como um solubilizante, sendo capaz de dissolver melhor fármacos em NLC (JOSHI; PATRAVALE, 2008; PATIL-GADHE; POKHARKAR, 2014). Assim, as duas misturas contendo CAP como lipídio líquido

poderiam ser usadas, para o prosseguimento dos estudos. Porém, a formulação contendo como lipídio sólido o Precirol, após meses de preparo, apresentou separação de fases (formação de precipitado), indicando sua pouca estabilidade, possivelmente pela cristalização do lipídio já relatado na literatura (KASONGO et al., 2011).

Por fim, a partir dos testes preliminares, a composição lipídica escolhida para este estudo foi a mistura de palmitato de cetila, como lipídio sólido e Capryol[®] 90 como lipídio líquido, por apresentarem menor tamanho de partícula, pequeno PDI e estabilidade dentro do esperado.

Realizou-se então, com essa composição lipídica, uma otimização por planejamento experimental para encontrar a melhor proporção entre os componentes da formulação, como descrito a seguir.

4.3 OTIMIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As misturas dos lipídios escolhidos nos testes preliminares (palmitato de cetila – Capryol[®] 90) foram capazes de produzir formulações com respostas adequadas. No entanto, as quantidades adequadas de cada componente, assim como a sua influência nas propriedades de interesse, ainda não eram conhecidas. Com esta finalidade, realizou-se análise estatística baseada em planejamento experimental (DOE, *Design Of Experiments*). Esta ferramenta permite, com um número reduzido de experimentos, encontrar um modelo matemático que descreva a influência dos componentes da formulação nas propriedades de interesse bem como suas interações. Isto permite encontrar as condições que levam à otimização efetiva do sistema (CARBONE et al., 2012). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a significância dos efeitos, suas interações e a falta de ajuste do modelo de regressão, no nível de confiança de 95%.

Para a realização do planejamento, conforme descrito na metodologia, foi utilizado o programa *Design Expert*[®]. Foi elaborado um planejamento 2^4 , com triplicata no ponto central. Sendo assim foram avaliadas quatro variáveis experimentais em dois níveis (alto e baixo), com triplicata no ponto central. A Tabela 9 mostra as condições do planejamento.

Tabela 9. Variáveis experimentais, níveis e propriedades de interesse (respostas) para o sistema Palmitato de Cetila e Capryol.

Variáveis experimentais	Símbolos no programa	Nível baixo	Nível alto
Palmitato de cetila (%m/m)	A	5	9
Capryol [®] 90 (%m/m)	B	1	5
Pluronic [®] F-68 (%m/m)	C	2,5	5
Bupivacaína S75-R25 (%m/m)	D	0,5	1,5
Propriedades de interesse	Critérios		
Tamanho da partícula (nm)	Mínimo		
Índice de polidispersão (PDI)	Mínimo		
Potencial Zeta (mV)	> 20		
% Encapsulação	Máximo		

Os níveis altos e baixos também foram definidos a partir dos testes preliminares. O ponto central foi ajustado como sendo a formulação que já havia apresentado respostas satisfatórias. A partir da escolha desses valores, foram geradas 19 combinações experimentais diferentes para serem formuladas e posteriormente analisadas. Estas foram preparadas e suas propriedades foram medidas, conforme descrito no item Métodos. O objetivo foi encontrar formulações com os menores tamanho de partículas e polidispersão possíveis, pois era desejada uma formulação que pudesse ser utilizada também para uso parenteral (DOKTOROVÁ et. al., 2016) e que fosse monodispersa. Para o potencial Zeta, era desejável ter valores maiores, em módulo, que 20 mV, garantindo nanopartículas com maior estabilidade (HAN et al., 2008a). Por fim, desejava-se a % de encapsulação máxima, para garantir que a maior parte do anestésico esteja encapsulada. Os resultados encontrados para todas as formulações preparadas de acordo com o planejamento experimental estão na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados obtidos (tamanho, PDI, Zeta, % EE) para as formulações dos carreadores lipídicos nanoestruturados com Bupivacaína S75:R25 (NLC_{BVC}), preparadas de acordo com o planejamento fatorial 2⁴.

Código Programa Formulação	Variáveis				Respostas			
	A	B	C	D	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (-mV)	% EE
	CP (%m/m)	Capryol® (%m/m)	BVC (%m/m)	Pluronic® (%m/m)				
1	5	5	1,5	2,50	189,6	0,115	26,8	73,3
2	5	1	0,5	5,00	187,7	0,132	17,9	49,8
3	9	1	0,5	5,00	221,9	0,137	27,5	48,2
4	9	5	1,5	5,00	157,6	0,140	20,8	76,9
5	5	5	1,5	5,00	107,1	0,148	19,1	67,3
6	5	5	0,5	2,50	184,6	0,123	27,0	58,2
7	7	3	1,0	3,75	214,9	0,178	23,1	57,8
8	5	1	1,5	2,50	276,0	0,242	30,5	74,0
9	9	5	0,5	5,00	148,5	0,122	30,9	43,6
10	9	1	0,5	2,50	281,2	0,176	31,8	50,7
11	7	3	1,0	3,75	221,2	0,169	23,8	69,5
12	9	1	1,5	2,50	275,0	0,220	27,7	61,8
13	9	1	1,5	5,00	199,3	0,145	14,5	64,1
14	5	1	0,5	2,50	229,2	0,185	29,4	55,5
15	9	5	0,5	2,50	223,9	0,157	24,3	61,3
16	5	1	1,5	5,00	162,6	0,192	34,2	76,4
17	9	5	1,5	2,50	303,7	0,162	41,5	74,7
18	7	3	1,0	3,75	176,3	0,119	21,9	68,8
19	5	5	0,5	5,00	111,8	0,155	19,5	58,0

4.3.1 Interpretação das respostas obtidas NLC_{BVC}

A partir das respostas obtidas é possível gerar um modelo matemático que descreve a influência de cada componente na resposta desejada. O programa utilizado (*Design Expert*) mostra quais os componentes significativos, ou seja, através da análise da variância (ANOVA) com $p < 0,05$, é possível verificar qual componente interfere significativamente na resposta. Através da análise dos sinais dos efeitos (ou dos coeficientes do modelo) é possível avaliar a maneira como o componente influencia a resposta: positivamente se o componente aumenta a propriedade estudada, ou negativamente se o componente diminui a propriedade estudada ou ainda se há interação entre eles e como esta interação afeta a resposta. Analisou-se a seguir cada propriedade de interesse desejada e no fim, uma formulação otimizada será determinada.

4.3.1.1 Tamanho de partículas

O tamanho de partículas dos NLC_{BVC} encontrado nas diferentes formulações, variou de 107,1 a 303,7 nm. Os resultados do tratamento estatístico aplicado estão mostrados na Tabela 11. Também nesta é mostrado quais coeficientes são significantes para o tamanho de partículas.

Foi verificado que o modelo matemático gerado é significativo, isto é, que a variação na resposta de fato depende da variação dos fatores estudados, assim como a falta de ajuste deste modelo não é significativa, comprovando que o modelo construído pode ser usado para explicar a variação de tamanho das nanopartículas.

Tabela 11. Análise estatística ANOVA para a resposta tamanho de partículas.

	p-valor	Significante?	Tipo de efeito
Modelo matemático	0.0006	Sim	-
A-CP	0.0005	Sim	Positivo
B-CAPRYOL	0.0003	Sim	Negativo
C-BVC	0.1253	Não	-
D-P68	< 0.0001	Sim	Negativo
AB	0.0450	Sim	Positivo
AC	0.4325	Não	-
AD	0.3473	Não	-
BC	0.0835	Não	-
BD	0.1092	Não	-
CD	0.0129	Sim	Negativo
ABC	0.0264	Sim	Positivo
ABD	0.1117	Não	-
ABCD	0.0477	Sim	Negativo
Falta de Ajuste	0.0611	Não	-

Valores de p menores que 0,05 indicam que os coeficientes são significantes; consequentemente, quanto menor for o valor de p, maior a significância dos mesmos (SHI et al. 2016). Portanto, podemos observar que as variáveis significantes são: CP, Capryol, Pluronic e suas interações, AB, CD, ABC, ABCD (ver siglas na Tabela 10). Dentre esses, os que contém o menor valor de p são P68 > CAP > CP, sendo estes os que mais interferem na resposta em relação ao tamanho.

Para tamanho, quanto maior a concentração de palmitato de cetila, maior o tamanho de partículas. Portanto, este exerce um efeito positivo. As causas desse efeito podem ser várias. Uma delas é que uma maior quantidade de lipídio sólido no sistema, resulta no aumento na viscosidade da fase lipídica, fazendo com que a homogeneização e sonicação sejam menos eficientes, facilitando a agregação das partículas e aumentando o tamanho destas (FANGUEIRO et al., 2012; LASOÑ; SIKORA; OGONOWSKI, 2013; PRADHAN et al., 2015; RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2010; ZHANG et al., 2010).

Os outros dois componentes que possuem maior efeito no sistema, P68 e CAP, exercem o efeito contrário, quanto maior concentração, menor o tamanho das partículas. Estes componentes são definidos como surfactantes. Assim, já seria preditivo este tipo de efeito na

formulação final, sendo que a explicação disso é que o surfactante leva à diminuição da tensão superficial entre a fase lipídica e a fase aquosa, levando assim à formação de nanopartículas de tamanhos menores e impedindo a coalescência de gotículas maiores. Confirmando este achado, outros pesquisadores também relataram a redução do tamanho de partícula em maior concentração de surfactante (DAS; NG; TAN, 2012; DAS NEVES; SARMENTO, 2015; PRADHAN et al., 2015; RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2010).

O interessante no planejamento experimental é poder visualizar a interação entre os componentes da formulação e sua resposta na propriedade de interesse estudada (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Para o tamanho das partículas, múltiplas interações estão envolvidas na resposta, como mostra a Tabela 11. O software utilizado dispõe de opções gráficas que mostram estas interações, como no exemplo da Figura 12.

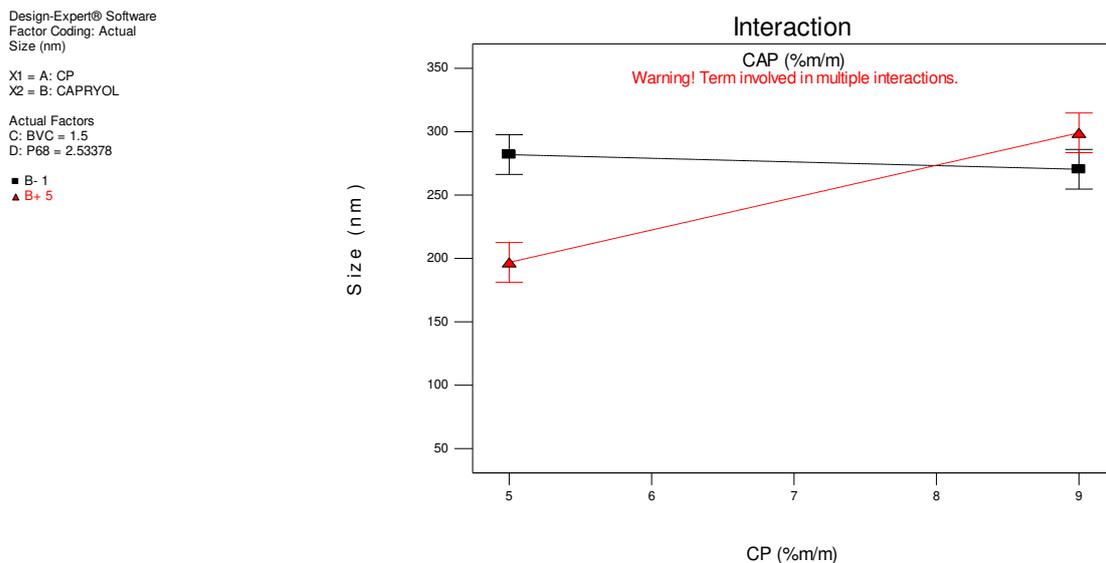


Figura 12. Gráfico de interações entre o palmitato de cetila e Capryol em relação à resposta tamanho de partículas. Retas em preto: Concentração de Capryol a 1% (menor nível); retas em vermelho: CAP a 5% (maior nível).

