

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FÁRMACIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento de Anestésicos Locais Nanoestruturados

LALI RONSONI ZANCAN

PORTO ALEGRE, 2007.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE FÁRMACIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento de Anestésicos Locais Nanoestruturados

Dissertação apresentada por **Lali Ronsoni Zancan** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Silvia Stanisçuaski Guterres

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 16.03.2007, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Adriana Raffin Polhmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Lilian Loperollo

Biolab Sanus Farmacêutica

Profa. Dr. Teresa Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

XXXX Zancan, Lali Ronsoni

Desenvolvimento de Anestésicos Locais Nanoestruturados/ Lali Ronsoni Zancan- Porto Alegre: UFRGS, 2007-xxxxxxx

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nanopartículas. 2. Anestésicos Locais 3. Atividade Anestésica. 4. Semi-sólidos. I. Guterres, Silvia Stanisçuaski. II. Título.

CDU: xxxxxxxxxxxxxx

Bibliotecária Responsável:

Maragarida Maria C. F. Ferreira- CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com financiamento do Projeto CNPq/Biolab Sanus Farmacêutica (n° 504246/2004-6). A autora recebeu bolsa de estudos da Empresa Biolab Sanus Farmacêutica.



*“O que é a vida sem um sonho?”*

(Edmund Rostand)



*Este trabalho é dedicado ao meu marido Anibal, com todo o meu amor e gratidão, pelo apoio incondicional aos meus projetos de vida.*



## AGRADECIMENTOS

À Professora Dr. Sílvia S. Guterres pela oportunidade e confiança durante a execução deste trabalho, sobretudo orientação e exemplo profissional nesses anos de convívio. Muito obrigada.

À Professora Dr. Adriana R. Pohlmann pela contribuição científica, confiança e estímulo no decorrer desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e seus professores pela dedicação e conhecimento transmitido.

Aos colegas e amigos do Laboratório 405 pelos bons momentos de convivência e pelo conhecimento compartilhado: Letícia Colomé, Renata Raffin, Ruy Becke, Karina Paese, Manuela Gonçalves, Nataly Siqueira, Eliézer Jäger, Alessandro Jäger, Maria Lionzo, Fernanda Poletto, Clarissa Xavier, Letícia Sias, Gislane Domingues, Denise Jornada, Sandra Haas, Helen Pedroni, Leandro Tasso, Cândice Felippi, Daniela Conrado, Clarissa Bettoni, Vitória Cattani e Rodrigo Feddo. Em especial, a Letícia Cruz, a Scheila Schaffazick, a Alessandra Badejo e a Valéria Angeli pela amizade, incentivo e companheirismo em todos os momentos. A grande amiga Cristiane de Bona, parceira de projeto, pelos momentos de discussão científica e pelo incentivo constante.

A Indústria Farmacêutica Biolab pelo apoio financeiro.

À minha família, especialmente a minha mãe, Dilce, por sempre ter priorizado os meus sonhos em relação aos seus e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao Anibal pelo seu grande companheirismo, incentivo e, sobretudo, amor. Tu és o grande responsável por mais essa conquista em nossas vidas. Este trabalho é dedicado especialmente a você!

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	07
2.1 Objetivo Geral.....	09
2.2 Objetivos Específicos.....	09
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Anestésicos Locais.....	13
3.1.1 Aspectos Gerais.....	13
3.1.2 Estrutura Química Básica dos Anestésicos Locais.....	14
3.1.3 Mecanismo de ação.....	15
3.1.4 Relação Estrutura Atividade.....	17
3.1.5 Características Farmacocinéticas.....	19
3.1.6 Efeitos Indesejáveis.....	20
3.2 Novos Sistemas de Liberação Contendo Anestésicos Locais.....	21
3.2.1 Microemulsões.....	24
3.2.2 Ciclodextrinas.....	25
3.2.3 Lipossomas.....	26
3.2.4 Nanoesferas.....	30
3.3 Avaliação da Atividade Analgésica <i>in vivo</i> .....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Materiais.....	35
4.1.1 Matérias-primas.....	35
4.1.2 Aparelhos e Equipamentos.....	35
4.1.3 Solventes, Reagentes e Outros Materiais.....	35
4.1.4 Animais de Laboratório.....	36

4.2 Métodos.....	37
4.2.1 Análise Quantitativa do(s) Anestésico(s) Local(is).....	37
4.2.1.1 Condições Experimentais.....	37
4.2.1.2 Preparação da Curva Padrão.....	37
4.2.2 Preparação das Nanoestruturas Contendo Anestésico(s) Local(is)....	37
4.2.3 Caracterização Físico-químico das Nanoestruturas.....	38
4.2.3.1 Determinação do pH das Suspensões.....	38
4.2.3.2 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico das Nanoestruturas.....	38
4.2.3.3 Determinação do Teor Total e da Taxa de Associação do(s) Anestésico(s) Local(is) nas Nanoestruturas.....	38
4.2.3.4 Determinação do Potencial Zeta.....	38
4.2.3.5 Determinação da Morfologia das Nanoestruturas.....	39
4.2.4 Preparação dos Semi-sólidos .....	39
4.2.5 Caracterização dos Semi-sólidos .....	39
4.2.5.1 Determinação do pH dos Semi-sólidos.....	39
4.2.5.2 Determinação Quantitativa do(s) Anestésico(s) Local(is) nos Semi- sólidos.....	40
4.2.5.3 Determinação do Diâmetro das Nanoestruturas Presentes nos Semi-sólidos.....	40
4.2.5.4 Determinação da Morfologia das Nanopartículas Presentes nos Semi-sólidos.....	40
4.2.5.5 Avaliação da Viscosidade.....	41
4.2.5.6 Avaliação da Espalhabilidade.....	41
4.2.6 Avaliação da Estabilidade do Produto Final.....	42
4.2.7 Avaliação da Atividade Analgésica <i>in vivo</i> .....	42
4.2.8 Análise Estatística.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Suspensões de Nanoestruturas.....	47
5.2 Avaliação da Influência dos Solventes nas Características das Nanoestruturas.....	51
5.3 Obtenção das Formulações Semi-sólidas.....	55
5.4 Características Reológicas dos Semi-sólidos.....	55

5.5 Avaliação da Estabilidade dos Semi-sólidos.....	57
5.5.1 Avaliação do Diâmetro das Nanoestruturas Presentes nas Formulações Semi-sólidas após Preparação e 90 dias de Estabilidade.....	58
5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	62
5.6.1 Suspensão 24.....	62
5.6.2 Semi-sólidos contendo a Suspensão 24.....	63
5.7 Avaliação da Atividade Analgésica.....	63
6 CONCLUSÕES.....	69
7 REFERÊNCIAS.....	73
8 ANEXOS.....	83



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura química de alguns anestésicos locais amino-ésteres (procaína, tetracaína e benzocaína) e amino-amidas (bupivacaína, prilocaína e lidocaína).	05
Figura 2:	Estrutura química da cocaína.	14
Figura 3:	Fórmula estrutural da procaína representando os componentes estruturais dos anestésicos locais.	15
Figura 4:	Representação esquemática da difusão do anestésico através da bicamada lipídica. BH <sup>+</sup> : Forma ionizada/ cátion; B: forma não-ionizada/ base livre ( <a href="http://www.septodont.ca/media/article/">www.septodont.ca/media/article/</a> , adaptado).	16
Figura 5:	Representação esquemática da ligação dos anestésicos locais no canal de sódio ( <a href="http://www.septodont.ca/media/article/">www.septodont.ca/media/article/</a> ).	17
Figura 6:	Diâmetros médios das suspensões das nanoestruturas em função do tempo de armazenamento (15, 30 e 45 dias).	49
Figura 7:	Polidispersões das suspensões de nanoestruturas em função do tempo de armazenamento (15, 30 e 45 dias).	50
Figura 8:	Diâmetros e índices de polidispersão das formulações 1, 6, 14, 17, 19, 22, 24 e 27 após 30 dias de armazenamento.	52
Figura 9:	Diâmetros e índices de polidispersões das formulações 4, 16, 21 e 26 ao longo de 30 dias de armazenamento.	53
Figura 10:	Potenciais zeta das nanoestruturas preparadas empregando-se diferentes proporções de solventes.	54

Figura 11:	Formulação semi-sólida contendo as nanoestruturas 24.	55
Figura 12:	Espalhabilidade dos semi-sólidos contendo as nanoestruturas e do produto comercial.	56
Figura 13:	Imagens de microscopia eletrônica por transmissão da suspensão 24 com aumentos de 20.000 x (A), 100.000 x (B), 200.000 x (C), 400.000 x (D).	62
Figura 14:	Imagens de microscopia eletrônica por transmissão do semi-sólido 24 com aumentos de 60.000 x (A), 100.000 x (B).	63
Figura 15:	Porcentagem de anestesia promovida pelos semi-sólidos 24, 27, 30, Controle 1, Controle 2, Controle 3 (nanoestruturas sem fármacos) e produto comercial após 10 minutos de exposição (n= 11/grupo).	65
Figura 16:	Porcentagem de anestesia promovida pelos semi-sólidos 24, 27, 30, Controle 1, Controle 2, Controle 3 e Produto Comercial após administração tópica de 20 minutos (n= 11/grupo).	69

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Sistemas de liberação contendo anestésicos locais.	23
Tabela 2:	Parâmetros avaliados para a determinação do número de animais por grupo de experimento.	45
Tabela 3:	Características físico-químicas das nanoestruturas.	49
Tabela 4:	Viscosidade dos semi-sólidos.	58
Tabela 5:	Valores de pH dos semi-sólidos após preparação, 30 e 90 dias de armazenamento a 40 °C e 75 % umidade relativa.	60
Tabela 6:	Diâmetros médios das partículas presentes nos semi-sólidos contendo suspensão após preparação e após 90 dias de estabilidade.	64



## RESUMO

O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de nanoestruturas contendo anestésico(s) local(is) incorporados em formulações semi-sólidas vislumbrando o prolongamento da atividade anestésica, em decorrência da penetração controlada das nanoestruturas nas camadas profundas da epiderme. Prepararam-se suspensões contendo diferentes quantidades de fármaco(s) empregando-se diferentes polímeros. As suspensões foram avaliadas em relação as suas propriedades físico-químicas (pH, potencial zeta, diâmetro médio, índice de polidispersão, teor, taxa de associação, microscopia eletrônica por transmissão-TEM). As formulações que apresentaram as características mais adequadas foram selecionadas e incorporadas em semi-sólidos. Avaliaram-se as características físico-químicas dos semi-sólidos (pH, teor, diâmetro das nanocápsulas, TEM, viscosidade e espalhabilidade). A atividade analgésica das formulações foi avaliada empregando o modelo animal *tail flick* (camundongos), assim como a estabilidade frente à temperatura de 40 °C e 75 % umidade por um período de 90 dias. Os semi-sólidos apresentaram-se estáveis durante 90 dias com teores em torno de 95 % e as nanoestruturas mantiveram-se íntegras após a incorporação no semi-sólido. A atividade analgésica de uma específica formulação promoveu uma analgesia de aproximadamente 40 % e uma duração de 225 min, enquanto que o produto comercial apresentou uma atividade de aproximadamente de 10 % e uma duração de anestesia de 110 min após 20 min de exposição.

Palavras-chave: anestésico local, nanoestruturas, semi-sólido, anestesia.

## ABSTRACT

The objective of present work was the development of nanostructures containing local anesthetic drugs incorporated in semi-solid formulations, aiming a prolonged and improved anesthetic activity, due to the controlled penetration of the nanostructures through the deep epidermis layers. Several formulations were prepared using different drug concentrations. The following physico-chemical characteristics were evaluated: pH, potential zeta, particle size, polydispersion, drug recovery, association efficiency and morphology. The formulations presenting the best characteristics were incorporated in semisolid-formulations. The semi-solid formulations were characterized in terms of pH, drug recovery, particle size, morphology, viscosity and spreadability. The analgesic activity was evaluated using the tail flick model in mice and the stability study was carried out at 40 °C (75 % humidity) during 90 days. The semi-solid formulations were stable and presented adequate drug contents. The selected semi-solid formulation containing nanostructures promoted a higher and prolonged anesthetic activity compared to the commercial product.

Keywords: local anesthetics, nanoestrutures, semi-solid formulation

## 1.INTRODUÇÃO



Os anestésicos locais são fármacos que bloqueiam reversivelmente a condução nervosa quando aplicados a uma região circunscrita do corpo (HAAS, 2002).

Os anestésicos locais podem ser administrados por várias vias, incluindo a tópica, através de bloqueio de campo ou de nervo, a regional intravenosa, a raquidiana ou a epidural. A vantagem prática dos anestésicos locais baseia-se no fato de que sua ação é reversível em concentrações clinicamente relevantes e sua utilização é seguida pela recuperação completa na função do nervo, sem evidências de lesão nas células ou nas fibras nervosas (CATTERALL e MACKIE, 1996).

De um modo geral e por apresentarem perfil farmacológico de interesse clínico frente à susceptibilidade metabólica, os anestésicos locais são classificados, de acordo com o tipo de ligação entre o anel aromático e a cadeia carbonada, em amidas e ésteres. Dentre os ésteres pode-se citar a procaína, a tetracaína e a benzocaína e dentre os representantes amídicos pode-se citar a lidocaína, a bupivacaína, a ropivacaína, a articaína e a prilocaína (Figura 1) (RANG e DALE, 1999; FRIEDMAN *et al.*, 2001).

Em geral, sua ação é restrita ao local da aplicação, uma vez que são moléculas pequenas que rapidamente atravessam as paredes dos vasos sanguíneos sofrendo, assim, uma rápida difusão do local de ação. Essa rápida redistribuição a partir do local de ação limita a duração efetiva da analgesia, tornando-os ineficazes para uma analgesia prolongada. Conseqüentemente, a duração da ação desses fármacos é relativamente pequena comparada com o potencial de duração da dor (GRANT e BANSINATH, 2001).

Os anestésicos locais são substâncias geralmente seguras quando aplicadas de forma apropriada. As reações indesejáveis podem ser separadas em duas categorias: efeitos atribuídos às soluções de anestésicos locais e efeitos atribuídos à inserção da agulha (KOYA e ORENGO, 2002). Efeitos adversos de soluções de anestésicos locais incluem toxicidade local ou sistêmica, afetando o sistema nervoso central e o sistema cardiovascular, assim como problemas de alergenidade e anafilaxia, relatados para os anestésicos contendo a função éster (GREKIN e

AULETTA, 1988; KOYA e ORENGO, 2002). Possíveis conseqüências da inserção da agulha incluem dor, edema, infecção, hematoma e dano no nervo (KOYA e ORENGO, 2002).

Sendo assim, novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de prolongar o tempo de duração dos anestésicos locais, assim como diminuir a toxicidade dos mesmos. Dentre os sistemas inovadores que vêm sendo estudados com esse objetivo destacam-se as microemulsões (KREILGAARD *et al.*, 2000, SINTOV e SHAPIRO, 2004), a complexação com ciclodextrinas (DOLLO *et al.*, 1996a; DOLLO *et al.*, 1996b, DOLLO *et al.*, 1998), os lipossomas (GESZTES e MEZEI, 1988; BOOGAERTS *et al.*, 1994; HSI-YING YU *et al.*, 1998; GRANT *et al.*, 1994; GRANT *et al.*, 1997; GRANT, 1999; GRANT e BANSINATH, 2001; GRANT *et al.*, 2004; CARAFA *et al.*, 2002; MULLER *et al.*, 2004; ALTMAN e GILDENBERG, 1999) e as nanoesferas (GORNER *et al.*, 1999). De uma forma geral, esses sistemas atuam no processo de distribuição do fármaco no local de ação sendo capazes de aumentar o tempo de residência do mesmo no organismo, através da modulação da sua liberação tornando-a lenta e sustentada, assim como aumentar a eficácia e/ou reduzir a toxicidade de alguns anestésicos locais (GRANT e BANSINATH, 2001).