Neste gráfico vê-se o efeito de interação entre os compostos. Vemos que na menor concentração de CAP o tamanho das partículas quase não muda com a variação da concentração de CP, porém na maior quantidade de CAP, a interação com o CP é significativa, pois os tamanhos das partículas sofrem grande variação. Os gráficos da Figura 13 mostram superfícies de resposta para o tamanho de partículas, em função dos componentes. Observa-se os efeitos (positivos ou negativos) de cada composto.

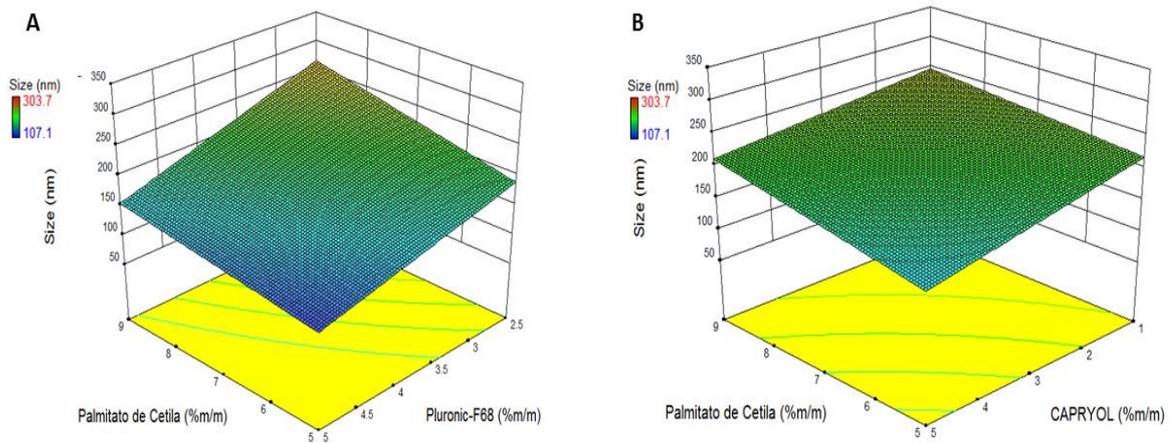


Figura 13. Gráficos de Superfície de Resposta 3D para tamanho de partículas (Size). A, Palmitato de cetila e Pluronic e B, Palmitato de cetila e Capryol.

4.3.1.2 Índice de Polidispersão (PDI)

Para a variável PDI, obtivemos variação entre 0,115 e 0,242. Os resultados da análise estatística (ANOVA) são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Análise estatística ANOVA, para a resposta Polidispersão.

	p-valor	Significante?	Tipo de efeito
Modelo	0.0004	Sim	-
<i>B-CAPRYOL</i>	<i>0.0002</i>	Sim	Negativo
<i>C-BVC</i>	<i>0.0065</i>	Sim	Positivo
<i>D-P68</i>	<i>0.0024</i>	Sim	Negativo
<i>AB</i>	<i>0.0511</i>	Não	
<i>AD</i>	<i>0.0266</i>	Sim	Negativo
<i>BC</i>	<i>0.0108</i>	Sim	Negativo
<i>BD</i>	<i>0.0015</i>	Sim	Positivo
<i>ABC</i>	<i>0.0706</i>	Não	-
<i>ABD</i>	<i>0.0545</i>	Não	-
<i>Falta de ajuste</i>	<i>0.9756</i>	Não	-

Os resultados mostram que o modelo matemático é significativo e não possui falta de ajuste, podendo ser utilizado, portanto, para estudar a resposta (PDI) com segurança. Os componentes significantes foram CAP e P68, com efeito negativo, e a BVC com efeito positivo, assim como as interações entre AD, BC e BD. Como já previsto, e da mesma forma que observado para a variável tamanho, CAP e P68 agem como surfactantes e ajudam a diminuir o PDI. Em relação à BVC, seu efeito é positivo, ou seja, quanto maior sua concentração, maior o PDI. A provável explicação para este fato é que a maior concentração de BVC, leva a uma

maior concentração de moléculas não encapsuladas, de baixa solubilidade aquosa (por utilizarmos a forma básica) e que pode precipitar, formando agregados de diversos tamanhos no meio, aumentando o PDI (DAS; NG; TAN, 2012). Os gráficos da Figura 14 mostram as superfícies de resposta obtida para os diversos componentes, em relação a resposta PDI, observando-se os efeitos descritos acima.

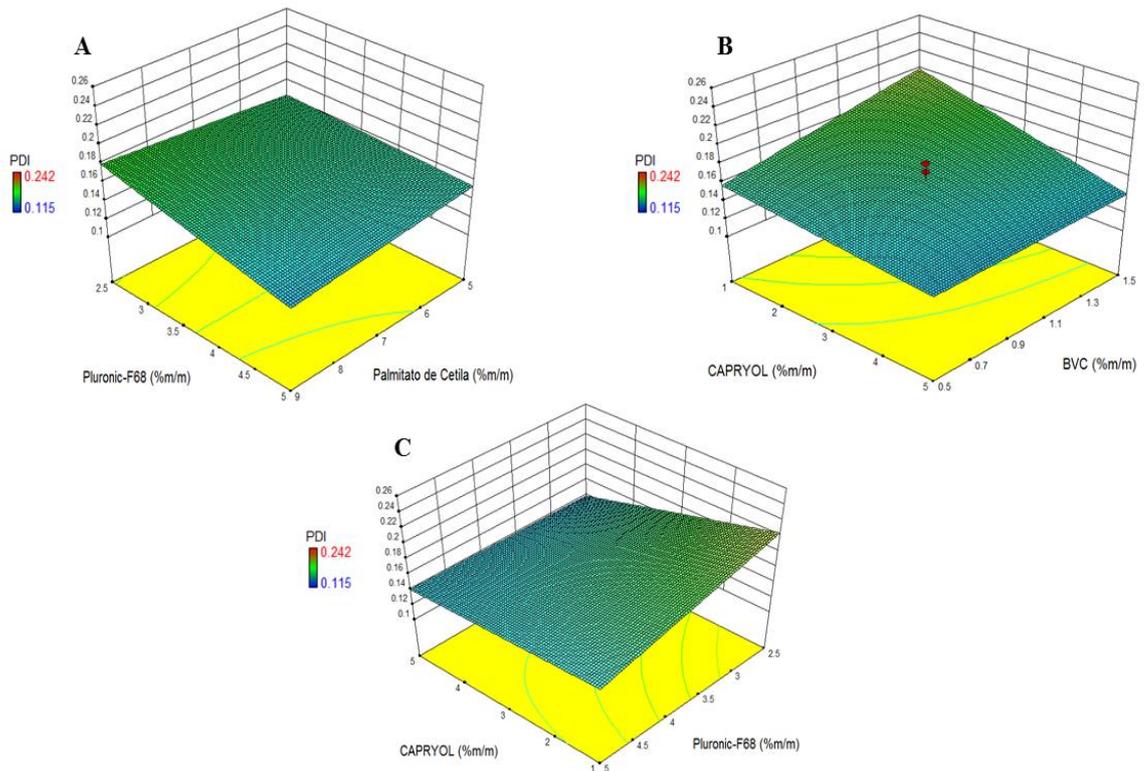


Figura 14. Superfícies de Resposta 3D. A; Palmitato de cetila e Pluronic. B; Capryol e bupivacaína e C; Capryol e Pluronic.

4.3.1.3 Potencial Zeta (ZP)

O potencial Zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade. Sua medição oferece uma visão detalhada sobre as causas da dispersão, agregação ou floculação, podendo ser aplicada para melhorar a formulação de dispersões, emulsões e suspensões (CHEN et al., 2015; ZHANG et al., 2010). Para o ZP, a variação experimental anotada foi de 14,5 a 41,5mV e a análise de Variância (Tabela 13) revelou os seguintes resultados:

Tabela 13. Resultados de ANOVA para a resposta potencial Zeta.

	p-valor	Significante?	Tipo de efeito
Modelo	< 0.0001	Sim	-
<i>D-P68</i>	<i>0.0002</i>	Sim	Negativo
<i>AB</i>	<i>0.0040</i>	Sim	Positivo
<i>AC</i>	<i>0.0195</i>	Sim	Negativo
<i>CD</i>	<i>0.0537</i>	Não	-
<i>ABC</i>	<i>0.0013</i>	Sim	Positivo
<i>ACD</i>	<i>0.0003</i>	Sim	Negativo
<i>BCD</i>	<i>0.0055</i>	Sim	Negativo
Falta de ajuste	<i>0.1195</i>	Não	-

Também para esta resposta o modelo matemático gerado é significativo, assim como não possui falta de ajuste, podendo ser utilizado para descrever esta propriedade. O único componente que exerceu um efeito negativo no potencial Zeta foi o surfactante P68. Essa resposta já era esperada, pois sendo o P68 um surfactante não iônico, a polarização que este causa na superfície da nanopartícula, seguida de adsorção de água, faz com que o potencial Zeta diminua (HAN et al., 2008b; LASOÑ; SIKORA; OGONOWSKI, 2013; ZHAO et al., 2014). Na recente publicação de Bhattacharjee, 2016, ele explica que aumento em módulo, do ZP, não indica necessariamente maior estabilidade do sistema coloidal. Porém, em nossos resultados, o uso de tensoativo não iônico não diminuiu a estabilidade do sistema, mesmo diminuindo o valor do ZP (Figura 15). Vemos também que as interações com outros componentes podem influenciar no potencial Zeta. No mesmo artigo, Bhattacharjee, indica que muitos outros fatores podem influenciar o ZP, tais quais o pH, a força iônica e a concentração de nanopartículas. Sendo assim, todas as outras interações que foram significativas podem interferir no potencial Zeta, por mudarem características do sistema sendo, desta forma, respostas esperadas. A indicação neste caso é acompanhar o valor de ZP no tempo, pois mesmo com um valor pequeno, o sistema pode ser estável (como observado nos testes de estabilidade).

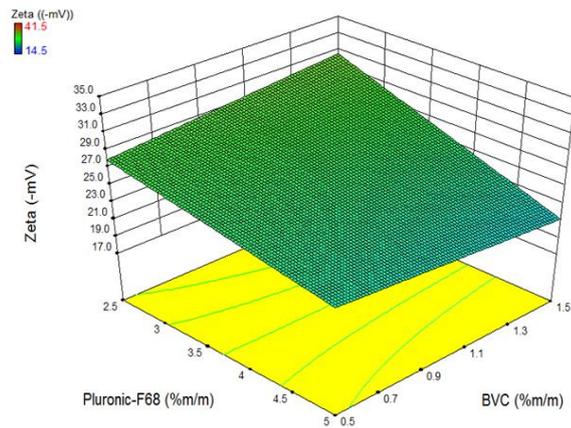


Figura 15. Superfície de resposta dos valores de potencial Zeta, para os componentes Pluronic e BVC S75:R25.

4.3.1.4 Eficiência de Encapsulação (%EE)

A eficiência de encapsulação, ou seja, a quantidade de fármaco presente no interior das nanopartículas variou de 43,6 a 76,9%. A análise estatística gerou os seguintes dados (Tabela 14).

Tabela 14. Resultados análise ANOVA para a resposta %EE.

	p-valor	Significante?	Tipo de efeito
Modelo	< 0.0001	Sim	-
C-BVC	< 0.0001	Sim	Positivo
Falta de Ajuste	0.6842	Não	-

Assim, o modelo é adequado para ser usado nesta resposta (%EE). Além disso, o único fator que afetou significativamente a resposta, de forma positiva, foi a bupivacaína (Figura 16).

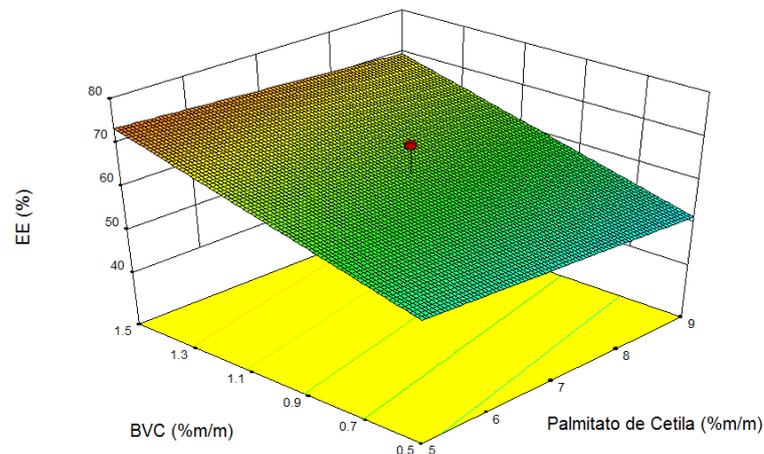


Figura 16. Superfície de resposta da variável %EE para os componentes palmitato de cetila e bupivacaína.

4.3.1.5 Otimização da NLC_{BVC}

A partir do tratamento dos dados pelo software *Design Expert*, e geração do modelo matemático para cada propriedade de interesse, foi definida uma formulação otimizada, que atendesse aos parâmetros de interesse. Foi inserido cada critério em cada propriedade de interesse desejada e, com base nos modelos construídos, um gráfico foi gerado (Figura 17), mostrando a região com a formulação que atenderia os critérios de menor tamanho e PDI e máximo ZP e %EE. Neste gráfico, o parâmetro desejabilidade indica diretamente (quanto mais próximo de “1”, melhor), a formulação que atende os critérios desejados.

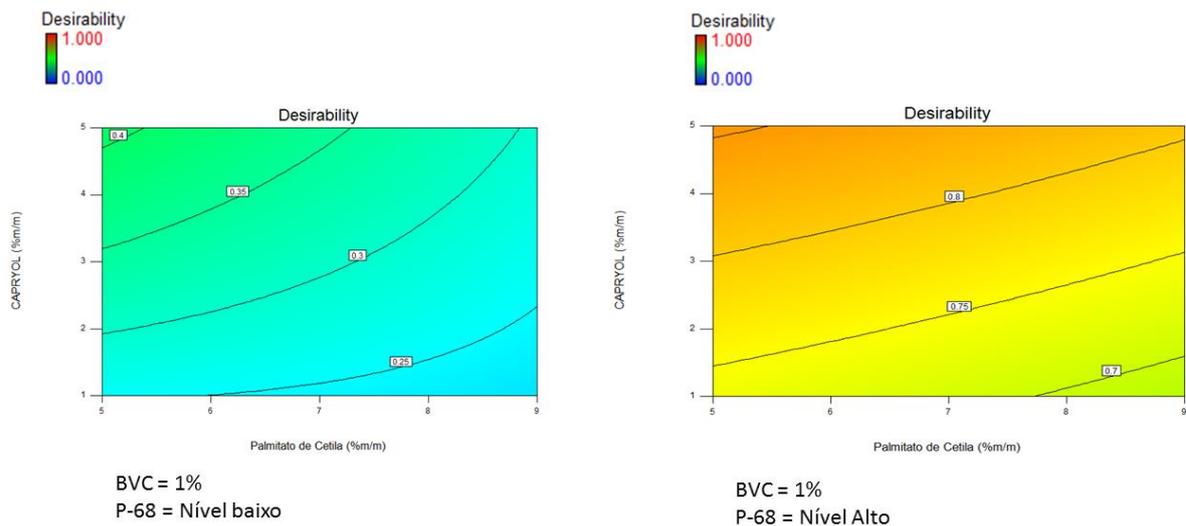


Figura 17. Mapas de desejabilidade para escolha da formulação NLC_{BVC}.

Observa-se que, para valores de desejabilidade maiores, seleciona-se o P68 em seu nível mais alto, ou seja 5%, i.e., a formulação ótima terá esta concentração de surfactante. Em relação aos lipídios sólido e líquido, maior quantidade de CAP é desejável, conforme os gráficos da Figura 16. Para uso de maior quantidade de CAP, e para manter a proporção de 70:30% de LS/LL (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002), utilizou-se na formulação otimizada o CP no seu nível máximo (9%) e CAP (4%), mantendo-se a proporção de 30% de lipídio líquido em relação ao lipídio sólido. A quantidade de bupivacaína escolhida foi de 1%, que apesar de não atingir os maiores índices de %EE, apresentará uma fração não encapsulada de anestésico, garantindo início imediato (*onset*) da ação anestésica, o que é desejado. Desta forma, obteve-se uma formulação que possa ser utilizada futuramente para todas as aplicações (tópica e parenteral, se diluídas). Para as concentrações escolhidas da formulação atingimos uma

desejabilidade de 0,85.

O programa é capaz de prever as propriedades de interesse, conforme mostrado na Tabela 15. Uma amostra foi preparada e comparada os resultados experimentais com os previstos, com ótima correlação.

Tabela 15. Comparação entre os resultados previstos pelo programa e os encontrados experimentalmente.

	Tamanho	PDI	Zeta	%EE
Previsto	169,8	0,135	-23,9	59,6
Experimental	165,9	0,123	-37,0	55,5

Neste ponto foi-se capaz de entender, na formulação de escolha, como cada componente age, alterando as propriedades de interesse. Ou seja, pelas interações foi selecionada uma formulação ótima, proposta como solução aos critérios desejados, demonstrando que é possível utilizar, com segurança, este modelo.

A partir deste ponto, o estudo teve continuidade com esta amostra otimizada, nas concentrações de 9% de palmitato de cetila, 4% de Capryol, 5% de Pluronic e 1% de bupivacaína (em massa).

Uma formulação sem BVC_{S75} foi preparada para ser utilizada nos estudos estruturais (controle), para comparação. Os resultados encontrados estão na Tabela 16. Nota-se que a adição de BVC S75:R25 ao sistema aumentou o tamanho médio de partículas, assim como o potencial Zeta, ambos indicativos da incorporação da BVC na matriz lipídica. Apresentamos nas Figuras 18 e 19 os gráficos de distribuição de tamanho, potencial Zeta e concentração de nanopartículas das amostras apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16. Propriedades das formulações utilizadas para caracterização e demais testes. NLC = carreador lipídico nanoestruturado sem fármaco e NLC_{BVC} = carreador lipídico nanoestruturado com bupivacaína S75:R25.

	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (mV)	%EE	Número de partículas / mL
NLC	156,0 ±2,5	0,123 ±0,009	-15,7 ±0,6	-	7,4 x 10 ¹² ±4,06 x 10 ¹¹
NLC_{BVC}	165,9 ±1,5	0,123 ±0,005	-37,0 ±1,1	55,5 ±3,6	8,8 x 10 ¹³ ±1,11 x 10 ¹²

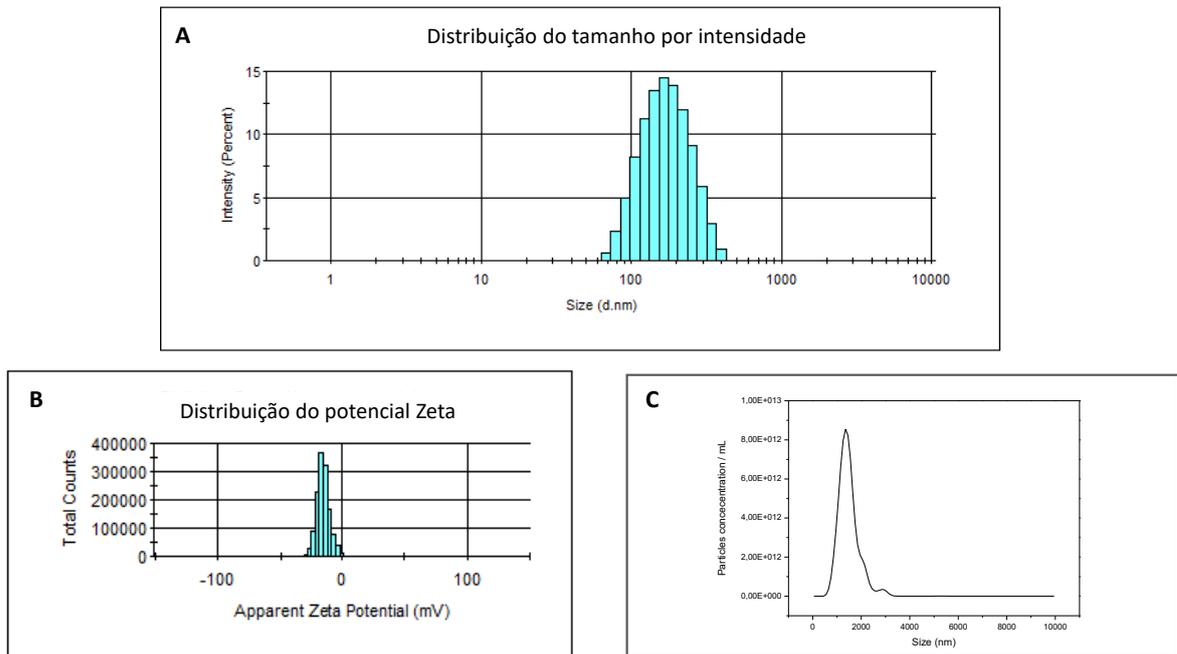


Figura 18. Carreadores lipídicos nanoestruturados sem bupivacaína; **A** Gráfico da distribuição de tamanho por intensidade obtido por DLS; **B**, gráfico da distribuição do potencial Zeta, obtido por microeletroforese Doppler a laser e **C**, Gráfico da distribuição da concentração da nanopartículas por tamanho obtido por NTA.

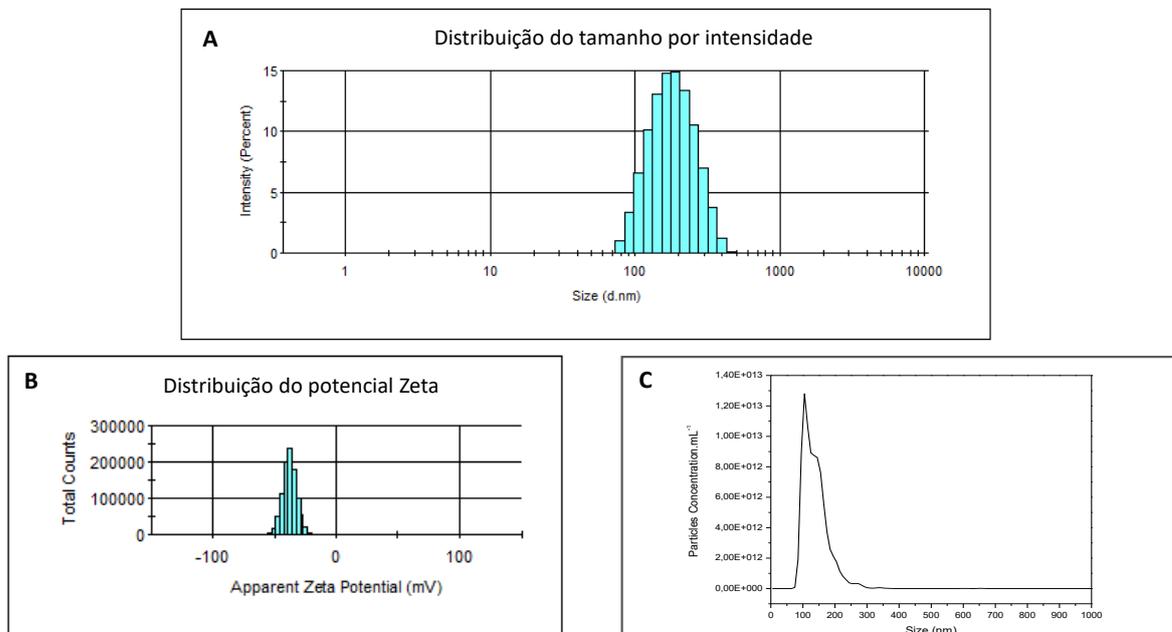


Figura 19. Carreadores lipídicos nanoestruturados com bupivacaína; **A** Gráfico da distribuição de tamanho por intensidade obtido por DLS; **B**, gráfico da distribuição do potencial Zeta, obtido por microeletroforese Doppler a laser e **C**, Gráfico da distribuição da concentração da nanopartículas por tamanho obtido por NTA

4.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

A estabilidade é sempre um fator importante para as formulações farmacêuticas e mais ainda nos carreadores lipídicos nanoestruturados, pois um dos problemas iniciais enfrentados com esses sistemas (em particular com SLN) foi a expulsão do fármaco do seu interior com o tempo, devido à cristalização do lipídio sólido. Esta expulsão foi reduzida com a adição de lipídio líquido na formulação (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002), porém deve ser analisada. Assim, após a seleção da formulação ideal pela análise fatorial, esta formulação foi estocada a temperatura ambiente (25 – 30°C) durante 12 meses. Para analisarmos o fator tempo de estabilidade, utilizamos como parâmetros, o diâmetro médio das partículas, PDI, potencial Zeta, % de encapsulação e pH. Os resultados obtidos estão na Figura 20. Nenhuma diferença aparente (visível) ou estatística foi encontrada nas partículas neste período, para todos os parâmetros analisados. Também concluímos que a incorporação da BVC_{S75} não desestabiliza este sistema coloidal e que o anestésico não é expulso do sistema por alterações na estrutura lipídica, devido a diminuição da cristalinidade, discutida a seguir.