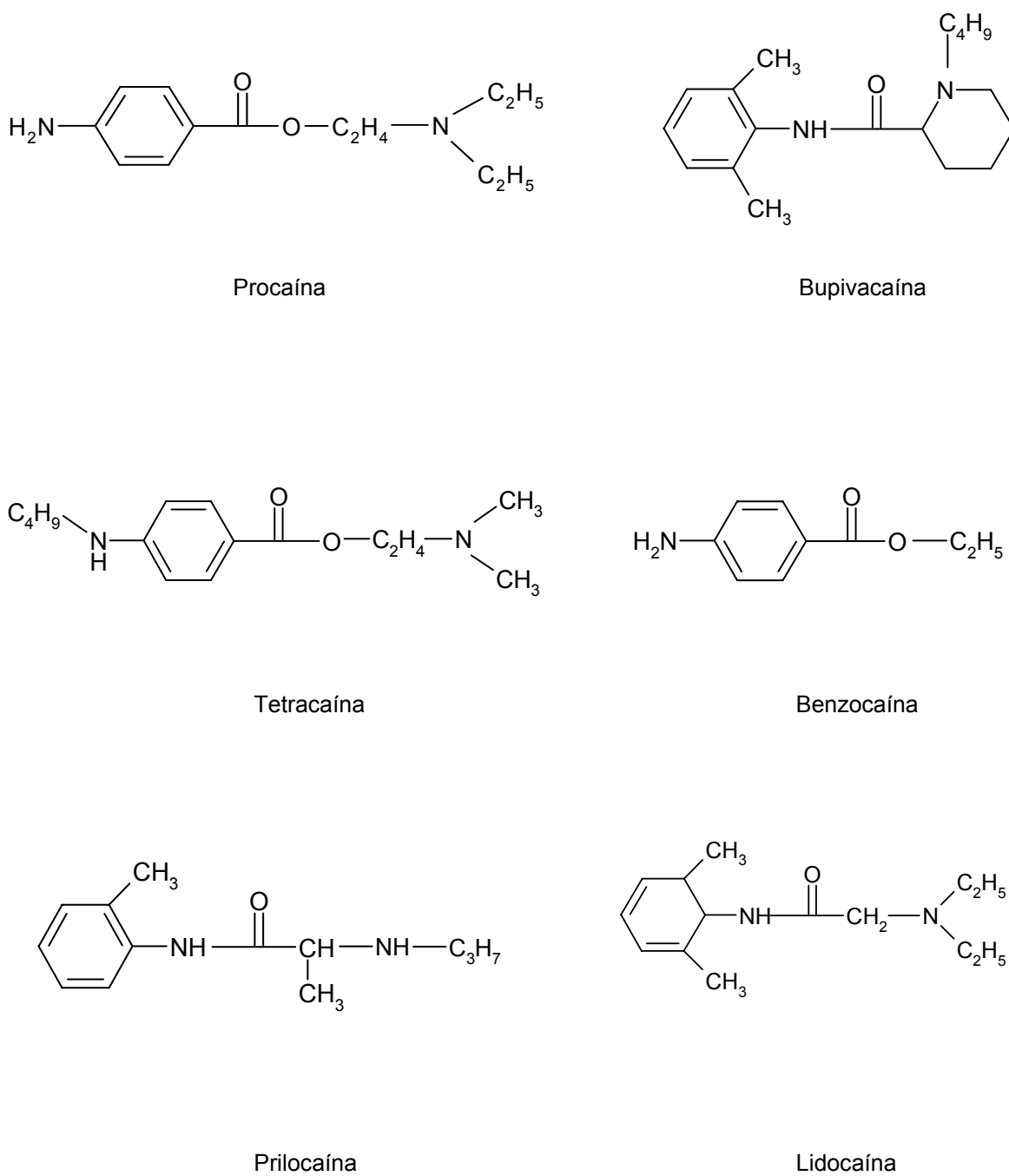


Figura 1. Estrutura química de alguns anestésicos locais amino-ésteres (procaína, tetracaína e benzocaína) e amino-amidas (bupivacaína, prilocaína e lidocaína).

A permeação cutânea de fármacos oferece uma alternativa para as vias de administração oral e injetável. Entretanto, esta aplicação tem sido limitada a poucos fármacos, tendo em vista a baixa permeabilidade da pele.

A propriedade de barreira da pele é atribuída à camada córnea que é formada por corneócitos, cuja bicamada lipídica aumenta a resistência a transportes de íons (LAVON e KOST, 2004; MITRAGOTRI *et al.*, 1995). Assim, o fluxo através da pele depende da natureza química da substância: fármacos lipofílicos são absorvidos em toda a área lipídica do estrato córneo, com coeficientes de permeação variáveis; enquanto que a absorção de fármacos hidrofílicos se dá quase que exclusivamente por poros de passagem sendo que o coeficiente de permeação é quase constante. Devido à dificuldade na penetração dos fármacos através da pele, agentes químicos, físicos e sistemas carreadores vêm sendo pesquisados a fim de suplantarem tal limitação (LAVON e KOST, 2004).

Considerando o exposto, existe um grande interesse no desenvolvimento de formas farmacêuticas tópicas para a administração de anestésicos locais, a fim de evitar o desconforto causado pelas aplicações infiltrativas. Dessa forma, o presente trabalho visa desenvolvimento de nanoestruturas contendo anestésico(s) local(is) incorporadas em formulações semi-sólidas. A hipótese do trabalho é que as nanoestruturas promoverão um prolongamento da atividade anestésica e, ainda, intensificarão o efeito da anestesia, em decorrência da penetração controlada das nanoestruturas nas camadas profundas da epiderme.

## **2. OBJETIVOS**





## **2.1 OBJETIVO GERAL**

O trabalho tem como objetivo desenvolver formulações nanoestruturadas contendo anestésico(s) local(is) com posterior incorporação em formulações semi-sólidas. Após, com base na avaliação das características físico-químicas, o presente trabalho visa selecionar uma formulação para a avaliação da atividade analgésica *in vivo* e avaliação da estabilidade do produto final.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver e proceder à caracterização físico-química das nanoestruturas contendo anestésico(s) local(is);
- Desenvolver e proceder à caracterização físico-química das formulações semi-sólidas contendo as nanoestruturas;
- Avaliar a estabilidade do produto final;
- Avaliar *in vivo* a atividade analgésica.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

---

---

---

## 3.1 ANESTÉSICOS LOCAIS

### 3.1.1 Aspectos Gerais

Os anestésicos locais são fármacos que produzem perda reversível da sensação, impedindo ou diminuindo a condução dos impulsos nervosos sensoriais próximos ao sítio de sua aplicação (REYNOLDS, 1996).

Essa perda da sensação se deve a um bloqueio reversível de geração ou condução do potencial de ação dos neurônios. Esses fármacos possuem muitos usos em medicina, que variam desde a odontologia até a obstetrícia e incluem intervenções simples como a infiltração para remoção de uma lesão cutânea superficial, até uma anestesia regional para reposicionamento do quadril, no tratamento da dor pós-operatória, neuropática e relacionada ao câncer (MINNEMAN & BRODY, 1997).

O primeiro anestésico local - a cocaína - foi descoberto acidentalmente no final do século XIX. A cocaína existe em grandes quantidades nas folhas de arbusto da coca (*Erythroxylon coca*). Durante séculos, os nativos dos Andes mascaram um extrato alcalino dessas folhas devido às suas ações estimulatórias e euforizantes. A cocaína foi isolada pela primeira vez em 1860 por ALBERT NIEMANN. Ele e muitos químicos daquela época provaram este composto, então isolado, e constataram que causava dormência da língua. SIGMUND FREUD estudou as ações fisiológicas da cocaína e, em 1884, CARL KOLLER introduziu a cocaína na prática clínica como um anestésico tópico oftalmológico. Logo depois, HALSTEAD popularizou seu uso na anestesia com bloqueio de condução e infiltração. Os muitos anestésicos locais utilizados na prática clínica atual originam-se dessas observações antigas (CATTERALL e MACKIE, 1996).

A cocaína (Figura 2) é um éster do ácido benzóico e do complexo álcool 2-carbometoxi-3-hidroxitropano. Devido à sua toxicidade e às suas propriedades viciantes, em 1892, EINHORN e colaboradores iniciaram uma pesquisa para obter substitutos sintéticos para a cocaína. Em 1905, esta pesquisa resultou na síntese da procaína, que se tornou o protótipo para os anestésicos locais durante quase meio

século. Na atualidade, os agentes mais amplamente utilizados são a procaína, a lidocaína a bupivacaína e a tetracaína (CATTERALL e MACKIE, 1996; REYNOLDS, 1996; YAGIELA, 2002).

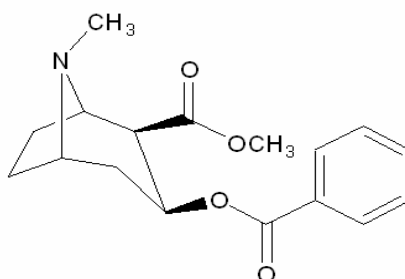


Figura 2. Estrutura química da cocaína.

### 3.1.2 Estrutura Química Básica dos Anestésicos Locais

A molécula do anestésico local típico é dividida em três partes: um grupo aromático, uma cadeia intermediária e um grupo terminal de amina secundária ou terciária (Figura 3). Todos os três componentes são determinantes da atividade anestésica local do fármaco. A parte aromática confere propriedades lipofílicas à molécula, enquanto o grupo amino fornece hidrossolubilidade. A porção intermediária é importante em dois aspectos. Primeiro, fornece a separação espacial necessária entre as extremidades lipofílicas e hidrofílicas do anestésico local. Segundo, a ligação química entre a cadeia de hidrocarboneto central e a porção aromática serve como base adequada para classificação da maioria dos anestésicos locais em dois grupos, os ésteres (- COO -) e as amidas (- NHCO -). Tal distinção é útil, porque há diferenças significativas na alergenicidade e metabolismo entre as duas categorias citadas (YAGIELA, 2002).

Dentre os representantes dos anestésicos locais amídicos pode-se citar a lidocaína, a bupivacaína, a ropivacaína, a articaína e a prilocaína e dentre os anestésicos ésteres, a procaína, a tetracaína e a benzocaína (RANG e DALE, 1999).

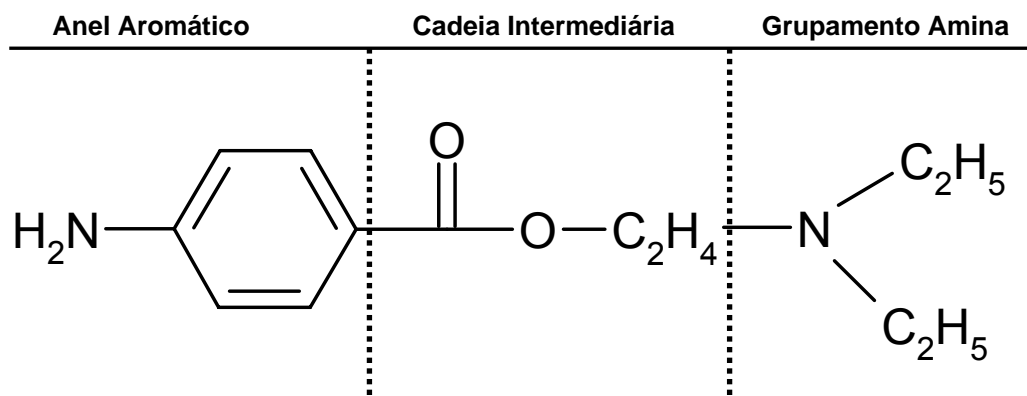


Figura 3. Fórmula estrutural da procaina representando os componentes estruturais dos anestésicos locais.

### 3.1.3 Mecanismo de Ação

Os processos de excitação e condução de um nervo são a expressão de fenômenos eletroquímicos, que variam em função do estado excitado ou de repouso da membrana. Existe uma diferença de potencial através da membrana que é considerada normal e é chamada de potencial de repouso. Nessas condições a membrana é totalmente permeável ao potássio e praticamente impermeável o sódio. A concentração de sódio extracelular é maior que a intracelular e o contrário é observado com o potássio. A manutenção dessa diferença de concentração entre os íons caracteriza o estado de repouso da célula (CARVALHO e MATHIAS, 1997).

Quando a membrana é ativada por qualquer estímulo físico, químico ou elétrico aumenta progressivamente a permeabilidade ao sódio e o potencial de ação é deflagrado, quando então, tem-se uma alta permeabilidade aos íons sódio através da membrana. Passando o estímulo, o estado de repouso é retomado. Todo esse processo ocorre com a participação dos íons potássio e é retomado o estado original da membrana (CARVALHO e MATHIAS, 1997).

Os anestésicos locais bloqueiam o início e a propagação dos potenciais de ação, impedindo o aumento na condutância de  $\text{Na}^+$ -voltagem dependente. Sua principal ação consiste em bloquear os canais de sódio. Nesse processo (Figura 4), inicialmente a fração de base não ionizada difunde-se através da bainha nervosa e membrana, pois a forma desprotonada é responsável pela difusão através das

membranas. A forma ionizada é responsável pela difusão em meio aquoso de forma que no axoplasma ocorre o reequilíbrio entre as formas básicas e catiônicas e só então, ocorre a ligação com o sítio de ligação do canal de sódio, resultando em bloqueio e inibição da passagem de íons sódio (Figura 5) (FITZPATRICK, 1997). À medida que a ação anestésica se desenvolve de forma progressiva em um nervo, o limiar para excitabilidade elétrica aumenta; a velocidade da elevação do potencial de ação, o impulso de condução e o fator de segurança para condução diminuem; esses fatores reduzem a probabilidade de propagação do potencial de ação e a condução nervosa falha (CATTERALL e MACKIE, 1996).

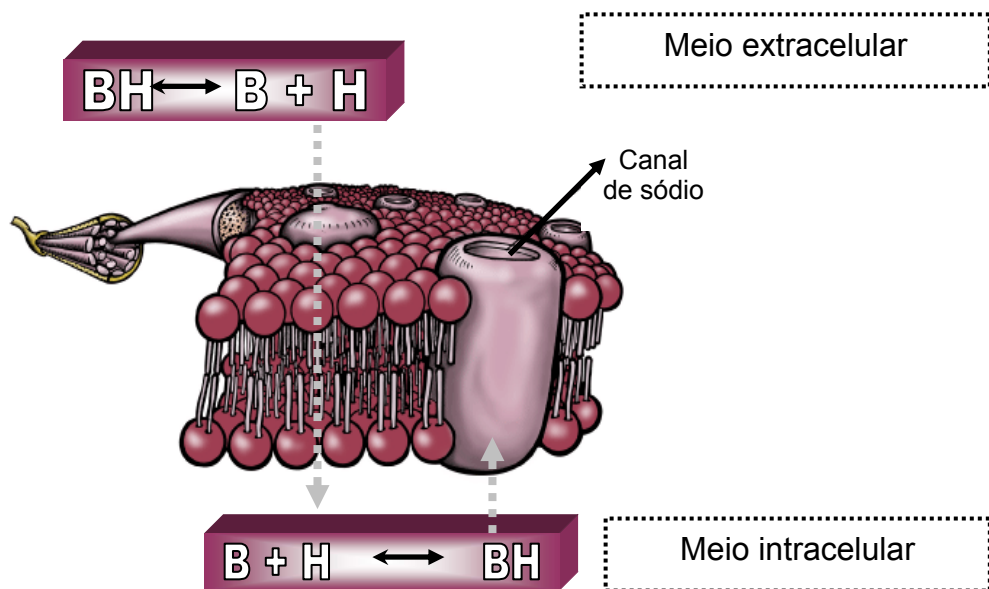


Figura 4. Representação esquemática da difusão do anestésico através da bicamada lipídica.  $BH^+$ : Forma ionizada/ cátion; B: forma não-ionizada/ base livre ([www.septodont.ca/media/article/cea\\_dh01/DH\\_2.gif](http://www.septodont.ca/media/article/cea_dh01/DH_2.gif), adaptado).

A atividade anestésica local depende acentuadamente do pH, sendo aumentada na presença de pH alcalino (isto é, quando a proporção de moléculas ionizadas é baixa) e vice-versa. Isto decorre do fato de que o fármaco precisa penetrar na bainha do nervo e na membrana axônica para alcançar a extremidade interna do canal de  $Na^+$ . Como a forma ionizada não permeia a membrana, a sua penetração será muito precária em pH ácido. Sendo assim, a acidez tecidual também pode impedir o desenvolvimento da anestesia local (RANG e DALE, 1999). Os produtos da inflamação diminuem o pH do tecido afetado e limitam a formação da

base livre. A captura iônica do anestésico local no espaço extra-celular não apenas retarda o início da anestesia local, mas também pode tornar impossível o bloqueio nervoso eficaz.

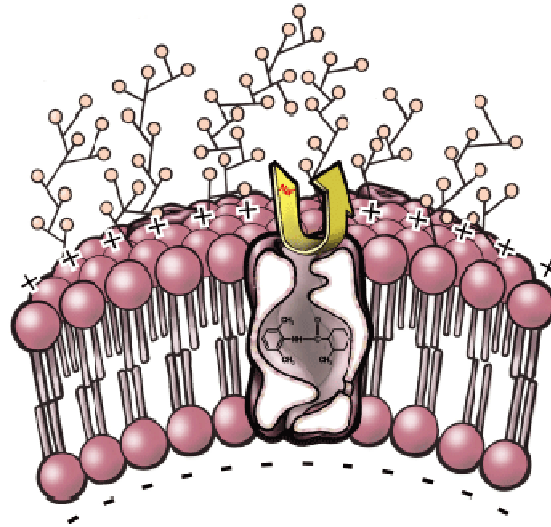


Figura 5. Representação esquemática da ligação dos anestésicos locais no canal de sódio ([www.septodont.ca/media/article/cea\\_dh01/DH\\_2.gif](http://www.septodont.ca/media/article/cea_dh01/DH_2.gif)).

### 3.1.4 Relação Estrutura Atividade

O anestésico local deve apresentar propriedades lipofílicas, como a parte aromática, pois são essenciais para a penetração em barreiras anatômicas existentes entre o local de administração do fármaco e o local de ação, incluindo a bainha nervosa (FERREIRA, 1998).

O perfil clínico dos anestésicos locais é determinado por três propriedades importantes que incluem a potência, velocidade de início de ação e duração da atividade anestésica. A potência está diretamente relacionada com a lipossolubilidade do fármaco (CARVALHO e MATIAS, 1997). Vários estudos demonstram a existência de uma correlação entre o coeficiente de partição dos anestésicos locais e a concentração mínima necessária para o bloqueio da condução nervosa (COVIDO, 1986 JONG, 1994).

O grupamento amina é a porção ionizável da molécula, que sofrerá a influência do pH do meio. Essa região também determina a velocidade de ação dos

anestésicos locais, uma vez que a mesma está relacionada ao pKa de cada agente anestésico. Anestésicos com menores pKa possuem início de ação mais rápido do que os com maior pKa . Isso se deve ao fato de suas soluções possuírem um maior número de moléculas de base livre lipofílica capazes de difundir através da membrana nervosa (MALAMED, 2001).

Esta situação ocorre uma vez que a velocidade de ação é inversamente proporcional ao grau de ionização do fármaco que, por sua vez, depende do pKa do fármaco e do pH do meio onde esse fármaco está dissolvido. O grau de ionização das moléculas é regido pela equação de Henderson- Hasselbach (Equação 1) (CARVALHO e MATIAS, 1997).



Equação 1

$$pH = pKa + \log \frac{[B]}{[BH^+]}$$

Onde:

BH<sup>+</sup>: Forma ionizada/ cátion

B: forma não-ionizada/ base livre

Os anestésicos locais ligam-se às proteínas plasmáticas albumina e  $\alpha_1$ -glicoproteína e proteínas teciduais, sendo que essa ligação protéica apresenta uma correlação direta com a duração da ação dos anestésicos. A porcentagem de ligação com as proteínas varia de 6 % a 96 %, para a procaína e levobupivacaína, respectivamente, sendo a duração da anestesia classificada como curta e longa, respectivamente (LANGAN e MCLURE, 2004).

Em resumo, a lipofilia aumenta a potência e a duração da ação dos anestésicos locais. Isto ocorre porque a presença do anestésico em locais hidrofóbicos aumenta a sua distribuição para seus locais de ação e reduz a taxa do metabolismo pelas esterases plasmáticas e pelas enzimas hepáticas. Além disso, acredita-se que o local receptor para esses agentes nos canais de Na<sup>+</sup> seja



---

---

hidrofóbico, de forma que a afinidade dos receptores por agentes anestésicos é aumentada para agentes mais hidrofóbicos. A hidrofobicidade também aumenta a toxicidade, de tal forma que, na realidade, o índice terapêutico é reduzido para agentes mais hidrofóbicos (CATTERALL e MACKIE, 1996).

### 3.1.5 Características Farmacocinéticas

Os anestésicos locais são normalmente administrados por meio de uma injeção próxima aos nervos a serem bloqueados, sendo que o grau de difusão dos mesmos através das membranas neuronais é mais dependente da lipossolubilidade do que do gradiente de concentração entre as membranas (LEMA, 1995).

Aos anestésicos locais ligam-se às proteínas plasmáticas e teciduais, conforme citado anteriormente. Mudanças na concentração de proteínas podem afetar a disponibilidade de fármaco livre. Isso se torna clinicamente importante durante reações de fase aguda como infecções, câncer e doenças auto-imunes, onde os níveis de  $\alpha_1$ -glicoproteína estão aumentados e, nesse momento, a quantidade de fármaco livre diminui reduzindo sua atividade (LEMA, 1995).

A presença da ligação éster ou amida nas moléculas dos anestésicos locais é importante, devido à sua suscetibilidade à hidrólise metabólica. Os ésteres geralmente são inativados no plasma e nos tecidos por esterases inespecíficas, apresentando um tempo de meia-vida entre 0,11 e 0,71 h. Os anestésicos amídicos são mais estáveis e, geralmente, possuem meia-vida plasmática mais longa que varia entre 1,6 e 3,5 h, sendo primeiramente metabolizados no fígado por enzimas microsossomais. Dentre os representantes amídicos pode-se citar a lidocaína, bupivacaína, ropivacaína, articaína e a prilocaína (LEMA, 1995; RANG e DALE, 1999; FRIEDMAN *et al.*, 2001).

O metabolismo dos anestésicos amídicos ocorre primariamente no fígado. A reação inicial geralmente é a *N*-desalquilação do grupo terminal de amina terciária. A amida secundária resultante é suscetível à hidrólise pela atividade da amidase hepática, mas também ocorrem conjugação, hidroxilação ou desalquilação adicional. O fluxo sanguíneo hepático parece ser o fator limitante da velocidade para a maioria

---

---

das amidas, sendo que as meias vidas de eliminação variam de 1,5 a 3,5 h. A inativação da prilocaína, que é uma amida secundária é incomum porque não é necessária desalquilação antes que ocorra hidrólise, o que pode explicar porque quase metade do seu metabolismo é extra-hepático. Alguns metabólitos dos anestésicos locais retêm acentuada atividade farmacológica e podem contribuir para sua toxicidade (FERREIRA, 1998).

A duração de um anestésico local é proporcional ao tempo em que este permanece em contato com o nervo. Os anestésicos locais produzem diferentes graus de vasodilatação. A vasodilatação facilita a velocidade de absorção, agravando, portanto, os efeitos sistêmicos e diminuindo a duração e efetividade da ação anestésica local. Dessa forma, na prática clínica as preparações dos anestésicos locais contêm, em geral, um vasoconstritor, em geral, a adrenalina. O vasoconstritor realiza uma dupla função. Ao reduzir a taxa de absorção, não apenas localiza o anestésico no local desejado, como também permite que a taxa com que ele é degradado no organismo entre em equilíbrio com a taxa com que ele é absorvido para a circulação. Esse processo reduz a toxicidade sistêmica. Entretanto, deve-se observar que a adrenalina também dilata os leitos vasculares da musculatura esquelética pelas ações nos receptores  $\beta$ -2 e, por conseguinte, tem potencial para aumentar a toxicidade sistêmica do anestésico depositado no tecido muscular. Alguns dos agentes vasoconstritores são absorvidos sistemicamente podendo causar efeitos indesejáveis como retardamento da cicatrização de ferimentos, edema tecidual ou necrose (CATTERALL e MACKIE, 1996).

### **3.1.6 Efeitos Indesejáveis**

Os principais efeitos adversos dos anestésicos locais afetam o sistema nervoso central e o sistema cardiovascular, constituindo a principal fonte de risco. O principal efeito sobre o sistema nervoso central consiste, paradoxalmente, em produzir estimulação. Este efeito resulta em agitação e tremor que podem progredir para convulsões. O aumento adicional de dose provoca depressão do sistema nervoso central, sendo que a principal ameaça à vida decorre da depressão respiratória nessa fase (RANG e DALE, 1999; CATTERALL e MACKIE, 1996).

---

---

Após absorção sistêmica, os anestésicos locais atuam no sistema cardiovascular. O local primário de ação é o miocárdio, onde ocorrem reduções na excitabilidade elétrica, na frequência de condução e na força de contração. Além disso, a maioria dos anestésicos locais provoca dilatação arteriolar. Os efeitos cardiovasculares, em geral, só são encontrados depois que são atingidas altas concentrações sistêmicas (CATTERALL e MACKIE, 1996).

Algumas vezes ocorrem reações de hipersensibilidade com anestésicos, geralmente na forma de dermatite alérgica e, raramente, como reações anafiláticas agudas (RANG e DALE, 1999). Sabe-se que o principal metabólito da hidrólise dos anestésicos ésteres é o ácido  $p$ -aminobenzóico (PABA), conhecido por sua alergenicidade. Conseqüentemente, esses anestésicos possuem uma alta incidência de alergenicidade quando comparado com os anestésicos amídicos (KOYA e ORENGO, 2002).

Outro efeito indesejável específico da prilocaína é a metemoglobinemia que surge após o uso de grandes doses, devido à produção de um metabólito tóxico, a *o*-toluidina (RANG e DALE, 1999; CATTERALL e MACKIE, 1996).

### **3.2 NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTENDO ANESTÉSICOS LOCAIS**

A resposta farmacológica a determinado fármaco está relacionada com a sua concentração no sítio de ação desejado. A distribuição deste fármaco no organismo baseia-se nas suas propriedades físico-químicas, que muitas vezes não permitem que a substância ativa atinja o local de ação. Assim, se faz necessária a administração de grandes quantidades de fármacos para a obtenção do efeito farmacológico desejado, trazendo, como conseqüência o aparecimento da toxicidade do fármaco frente a outros tecidos (COUVREUR *et al.*, 2002).

O efetivo manejo da dor aguda e crônica permanece sendo um desafio, apesar de há muito tempo haver conhecimento de qual é o problema da curta duração dos anestésicos locais. Por esse motivo, eles não são os melhores candidatos para uma analgesia prolongada. Sendo assim, existe a necessidade de

se desenvolver formulações de anestésicos locais seguros e de longa duração (GRANT *et al.*, 2004).

Estratégias que visam o aumento da duração da anestesia e à diminuição do problema de toxicidade estão sendo desenvolvidas, como por exemplo, a alteração de estrutura molecular de anestésicos locais, a identificação de novos agentes com atividades anestésicas (GRANT e BANSINATH, 2001), assim como infusão contínua de anestésicos locais através do implante de cateteres com bomba eletrônica ou mecânica (GRANT *et al.*, 2004). Mais recentemente, o foco foi transferido para os sistemas vetorizados de fármacos que atuam como reservatórios para os anestésicos locais como em microemulsões, ciclodextrinas, lipossomas e nanoesferas (Tabela 1).

Tabela 1. Sistemas de liberação contendo anestésicos locais.

<b>Sistema</b>	<b>Anestésico Local</b>	<b>Referência</b>
Ciclodextrinas	Bupivacaína	DOLLO <i>et al.</i> , 1996a, DOLLO <i>et al.</i> , 1998.
Ciclodextrinas	Lidocaína	DOLLO <i>et al.</i> , 1995, DOLLO <i>et al.</i> 1996a.
Ciclodextrinas	Etidocaína	DOLLO <i>et al.</i> , 1996a.
Ciclodextrinas	Mepivacaína	DOLLO <i>et al.</i> , 1996b.
Ciclodextrinas	Prilocaína	DOLLO <i>et al.</i> , 1996a.
Lipossomas	Dibuvacaína	OKANO <i>et al.</i> , 1980.
Lipossomas	Tetracaína	GESZTES e MEZEI, 1988.
Lipossomas	Bupivacaína	BOOGAERTS <i>et al.</i> , 1994; HSI-YING YU <i>et al.</i> , 1998; GRANT <i>et al.</i> , 1994; GRANT <i>et al.</i> , 1996; GRANT <i>et al.</i> , 2001 ; GRANT <i>et al.</i> , 2004;
Lipossomas	Ropivacaína	GRANT, 1999.
Lipossomas	Lidocaína	CARAFI <i>et al.</i> , 2002, MULLER <i>et al.</i> , 2004; ALTMAN e GILDENBERG, 1999; EREMIA e NEWMAN, 2000.
Lipossomas	Cloridrato de procaína	MULLER <i>et al.</i> , 2004.
Microemulsão	Lidocaína	SINTOV e SHAPIRO 2004; KREILGAARD <i>et al.</i> , 2000.
Microemulsão	Cloridrato de prilocaína	KREILGAARD <i>et al.</i> , 2000.
Nanoesferas	Lidocaína	GORNER <i>et al.</i> , 1998.

---

---

### 3.2.1 Microemulsão

Microemulsão é um sistema quaternário composto por uma fase oleosa, uma fase aquosa, tensoativos e co-tensoativos. Esse sistema é formado espontaneamente e possui propriedades físico-químicas específicas como transparência, isotropia óptica, baixa viscosidade e estabilidade termodinâmica. O diâmetro das gotículas das microemulsões situa-se usualmente entre 10-100 nm, sendo assim, esses sistemas podem ser denominados de emulsões nanométricas (SINTOV e SHAPIRO, 2004).

Tais sistemas têm a capacidade de aumentar o fluxo transdermal de moléculas lipofílicas e hidrofílicas. Estudos têm demonstrado que as formulações de microemulsões apresentam um aumento na permeabilidade intradermal de fármacos lipofílicos quando comparado com as macroemulsões comerciais. Nesse sentido KREILGAARD e colaboradores (2000) avaliaram a influência da composição das microemulsões na capacidade de liberação transdermal da lidocaína e do cloridrato de prilocaína. Foram utilizadas concentrações variadas dos seguintes componentes: Labrasol<sup>®</sup>, Plurol isoesteárico<sup>®</sup>, estearato de isoesterila e água. Os autores observaram que as microemulsões aumentaram o fluxo transdermal da lidocaína em 4 vezes quando comparada com a emulsão convencional óleo em água e, por sua vez, o cloridrato de prilocaína aumentou o fluxo transdermal em 10 vezes quando comparado com hidrogel, ao se empregar o modelo de permeação através de célula de Franz. Esses resultados, segundo os autores, foram atribuídos à grande capacidade de solubilização do fármaco nas microemulsões, permitindo o estabelecimento de um grande gradiente de concentração. Observou-se, também, que não ocorreram alterações visíveis da epiderme indicando, portanto, um baixo potencial irritativo da formulação.

SINTOV e SHAPIRO (2004) compararam a penetração cutânea *in vitro* utilizando o modelo de célula de Franz e avaliaram a biodisponibilidade da lidocaína (2,5 %) *in vivo* a partir de duas formulações de microemulsões. O sistema A era constituído por palmitato de isopropila tetraglicol, água, oleato de glicerila, polietilenoglicol-40 hidrogenado (PEG-40) e óleo de rícino, e o sistema B era constituído por palmitato de isopropila, tetraglicol, água, oleato de glicerila e

---

---

estearato de PEG-40. Além disso, avaliou-se para ambos os sistemas a forma não oclusiva e a oclusiva. O estudo de penetração cutânea utilizando peles de ratos demonstrou que o sistema *B* apresentou uma maior penetração e distribuição cutânea, assim como um maior fluxo transdermal *in vitro*. Esse estudo também evidenciou, *in vivo*, um maior acúmulo de lidocaína na epiderme e na derme para as microemulsões *B* de dois tipos oclusivas e não oclusiva, quando comparados com o creme EMLA<sup>®</sup> (tempo de 30 minutos). As concentrações de lidocaína obtidas para microemulsões oclusivas foram maiores do que as microemulsões não oclusivas. Portanto, a partir desses resultados os autores sugeriram que as microemulsões *B* não oclusivas e oclusivas, contendo lidocaína, podem prover uma adequada analgesia por um período de tempo relativamente curto.

### 3.2.2 Ciclodextrinas

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, obtidos pela degradação do amido pela ação da enzima ciclodextrinaglicosiltransferase que está presente em uma infinidade de microrganismos e plantas. As principais ciclodextrinas naturais são denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -, as quais possuem seis, sete e oito unidades de glicopirranose, respectivamente, ou mais unidades de glicopirranose que estão unidas entre si através de ligações  $\alpha$ -(1-4) (LOFTSON e MÁSSON, 2001; VALLE, 2004). Esses polissacarídeos possuem uma estrutura cilíndrica cuja cavidade central é constituída por carbonos e oxigênios etéreos e cuja parte externa é constituída por hidroxilas resultando, portanto, num interior lipofílico e um exterior hidrofílico. Assim, tais complexos de inclusão são capazes de abrigar moléculas lipofílicas na cavidade central aumentando, portanto, a sua solubilidade em meio aquoso (LOFTSSON e BREWSTER, 1996).

DOLLO e colaboradores publicaram três trabalhos a respeito da inclusão de anestésicos locais em ciclodextrinas. No primeiro trabalho (1996a) foi avaliada a inclusão de anestésicos do tipo amida, como a bupivacaína e a lidocaína, em três diferentes ciclodextrinas:  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina e (2,6-di-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina. Utilizando métodos espectrais (RMN e IV) e análise térmica (DSC) foi possível concluir que através do método de liofilização foi possível realizar

---

---

a inclusão dos anestésicos locais nessas ciclodextrinas. Esse resultado permitiu prever a possibilidade do uso dos anestésicos locais encapsulados em ciclodextrinas como sistemas de liberação controlada.

No segundo trabalho (1996b) os autores, avaliaram a inclusão de outros anestésicos (bupivacaína, etidocaína, lidocaína, mepivacaína e prilocaína) em  $\beta$ -ciclodextrinas e os seus derivados 2-hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina e (2,6-di-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina. Nesse estudo foi possível observar que o aumento da concentração das ciclodextrinas aumenta a solubilidade dos anestésicos locais na seguinte ordem: 2-hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina > (2,6-di-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina >>  $\beta$ -ciclodextrina. Dentre as ciclodextrinas estudadas, a 2-hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina e a (2,6-di-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina apresentaram maior capacidade de complexação, formando um forte complexo com a bupivacaína.

No terceiro trabalho, DOLLO e colaboradores (1998) realizaram a inclusão de bupivacaína em sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina, assim como avaliaram o índice terapêutico da analgesia após administração subcutânea em nervo ciático de coelho (n= 6). A concentração plasmática máxima obtida para o cloridrato de bupivacaína foi 2,5 vezes maior do que para o complexo bupivacaína-ciclodextrina ( $380 \pm 139$  e  $154 \pm 59$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), sendo que essa concentração foi atingida em um período de 4 vezes menor para a bupivacaína livre do que para o complexo de bupivacaína-ciclodextrina ( $14 \pm 9$  e  $58 \pm 36$  min, respectivamente). O tempo de meia-vida da bupivacaína livre apresentou-se significativamente menor do que para o complexo com bupivacaína. Tais resultados sugeriram uma diminuição da taxa de absorção do anestésico local para a circulação sistêmica, assim como indicaram que o complexo pode ser útil para o controle da liberação do fármaco.

### 3.2.3 Lipossomas

Lipossomas são vesículas lipídicas com diâmetro entre 0,05  $\mu\text{m}$  a 5,0  $\mu\text{m}$  que se formam espontaneamente quando dispersos em meio aquoso (GRANT *et al.*, 2002). Os lipossomas podem ter uma ou mais bicamadas lipídicas dispostas concêntricamente cercadas por compartimentos aquosos (EGBARIA e WEINER, 1990). A estrutura dos lipossomas é determinada pela natureza da interação entre



---

---

os lipídios e o meio aquoso durante o processo de preparação (GRANT *et al.*, 2001). Os lipossomas vêm sendo empregados como carreadores de fármacos em substituição às formas farmacêuticas convencionais devido à sua grande capacidade de proteger os fármacos da degradação direcioná-los ao seu alvo de ação, assim como, reduzir a toxicidade ou efeitos adversos (STORM e CROMMELIN, 1998).

A encapsulação de anestésicos locais em lipossomas como a dibuvacaína (OKANO *et al.*, 1980), tetracaína (GESZTES e MEZEI, 1988), bupivacaína (BOOGAERTS *et al.*, 1994; GRANT *et al.*, 1994; GRANT *et al.*, 1997, HSI-YING YU *et al.*, 1998; GRANT, 1999; GRANT *et al.*, 2001 e GRANT *et al.*, 2004), ropivacaína (GRANT *et al.*, 1999), lidocaína (CARAFA *et al.*, 2002) vêm sendo estudada, assim como, a avaliação do prolongamento da duração da analgesia.