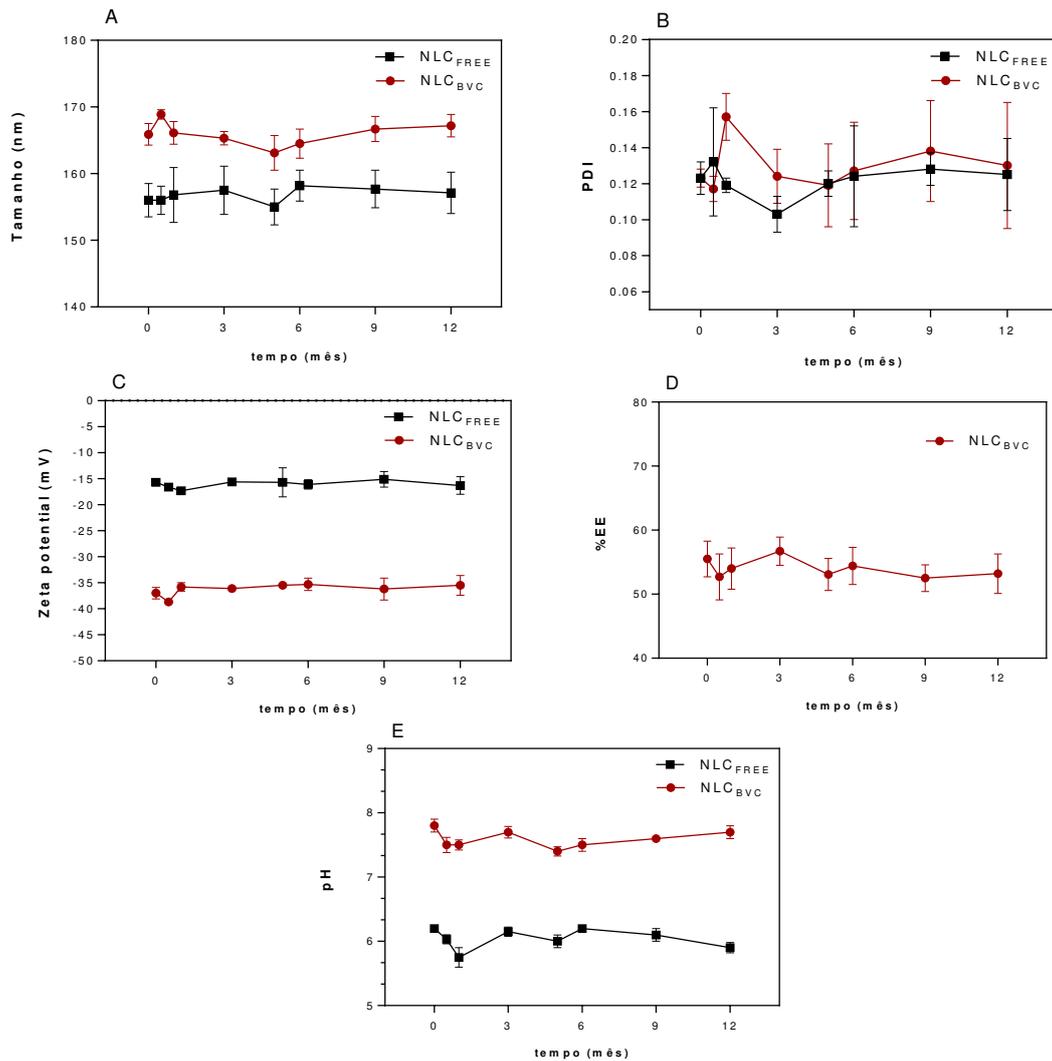


Figura 20. Medidas de estabilidade. **A**, Variação do tamanho médio das partículas em função tempo; **B**, Variação do PDI; **C**, Variação do potencial Zeta; **D**, Variação da % de Encapsulação e **E**, Variação do pH. NLC_{FREE} = carreadores lipídicos nanoestruturados sem bupivacaína e NLC_{BVC} = carreadores lipídicos nanoestruturados com bupivacaína.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

O estudo de microscopia eletrônica de transmissão teve como objetivo obter informação sobre o formato e o tamanho das nanopartículas lipídicas. Partículas esféricas e com superfícies suaves foram encontradas nas formulações controle sem (NLC) e com BVC_{S75} (NLC_{BVC}), como e podem ser vistos na Figura 21. Também pode ser visto que a adição de BVC_{S75} ao sistema não perturbou a integridade das nanopartículas (Figura 21 B e D).

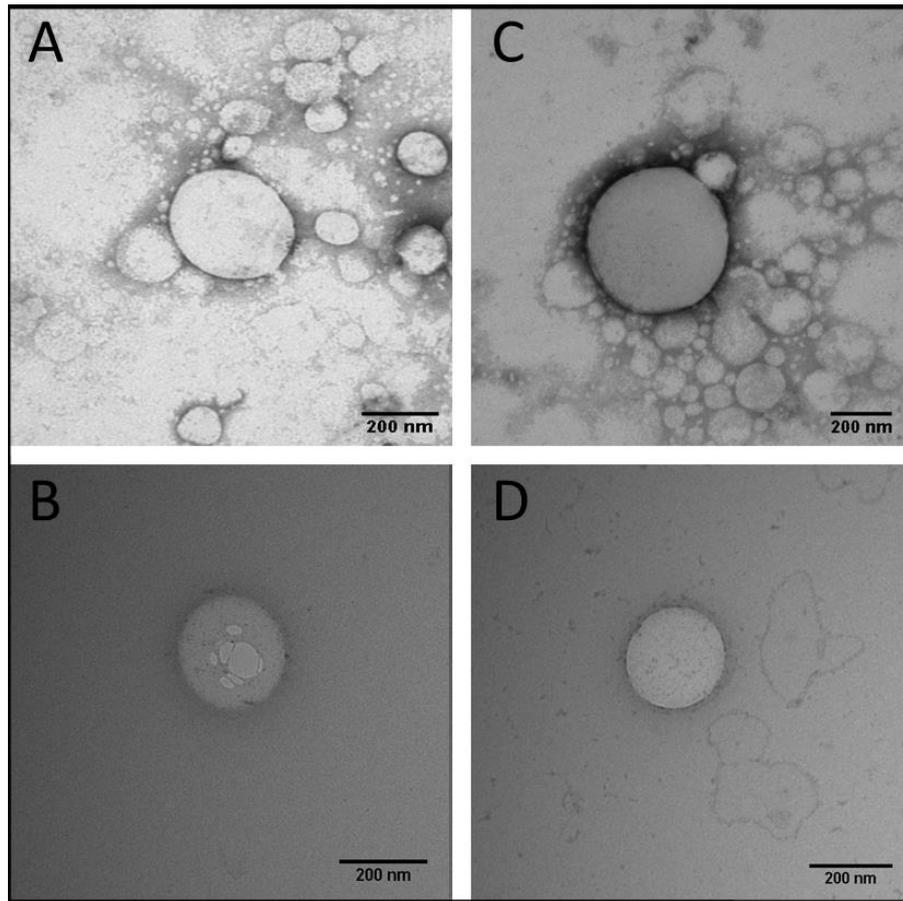


Figura 21. Micrografias (MET) das nanopartículas lipídicas, sem (A, B) e com (C e D) bupivacaína S75:R25, em duas diferentes magnitudes: 60.000x (A, C) e 100.000x (B, D). Escala = 200 nm.

4.6 ANÁLISES DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Nos sistemas de carreadores lipídicos uma importante parte de sua caracterização é o estudo da cristalinidade lipídica. A relação entre modificações lipídicas e a incorporação de fármacos já é bem descrita na literatura e é um ponto importante que difere nanopartículas compostas com um “*core*” somente composto de lipídio sólido (SLN), de compostas por mistura de sólido e líquido (NLC) (MÄDER; MEHNERT, 2001). Apesar do sistema estudado já possuir uma mistura de lipídios, a análise dessa característica física ainda se torna importante e, portanto, utilizou-se duas técnicas básicas para esta caracterização.

A primeira, foi a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Seu uso se deve ao fato que modificações na composição lipídica podem ser relacionadas com ponto de fusão e entalpia diferentes. Ou seja, de forma breve, a transição de fases requer menos energia, quanto mais desorganizado estiver a estrutura lipídica, ou seja: menor cristalinidade = menor entalpia.

A Figura 22A, mostra os termogramas obtidos com os excipientes dos NLC. Observou-se que palmitato de cetila possui ponto de fusão 57,7°C, enquanto o P68 57,9°C e a bupivacaína

S75:R25 114,3°C. O pico da bupivacaína não é estreito, como apresentam amostras puras, mas sim uma curva composta (com “ombro”), devido à combinação das formas enantioméricas da bupivacaína, aparecendo como se fosse um efeito de impureza.

Na Figura 22B têm-se termogramas referentes a nanopartículas compostas somente por CP e P68 (SLN), uma composta por CP, CAP e P68 e sem anestésico (NLC) e outra com BVC_{S75} (NLC_{BVC}). Neste caso, observa-se somente um pico de fusão, referente ao CP, que é o componente majoritário do sistema (MARTINS et al., 2012), ponto de fusão 58,5°C (nas SLN) e 53,9°C (nas NLC) e 54,6°C na amostra NLC_{BVC}, indicando alteração estrutural no arranjo lipídico do interior das nanopartículas.

Fica evidente que nas NLC, a adição de lipídio líquido altera a estrutura lipídica, diminuindo o ponto de fusão, a entalpia e o índice de cristalinidade, por consequência. Também como esperado, a cristalinidade lipídica diminui nos carreadores lipídicos nanoestruturados (em comparação com SLN), conforme já relatado por Ali et al., 2010.

Quando a BVC_{S75} foi adicionada ao sistema, não foi observado nenhum pico referente à bupivacaína livre, indicando que o anestésico foi incorporado na matriz lipídica. Isto é comprovado pela diminuição da entalpia da transição lipídica, de 96,6 para 79,9 J.g⁻¹ (Tabela 17). Assim, a diminuição desta energia caracteriza que a BVC_{S75} está dissolvida na fase lipídica, alterando sua organização molecular e levando à diminuição da energia necessária para ocorrer a fusão, bem como sua cristalinidade (diminuída de 74,7% para 65,2%). A comprovação da diminuição da cristalinidade foi também evidenciada nas análises de difratometria de Raios-X, descritas a seguir.