GESZTES e MEZEI (1988) desenvolveram o primeiro estudo em humanos com anestésicos locais lipossomados. Para os 24 pacientes analisados administraram-se topicamente tetracaína lipossomada e cloridrato de tetracaína (Pontocaine<sup>®</sup>), ambos contendo 0,5 % do fármaco. Para a análise da anestesia empregou-se a metodologia *pinprick*, onde se avalia a anestesia em uma escala de 1 a 10. Administraram-se durante 30 minutos os anestésicos e avaliou-se a analgesia promovida após 4,5 horas do início da aplicação. A tetracaína lipossomada, produziu uma analgesia de 8,33, enquanto que o cloridrato de tetracaína promoveu uma anestesia de 0,62. Segundo os autores a formulação contendo os lipossomas apresentou alta efetividade sendo, portanto, uma alternativa para a promoção de uma anestesia mais duradoura.

BOOGAERTS e colaboradores (1994) avaliaram a anestesia promovida pela formulação de lipossomas de bupivacaína (0,5 %) quando comparada com as formulações convencionais. Administrou-se epiduralmente em humanos (n= 26) 3 mL de ambos os anestésicos. Segundo os resultados a anestesia aumentou de 3,2 horas (solução contendo os fármacos livres) para 6,25 horas (lipossomas de bupivacaína). Segundo os autores, ocorreu um aumento na analgesia com a formulação lipossomada, concluindo-se que é possível a utilização da mesma para a administração da dor pós-cirúrgica.

---

---

GRANT e colaboradores em 1994 desenvolveram lipossomas contendo bupivacaína e em 1999 lipossomas contendo ropivacaína. Em os ambos os trabalhos constataram o prolongamento da ação anestésica do sistema lipossomal em ratos, após administração subcutânea.

Trabalho similar foi desenvolvido por HSI-YING YU e colaboradores (1998) utilizando lipossomas multilamelares contendo bupivacaína. Nesse estudo administrou-se na veia caudal de ratos Wistar (n= 10) bupivacaína lipossomada e no grupo controle uma solução de bupivacaína, ambas na concentração de 5 mg/mL. A duração do bloqueio sensorial e do índice de antinocicepção em ratos tratados com uma solução de bupivacaína foi de  $87 \pm 6,7$  min e  $30 \pm 8$  %, respectivamente, e para a bupivacaína lipossomada foi de  $447 \pm 19,6$  min e  $54 \pm 5$  %, respectivamente. Os autores concluíram que a bupivacaína lipossomada prolongou a duração do efeito, assim como intensificou a anestesia local, quando comparada com uma solução de bupivacaína.

BUCALO e colaboradores (1998) compararam o efeito anestésico da lidocaína livre (5 %), lidocaína lipossomada (5 %) e do EMLA<sup>®</sup> após 30 minutos de aplicação tópica em pacientes (n= 13). Para a avaliação da anestesia empregou-se o modelo *pinprick*, onde se avalia a anestesia em uma escala de 1 a 10. Os autores verificaram que 1,5 horas após a administração dos anestésicos a anestesia promovida pela lidocaína livre, lidocaína lipossomada e do EMLA<sup>®</sup> foi de 0,7, 6 e 5,6, respectivamente. Sendo assim, os autores concluíram que o sistema lipossomado demonstra ser uma alternativa efetiva para a veiculação de anestésicos locais para aplicação tópica.

ALTMAN e GILDENGERG (1999) avaliaram a redução da dor em pacientes que realizam a retirada de folículos pilosos utilizando ELA-max<sup>®</sup> (4 % de lidocaína lipossomada) e EMLA<sup>®</sup> (oclusão). Nesse estudo, verificou-se uma maior efetividade do ELA-max<sup>®</sup>, sendo que o mesmo apresentou um início de analgesia em 20 min, enquanto o EMLA<sup>®</sup>, em 1,5 h. Além disso, para a aplicação do ELA-max<sup>®</sup> não houve oclusão da pele tornando a sua utilização, portanto, mais fácil. EREMIA e NEWMAN (2000) também constataram a eficácia da analgesia promovida pelo ELA-max<sup>®</sup> (5% de lidocaína lipossomada) para a retirada de pêlos.

---

---

FRIEDMAN e colaboradores (1999) compararam a eficácia de quatro anestésicos locais: EMLA<sup>®</sup>, ELA-max<sup>®</sup> (4 % de lidocaína lipossomada), betacaína – LA<sup>®</sup> e tetracaína (4 %) após aplicação tópica em 12 pacientes. Todos os anestésicos foram avaliados após 60 minutos de aplicação tópica com oclusão. Os autores verificaram que o produto comercial ELA-max<sup>®</sup> produziu uma anestesia mais efetiva do que os demais anestésicos avaliados, porém a diferença não é estatisticamente superior ao EMLA<sup>®</sup> em função do número de pacientes analisados. Esse estudo mostrou que a encapsulação em lipossomas promoveu um aumento no direcionamento do anestésico dentro da derme. À época da pesquisa, o custo do EMLA<sup>®</sup> era muito superior comparado com os outros anestésicos. Para uma amostra de 30 g os custos eram os seguintes: EMLA<sup>®</sup>, U\$ 53,24; ELA-max<sup>®</sup>, U\$ 26,03, Betacaína- LA<sup>®</sup>, U\$ 42,50 e tetracaína, U\$ 9,34.

CARAFA e colaboradores (2002) avaliaram a permeação de lidocaína e do cloridrato de lidocaína a partir de vesículas lipossomais contendo tensoativos não-iônicos (Tween 20<sup>®</sup> e colesterol) utilizando dois modelos de difusão: membrana (Silastic<sup>®</sup>) e pele de rato. Os experimentos mostraram que o fluxo de lidocaína através dos modelos de permeação só foi possível depois da encapsulação da mesma. As vesículas lipossomais de tensoativos não-iônicos contendo cloridrato de lidocaína apresentaram uma melhor *performance* e uma maior taxa de encapsulação do que o observado para lipossomas clássicos e para micelas contendo Tween 20<sup>®</sup>.

Com a finalidade de minimizar a dor durante a aplicação intravenosa, MÜLLER e colaboradores (2004) adicionaram cloridrato de lidocaína ou cloridrato de procaína a emulsões contendo propofol. Porém, essa adição não manteve a estabilidade físico-química da emulsão, levando a coalescência. Os autores propuseram, então, encapsular separadamente os anestésicos locais (1 a 15 %) em lipossomas, a fim de tornar a emulsão estável. Nesse estudo foi possível a obtenção de lipossomas contendo os anestésicos locais, sendo que os mesmos apresentaram diâmetros médios inferior à <1 µm, faixa de tamanho compatível para a aplicação intravenosa.

Em 2004, GRANT e colaboradores desenvolveram lipossomas contendo bupivacaína e avaliaram sua eficácia em humanos (n= 6). Para cada paciente foram

---

---

administradas seis injeções intradérmicas contendo bupivacaína lipossomada, solução aquosa de bupivacaína, lipossomas vazios e solução salina. As durações médias da analgesia das formulações contendo 0,5, 1,0 e 2,0 % de bupivacaína lipossomada foram 19, 38 e 48 h, respectivamente e de 1 h para a bupivacaína padrão. Não se observou analgesia para as formulações de solução salina e lipossomas vazios. Os autores concluíram que uma única administração intradermal promoveu uma duração prolongada da analgesia.

### 3.2.4 Nanoesferas

Nanoesferas são nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ , sendo caracterizadas como uma matriz polimérica, onde o fármaco encontra-se retido ou adsorvido (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de nanoesferas contendo lidocaína (10 mg - 50 mg) e caracterização das mesmas foi alvo de estudo de GORNER e colaboradores (1999). As nanoesferas foram preparadas através do método de evaporação de solvente utilizando poli(D,L-ácido láctico)(PLA)-90, PLA50 e PLA45-PEG em diferentes concentrações. Os autores evidenciaram que o tipo de polímero não interfere na taxa de encapsulação do fármaco, mas sim a concentração de polímero empregado. Concluiu-se que quanto maior a concentração de polímero, maior o diâmetro das nanoesferas (250 nm a 820 nm) e mais eficiente a encapsulação do anestésico local (20 a 57 % m/m). Além disso, a cinética de liberação *in vitro* apresentou proporcionalidade com a capacidade de encapsulação das partículas, sendo que as partículas que contém 30 % de fármaco apresentaram uma liberação lenta entre 24 – 30 h, as partículas de tamanho médio (13 % de fármaco) liberaram o fármaco em 15 h e as partículas pequenas (7 %) apresentaram rápida liberação em menos de 2 h. Os modelos de difusão e dissolução foram avaliados para descrever e identificar os perfis de liberação da lidocaína presentes nas nanoesferas. Através da modelagem matemática dos dados, os autores concluíram que nas formulações com alta concentração de lidocaína a etapa limitante da liberação foi a dissolução dos cristais de fármaco. Em contrapartida, as suspensões contendo menor concentração de fármaco a liberação ocorreu por difusão do mesmo a partir da matriz polimérica.

---

---

### 3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA *IN VIVO*

Métodos nociceptivos são amplamente empregados na avaliação da potência dos analgésicos. Na literatura são relatados diversos modelos para avaliação da atividade anestésica que estimulam diferentes níveis de transmissão nociceptiva (GARDMARK *et al.*, 1998), dentre eles: o modelo da vocalização por estimulação elétrica, da contração abdominal por indução de ácido acético, o teste de formalina, a indução da dor por capsaicina, o *hot plate* e o *tail flick* (VAZ *et al.*, 1996).

D'AMOUR e SMITH (1941) desenvolveram o ensaio *tail flick* para a avaliação da atividade anestésica de diferentes opiáceos administrados intraperitonealmente. Opiáceos administrados centralmente, sistemicamente ou topicamente produzem um efeito dependente da dose em ensaios termiais como o *tail flick* (KOLESNIKOV *et al.*, 2004). Para a realização do ensaio é utilizado um equipamento provido de uma fonte de calor (lâmpada 50 W) que é incidido na cauda do rato ou camundongo. A resposta ao estímulo da dor em função do aquecimento será o movimento ou remoção da cauda. O intervalo de tempo entre o início da incidência de luz e início do movimento/remoção da cauda do animal é determinado como o tempo de latência (VAZ *et al.*, 1996; GARDMARK, *et al.*, 1998; KANG *et al.*, 2001).

GRANT e colaboradores (1994) avaliaram o prolongamento da analgesia de lipossomas contendo bupivacaína através do modelo *tail flick*. Formulações contendo 1,1 % de fármaco foram administradas peritonealmente em camundongos machos *Swiss Webster*. Através desse modelo verificaram um aumento significativo na duração do bloqueio sensorial ( $130 \pm 38$  minutos versus  $46 \pm 11$ , respectivamente) quando comparado com a bupivacaína não lipossomada.

KANG e colaboradores (2001) avaliaram a atividade anestésica de uma formulação tópica contendo 5 % lidocaína, timol e/ou etanol através do modelo *tail flick*. Segundo os autores, o modelo aplicado apresentou-se adequado para a determinação da analgesia, uma vez que foi possível observar que a atividade anestésica da formulação apresentou-se similar à observada para o produto comercial EMLA<sup>®</sup> e ambas apresentaram maior atividade do que o controle negativo.

Em outro estudo avaliou-se o efeito sinérgico ente lidocaína e morfina quando aplicadas topicamente na cauda de camundongos empregando o modelo *tail flick*. Os resultados demonstraram uma maior analgesia para a lidocaína base do que para o cloridrato de lidocaína, em função da maior lipofilia do primeiro. Além disso, observou-se uma relação direta entre promoção de anestesia e dose aplicada até uma dose de 20 mM de lidocaína, pois ao empregar-se uma maior dose ocorreu uma redução brusca da anestesia. Este estudo também evidenciou um efeito sinérgico entre os dois anestésicos locais avaliados (KOLESNIKOV *et al.*, 2000).

Com o intuito de avaliar a analgesia promovida pela associação de lidocaína e promotores de absorção cutânea, SHIN e colaboradores (2004) empregaram o modelo *tail flick*. Com sucesso, os autores evidenciaram que o emprego de dietileno glicol em géis contendo lidocaína promoveu uma analgesia 3,89 vezes superior do que em géis ausentes de tal promotor de permeação.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

## 4.1 MATERIAIS

### 4.1.1 Matérias-Primas

- Anestésicos locais (Nortecquímica, Brasil);
- Macromoléculas (Aldrich, França; Almapal, Brasil; Henrifarma, Brasil);
- Tensoativos (Delaware, Brasil; Lucas Meyer, Alemanha).

### 4.1.2 Aparelhos e Equipamentos

- Agitador magnético TE-085 (Tecnal, Brasil);
- Analgesímetro *tail flick* modelo EFF-300 (Insight, Brasil);
- Balança analítica AB204 (Mettler Toledo, Suíça);
- Bomba de vácuo V-500 (Büchi Vac<sup>®</sup>, Alemanha);
- Câmara climática modelo 420/CLD 150 (Nova Ética, Brasil);
- Centrífuga Sigma 4K15 (Sigma, Alemanha);
- Cromatógrafo Líquido de alta eficiência Perkin Elmer;
  - Detector: UV-VIS Série 200 (Perkin Elmer, EUA);
  - Bomba: Série 200 (Perkin Elmer, EUA);
  - Injetor: Autosampler Série 200 (Perkin Elmer, EUA).
- Dispositivo para a determinação da espalhabilidade;
- Espectrofotômetro FTIR Shimadzu, modelo 8001 (Shimadzu, Japão);
- Espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, UV 160 A (Shimadzu, Japão);
- Evaporador rotatório (Büchi R-114, Alemanha);
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII (Jeol, Japão);
- Potenciômetro B474 (Micronal, Brasil);
- Viscosímetro rotativo Brookfield, modelo DV-II+PRO, série LV (Brookfield, EUA);
- Zetasizer<sup>®</sup> nano- ZS modelo ZEN 3600 (Malvern, EUA);
- Ponto de fusão automático (Mettler Toledo, modelo FP81HT MBC acoplado a unidade central FP 90, Suíça).

### 4.1.3 Solventes, Reagentes e Outros Materiais



- Acetato de uranila p.a (Reagem, Brasil);
- Acetona p.a. (Merck, Alemanha);
- Acetonitrila grau CLAE (Merck, Alemanha);
- Água destilada;
- Água Milli-Q (destilador/deionizador Milli-Q<sup>®</sup> - Millipore, EUA);
- Coluna LiChrospher<sup>®</sup>100 RP- 18 (5 x 150 mm (Merck, Alemanha);
- Filtros Ultrafree<sup>®</sup> MC GPMC 10,000 NMWL (Millipore, EUA);
- Hidróxido de sódio (Merck, Alemanha);
- Membranas de polivinilideno (0,45 µm, 13 mm, Millipore, EUA);
- Membranas de polivinilideno (0,45 µm, 47 mm, Millipore, EUA);
- Trietilamina (Delaware, Brasil).

#### **4.1.4 Animais de Laboratório**

- Camundongos *Swiss*, pesando entre 25 e 30 g (procedência: FEPPS, Porto Alegre, Brasil).

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Análise Quantitativa do(s) Anestésico(s) Local(is)**

#### **4.2.1.1 Condições experimentais**

As análises foram desenvolvidas empregando-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer, equipado com detector UV-VIS S-200, bomba S- 200 e injetor automático autosampler S- 200.

No método de doseamento dos anestésicos locais empregou-se uma coluna LiChrospher<sup>®</sup>100 de fase reversa C<sub>18</sub>. A fase móvel empregada correspondeu à acetonitrila: tampão fosfato (0,02M): trietilamina na proporção de 50:50:0,01 (v/v/v), o volume de injeção foi de 20 µL, o comprimento de onda de detecção de 205 nm e o fluxo de 1 mL/min .

O método foi validado através da avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e especificidade, conforme consta na Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Anexo 1).

#### **4.2.1.2 Preparação da Curva Padrão**

A partir de uma solução da substância química de referência padrão USP de cada anestésico com concentração de 0,5 mg/mL, transferiram-se alíquotas de 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600 µL para balões volumétricos de 10 mL. Completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se, ao final, soluções com concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 µg/mL.

### **4.2.2 Preparação das Nanoestruturas Contendo Anestésico(s) Local(is)**

Diversas formulações de nanoestruturas contendo anestésico(s) local(is) foi/foram preparada(s) empregando-se métodos específicos e variando-se as composições quali e quantitativas.

As formulações foram designadas com a numeração de 1 a 30.

### **4.2.3 Caracterização Físico-Química das Nanoestruturas**

#### **4.2.3.1 Determinação do pH das Suspensões**

O pH das diferentes formulações de nanoestruturas foi determinado após a preparação, à temperatura ambiente, mediante utilização de potenciômetro (B474, Micronal), calibrado com soluções-tampão de valores de pH 4,0 e 7,0. Para cada formulação foram realizadas três determinações.

#### **4.2.3.2 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico das Nanoestruturas**

A avaliação do diâmetro e do índice de polidispersão das partículas em suspensão foi determinada através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer<sup>®</sup> nano- ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA). As amostras foram diluídas em água ultrafiltrada 500 vezes à temperatura ambiente.

#### **4.2.3.3 Determinação do Teor Total e Taxa de Associação do(s) Anestésico(s) Local(is) nas Nanoestruturas**

Os teores dos fármacos foram determinados por HPLC, conforme metodologia validada (Anexo1).

#### **4.2.3.5 Determinação do Potencial Zeta**

O potencial zeta das suspensões foi determinado através de Zetasizer<sup>®</sup> nano- ZS modelo ZEN 3600 (Malvern, EUA). Essa determinação foi realizada 24 horas após preparação das suspensões utilizando uma célula modelo DTS 1060. As amostras foram diluídas 500 vezes em uma solução de NaCl (1 mM) previamente

filtrada em membrana hidrofílica 0,45 µm. Os resultados representam a média de três determinações.

#### **4.2.3.6 Determinação da Morfologia das Nanoestruturas**

A morfologia das nanopartículas foi determinada através da diluição em água ultrafiltrada na proporção de 1:10 (suspensão:água). Após tal diluição 20 µL de amostra foi adicionada sobre um suporte metálico (400 *mesh*) de cobre, sendo o contraste negativo realizado com acetato de uranila previamente filtrado em membrana 0,45 µm. As amostras foram mantidas armazenadas por um período de 48 horas antes da análise. Empregou-se uma voltagem de 80 Kv para a realização das análises (Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII, Jeol, Japão). Somente a suspensão selecionada como promissora foi avaliada.

#### **4.2.4 Preparação dos Semi-sólidos**

Prepararam-se bases de semi-sólido contendo como agente espessante o Carbopol® 940. Às bases incorporaram-se as nanoestruturas desenvolvidas no item 4.2.2 previamente selecionadas. Preparou-se como controle positivo uma formulação contendo uma solução aquosa do(s) fármaco(s) em questão. Como controle negativo, desenvolveu-se uma formulação sem adição dos fármacos ou nanoestruturas.

#### **4.2.5 Caracterização dos Semi-sólidos**

##### **4.2.5.1 Determinação do pH dos Semi-sólidos**

As formas farmacêuticas semi-sólidas foram diluídas a 10 % (m/v) em água, e as determinações do pH foram efetuadas utilizando-se potenciômetro (B474, Micronal), previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,0 e 7,0. Os resultados correspondem à média de três determinações.

#### **4.2.5.2 Determinação Quantitativa do(s) Anestésico(s) Local(is) nos Semi-sólidos**

Em erlenmeyer de 50 mL de capacidade, pesou-se exatamente cerca de 0,250 g de cada preparado de acordo com o descrito no item 4.2.5. Após, adicionou-se 20 mL de água destilada e aqueceu-se por 90 minutos a 37° C. Verteu-se tal solução para um balão volumétrico de 50 mL e o resíduo do erlenmeyer foi tratado com duas alíquota de 10 mL de acetonitrila. Manteve-se tal solução com agitação em banho-maria (37° C) por 90 minutos e, então, completou-se o volume do balão com acetonitrila. Em seguida, a amostra foi filtrada através de membrana hidrofílica (0,45 µm, Millipore), e injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência, procedendo-se conforme metodologia validada (Anexo 1).

#### **4.2.5.3 Determinação do Diâmetro das Nanopartículas Presentes nos Semi-sólidos**

A avaliação do diâmetro e do índice de polidispersão das partículas em semi-sólido foi determinada através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA). Realizou-se uma diluição de 500 vezes do semi-sólido empregando água previamente filtrada em membrana hidrofílica (0,45 µm, Millipore) (SOUTO *et al.*, 2004). Os resultados correspondem à média de três determinações.

#### **4.2.5.4 Determinação da Morfologia das Nanopartículas Presentes no Semi-sólido**

A morfologia das nanopartículas foi determinada através da diluição em água ultrafiltrada na proporção de 1:50 (semi-sólido:água). Após diluição a amostra foi filtrada em membrana de 0,45 µm e, então, 20 µL de amostra foi adicionada sobre um suporte metálico (400 mesh) de cobre, sendo o contraste negativo realizado com acetato de uranila previamente filtrado em membrana 0,45 µm. As amostras foram mantidas armazenadas por um período de 48 horas antes da análise. Empregou-se uma voltagem de 80 Kv para a realização das análises (Microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 ExII, Jeol, Japão).

#### 4.2.5.5 Determinação da Viscosidade

A determinação da viscosidade das formulações foi realizada com auxílio de um viscosímetro rotacional Brookfield, modelo DVI+, série RV utilizando-se *spindle* SC<sub>4</sub>-25. As velocidades de rotação do *spindle* foram selecionadas com base em determinações preliminares. Um minuto após o ajuste de cada velocidade foi efetuada a leitura das viscosidades e das tensões de cisalhamento.

#### 4.2.5.6 Determinação da Espalhabilidade

Para a determinação da estabilidade, foi empregada metodologia proposta por MUNZEL (1959), modificada por KNORST em 1991.

Uma placa-molde, de vidro (diâmetro= 20 cm; espessura = 0,2 cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa suporte de vidro (20 cm x 20 cm). Sob essas placas, foi posicionada uma folha de papel milimetrado e uma fonte luminosa. A amostra foi introduzida no orifício da placa e a superfície foi nivelada com espátula. Após, a placa-molde foi cuidadosamente retirada. Sobre a amostra colocou-se uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto, anotaram-se os diâmetros abrangidos pela amostra, através da medição dos mesmos em duas posições opostas, com auxílio da escala do papel milimetrado. Posteriormente, calculou-se o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se sucessivamente outras placas, em intervalos de um minuto, registrando-se após cada determinação a superfície abrangida pela amostra e o peso da placa adicionada.

A espalhabilidade ( $E_i$ ) foi calculada através da equação 2:

$$E_i = \frac{d^2 \cdot \pi}{4} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

- $E_i$ = espalhabilidade a amostra para um determinado peso  $i$  ( $\text{cm}^2$ );
- $D$ = diâmetro médio (cm).

Os valores da espalhabilidade em função da massa e carga adicionada foram plotados em gráficos e correspondem à média de nove determinações.

A espalhabilidade máxima foi considerada como sendo o ponto no qual a adição de massa não ocasionou alterações significativas nos valores de espalhabilidade.

#### **4.2.6 Avaliação da Estabilidade do Produto Final**

As formulações semi-sólidas foram submetidas a uma temperatura de  $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  e a uma umidade relativa de  $75\% \pm 5\%$ , por períodos três meses. Após a preparação, 30 e 90 dias realizou-se o acompanhamento da concentração dos anestésicos locais nas amostras em estudo, através de metodologias analíticas seguindo os mesmos parâmetros conforme descrito no item 4.2.7.2.

#### **4.2.8 Avaliação da Atividade Analgésica *in vivo***

A atividade anestésica foi avaliada através do modelo de dor induzido *tail flick* utilizando metodologia descrita por D' AMOUR e SMITH (1941).

Para a determinação do número de animais em cada grupo estudado utilizou-se o programa estatístico Sigma-Stat<sup>®</sup> 2.03. Os parâmetros avaliados (Tabela 2) foram o desvio padrão, poder de teste, nível de significância, número de grupos a serem utilizados admitindo-se uma diferença de 30 % para o tempo de anestesia como sendo uma diferença aceitável (RANG *et al.*, 2001). Segundo o programa Sigma-Stat<sup>®</sup> 2.03 foram utilizados 11 animais por grupo. Previamente aos experimentos os animais foram selecionados, quanto a sua resposta ao estímulo térmico, tendo-se utilizado um número de 50 % superior de animais por grupo. Apenas os animais sensíveis ao estímulo foram utilizados para a avaliação da atividade analgésica.

Tabela 2. Parâmetros avaliados para a determinação do número de animais por grupo de experimento.

Parâmetro	Valor
Desvio padrão	0,0500
Nível de significância	0,170
Número de grupos	8
Poder de teste	0,800
Diferença não significativa	0,300

Para a realização deste experimento utilizaram-se camundongos albinos *Swiss* adultos, fêmeas e com peso variando entre 30 - 35 g. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia, com temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas (7 h- 19 h). Os animais tiveram livre acesso a água e alimentação (ração certificada Nuvilab CR1<sup>®</sup>) e foram mantidos em gaiolas com no máximo 5 animais.

Os animais foram aclimatizados no laboratório de experimentação por pelo menos 7 dias antes do teste. Após o término da avaliação farmacológica, os animais sofreram eutanásia utilizando câmara de CO<sub>2</sub> e foram acondicionados em *freezer* (-20 °C) até a coleta especial realizada pela Prefeitura de Porto Alegre.

Para a realização deste projeto, as normas do Conselho Canadense de Proteção aos Animais foram seguidas, de acordo com as condições laboratoriais (<http://www.ccac.ca>). O projeto foi aprovado ao Comitê de Ética da UFRGS (deliberação número: 2005490).

Foram estudados os seguintes grupos:

- **Grupo controle positivo**  
Aplicação tópica do produto comercial
- **Grupo controle negativo**  
Formulação semi-sólida contendo nanoestruturas sem fármaco
- **Grupo teste**  
Formulações semi-sólidas de nanoestruturas contendo anestésico(s) local(is).



Durante o experimento os animais foram mantidos dentro de um contensor com a cauda estendida para fora do mesmo. Primeiramente avaliou-se a linha de base de sensibilidade (LB) de cada animal através do equipamento analgesímetro (Analgesímetro *tail flick* modelo EFF-300). Em seguida, imergiu-se a cauda do animal em dimetilsulfóxido (DMSO) por 2 minutos, que foi posteriormente retirado com uma gaze umidificada. Na seqüência, a cauda do animal foi cuidadosamente imersa em um Eppendorf<sup>®</sup> contendo a formulação semi-sólida. Após 10 e 20 minutos de aplicação da formulação a mesma foi removida utilizando uma gaze umidificada. Colocou-se a cauda do animal na superfície do equipamento provido de um filamento metálico aquecido. Para a avaliação da analgesia mediu-se o tempo de latência (TL) para a reação do estímulo induzido pelo calor através do movimento da cauda. O tempo máximo de exposição à radiação foi de 6 segundos, a fim de minimizar lesões teciduais na cauda do animal. Para cada animal foram realizadas três medições de tempo de latência.

Os resultados foram avaliados quanto à porcentagem de anestesia obtida para cada animal, conforme equação abaixo (Equação 3) (KOLESNIKOV *et al.*, 2000):

$$\% \text{ anestesia} = \frac{(TL - LB)}{(6 - LB)} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

TA: Tempo de latência;

LB: Linha de base;

6: Tempo máximo de exposição à radiações.

#### 4.2.9 Análise Estatística

A análise estatística dos dados da avaliação da atividade anestésica foi realizada de acordo com o método de Mann Withey (Sigma-Stat<sup>®</sup>, Jandel Scientific, USA), utilizando-se o creme comercial EMLA<sup>®</sup> como referência.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 5.1 Suspensões de Nanoestruturas

Para todas as formulações desenvolvidas constatou-se um aspecto macroscopicamente homogêneo, assim como um aspecto azulado, decorrente do efeito *Tyndall* em virtude do movimento browniano das partículas em suspensão, mediante a observação à luz natural (FESSI *et al.*, 1989).

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos de teores, taxas de associação, diâmetros, índices de polidispersão (PDI) e pH após a preparação das suspensões utilizando concentrações crescentes do(s) fármaco(s).

Tabela 3. Características físico-químicas das nanoestruturas.

Formulações	Diâmetro (nm)	PDI	pH
1	132	0,13	9,3 ± 0,2
2	185	0,24	9,1 ± 0,4
3	142	0,56	8,4 ± 0,1
4	181	0,24	8,3 ± 0,1
5	122	0,47	9,3 ± 0,5
6	116	0,09	9,3 ± 0,2
7	164	0,21	9,2 ± 0,1
8	175	0,44	8,4 ± 0,3
9	198	0,20	8,3 ± 0,3
10	134	0,17	8,4 ± 0,3
11	199	0,24	9,1 ± 0,2
12	145	0,24	9,3 ± 0,1
13	173/634	0,7	7,9 ± 0,1

---

---

As formulações apresentaram valores de pH alcalinos devido à presença de grupamentos amínicos existentes nos anestésicos locais. As formulações 1, 2, 5, 6, 7, 11 e 12, apresentaram valores de pH em torno de 9,2, enquanto as formulações 3, 4, 8, 9, 10 e 13 apresentaram valores de pH em torno de 8,4. A atividade anestésica local depende acentuadamente do pH, sendo aumentada na presença de pH alcalino (isto é, quando a proporção de moléculas ionizadas é baixa) e vice-versa, tendo em vista que o pKa de ambos os fármacos é de 7,9 (RANG e DALE, 1999). Dessa forma, as suspensões apresentaram um pH adequado para a não ionização do(s) anestésico(s) local(is) o que proporciona, portanto, de acordo com a literatura, a penetração das mesmas na bainha do nervo e na membrana axônica bloqueando os canais de Na<sup>+</sup> e instalando a anestesia.

Todas as formulações apresentaram valores médios de diâmetro inferiores a 200 nm, compatíveis com os descritos na literatura (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), com exceção da formulação 13 que apresentou duas populações características.

As taxas de associação das suspensões contendo o(s) anestésico(s) local(is) recém preparadas mostraram-se satisfatórias, acima de 70 % em todos os casos. Os doseamentos totais das substâncias ativas, expressos em teores, demonstraram valores superiores a 85 % para cada fármaco, com exceção da formulação 2 que apresentou abaixo de 50 %.

Com base nos parâmetros físico-químicos acima avaliados oito formulações foram selecionadas para continuidade dos estudos: 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 11.

Com o intuito de verificar estabilidade das formulações selecionadas a temperatura ambiente, procedeu-se à avaliação do diâmetro, índice de polidispersão, pH e teor por um período de 45 dias.

Os resultados de diâmetros médios de partículas em função do tempo de armazenamento (Figura 6) demonstraram um aumento para as formulações 3, 4, 8 e 10. Tal aumento pode ser em consequência da inexistência de uma parede estruturada, o que favoreceria uma possível troca de material entre as partículas formadas e, conseqüentemente, uma coalescência das mesmas ao longo do tempo.

As demais formulações (1, 5, 6, e 11) obtiveram diâmetros médios constantes entre 122 a 160 nm, ao longo do período de armazenamento.

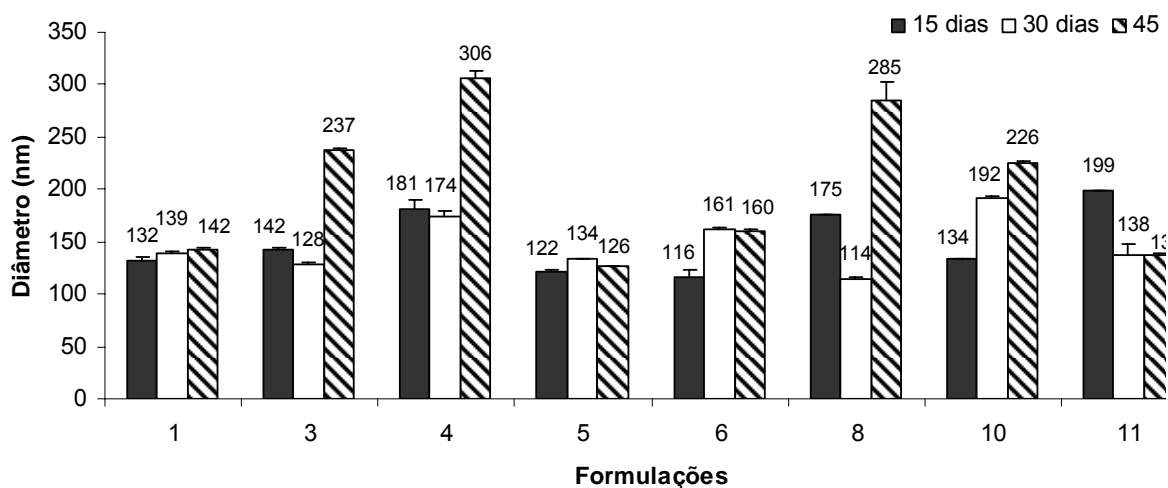


Figura 6. Diâmetros médios das nanoestruturas em função do tempo de armazenamento (15, 30 e 45 dias).

O índice de polidispersão determina a distribuição do tamanho das partículas em relação à média dos diâmetros das nanoestruturas presentes nas suspensões (PECORA, 2000). Esta análise possibilita a avaliação da tendência à sedimentação durante um longo período de armazenamento sendo, portanto, uma ferramenta de avaliação da estabilidade do sistema.

Os índices de polidispersão (Figura 7) obtidos para as formulações 1 e 6 apresentaram-se constantes ao longo dos 45 dias de armazenamento verificando-se uma distribuição de partículas entre 0,09 a 0,15. As formulações 4 e 10 apresentaram uma polidispersão entre 0,17 a 0,24 o que denota a manutenção dos valores de polidispersão ao longo do período de armazenamento, demonstrando a influência do estabilizante na manutenção do sistema em comparação com as respectivas formulações sem a presença de tal matéria-prima (3 e 8) que apresentaram índices de polidispersão de 0,46 e 0,68, respectivamente, após 45 dias. Segundo COUVREUR e colaboradores (2002) os tensoativos não são essenciais para a formação das nanoestruturas, porém são importantes na estabilização dos sistemas durante o seu armazenamento, uma vez que os mesmos

contribuem para a não aglomeração das partículas. As formulações 3, 8, 5 e 11 apresentaram polidispersões superiores a 0,3 e aumento gradativo de diâmetro médio após 45 dias de armazenamento, refletindo a instabilidade física desses sistemas. Dessa forma, tais suspensões não demonstraram potencialidade no que tange a manutenção de um sistema com diâmetros inferiores a 300 nm e polidispersão inferior a 0,3 ao longo de 45 dias de armazenamento.