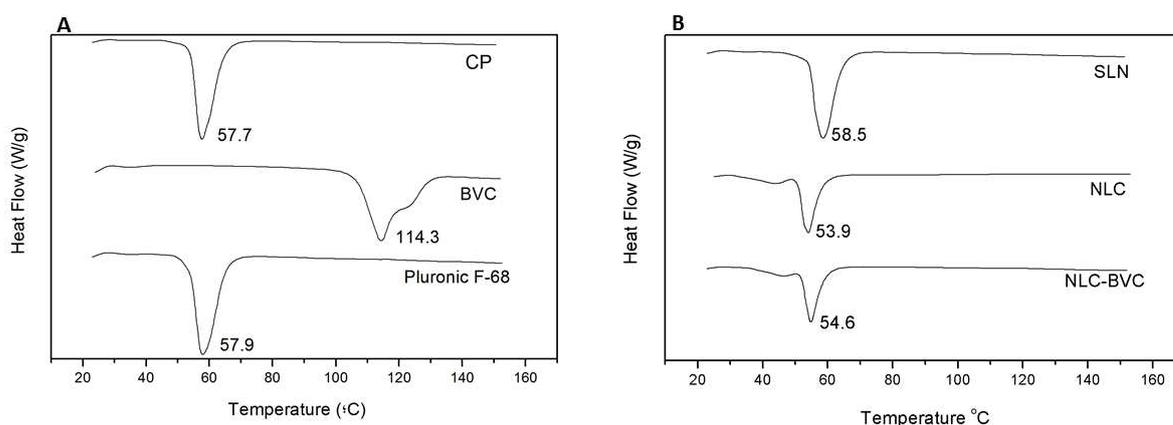


Figura 22. Termogramas (DSC). **A**, amostras palmitato de cetila (CP), bupivacaína S75:R25 (BVC) e Pluronic F-68. **B**, Nanopartículas lipídicas sólida (SLN), Carreadores lipídicos nanoestruturados controle, sem anestésico (NLC) e carreador lipídicos nanoestruturados com Bupivacaína S75:R25(NLC-BVC). Taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

Tabela 17. Entalpia de fusão e Índice de cristalinidade (IC) determinados por análise dos termogramas de DSC.

Amostra	Entalpia de fusão (J/g)	IC (%)
SLN	179,1	100
NLC	96,9	74,7
NLC _{BVC}	79,9	65,2

4.7 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (XDR)

Como mencionado, lipídios sólidos são caracterizados por apresentarem polimorfismos, devidos à sua organização estrutural, podendo exibir diferentes espécies cristalinas. Essas mudanças podem influenciar a encapsulação do fármaco e, desta forma, alterar a estabilidade de nanopartículas lipídicas, tornando importante o seu estudo (ÜNER, 2016). A difratometria de Raios-X é uma técnica que permite analisar a mudança no arranjo cristalino das nanopartículas lipídicas (BUNJES, 2011). Na literatura duas informações podem ser obtidas através desta análise: se há formação de uma estrutura amorfa do lipídio sólido pela adição de lipídio líquido à formulação, evidenciada pela diminuição na intensidade dos picos e/ou da largura, e se o fármaco também apresenta mudanças na sua estrutura cristalina, caracterizada pela ausência dos picos de difração de sua forma cristalina, indicativo que ele se encontra na matriz lipídica (GONZALEZ-MIRA et al., 2011; NEUPANE et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016). Os resultados encontrados para NLC, NLC_{BVC} e seus componentes estão na Figura 23.

Foi encontrado, no difratograma de CP puro (Figura 22), picos característicos em 7, 11, 21 e 24°, com alta intensidade, evidenciando alto grau de cristalinidade do lipídio puro, conforme relatado em literatura (RUKTANONCHAI et al., 2008). Estes picos diminuem de intensidade quando CP está nas nanopartículas NLC e NLC_{BVC}, indicando que a adição de lipídio líquido e de BVC_{S75}, amorfiza o palmitato de cetila, o que é esperado.

Outro resultado encontrado, foi o padrão de difração da bupivacaína, com pico de maior intensidade em 10°, de acordo com a literatura (para mistura racêmica; (CHEUNG et al., 2004)) mostrando estar em sua forma cristalina, quando pura. Nota-se que quando adicionada à NLC, este pico praticamente desaparece, comprovando sua incorporação na matriz lipídica. Porém, ainda é perceptível um pico de menor intensidade, provavelmente devido à fração não encapsulada de BVC_{S75} no sistema (~45%), Tabela 16.

Assim, as análises de DSC e XDR permitiram identificar a formação de matrizes lipídicas amorfas, que ajudam a manter a estabilidade no sistema, bem como forneceram fortes indícios da encapsulação do fármaco no meio lipídico dos NLC.

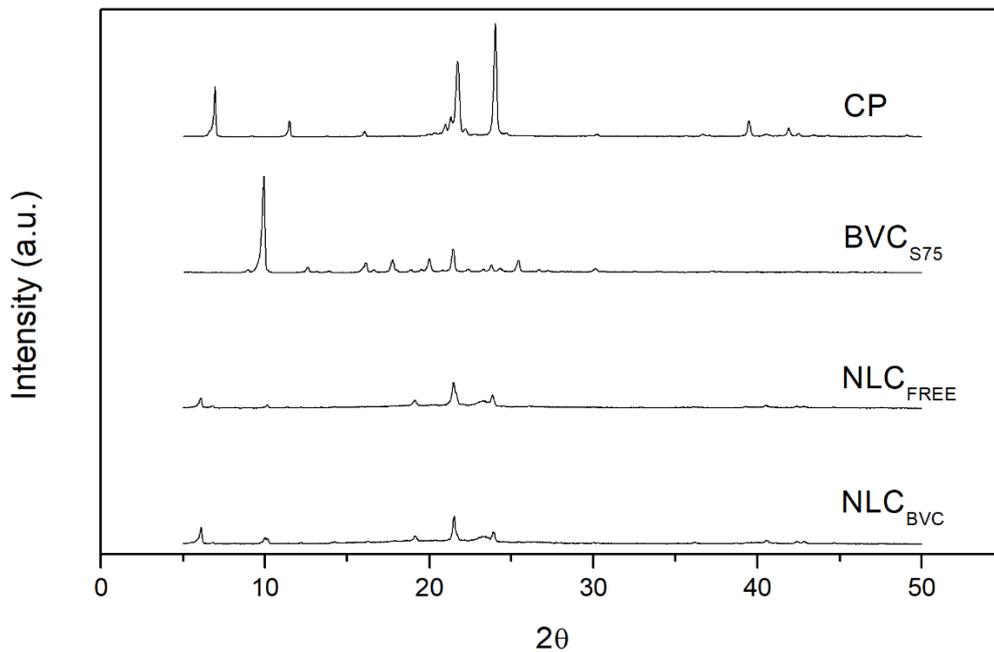


Figura 23. Difratogramas de raios-X do palmitato de cetila puro (CP), bupivacaína S75:R25 (BVC_{S75}), carreador lipídico nanoestruturado sem fármaco (NLC_{FREE}) e com bupivacaína S75:R25 (NLC_{BVC}).

Até o momento, foram realizadas análises estruturais a fim de otimizar e caracterizar o carreador lipídico nanoestruturado. Encontrou-se uma formulação ótima, com formato e dimensões dentro do esperado, assim como esta apresentou estabilidade no tempo estudado. Foi possível também, identificar uma matriz lipídica amorfa e a encapsulação da bupivacaína nesta matriz, em concordância com o aumento no tempo de liberação (item 4.8). Também a partir daqui foi possível a realização dos estudos *in vitro* e *in vivo* com esta formulação otimizada.

4.8 ENSAIOS DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

A cinética de liberação de fármaco encapsulado em uma matriz deve ser investigada para se ter acesso a dados da eficácia desta formulação, para ser considerada um sistema de liberação sustentada/controlada. Também, as NLC possuem uma matriz biodegradável com propriedades dependentes de temperatura. Assim, um aumento de temperatura favorece a liberação do fármaco, sendo mais um importante fator que o estudo de cinética irá indicar (ABDEL-MOTTALEB; NEUMANN; LAMPRECHT, 2010).

Para esse estudo, a maioria dos artigos utiliza células de difusão, baseados na publicação de Franz, 1975. Assim, foi utilizado este modelo para realizar o estudo. O ensaio foi realizado

a 37°C. Em vários intervalos de tempo foram coletados, do compartimento receptor, 200 µL de amostra e a quantificação de bupivacaína foi realizada por CLAE.

A taxa de liberação *in vitro* da bupivacaína em solução aquosa e da BVC_{S75} encapsulada em NLC foi determinada de experimentos realizados em sextuplicata e os resultados expressos em porcentagem do anestésico liberado em função do tempo. Os resultados obtidos estão representados na Figura 24.

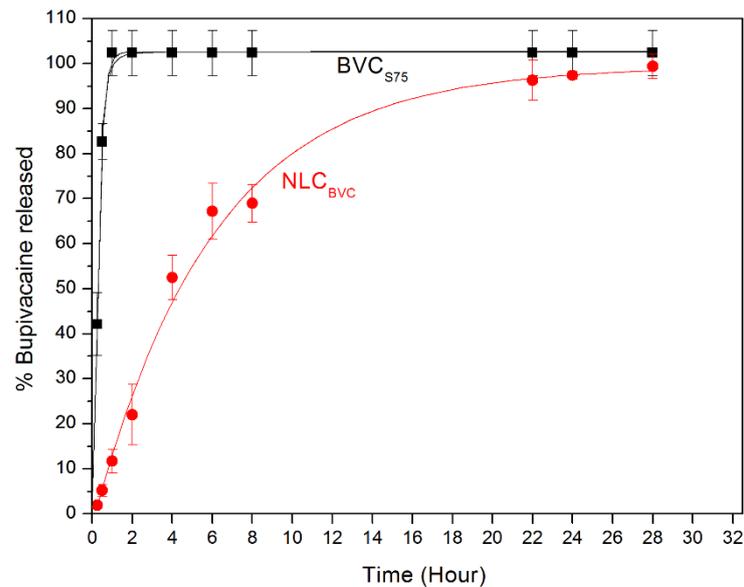


Figura 24. Cinética de liberação, da bupivacaína S75:R25, (BVC_{S75}) em solução aquosa e NLC_{BVC}, (em carreador lipídico nanoestruturado) realizadas em tampão PBS pH 7,4; n=6.

Como controle das formulações, utilizou-se a bupivacaína em sua forma de cloridrato, em solução aquosa, respeitando a condição *sink*. A bupivacaína em solução apresentou 100% de liberação em 1 hora de experimento, enquanto que a formulação NLC_{BVC} apresentou uma difusão prolongada. Castelli e col., 2005, estudaram a interação da matriz lipídica dos NLC com diferentes fármacos e concluíram que provavelmente esta interação é o principal fator na modulação da taxa de liberação do composto encapsulado. Da mesma forma, a formulação por nós estudada também apresentou uma taxa de liberação modificada, confirmando os resultados das análises estruturais que mostraram a encapsulação do fármaco. A NLC_{BVC} apresentou 100% de liberação em aproximadamente 28 horas. Estes dados confirmam que os NLC são capazes de retardar a difusão de compostos encapsulados, como relatado na literatura (MULLER; KECK, 2004).

Em sistemas de liberação sustentada como os NLC, têm-se uma liberação inicial rápida (*burst release*) seguida por uma liberação sustentada (RIBEIRO et al., 2016). Assim, na

NLC_{BVC}, o efeito *burst release* é visto nas primeiras 2 horas de experimento (20% do fármaco liberado), provavelmente pela difusão simples da fração não encapsulada do anestésico, sendo o restante liberado de forma prolongada, conforme esperado para um DDS.

4.8.1 Análise do mecanismo de liberação do fármaco, a partir dos NLC

Os resultados encontrados no estudo de liberação foram analisados conforme os modelos de liberação: de zero e primeira ordens e pelos modelos de Higuchi, Hixcon-Crowell e Korsmeyer-Peppas, pela análise da regressão linear de cada equação, conforme dados da Tabela 18, empregando o programa KinectDS3.