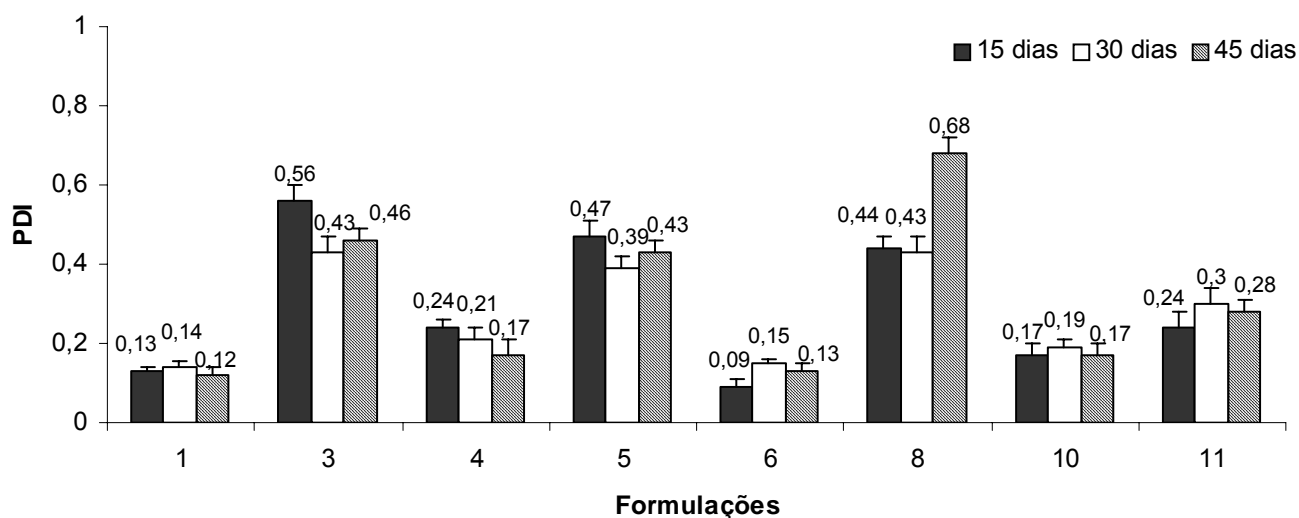


Figura 7. Polidispersões das nanoestruturas em função do tempo de armazenamento (15, 30 e 45 dias).

No que diz respeito aos teores do(s) anestésico(s) local(is), após preparação e 45 dias de armazenamento, todas as formulações apresentaram valores concordantes com os valores teóricos, estabelecidos com base nas concentrações de cada fármaco empregado nas formulações, exceto para a 5 que apresentou um teor na faixa de 80 %, em virtude de uma leve precipitação ao longo do período.

Todas as formulações apresentaram a manutenção dos valores de pH entre 9,2 e 8,4 durante o período em análise.

Apesar da suspensão 4 ter apresentado um diâmetro médio acima de 300 nm ao final dos 45 dias de armazenamento, a distribuição do tamanho das partículas mostrou-se unimodal e o teor adequado. Esta suspensão apresenta-se promissora no que diz respeito à estabilidade sendo, portanto, também selecionada para a continuidade dos estudos.

---

---

Após a avaliação das características físico-químicas das formulações contendo as nanoestruturas durante 45 dias foram selecionadas para prosseguimento dos experimentos aquelas que apresentaram um diâmetro inferior a 300 nm e um índice de polidispersão inferior a 0,25. Sendo assim as suspensões selecionadas foram: 1, 4 e 6.

## **5.2 Avaliação da Influência dos Solventes nas Características das Nanoestruturas**

Com a finalidade de avaliar a influência dos solventes nas características físico-químicas das formulações, procedeu-se o desenvolvimento de produtos contendo diferentes proporções de solventes. Foram avaliadas quatro proporções do solvente A e B 33 % e 66 %, 50 % e 50 %, 60 % e 40 %, com um volume final de 800 mL. As características físico-químicas como diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, e pH foram avaliados ao longo de 30 dias, sendo o teor monitorado por 45 dias.

As formulações 1, 6, 14, 17, 19, 22, 24 e 27 (Figura 8) apresentaram diâmetros médio abaixo de 200 nm, assim como uma distribuição de partículas inferior a 0,3 para todas as formulações ao longo de 30 dias. O emprego de diferentes proporções dos solventes A e B no desenvolvimento das suspensões não demonstrou influenciar o diâmetro médio e o índice de polidispersão das formulações acima.

Com o intuito de facilitar o processo de evaporação dos solventes tornando-o mais rápido foram selecionadas as formulações contendo maior proporção do solvente mais volátil. Dessa forma, as formulações 24 e 27 que contém 60 % do solvente mais volátil foram escolhidas para a continuidade dos estudos.

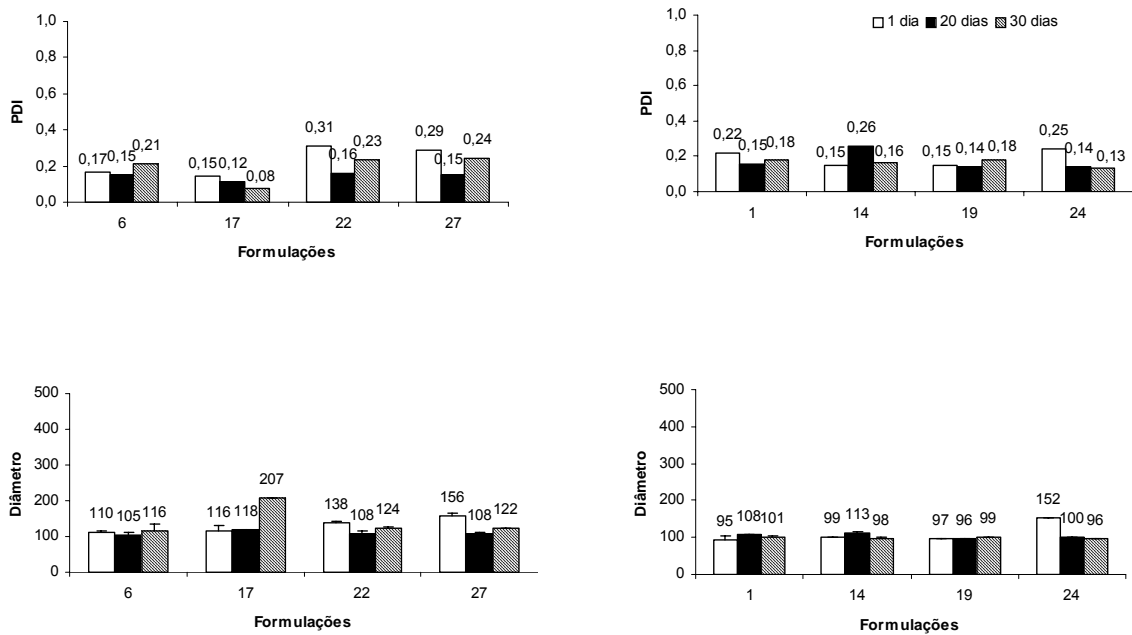


Figura 8. Diâmetros e índices de polidispersão das formulações 1, 6, 14, 17, 19, 22, 24 e 27 após 30 dias de armazenamento.

Para as formulações 3, 4, 15, 16, 20, 21, 25 e 26 (Figura 9), observou-se a influência dos solventes nos diâmetros das nanoestruturas e nos índices de polidispersão. O aumento da proporção do solvente mais volátil ocasionou um aumento no diâmetro médio das partículas, assim como um aumento na distribuição das partículas ao longo de 30 dias.

As formulações 21 e 26 apresentaram uma polidispersão acima de 0,3, assim como um diâmetro médio acima de 200 nm ao final de 30 dias. A suspensão 16, apesar de apresentar um diâmetro inferior a 200 nm possuiu uma polidispersão superior a 0,3. Tais resultados demonstraram a não adequabilidade dessas suspensões para a continuidade dos estudos. No entanto, a suspensão 4 apresentou um diâmetro médio próximo a 200 nm e um índice de polidispersão, ao final de 30 dias, abaixo de 0,3. Dessa forma, esta formulação também foi eleita para a seqüência dos estudos.



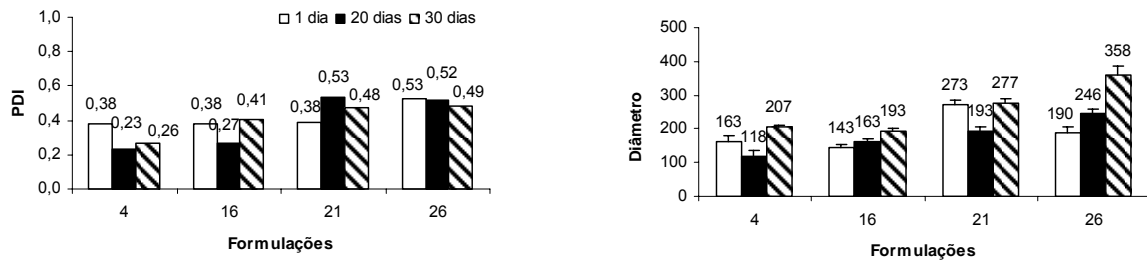


Figura 9. Diâmetros e índices de polidispersão das formulações 4, 16, 21 e 26 ao longo de 30 dias de armazenamento.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas devido à presença de grupos funcionais ionizáveis na superfície ou à adsorção de íons a partir do meio aquoso de dispersão. Todas as formulações (Figura 10) apresentaram valores negativos inferiores a -20 mV denotando, portanto, uma baixa possibilidade de agregação das partículas do sistema (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005).

As formulações 6, 11, 18, 22, 23 27 e 28 apresentaram uma manutenção dos valores ao longo dos 30 dias, exceto a suspensão 17 que apresentou um aumento. Para as suspensões 1, 14, 19, e 24 observaram-se uma leve redução de potencial zeta em função do tempo, mas os valores permaneceram suficientemente altos em módulo (-30 mV) para prevenir a coalescência das partículas. A leve queda pode ser atribuída à re-organização do sistema, tendo em vista a grande quantidade de matérias-primas lipofílicas empregadas nestas suspensões.

O potencial zeta das formulações 4, 16, 21, e 26 foi maior do que para as suspensões anteriormente citadas. Isso pode ser explicado pela presença de matérias-primas que possuem grupamentos carregados negativamente em sua estrutura. (MOSQUEIRA *et al.*, 2000)

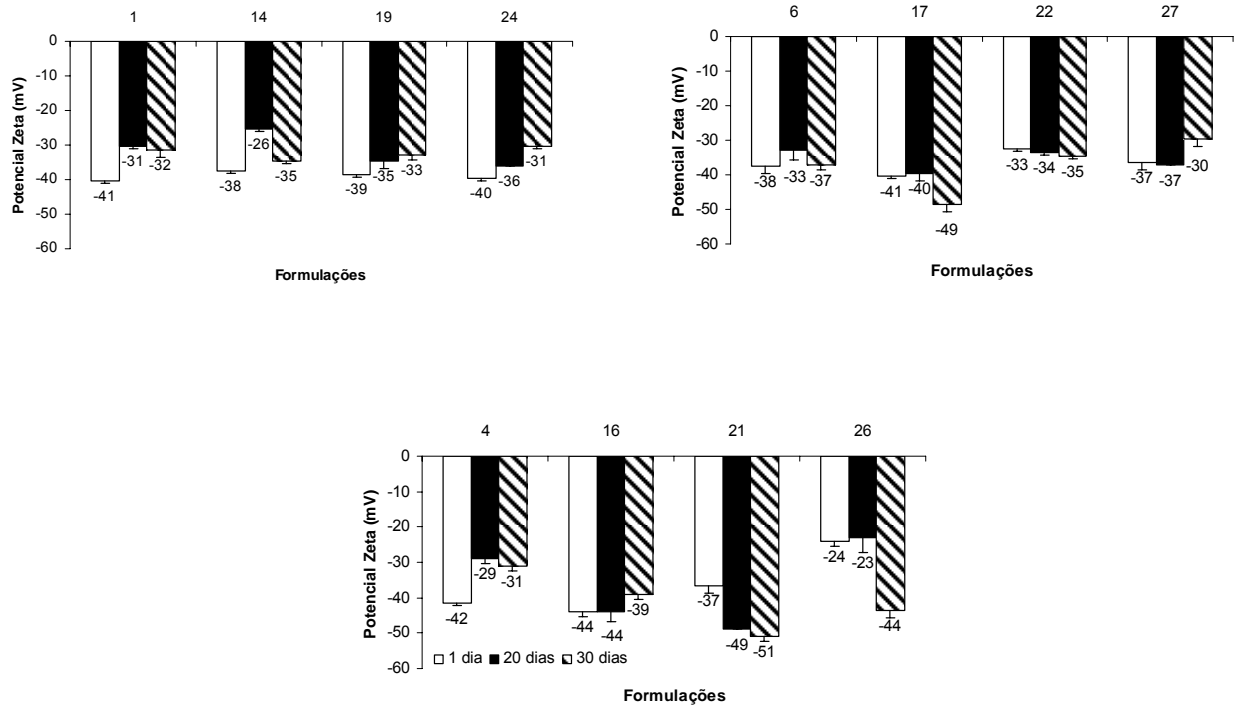


Figura 10. Potenciais zeta das nanoestruturas preparadas empregando-se diferentes proporções de solventes.

Os teores foram analisados após 45 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Todas as formulações apresentaram valores concordantes com o valor teórico no que diz respeito aos teores de cada fármaco.

Após a preparação as formulações 1, 6, 14, 17, 19, 22, 24 e 27 apresentaram valores de pH em torno de 9,2, enquanto as formulações 3, 4, 15, 16, 20, 21, 25 e 26 apresentaram valores em torno de 8,4. Estes valores mantiveram-se constantes após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Após a avaliação das características físico-químicas das formulações foram selecionadas para prosseguimento dos experimentos aquelas que atenderam os seguintes critérios: diâmetro médio de aproximadamente 300 nm, índice de polidispersão inferior a 0,3 e teor entre 90 e 110 %. Sendo assim, as suspensões selecionadas foram 4, 24 e 27.

Além das suspensões anteriormente citadas, desenvolveu-se uma formulação alternativa número 29 contendo a mesma composição quali-quantitativa da

---

---

suspensão 27 porém alterando-se o método de preparação. Sendo assim tal suspensão contém uma fração de fármaco livre e outra de fármaco associado às nanoestruturas. O interesse em preparar esta formulação alternativa foi avaliar o impacto da presença dos fármacos livres e associados, presentes simultaneamente na mesma formulação, sobre o efeito farmacológico. A hipótese é que a fração dos fármacos livres apresente um efeito anestésico rápido e que a de fármacos associados contribua para um efeito anestésico prolongado.

### 5.3 Obtenção das Formulações Semi-sólidas

Desenvolveram-se formulações semi-sólidas contendo as nanoestruturas 4, 24, 27 e 29, assim como formulações similares contendo o(s) fármaco(s) livre(s) como controles.. As formulações semi-sólidas apresentaram-se consistentes, homogêneas, aspectos brilhantes e sem odor (Figura 11).



Figura 11. Formulação semi-sólidas contendo as nanoestruturas 24.

### 5.4 Características Reológicas dos Semi-Sólidos

Através dos resultados obtidos na avaliação da viscosidade das formulações semi-sólidas contendo as nanoestruturas verificou-se uma relação entre o pH das mesmas e a viscosidade dos semi-sólidos. As formulações contendo as

nanoestruturas 24 e 27 que apresentaram valores de pH de 9,2 promoveram uma maior viscosidade ao produto, enquanto formulação 4 cujo valor de pH foi de 8,4, promoveu uma menor viscosidade ao semi-sólido (Tabela 4). Entretanto, todos os semi-sólidos apresentaram uma consistência adequada para a aplicação tópica.

Tabela 4. Viscosidade dos semi-sólidos.

Formulação	Viscosidade (cP) Velocidade 2,0 RPM
4	307200
24	791000
27	730000
29	763100

A espalhabilidade obtida para os semi-sólidos demonstrou concordância com a viscosidade dos mesmos para todas as formulações (Figura 12). A formulação 24 apresentou a maior viscosidade e, conseqüentemente, menor espalhabilidade, enquanto a formulação 4 apresentou uma menor viscosidade e uma maior espalhabilidade. Avaliou-se também o produto comercial de referência que apresentou uma espalhabilidade similar a formulação 27.

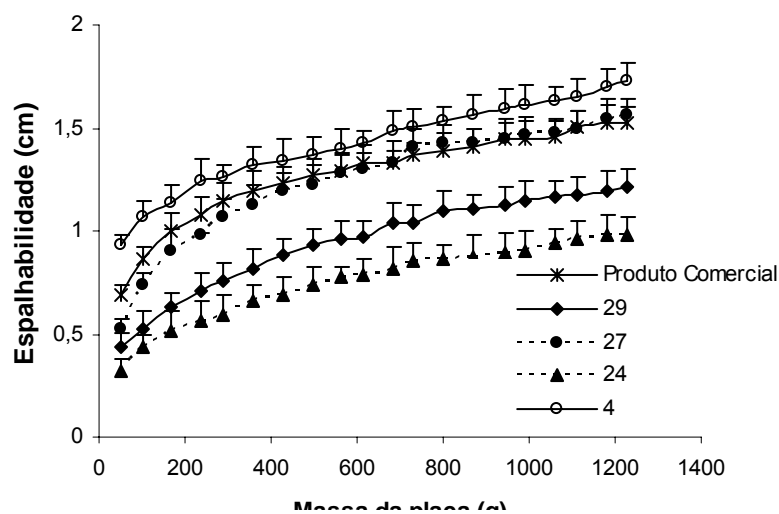


Figura 12. Espalhabilidade dos semi-sólidos contendo as nanoestruturas e do produto comercial.

---

---

## 5.5 Avaliação da Estabilidade dos Semi-sólidos

As avaliações de estabilidade de produtos farmacêuticos são necessárias para que se possa garantir as características terapêuticas adequadas do produto até o seu uso, bem como, estabelecer seu prazo de validade (GRIMM e THOME, 1987).

As formulações semi-sólidas contendo as nanoestruturas foram submetidas a uma temperatura de  $40 \pm 2^\circ \text{C}$  e umidade relativa de  $75 \pm 5 \%$  por um período de três meses de armazenamento, conforme preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para registro de medicamentos (BRASIL, 2005). Os teores das formulações foram determinados após preparação, 30 e 90 dias de estocagem nas condições anteriormente descritas.

No que diz respeito aos teores do(s) fármaco(s), após preparação dos semi-sólidos, todas as formulações apresentaram valores concordantes com os valores teóricos. Após 30 dias de armazenamento os teores das formulações mantiveram-se constantes, sem apresentar reduções significativas. Os semi-sólidos, após 90 dias apresentaram uma leve redução de teor, porém mantendo-se acima de 90 %, exceto a formulação 29, cujo teor situou-se abaixo de 90 %.