Tabela 18. Análise da cinética de liberação de BVC_{S75} por diferentes modelos de liberação *in vitro*, em termos de coeficiente de regressão linear (r^2).

Modelos	r^2				
	Ordem zero	Primeira ordem	Higuchi	Hixcon-Crowell	Korsmeyer-Peppas
NLC _{BVC}	0,8206	0,1460	0,6091	0,5843	0,9953

Com estes dados, o melhor modelo, baseado no valor de r^2 , é o de Korsmeyer-Peppas, apresentando o melhor ajuste, em comparação com os outros modelos. Este modelo é comumente aplicado para nanoestruturados DDS, e também é utilizado para NLC (HAZZAH et al., 2015). Este resultado está de acordo com outros dados em literatura, em que o modelo Korsmeyer-Peppas foi o melhor descreveu o comportamento de liberação de fármacos, a partir de NLC (BARBOSA, 2013; CASTRO, 2016; NAHAK et al., 2015; NEUPANE et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016).

Conforme o expoente n da equação de Korsmeyer-Peppas, um tipo de mecanismo de difusão é definido. Para $n < 0,43$ caracteriza-se mecanismo de difusão Fickiana simples; para $0,43 < n < 0,85$, é caracterizado um modelo de transporte anômalo (difusão combinada com outro fator de liberação) e para $n \geq 0,85$ configura-se um mecanismo de super transporte tipo II (*super case II transport*) (PEPPAS, 1985). O valor de n para a formulação NLC_{BVC} foi de 0,8, indicando que a liberação é de transporte anômalo não Fickiano, como relatado por também por Ramos (2016) e Ribeiro (2016) em formulações de anestésicos locais em NLC. Assim, há mais de um mecanismo de difusão da droga no sistema de nanopartículas, estando de acordo com os resultados encontrados previamente onde existe no sistema uma quantidade de fármaco não encapsulada (difusão rápida) e encapsulada (difusão lenta). Em até 6 horas de estudo 70% do

fármaco foi liberado, representando a fração do fármaco não encapsulado mais o fármaco presente na superfície das nanopartículas; após este período, tem-se uma liberação sustentada, até o fim do experimento, devido a degradação das nanopartículas lipídicas e consequente liberação do fármaco de sua matriz (MÜLLER; RÜHL; RUNGE, 1996b).

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA *IN VIVO*

O modelo experimental de pressão na pata (PWPT) é um método utilizado para avaliar a hipernocicepção e foi desenvolvido por Randall e Selitto (1957). O método baseia-se na indução de hiperalgesia através de pressão crescente, exercida na pata do animal. Neste ensaio experimental, o fármaco estudado é injetado no espaço popliteal, na fase posterior do joelho, na área do nervo ciático (DE MELO et al., 2011) e é medido o tempo de latência da retirada da pata a partir da pressão exercida sobre esta através de um analgesímetro (Figura 24), que gera aumento gradual da força (em gramas) sobre a superfície dorsal da pata do animal (ARAÚJO et al., 2005). O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar hipernociceptivo, definido pela força necessária (aplicada à pata) para induzir uma resposta aversiva a um estímulo nocivo. Experimentalmente, avalia-se primeiro o limiar basal do animal, previamente à injeção do fármaco e após a administração tiram-se medidas contínuas no intervalo de tempo. O limite de pressão na pata do animal para não causar injurias é chamado de *cutoff*, que para ratos é de 180 g. Após a coleta de dados, estes foram normalizados, para cada animal (Equação 12), para máximo efeito possível (%MPE).



Figura 25. Analgesímetro Hugo Basile utilizado para o teste de pressão na pata.

O bloqueio do nervo ciático é um teste que provê informações sobre a intensidade e a duração do bloqueio sensorial induzido por anestésicos locais em ratos (ARAÚJO et al., 2005; GRILLO et al., 2010; LESZCZYNSKA; KAU, 1992), assim, a literatura já utiliza este modelo para avaliar diversos DDS com o anestésico bupivacaína (ARAÚJO et al., 2004). Aqui, foi avaliado a eficácia anestésica de soluções de cloridrato de bupivacaína S75:R25 a 0,125% (BVC_{S75} 0,125%) e a 0,5% (BVC_{S75} 0,5%) e também de formulações de bupivacaína S75:R25 encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados a 0,125% (NLC_{BVC} 0,125%) e 0,5% (NLC_{BVC} 0,5%), obtendo um gráfico de máxima dose possível, apresentado na Figura 26.

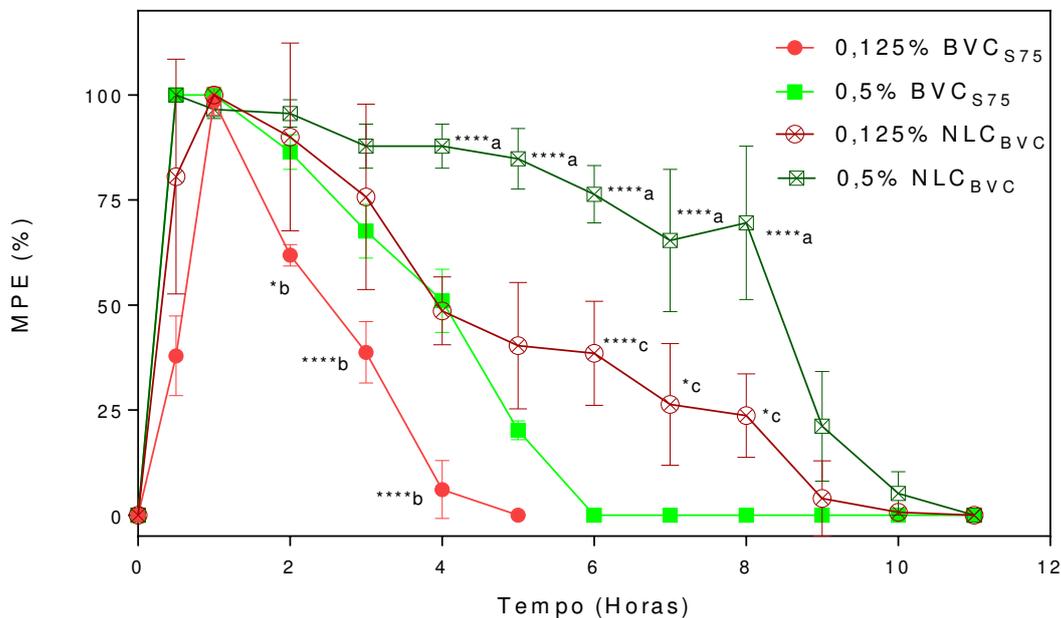


Figura 26. Efeito anestésico (teste PWPT): Efeito Máximo possível (MPE %) em função do tempo. BVC_{S75} , formulação bupivacaína S75:R25 livre e NLC_{BVC} , formulação de carreador lipídico nanoestruturado com bupivacaína S75:R25. $n=5$. Teste estatístico One-way ANOVA com Tukey–Kramer *post hoc* teste: a, BVC_{S75} 0,5% x NLC_{BVC} 0,5%; b, BVC_{S75} 0,125% x NLC_{BVC} 0,125%; c, BVC_{S75} 0,5% x NLC_{BVC} 0,125%. * $p<0.05$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

A partir destes resultados (Figura 26), o efeito total anestésico de cada formulação foi estimado pela área sob a curva efeito-tempo (AUC), cujos resultados são apresentados na Figura 27. A estes dados foi aplicado o tratamento estatístico One-way ANOVA com testes de Tukey–Kramer *post hoc*.

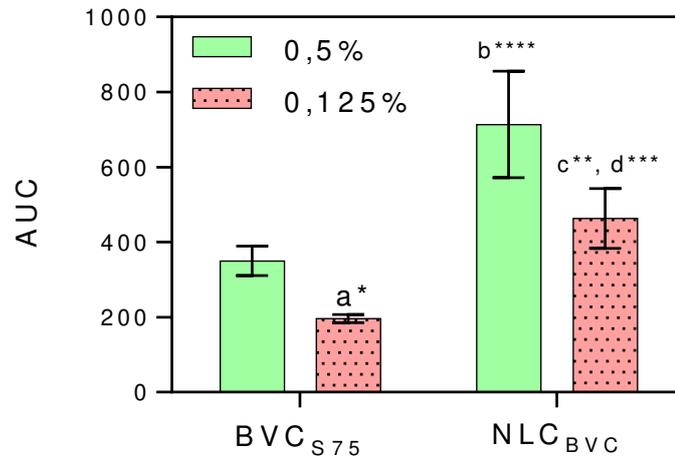


Figura 27. Efeito anestésico (teste PWPT). Área sob a Curva (efeito-tempo) pós injeção de solução de bupivacaína S75:R25 em solução (BVC_{S75}) e em carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC_{BVC}). Testes estatísticos One-way ANOVA com Tukey–Kramer *post hoc*: a, BVC_{S75} 0,125% x BVC_{S75} 0,5%; b, BVC_{S75} 0,5% x NLC_{BVC} 0,5%; c, NLC_{BVC} 0,5% x NLC_{BVC} 0,125%, d, BVC_{S75} 0,125% x NLC_{BVC} 0,125%. * p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Os resultados encontrados no gráfico de máximo efeito possível (Figura 26) mostram que, em concordância com o teste de liberação *in vitro*, os carreadores lipídicos nanoestruturados induzem maior tempo de anestesia em relação à bupivacaína livre, consistindo em um sistema de liberação prolongada. Desta forma o anestésico foi capaz de permanecer um maior tempo no local de ação, prolongando o bloqueio sensorial. Esse resultado também foi notado pela inclusão de bupivacaína em outros sistemas de liberação prolongada (GRILLO et al., 2010; ROGOBETE et al., 2015; SHIKANOV; DOMB; WEINIGER, 2007).

Em ambas as formulações de NLC (com 0,125 e 0,5% de BVC_{S75}), o tempo de analgesia foi praticamente dobrado, em comparação com o anestésico em solução. Quando comparado com outros sistemas de DDS com bupivacaína, (ARAÚJO et al., 2005), aumentaram em menos de uma hora o efeito analgésico do bupivacaína complexada com ciclodextrina no seu teste de PWPT em camundongos. MCALVIN e colaboradores (2014) descreveram que a média de duração do bloqueio anestésico do nervo ciático em ratos de soluções lipossomais de bupivacaína comercial (Exparel™) 1,3% é de 4 horas. Assim, o sistema de NLC_{BVC} apresentou maior tempo de anestesia (8 horas) se comparado com o sistema lipossomal (4 horas), utilizando uma menor dose de fármaco.

Outro dado observado é que não houve diferença estatística, em relação à área sobre a curva, significativa entre as formulações de BVC_{S75} 0,5% e NLC_{BVC} 0,125%. Este resultado é promissor e indica ser possível diminuir a dose do anestésico em 75% e manter a anestesia, tal

que muito menos fármaco poderia ser aplicado na clínica, diminuindo a toxicidade.

Observou-se, para todas as formulações testadas um efeito inicial (*onset*) de anestesia rápido, interessante para um anestésico local (BECKER; REED, 2012; DE PAULA et al., 2012), sendo este dado em conformidade com o teste de liberação *in vitro*. Este resultado é possivelmente devido à fração de fármaco não encapsulada nas formulações de NLC (EE% = 55%) mostrando que a encapsulação alcançada, mesmo que não total, foi benéfica para garantir anestesia inicial e prolongada. Nota-se que, logo após atingido o máximo efeito possível, a formulação contendo BVC_{S75} livre (em solução) já começava a diminuir seu efeito, o que não ocorreu com as NLC, que apresentou comportamento de liberação sustentada, confirmando a presença da BVC_{S75} por um maior tempo, no local da injeção.

5 CONCLUSÕES

Nesta dissertação foi desenvolvida uma nova formulação de liberação sustentada para o anestésico local BVC_{S75} (NovaBupi[®], bupivacaína com excesso enantiomérico S75:R25) utilizando carreadores lipídicos nanoestruturados. A composição escolhida para esse desenvolvimento foi palmitato de cetila como lipídio sólido, Capryol 90 como lipídio líquido e Pluronic F68 como surfactante. A partir do planejamento experimental 2⁴ foi possível otimizar esta formulação e encontrar a quantidade ideal de cada componente para uma formulação de menor tamanho de partículas e PDI, e máximos potencial Zeta e %EE. A formulação otimizada (contendo 4% palmitato e cetila, 4% Capryol 90, 5% Pluronic F-68, 1% bupivacaína (S75:R25) m/m) apresentou diâmetro médio de partículas de 165,9 ±1,50 nm, PDI de 0,123 ±0,005, PZ de -37,0 ±1,1 mV

Através das caracterizações físico-químicas, foi possível determinar que a adição de BVC_{S75} às nanopartículas não alterou sua estrutura, porém aumentou o tamanho médio das partículas, assim como seu potencial Zeta, demonstrando encapsulação do fármaco. Os testes de DSC e DRX confirmaram que a BVC_{S75} foi encapsulada nas nanopartículas, diminuindo a organização estrutural dos lipídios da matriz, evidenciado pela menor entalpia de transição / grau da cristalinidade.

Durante um período de doze meses, a formulação desenvolvida se mostrou estável, não apresentando diferenças estatísticas significativas no seu tamanho, PDI, PZ, %EE e pH, quando mantida na temperatura ambiente.

A avaliação farmacológica da bupivacaína S75:R25 encapsulada em nanopartículas, através do teste de analgesia (PWPT) em animais, mostrou que o sistema foi capaz de duplicar o tempo de analgesia, bem como reduzir em quatro vezes a dose de anestésico necessária para se obter o mesmo tempo de anestesia, em relação a BVC_{S75} livre (solução comercial de cloridrato de BVC_{S75}).

Pode-se concluir que este novo DDS para bupivacaína é promissor para a aumento de tempo de analgesia, principalmente para uso no controle da dor pós-operatória (maior tempo de duração, evitando re-injeção) ou ainda em procedimentos cirúrgicos (uso mais difundido da bupivacaína), diminuindo a dose necessária para atingir o mesmo efeito da formulação comercial, com conseqüente diminuição na toxicidade sistêmica.

6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOTTALEB, M. M. A.; NEUMANN, D.; LAMPRECHT, A. In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 2, p. 208–213, 2010.
- ALI, H. et al. Molecular interaction and localization of tocotrienol-rich fraction (TRF) within the matrices of lipid nanoparticles: Evidence studies by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (¹H NMR). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, n. 2, p. 286–297, 2010.
- ARAÚJO, D. R. DE et al. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53, p. 663–671, 2003.
- ARAÚJO, D. R. DE et al. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. **Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie**, v. 51, n. 6, p. 566–572, 2004.
- ARAÚJO, D. R. DE et al. Drug-Delivery Systems for Racemic Bupivacaine (S50-R50) and Bupivacaine Enantiomeric Mixture (S75-R25): Cyclodextrins Complexation Effects on Sciatic Nerve Blockade in Mice. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 3, p. 316–328, jun. 2005.
- BALAKRISHNAN, P. et al. Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 539–545, 2009.
- BARBOSA, R. M. . **Preparo e caracterização de nanopartículas lipídicas como carreadores do anestésico local dibucaína**. [s.l.] Tese de Doutorado, Unicamp, 2013.
- BARDSLEY, H. et al. A comparison of the cardiovascular effects of levobupivacaine and rac-bupivacaine following intravenous administration to healthy volunteers. **British journal of clinical pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 245–249, set. 1998.
- BARROS NETO, B. DE.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimeno na ciência e na indústria**. [s.l.] Editora da Unicamp, 2001.
- BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 5, p. 497–508, 2012.
- BECKER, D. E.; REED, K. L. Local Anesthetics: Review of Pharmacological Considerations. **Anesthesia Progress**, v. 59, n. 2, p. 90–102, jun. 2012.
- BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016.

- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- BRASIL, A. N. DE V. S. **Resolução ANVISA, RE nº 899, 29/05/2003**, 2003.
- BREITKREITZ, M. C. et al. Characterization of semi-solid Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) of atorvastatin calcium by Raman image spectroscopy and chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Journal of Pharmaceutical and Biomedical**, v. 73, p. 3–12, 2013.
- BRUGÈ, F. et al. A comparative study on the possible cytotoxic effects of different nanostructured lipid carrier (NLC) compositions in human dermal fibroblasts. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, n. 2, p. 879–885, 2015.
- BRUNTON, L. L.; BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman (12a. ed.)**. [s.l: s.n.].
- BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405–411, 2011.
- CARBONE, C. et al. Preparation and optimization of PIT solid lipid nanoparticles via statistical factorial design. **European journal of medicinal chemistry**, v. 49, p. 110–7, mar. 2012.
- CARVALHO, J. Farmacologia dos anestésicos locais. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 44, n. Figura 1, p. 75–82, 1994.
- CASTELLI, F. et al. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, p. 231–238, 2005.
- CASTRO, S. R. **Preparo e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados dispersos em hidrogéis termorreversíveis para liberação tópica do anestésico local tetracaína**. [Dissertação de Mestrado] UNICAMP, 2016.
- CHEN, C. K. et al. Levobupivacaine vs racemic bupivacaine in spinal anesthesia for sequential bilateral total knee arthroplasty: a retrospective cohort study. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 33, p. 75–80, set. 2016.
- CHEN, H. et al. Development of a ropivacaine-loaded nanostructured lipid carrier formulation for transdermal delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 465, p. 130–136, 2015.
- CHEUNG, E. Y. et al. Rationalizing the Structural Properties of Bupivacaine Base—A Local Anesthetic—Directly from Powder X-Ray Diffraction Data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 3, p. 667–674, mar. 2004.
- CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer

micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 3, p. 303–317, 2007.

CHO, C. W.; KIM, D. B.; SHIN, S. C. Development of bioadhesive transdermal bupivacaine gels for enhanced local anesthetic action. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 423–431, 2012.

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. **Anesthesiology**, v. 62, n. 4, p. 396–405, abr. 1985.

COLLETT, J.; MORETIN, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, M. E. (Ed.). **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 298–313.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 139–151, 30 ago. 2012.

DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Precise engineering of dapivirine-loaded nanoparticles for the development of anti-HIV vaginal microbicides. **Acta Biomaterialia**, v. 18, p. 77–87, 2015.

DATE, A.; NAGARSENKER, M. Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for cefpodoxime proxetil☆. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1–2, p. 166–172, 1 fev. 2007.

DE MELO, N. F. S. et al. Poly(Lactide-co-Glycolide) Nanocapsules Containing Benzocaine: Influence of the Composition of the Oily Nucleus on Physico-Chemical Properties and Anesthetic Activity. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 8, p. 1984–1994, 7 ago. 2011.

DE PAULA, E. et al. Micro and nanosystems for delivering local anesthetics. **Expert opinion on drug delivery**, v. 9, n. 12, p. 1505–24, 10 dez. 2012.

DOKTOROVÁ, S. et al. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 235–252, ago. 2016.

DUGGAL, R.; KAPOOR, R.; MOYAL, G. A comparison of intrathecal levobupivacaine with hyperbaric bupivacaine for elective cesarean section: A prospective randomized double-blind study. **Journal of Obstetric Anaesthesia and Critical Care**, v. 5, n. 2, p. 78, 2015.

ELDER, R. Final Report on the Safety Assessment of Octyl Palmitate, Cetyl Palmitate and Isopropyl Palmitate. **International Journal of Toxicology**, v. 1, n. 2, p. 13–35, 1982.

- FANGUEIRO, J. F. et al. Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 100, p. 84–89, 1 dez. 2012.
- FERLAS, B.; BORN, M. Liposomal Bupivacaine: A New Option for Postoperative Pain. **US Pharm**, v. 40, n. 3, p. HS17-HS20, 2015.
- FRANZ, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190–195, 1975.
- FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN®) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221–229, jun. 1998.
- GHOSH, P. et al. Gold nanoparticles in delivery applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1307–1315, 2008.
- GONZALEZ-MIRA, E. et al. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. **Nanotechnology**, v. 22, n. 4, p. 45101, 28 jan. 2011.
- GÖPPERT, T. M.; MÜLLER, R. H. Protein adsorption patterns on poloxamer- and poloxamine-stabilized solid lipid nanoparticles (SLN). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 3, p. 361–372, 2005.
- GRILLO, R. et al. Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. **Journal of drug targeting**, v. 18, n. 9, p. 688–699, 2010.
- HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1–3, p. 210–216, fev. 2008a.
- HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1–3, p. 210–216, fev. 2008b.
- HAZZAH, H. A. et al. Gelucire-Based Nanoparticles for Curcumin Targeting to Oral Mucosa: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity Assessment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 11, p. 3913–3924, nov. 2015.
- ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.
- JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1, p. 124–132, 2008.
- KASONGO, W. A. et al. Selection and Characterization of Suitable Lipid Excipients for use in the Manufacture of Didanosine-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers.

Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 100, n. 12, p. 5185–5196, dez. 2011.

LAGAN, G.; MCLURE, H. A. Review of local anaesthetic agents. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 15, n. 4–5, p. 247–254, out. 2004.

LASOŃ, E.; SIKORA, E.; OGONOWSKI, J. Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation. **Acta biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, p. 773–7, 2013.

LESZCZYNSKA, K.; KAU, S. T. A sciatic nerve blockade method to differentiate drug-induced local anesthesia from neuromuscular blockade in mice. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 27, n. 2, p. 85–93, 1992.

LOWRY, G. V. et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. **Environ. Sci.: Nano**, 2016.

LYONS, G. et al. Epidural pain relief in labour: potencies of levobupivacaine and racemic bupivacaine. **British journal of anaesthesia**, v. 81, n. 6, p. 899–901, dez. 1998.

MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 165–96, 2001.

MALAMED, S. F. **Handbook of local anesthesia**. [s.l.] Elsevier, 2013.

MARTINS, S. et al. Brain delivery of camptothecin by means of solid lipid nanoparticles: Formulation design, in vitro and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, n. 1, p. 49–62, 2012.

MATHER, L. E.; CHANG, D. H. Cardiotoxicity with modern local anaesthetics: is there a safer choice? **Drugs**, v. 61, n. 3, p. 333–42, 2001.

MCALVIN, J. B. et al. Multivesicular liposomal bupivacaine at the sciatic nerve. **Biomaterials**, v. 35, n. 15, p. 4557–64, maio 2014.

MORAES, C. M. et al. Validation of analytical methodology by hplc for quantification of bupivacaine (s75-r25) in poli-lactide-co-glicolide nanospheres. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2152–2155, 2008.

MULLER, R. H.; KECK, C. M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs - A review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. **Journal of Biotechnology**, v. 113, n. 1–3, p. 151–170, 2004.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161–177, jul. 2000.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured

lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. SUPPL., p. 131–155, 2002.

MÜLLER, R. H.; RÜHL, D.; RUNGE, S. A. Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 144, n. 1, p. 115–121, jan. 1996a.

MÜLLER, R. H.; RÜHL, D.; RUNGE, S. A. Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 144, n. 1, p. 115–121, jan. 1996b.

MÜLLER, R. H.; SHEGOKAR, R.; M. KECK, C. 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 8, n. 3, p. 207–227, 1 set. 2011.

NAHAK, P. et al. Physicochemical studies on local anaesthetic loaded second generation nanolipid carriers. **RSC Adv.**, v. 5, n. 33, p. 26061–26070, 2015.

NETO, O. A. **Dor: Princípios e prática**. [s.l.] Artmed Editora, 2009.

NEUPANE, Y. R. et al. Lipid based nanocarrier system for the potential oral delivery of decitabine: Formulation design, characterization, ex vivo, and in vivo assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 601–612, 2014.