A Tabela 5 apresenta a evolução do pH dos semi-sólidos em função do armazenamento à temperatura de  $40^\circ \text{C}$  e umidade relativa de 75 % durante o período de 90 dias. Todas as formulações apresentaram valores iniciais de pH básicos. As suspensões nanoestruturadas inicialmente apresentaram valores de pH na faixa entre 8,3 e 9,2. Após a incorporação das suspensões ao agente estruturante, os semi-sólidos apresentaram uma leve redução dos valores de pH, que passaram para a faixa entre 7,8 e 8,4, respectivamente. Além disso, os valores de pH observados são indicados para a administração tópica de anestésicos locais, tendo em vista a necessidade de um pH alcalino para a não ionização das moléculas. Esta faixa de pH permite que os anestésicos permeiem a bainha do nervo bloqueando os canais de  $\text{Na}^+$  e impedindo a condução nervosa (CARVALHO e MATHIAS, 1997). As formulações armazenadas durante 30 e 90 dias mantiveram seus valores de pH praticamente inalterados com o passar do tempo, não sofrendo influência da concentração de fármacos empregados.

Tabela 5. Valores de pH dos semi-sólidos após preparação, 30 e 90 dias de armazenamento a 40°C e 75 % umidade relativa.

Géis	pH inicial	pH após 30 dias	pH após 90 dias
4	7,9 ± 0,7	7,9 ± 0,38	8,0 ± 0,1
24	8,4 ± 0,1	8,4 ± 0,3	8,5 ± 0,2
27	7,8 ± 0,3	7,8 ± 0,3	7,8 ± 0,1
29	8,4 ± 0,5	8,3 ± 0,2	8,4 ± 0,3

Considerando-se os aspectos organolépticos, as amostras em estudo armazenadas durante três meses, conservaram suas características originais em relação à cor, homogeneidade e odor.

A análise em conjunto dos resultados de teor, pH e características macroscópicas evidenciaram a estabilidade térmica das formulações semi-sólidas, exceto a formulação 29, durante 90 dias de armazenamento.

### 5.5.1 Avaliação do Diâmetro das Nanoestruturas nas Formulações Semi-sólidas após Preparação e 90 dias de Estabilidade

Com o intuito de avaliar a manutenção do diâmetro médio das nanoestruturas presentes na suspensão após a incorporação nas formulações semi-sólidas procedeu-se a determinação do diâmetro das partículas presentes nas diferentes formulações. As formulações avaliadas foram aquelas contendo as suspensões nanoestruturadas e as formulações controle contendo o(s) fármaco(s) livre(s) após a incorporação e após 90 dias de armazenamento à temperatura de 40 °C e umidade relativa de 75 %. A Tabela 6 apresenta estes resultados de diâmetro de partículas e respectivas populações.

Para os controles observou-se uma única população de aproximadamente 500 para o Controle 1 e 850 nm para o Controle 2, após preparação, assim como se verificou a evolução do diâmetro ao longo da avaliação da estabilidade para aproximadamente 600 e 1000 nm, respectivamente. Tais resultados denotam uma

---

---

relação entre a quantidade de matérias-primas lipofílicas empregadas e os diâmetros das estruturas presentes, assim como uma tendência a coalescência ao longo dos 90 dias de estabilidade. Nas formulações sem fármacos não se observou a presença de partículas nanométricas, em contrapartida verificou-se a presença de partículas com diâmetros em torno de 5000 nm que podem ser atribuídas a estruturas microscópicas como poeira.

O semi-sólido contendo as nanoestruturas 24 apresentou uma única população com diâmetro de aproximadamente 150 nm, mesma faixa de diâmetro observada para as nanoestruturas antes da incorporação ao semi-sólido (152 nm), podendo-se inferir, devido aos diâmetros semelhantes, tratarem-se das mesmas estruturas. Após 90 dias de armazenamento observou-se a formação de uma segunda população (25 %) com 537 nm, supostamente originada da coalescência das partículas.

As formulações 27 e 29 apresentaram duas populações com diâmetro de aproximadamente 110 e 5000 nm indicando as nanoestruturas e, simultaneamente, a possível presença de estruturas microscópicas, respectivamente, após preparação. Após 90 dias de estabilidade, verificou-se a manutenção de 97 % e 3 % das populações presentes no semi-sólido 27. Em contrapartida, o semi-sólido 29 apresentou duas populações de 109 nm (65 %), com diâmetros similares aos diâmetros originais das nanoestruturas e uma nova população de 626 nm (35 %) referente, provavelmente, à coalescência das partículas.

O semi-sólido contendo as nanoestruturas 4, após a preparação, apresentou uma população (100 %) com diâmetro de 527 nm superior ao encontrado nas suspensões demonstrando, portanto, a instabilidade do sistema ao incorporar o agente estruturante. Em tais suspensões provavelmente não há formação de uma parede possibilitando, dessa forma, a formação de gotículas com diâmetros superiores aos presentes na suspensão, além disso, após 90 dias de avaliação, observou-se um aumento do diâmetro para 1977 nm, resultante de uma possível da coalescência das mesmas.

Conforme o exposto, conclui-se que as nanoestruturas 24 e 27 incorporadas em formulações semi-sólidas, após a preparação e 90 dias de armazenamento, apresentaram-se estáveis quanto aos diâmetros das partículas, tendo em vista a manutenção das dimensões em torno de aproximadamente 110 e 150 nm, respectivamente. Para os semi-sólidos 4 e 29, a incorporação das suspensões em semi-sólidos propiciou um aumento nas dimensões das partículas demonstrando instabilidade de formulação.



Tabela 6. Diâmetros médios das partículas presentes nos semi-sólidos contendo as nanoestruturas após preparação e após 90 dias de estabilidade.

Hidrogéis	Após Preparação				Após 90 dias de estabilidade			
	Diâmetro da população 1 (nm)	% população 1	Diâmetro da população 2 (nm)	% população 2	Diâmetro da população 1 (nm)	% população 1	Diâmetro da população 2 (nm)	% população 2
Controle 1	498	100	—	—	576	100	—	3
Controle 2	824	100	—	—	1048	100	—	—
4	527	100	—	—	1977	93	49	25
27	114	97	5485	3	112	97	5120	3
29	111	96	5188	4	109	65	626	35
24	149	100	—	—	158	75	537	25

## 5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

O emprego da microscopia de transmissão foi realizado com o intuito de elucidar aspectos morfológicos e confirmar os diâmetros e distribuições das nanoestruturas presentes na suspensão 24 e no semi-sólido contendo esta mesma suspensão.

### 5.6.1 Suspensão 24

A Figura 13 apresenta as fotomicrografias das nanoestruturas contendo o(s) anestésico(s) local(is). Tais imagens revelam estruturas esféricas de diâmetros na faixa de 100 nm, com interfaces definidas. Além disso, é possível observar na imagem A uma distribuição homogênea das nanoestruturas confirmando, portanto, os resultados de índice de polidispersão próximos de 0,1 obtidos para esta formulação.

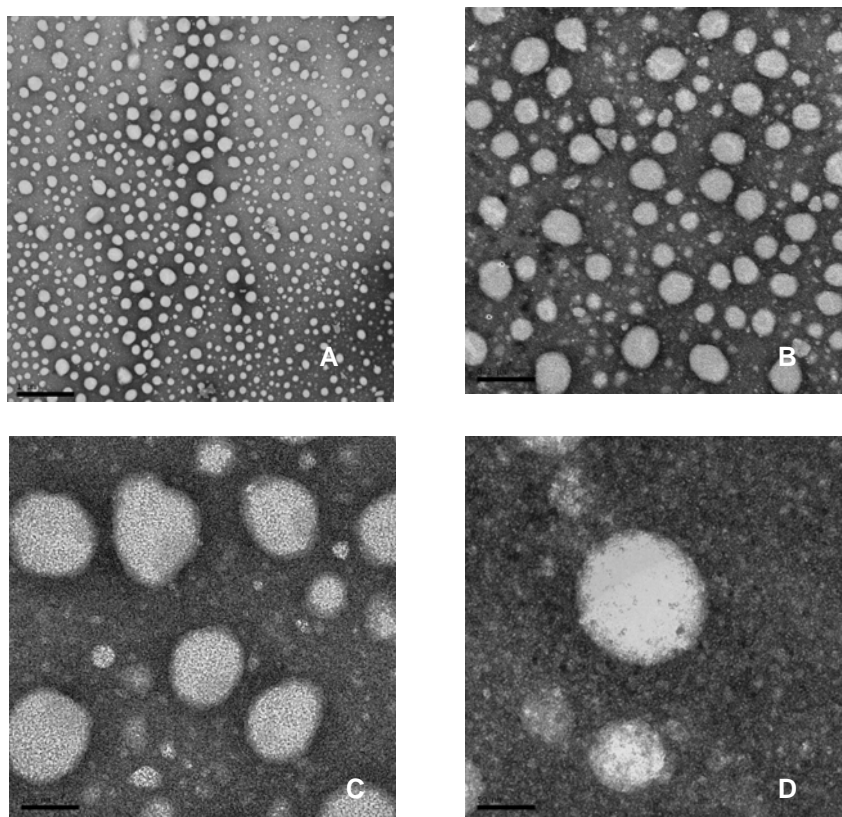


Figura 13. Imagens de microscopia eletrônica por transmissão da suspensão 24 com aumentos de 20.000 x (A), 100.000 x (B), 200.000 x (C), 400.000 x (D).

### 5.6.2 Semi-sólido contendo a suspensão 24

Avaliou-se também a morfologia das nanoestruturas 24 incorporadas na formulação semi-sólida através de microscopia eletrônica por transmissão.

As imagens (Figura 14) revelam a manutenção das nanoestruturas esféricas com interfaces definidas após a incorporação na base semi-sólida. Tais resultados confirmam a presença de estruturas com diâmetros semelhantes aos medidos para as nanoestruturas antes da incorporação à formulação semi-sólida através da técnica de espalhamento de luz dinâmico para os semi-sólidos.

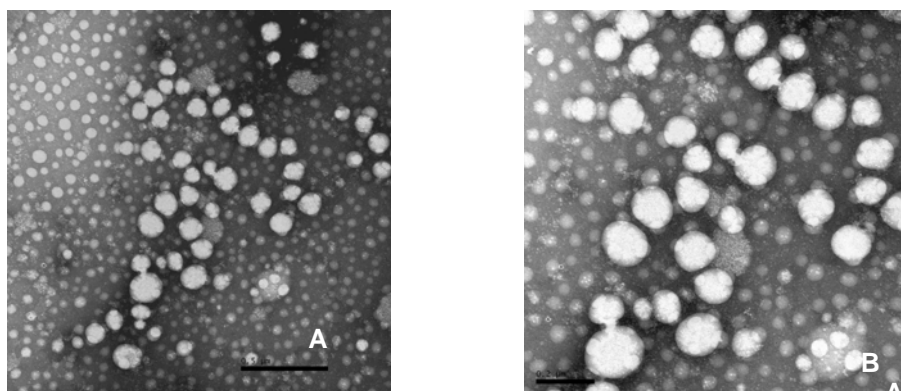


Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica por transmissão dos semi-sólidos contendo a suspensão 24 com aumentos de 60.000 x (A), 100.000 x (B).

### 5.7 Avaliação da Atividade Analgésica

Tendo em vista a atividade anestésica associada ao produto comercial de referência, avaliou-se comparativamente a porcentagem de analgesia *in vivo* promovida pelas formulações semi-sólidas contendo nanoestruturas através do modelo *Tail Flick*. Os semi-sólidos foram avaliados foram os de número 24, 27 Controle 1, Controle 2 e o produto comercial de referência.

De acordo com os resultados apresentados (Figura 15), a associação de anestésico(s) local(is) às nanoestruturas promoveu um aumento considerável na porcentagem de analgesia quando comparadas com as formulações Controle 1 e 2.

Mesmo o semi-sólido 4 que apresenta menor concentração de fármaco(s) apresentou um percentual analgésico de 23 % estatisticamente superior ao semi-sólido fármacos contendo uma concentração de fármaco(s) 66 % superior, cuja analgesia foi de 18 %. Além disso, houve um prolongamento tempo de atividade para ambas as formulações contendo as nanoestruturas (24 e 27) cujos valores são de 125 e 110 minutos, respectivamente. Em contrapartida, os semi-sólidos contendo o(s) fármaco(s) livres (Controles 1 e 2) apresentaram uma duração da analgesia de 95 e 65 minutos, respectivamente. Estes resultados evidenciam a importância da presença das nanoestruturas para a promoção da permeação e liberação controlada dos anestésicos, visto a baixa porcentagem e tempo de analgesia obtido para as formulações contendo os fármacos livres.

Ao se avaliar a analgesia promovida pelo produto comercial de referência, após 10 minutos de contato com a cauda do animal, observou-se uma atividade analgésica de aproximadamente 50 % após 10 minutos de administração, porém para o semi-sólido contendo concentrações iguais de fármacos livres verificou-se uma analgesia de aproximadamente de 3 %. A superioridade de atividade apresentada para o produto comercial em relação ao Controle 2 pode estar relacionada com a diferença de viscosidade e/ou com a base empregada. A capacidade do fármaco em uma formulação tópica de permear a pele e exercer os efeitos é dependente de dois eventos consecutivos. O fármaco deve difundir através do veículo até a superfície da pele e deve permear tal barreira fisiológica para, então, exercer a ação no local desejado. Ambos os passos são dependentes de propriedades físico-químicas do ativo, veículo e da pele, sendo assim é importante considerar a solubilidade das substâncias ativas no veículo, assim como o coeficiente de partição do fármaco tanto no estrato córneo, quanto no veículo (NISHIHATA *et al* 1988.; PRISTA, 1995).

Tal suposição também pode ser estendida à formulação 24. Além disso, verificou-se maiores tempos de analgesia para os semi-sólidos quando comparados com o produto comercial, sendo verificada uma analgesia mais prolongada em 45 minutos para o produto 24. Esta diferença demonstra a capacidade de tais sistemas nanoestruturados de promover uma liberação mais lenta dos fármacos em questão.

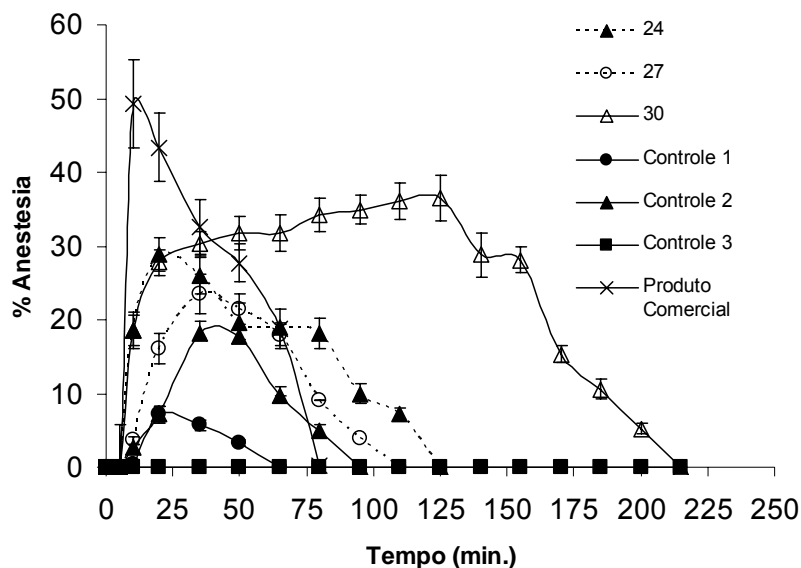


Figura 15. Porcentagem de analgesia promovida pelos semi-sólidos 24, 27, 30, Controle 1, Controle 2, Controle 3 (nanoestruturas sem fármacos) e Produto comercial após 10 minutos de exposição (n= 11/grupo).

Com o intuito de verificar a influência da viscosidade sobre a atividade analgésica desenvolveu-se um semi-sólido contendo as nanoestruturas 24, porém com viscosidade inferior (semi-sólido 30). A redução da viscosidade de 791000 cP para 640000 cP promoveu um aumento na atividade analgésica de aproximadamente 30 para 40 %, além de um prolongamento da analgesia de 125 para 210 minutos. Tais resultados demonstram a grande influência da viscosidade na promoção da permeação dos fármacos através da pele do animal. O aumento da viscosidade ocasiona um forte decaimento no coeficiente difusional do ativo promovendo uma liberação a partir desses sistemas muito lenta (KRIWET e MÜLLER-GOYMANN, 1995). Em se tratando de fármacos de elevada permeabilidade, o controle da velocidade de permeação pode ser atribuído ao veículo empregado. Nesse sentido, a difusão da substância ativa na formulação é a etapa limitante para a penetração cutânea (ZATZ, 1995). Apesar da intensidade obtida para a formulação 30 ter sido levemente inferior ao produto comercial, deve-se considerar que uma das qualidades desejadas para os anestésicos locais é uma

atividade de longa duração ou de liberação controlada. Essas qualidades possibilitam um aumento na duração da anestesia, diminuindo a frequência de administrações diárias e reduzindo a toxicidade sistêmica inerente aos anestésicos locais atualmente disponíveis, principalmente para pacientes submetidos a cirurgias ou com dor crônica que necessitam de administrações repetidas (ARAÚJO *et al.*, 2003).

Avaliou-se também a influência do tempo de permanência na atividade analgésica aplicando-se as formulações durante 20 minutos (Figura 16). Observou-se uma superioridade na atividade analgésica para todas as formulações quando comparadas à aplicação de após 10 minutos. Apesar de a dose aplicada ser alta, pode-se relacionar tais resultados com as observações realizadas por KOLESNIKOV e colaboradores (2000), tendo em vista a liberação gradual dos fármacos. Para os semi-sólidos contendo nanoestruturas desenvolvidos no presente trabalho, verificou-se uma superioridade na atividade e na duração da anestesia quando comparadas com os Controles contendo os fármacos livres. Tais resultados são similares com os encontrados para o tempo de exposição de 10 minutos confirmando, portanto, a liberação mais controlada dos fármacos através dos sistemas nanoestruturados.