OH, K. S. et al. Paclitaxel-loaded Pluronic nanoparticles formed by a temperature-induced phase transition for cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 3, p. 344–350, dez. 2010.

OHMURA, S. et al. Systemic Toxicity and Resuscitation in Bupivacaine-, Levobupivacaine-, or Ropivacaine-Infused Rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 93, n. 3, p. 743–748, set. 2001.

PACELLA, E. et al. Efficacy and safety of 0.5% levobupivacaine versus 0.5% bupivacaine for peribulbar anesthesia. **Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)**, v. 7, p. 927–32, 2013.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1–2, p. 170–184, 2009.

PATHAK, P.; NAGARSENKER, M. Formulation and evaluation of lidocaine lipid nanosystems for dermal delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 985–992, 2009.

PATIL-GADHE, A.; POKHARKAR, V. Montelukast-loaded nanostructured lipid carriers: Part I Oral bioavailability improvement. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 160–168, 2014.

PATNAIK, P. **Infrared and Raman Spectroscopy** *Dean's Analytical Chemistry Handbook, Second Edition* McGraw Hill Professional, Access Engineering, , 2004. Disponível em:

<https://www.accessengineeringlibrary.com:443/browse/deans-analytical-chemistry-handbook-second-edition/p2000ad3299707_1001>

PENNING, J. P.; YAKSH, T. L. Interaction of intrathecal morphine with bupivacaine and lidocaine in the rat. **Anesthesiology**, v. 77, n. 6, p. 1186–2000, dez. 1992.

PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 60, n. 4, p. 110–111, 1985.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 71–80, jan. 2007.

PRADHAN, M. et al. Design, characterization and skin permeating potential of Fluocinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. **Steroids**, v. 101, p. 56–63, set. 2015.

PUGLIA, C. et al. Development, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of benzocaine- and lidocaine-loaded nanostructured lipid carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 5, p. 1892–1899, maio 2011.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 127–137, set. 2010.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de thérapie**, v. CXI, p. 409–419, 1957.

RAO, M. R. P. et al. Determination of Required HLB of Capryol 90. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 161–167, 30 jan. 2014.

RIBEIRO, L. N. M. et al. Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 192–202, 2016.

RIBEIRO, L. N. M. et al. Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. in press, p. 102–112, 2017a.

RIBEIRO, L. N. M. et al. Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, p. 102–112, ago. 2017b.

ROGOBETE, A. F. et al. Liposomal bupivacaine – New trends in Anesthesia and Intensive Care Units. **Egyptian Journal of Anaesthesia**, v. 31, n. 1, p. 89–95, jan. 2015.

RUKTANONCHAI, U. et al. The effect of cetyl palmitate crystallinity on physical properties of gamma-oryzanol encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 19, n. 9, p. 95701, 5 mar. 2008.

SACRÉ, P.-Y. et al. Data processing of vibrational chemical imaging for pharmaceutical applications.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 101, p. 123–140, 2014.

SANTOS, A. C.; DEARMAS, P. I. Systemic Toxicity of Levobupivacaine, Bupivacaine, and Ropivacaine during Continuous Intravenous Infusion to Nonpregnant and Pregnant Ewes. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 95, n. 5, p. 1256–1264, 2001.

SAUPE, A.; GORDON, K. C.; RADES, T. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 56–62, 2006.

SAUPE A, WISSING SA, LENK A, SCHMIDT C, M. R. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC)-structural investigations on two different carrier systems. **Biomed Mater Eng**, v. 15, p. 393–402, 2005.

SHIKANOV, A.; DOMB, A. J.; WEINIGER, C. F. Long acting local anesthetic-polymer formulation to prolong the effect of analgesia. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 117, n. 1, p. 97–103, 22 jan. 2007.

SLOWING, I. I. et al. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1278–1288, 2008.

TEERANACHAIDEEKUL, V. et al. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 141–148, 2007.

UCHEGBU, I. F.; SCHATZLEIN, A. G. **Polymers in drug delivery**. [s.l.] CRC/Taylor & Francis, 2006.

ÜNER, M. Characterization and Imaging of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. In: **Handbook of Nanoparticles**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 117–141.

WENNINGER, J. A.; MCEWEN, G. N.; COSMETIC, T. AND F. A. **International cosmetic ingredient dictionary**. [s.l.] Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, 1995.

WHITESIDE, J. B.; WILDSMITH, J. A. W. Developments in local anaesthetic drugs. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 1, p. 27–35, 2001.

ZHANG, X. et al. Formulation optimization of dihydroartemisinin nanostructured lipid carrier using response surface methodology. **Powder Technology**, v. 197, n. 1, p. 120–128, 2010.

ZHAO, S. et al. Mixture of Nonionic/Ionic Surfactants for the Formulation of Nanostructured Lipid Carriers: Effects on Physical Properties. **Langmuir**, v. 30, n. 23, p. 6920–6928, 17 jun. 2014.

ZUR MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 149–155, mar. 1998.

ANEXO 1

ARTIGOS PRODUZIDOS

Rodrigues da Silva, Gustavo H., Lígia N. M. Ribeiro, Hery Mitsutake, Simone R. Castro Viviane A. Guilherme, Ronei J. Poppi, Márcia C. Breitzkreitz, and Eneida de Paula; *Optimised NLC: A Nanotechnological Approach to Improve the Anaesthetic Effect of Bupivacaine (S75:R25)*; International Journal of Pharmaceutics, v.529, p.253-263, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.066>.

Rodrigues da Silva, G. H., Lígia N. M. Ribeiro, Viviane A. Guilherme, Simone C. Castro, M. C. Breitzkreitz, E. De Paula; *Bupivacaine (S75:R25) Loaded in Nanostructured Lipid Carriers: Factorial Design, HPLC Quantification Method and Physicochemical Stability Study*. Current Drug Delivery, v.14, 2017, doi: 10.2174/1567201814666170726101113.

Lígia Nunes de Moraes Ribeiro; Márcia C Breitzkreitz; Viviane A Guilherme; Gustavo H. Rodrigues da Silva; Verônica M Couto; Simone R Castro; Bárbara O De Paula; Daysi Machado; Eneida de Paula; *Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies*; European Journal of pharmaceutics, v.16, p102-112, 2017. Citações Google Scholar: 1

Lígia N.M. Ribeiro, Ana C.S. Alcântara, Gustavo H. Rodrigues da Silva, Michelle Franz-Montan, Silvia V.G. Nista, Simone R. Castro, Verônica M. Couto, Viviane A. Guilherme, Eneida de Paula; *Bio-hybrid advanced biomaterials for sustained drug release*; submetido a revista "Current Pharmaceutical Design".

PEDIDO DE PATENTE CONCEDIDO

Lígia N.M. Ribeiro, Gustavo H. Rodrigues da Silva, Michelle Franz-Montan, Simone R. Castro, Viviane A. Guilherme, Eneida de Paula; *Método De Obtenção De Filme Lipídico-Biopolimérico Nanoestruturado, Filme Lipídico-Biopolimérico Nanoestruturado*; Patente Concedida.

ANEXO 2

Apresentações e participações em congressos

Unit
UNIVERSIDADE TIRADENTES

II Congresso Internacional de
INOVAÇÃO
2º Encontro de Jovens Investigadores em
ENGENHARIA BIOTECNOLÓGICA

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado "OTIMIZAÇÃO DE CARREGADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE BUPIVACAÍNA (S75-R25) POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL" dos autores: GUSTAVO H. RODRIGUES DA SILVA, SIMONE RAMOS DE CASTRO, VIVIANE A. GUILHERME, LÍGIA NUNES DE MORAIS RIBEIRO, MÁRCIA CRISTINA BREITKREITZ, ENEIDA DE PAULA, foi apresentado em forma de pôster, por ocasião da realização do II Congresso Internacional de Inovação e 2º Encontro de Jovens Investigadores em Engenharia Biotecnológica, realizado no período de 01 a 04 de dezembro de 2015 em Aracaju/SE.

Aracaju/SE, 04 de dezembro de 2015.

Aracaju, de 01 a 04 de dezembro de 2015

Luiz Pereira da Costa
Prof. Dr. Luiz Pereira da Costa
Presidente

Leonardo Maestri Teixeira
Prof. Dr. Leonardo Maestri Teixeira
Diretor-Científico

Brazil MRS Meeting
September 27 to October 01

SBPMat
Brazil-MRS

Brazilian Materials Research Society
Excellence in the union of science and research in materials technology in Brazil

Certificate

(R.P2.129)

Hereby we certify that the work
Characterization of a Nanostructured Lipid Carrier for the delivery of Lidocaine and toxicity studies in Zebrafish,
submitted by
Gustavo Henrique Rodrigues da Silva, Lígia Nunes de Moraes Ribeiro, Viviane Aparecida Guilherme, Simone Ramos de Castro, Verônica Muniz Couto, Bárbara O. De Paula and Eneida de Paula
was presented in **Poster** form by **Gustavo Henrique Rodrigues da Silva** at
the XV Brazilian MRS Meeting, in Campinas-SP, from 25th to 29th of September 2016.

Ana Flávia Nogueira
Ana Flávia Nogueira
Conference Chair

Mônica Alonso Cotta
Mônica Alonso Cotta
Conference Chair

Osvaldo Novais de Oliveira Junior
Osvaldo Novais de Oliveira Junior
Brazil MRS President

ANEXO 3

Participação em Cursos



Fundação Médica
do Rio Grande do Sul

CERTIFICADO

Certificamos que GUSTAVO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA participou como Cursista, no(a) II ESCOLA DE VERÃO DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UFRGS., realizado no(a) AUDITÓRIO DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UFRGS, no período de 13/2/2017 a 17/2/2017, com duração de 30 horas.

PORTO ALEGRE, 27 DE FEVEREIRO DE 2017.

STELA MARIS KUZÉ RATES
Coordenador do Curso/Seminário

FERNANDO GRILO GOMES
Presidente

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Sala 177 - Bom Fim - Porto Alegre / RS - CEP 90035-003 - CNPJ nº 94.391.901/0001-03
Fones: (51) 3332-6840 ou (51) 3333-1585 - www.fundacaomedica.org.br

Certificamos que

GUSTAVO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA

Participou do curso de extensão universitária:

"Animais de Laboratório: uma especialidade", realizado no período de 15 a 19 de maio de 2017, no Instituto Butantan, com carga horária de 40h/aula.

ib



Vania Gomes de Moura Mattarala
Instituto Butantan

fundação
butantan

ib

butantan



GOVERNO DO ESTADO
SÃO PAULO
Secretaria de Saúde



DECLARAÇÃO

GUSTAVO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA

participou do curso "Método Lógico para Redação Científica" (Nível Básico), ministrado pelo Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato (UNESP/Botucatu) no Auditório III do Centro de Convenções da Universidade Estadual de Campinas, no dia 22 de maio de 2017, totalizando 8 horas/aula.

Espaço da Escrita
Coordenadoria Geral da Universidade
UNICAMP

ANEXO 4



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Preparo e caracterização de carregadores lipídicos nanoestruturados para o anestésico local bupivacaína", protocolo nº 4155-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula / Gustavo Henrique Rodrigues da Silva, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, tendo sido aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 04 de abril de 2016.

Vigência do projeto: 08/2015-08/2017

Início do experimento envolvendo manipulação animal: ABRIL/2016

Espécie/Linhagem: Rato heterogênico / Wistar

No. de animais: 56

Idade/Peso: 05 semanas / 150g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 04 de abril de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

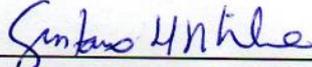
IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

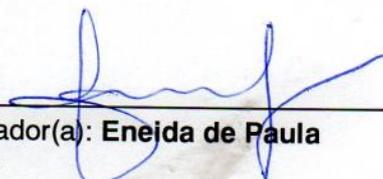
ANEXO 5

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO (S75:R25)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 01 de Agosto de 2017

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Gustavo Henrique Rodrigues da Silva**
RG n.º 33470171-5

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Enejda de Paula**
RG n.º 151215595