Ao se comparar à atividade promovida pelo produto comercial após 20 minutos de exposição, observou-se uma anestesia máxima de aproximadamente 10 %, enquanto para formulação contendo as nanoestruturas a atividade foi de aproximadamente 35 %. Além disso, a duração de ação do semi-sólido 24 foi 65 % superior ao produto comercial. Conforme o fabricante para cada tipo de procedimento há uma indicação de quantidade de produto (dose), tempo mínimo e máximo de exposição, sendo necessário após o tempo máximo, a retirada do produto. A partir dos resultados obtidos supõe-se que, em função da quantidade aplicada do semi-sólido no ensaio ser alta, possa ter ocorrido uma alta absorção dos fármacos, em virtude da capacidade dos mesmos de causar vasodilatação, ocasionando uma rápida metabolização dos fármacos não permitindo a instalação da anestesia. Nesse sentido, para o emprego do produto comercial torna-se necessário um maior controle de dose e de tempo de contato por parte do consumidor, pois um erro de dosificação ou de exposição poderá propiciar uma

anestesia insuficiente para o início de um procedimento. Em contrapartida, a aplicação do semi-sólido contendo as nanoestruturas poderia, conforme os resultados obtidos, promover uma ação anestésica satisfatória sem a necessidade de um controle no tempo de exposição, pois o filme formado associado às nanoestruturas resultaria em uma alternativa de dosificação gradual do fármaco no sítio de ação (SCHROEDER *et al.*, 2006).

Assim como para o tempo de exposição de 10 minutos, também se avaliou a formulação contendo 50 % a menos de agente estruturante para o tempo de contato de 20 minutos. Nesse ensaio também se observou um aumento na intensidade e na duração da analgesia para o semi-sólido 30. Após 20 minutos, a anestesia obtida foi de 33 % e 5 % para o semi-sólido 29, contendo menor concentração de agente espessante e para o produto comercial, respectivamente. Além disso, a duração da analgesia promovida pelo semi-sólido 30 foi de 225 min, enquanto que para o produto comercial foi de 125 min.

Conforme o exposto, a formulação 30 demonstrou maior potencialidade na promoção de uma anestesia eficaz e duradoura sendo eleita como a formulação mais promissora para aplicabilidade comercial.

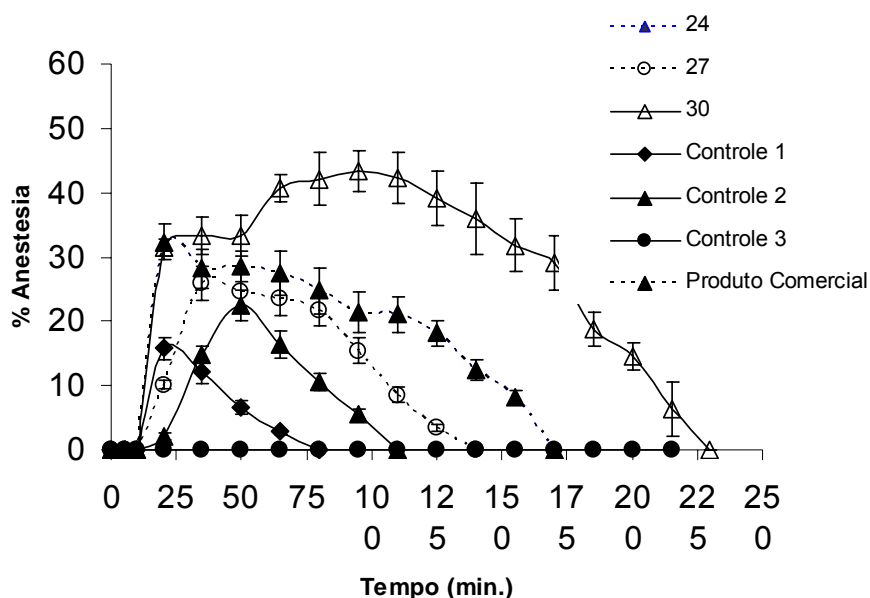


Figura 16. Porcentagem de anestesia promovida pelos semi-sólidos 24, 27, 30, Controle 1, Controle 2, Controle 3 e Produto Comercial após administração tópica de 20 minutos (n= 11/grupo).

## **6. CONCLUSÕES**





- Os resultados obtidos na caracterização físico-química das nanoestruturas permitiram concluir foi possível obter formulações estáveis contendo anestésico(s) local(is) com diâmetros inferiores a 200 nm e uma distribuição unimodal.
- O emprego de diferentes proporções de solventes na preparação das nanoestruturas influenciou as características físico-químicas das suspensões, dependendo da composição qualitativa das formulações.
- Foi possível obter formulações sem-sólidas contendo as suspensões nanoestruturadas, apresentando características físico-químicas adequadas.
- O estudo preliminar da estabilidade térmica dos semi-sólidos contendo as nanoestruturas de anestésico(s) local(is) demonstrou a manutenção dos teores do(s) fármaco(s) e das características organolépticas por um período de 90 dias a 40 C e 75 % de umidade, exceto para a formulação 29.
- Através dos testes de espalhamento de luz dinâmico e microscopia eletrônica de transmissão por possível observar a presença das nanoestruturas 24 após a incorporação ao semi-sólido.
- A atividade analgesica *in vivo* promovida pelo produto comercial, após exposição de 10 min, apresentou-se mais intensa do para as formulações avaliadas, porém a duração da anestesia para a formulação 24 mostrou-se maior.
- A atividade analgesica em comparação com o produto comercial, após 20 min de exposição, apresentou-se mais intensa e prolongada para o semi-sólido 24.
- A viscosidade do hidrogel apresentou grande influência sobre a atividade analgesica para a formulação 24, tendo em vista o aumento da atividade e da duração anestésica ao se reduzir à porcentagem do agente espessante.



## **7. REFERÊNCIAS**

---

ALTMAM, D.A.; GILDENBERG, S.R. High-energy Pulsed Light Source Hair Removal Device Used to Evaluate the Onset of Action of the New Topical Anesthetic. *Dermatologic Surgery*, v. 25, p. 816-818, 1999.

ANDRADE E.D. Terapêutica medicamentosa em odontologia. São Paulo: Artes, p. 93-140, 1998.

ARAÚJO, D.R.; PINTO, L.M.A.; BRAGA, A.F. A.; PAULA, E.; Formulações de Anestésicos Locais de Liberação Controlada: Aplicações Terapêuticas. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v. 53, p. 663-671, 2003.

BARDSLEY H.; GRISTWOOD R.; BAKER H.; WATSON N.; NIMMO W.A. Comparison of the Cardiovascular Effects of Levobupivacaine and Bupivacaine Following Intravenous Administration to Healthy Volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 46, p. 245-249, 1998.

BARRY, B. W. Lipid-protein-partitioning Theory of Skin Penetration Enhancement. *Journal of Controlled Release*, v. 15, p. 237-248, 1991.

BOOGAERTS, J.G.; LAFONT, N.D.; DECLERCQ, A.G.; LUO, H.C.; GRAVET, E.T.; BIANCHI, J.A.; LEGROS, F.J.; Epidural Administration of Liposome-Associated Bupivacaine for the Management of Postsurgical Pain: a First Study. *Journal of Clinical Anesthesia*, v. 6, p. 315-320, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Página visitada em 19 de novembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 133 de 19 de novembro de 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Página visitada em 19 de novembro de 2006.

BUCALO, B. D.; MIRIKITANI, E. J.; MOY, R. L. Comparasion of skin anesthetic effect of lipossomal licocaine , Ionlipossomal lidocaine and EMLA using 30-minute aplication time. *Dermatologic Surgery*, v. 24, p. 537-541, 1998.

CARAFÁ, M.; SANTUCCI, E.; LUCANIA, G. Lidocaine-loaded Non-ionic Surfatant Vesicles: Characterization and In Vitro Permeation Studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 231, p. 21-32, 2002.

CARVALHO, J. C. A.; MATHIAS, R. S. Farmacologia dos anestésicos locais. In: Manica, J. T. *Anestesiologia: princípios e técnicas*, 2º ed. Porto Alegre. Artes Médicas, p. 332-340, 1997.

CATTERALL, W; MACKIE, K. Local Anesthetics. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E. (Eds.), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9º ed. Mc-Graw-Hill, New York. p. 331-348, 1996.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; AUTHIER, C. Nanocapsule Tecnology: A Review. *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.19, p. 99-134, 2002.

COVIDO, B. G. Pharmacology of Local Anesthetic Agent. *British Journal of Aneaesthesia*, v. 58, p. 701-716, 1986.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.72, p. 74-79, 1941.

DOLLO, G.; CORRE, P. L.; CHEVANNE, F.; VERGE, R. L. Inclusion Complexation of Amide-typed Local Anesthetics with  $\beta$ -cyclodextrin and its Derivatives. I. Physicochemical Characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 131, p. 219 -28, 1996a.

DOLLO, G.; CORRE, P. L.; CHEVANNE, F.; VERGE, R. L. Inclusion Complexation of Amide-typed Local Anesthetics with  $\beta$ -cyclodextrin and its Derivatives. II. Evaluation of Affinity Constants and In Vitro Transfer Rate Constants. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 136, p. 165-174, 1996b.

DOLLO, G.; DIANE, O; THOMPSON, D. O.; CORRE, P. L.; CHEVANNE, F.; VERGE, R. L. Inclusion Complexation of Amide-typed Local Anesthetics with  $\beta$ -Cyclodextrin and its Derivatives. III. Biopharmaceutics of Bupivacaine-SBE7- $\beta$ CD Complex Following Percutaneous Sciatic Nerve Administration in Rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 164, p. 11-19, 1998.

EGBARIA, K.; WEINER, N. Liposomes as a topical drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 5, p. 287-300, 1990.

EREMIA, S.; NEWMAN, N. Topical Anesthesia for Laser Hair Removal: Comparison of Spot Size and 755 nm versus 800nm wavelengths. *Dermatologic Surgery*, v. 26, p. 667-669, 2000.

FERREIRA, M. B. C. Anestésicos locais. In: Fuchs FD, Wannmacher L (eds). *Farmacologia clínica*. Fundamentos da Terapêutica Nacional. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.15-64, 1998

FRIEDMAN, P. M.; MAFONG, E. A.; FRIEDMAN, E. S. Topical Anesthetics Update: EMLA<sup>®</sup> and Beyond. *Dermatologic Surgery*, v. 27, p. 1019-1026, 2001.

FITZPATRICK, K. Anestésicos Locais. In: DUKE, J.; ROSENBERG, S.G. (Ed). *Segredos em Anestesiologia*. Porto Alegre: Artes Médicas, cap. 13, p. 112-117, 1997.

GARDMARK, M.; HOGLUND. A. U.; UDENAES, M. H. Aspects on Taik-Flick, Hot-Plate and Eletrical Stimulation Tests for Morphine Antinociception. *Pharmacology & Toxicology*, v. 83, p. 252-258, 1998.

GESZTES, A.; MEZEI, M. Topical Anesthesia of the Skin by Liposome-Encapsulated Tetracaine. *Anesthesia and Analgesia*, v. 67, p.1079-1081, 1988.

GORNER, T.; GREF, R.; MICHENOT, D; SOMMER, F.; TRAN, M.N.; DELLACHERIE, M. N. Lidocaine-loaded Biodegradable Nanospheres. I. Optimization of the Drug Incorporation into the Polymer Matrix. *Journal of Controlled Release*, v. 57, p. 259–68, 1999.

GRANT, G. J.; VERMEULEN, K.; LANGERMAN, L.; ZAKOWSKI, M.; TURNDORF, H. Prolonged Analgesia with Liposomal Bupivacaine in a Mouse Model. *Regional Anesthesia*, v.19, p. 264–269, 1994.

GRANT, G. J. Liposomal Ropivacaine: Evaluation in a Mouse Model. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, v. 24, p. 3, 1999.

GRANT, G. J.; BANSINATH, M. Liposomal Delivery Systems for Local Anesthetics. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. v. 26, p. 61–63, 2001.

GRANT, G. J.; BARENHOLZ, Y.; BOLOTIN, E. M.; BANSINATH, M.; TURNDORF, H.; PISKOUN, B.; DAIDSON, E. M. A. Novel Liposomal Bupivacaine Formulation to Produce Ultralong-acting. *Analgesia and Anesthesiology*, v. 101, p. 133–137, 2004.

GRIMM, W; THOME, K. *Stability Testing on Drug Products*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1987.

GREKIN, R. C.; AULETTA, M. J. Local Anesthesia in Dermatology Surgery. *Journal American Academy Dermatology*, v.19, p. 599-614, 1988.

HAAS D. A. Drugs in dentistry. In: *Compendium of pharmaceuticals and Specialties (CPS)*. 37° ed. Canadian Pharmaceutical Association, p. L26-L29, 2002.

HSIU-YING, Y.; PIN, S.; WEN-YUONG, H. Prolonged Local Anesthetic Effect of Bupivacaine Liposomes in Rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.176, p. 133-136, 1998.

KANG, L.; JUN, H. W.; MANI, N. Preparation and Characterization of Two Phase Melt Systems of Lidocaine. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 222, p. 35-44, 2001.

KOLESNIKOV Y. A.; CHERESHNEV I.; PASTERNAK G. W. Analgesic Synergy between Topical Lidocaine and Topical Opioids. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 295, p. 546-551, 2000.

KOLESNIKOV, Y.; CRISTES. M.; OKSMAN, G., TOROSJAN, A., WILSON, R. Evaluation of the Tail Formalin Test in Mice as a New Model to Assess Local Analgesic Effects. *Brain Research*, v. 1029, p. 217-223, 2004.

KOYA, J.; ORENGO, I. Application of Local Anesthetics in Dermatologic Surgery. *Dermatologic Surgery*, v. 28, p. 143-148, 2002.

KREILGAARD, M.; PEDERSEN, E. J.; JAROSZEWSKI, J. W. NMR Characterization and Transdermal Drug Delivery Potential of Microemulsion systems. *Journal of Controlled Release*. v. 69, p. 421-433, 2000.

KRIWET, K.; MÜLLER-GOYMANN, C. Diclofenac Release from Phospholipid Drug Systems and Permeation Through Excised Human Stratum Corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 125, p. 231-243, 1995.

LAVON, L.; KOST, J. Ultrasound and Transdermal Drug Delivery. *Drug Discovery Today*, v. 9, p. 670-676, 2004.

LEMA, M. J., Local Anesthetic Agent. In: SMITH, C.M.; REYNARD, A. M. *Essentials of Pharmacology*. 1° ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, cap. 12, p. 111-118, 1995.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 85, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M. Cyclodextrins in Topical Formulations: Theory and Practice. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 225, p. 15-30; 2001.

MALAMED, S. F., Ação Clínica de Agentes Específicos. In: *Manual de anestesia local*. 4° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 4, p. 44 – 65, 2001.

MINNEMAN, K. P.; BRODY, T. M. Anestésicos Locais. In: Brody, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. *Farmacologia Humana: da molécula à clínica*. 2. ed., Rio de Janeiro, p. 369-374, 1997.

MITRAGOTRI, S.; EDWARDS, D., BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. A Mechanistic Study of Ultrasonically Enhanced Transdermal Delivery. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 84, p. 697-706, 1995.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 89, p. 614-626, 2000.

MÜLLER, M.; MACKEBEN, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical Characterization of Liposomes with Encapsulated Local Anesthetics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, p. 139–48, 2004.

NISHIHATA, T.; KAMADA, T.A.; SAKAI, K.; TAKAHASHI, K.; MATSUMOTO, K.; SHINOZAKI, K.; TABATA, Y.; KEIGAMI, M.; MIYAGI, T.; TATSUMI, N. Percutaneous Absorption of Diclofenac in Rats and Humans: Aqueous Gel

- Formulation. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 46, p. 1-7, 1998.
- OKANO, T.; HAGA, M.; WATANABE, Y.; YOSHIMURA, K. Duration of the Local Anesthetic Action of Dibucaine by Liposomes and its Mechanism. *Yakugaku Zasshi*, v. 100, p. 1097-1103, 1980 (Abstract).
- PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. *Tecnologia Farmacêutica*. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 1995.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTEER, J. M. *Farmacologia*. 4° ed. Guanabara Rio de Janeiro, Koogam, 1999, p. 532-41.
- REYNOLDS, J.E.F. *Martindale The Extra Pharmacopoeia*, 31° ed. The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London, 1996, p. 1324–1327.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e Estabilidade Físico-química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para a Administração de Fármacos, *Química Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003.
- SCHROEDER, I. Z.; FRANKE, P.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C. Development and Characterization of Film Forming Polymeric Solutions for Skin Drug Delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. IN PRESS, 2006.
- SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New Microemulsion Vehicle Facilitates Percutaneous Penetration in Vitro and Cutaneous Drug Bioavailability In Vivo. *Journal of Controlled Release*, v. 95, p. 173–83, 2004.
- STORM, G.; CROMMELIN, D. J. A. Liposomes: quo vadis? *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 1, n. 1, 1998.
- VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and Their Uses: a review. *Process Biochemistry*, v. 39, p.1033-1046, 2004.
- VAZ, Z. R.; CECHINEL, V. F. ; YUNES, R. A. ; CALIXTO, J. B. Antinociceptive Action of 2-(4-Bromobenzoyl)-3-Methyl-4,6-Dimethoxy Benzofuran, a Novel Xanthoxyline Derivative on Chemical and Thermal Models of Nociception in Mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 278, p.304-312, 1996.
- YAGIELA, J.A. Local anesthetics. In: DIONE R.A., PHERO, J.C., BECKER, D.E. editors. Pain and Anxiety Control in Dentistry. Philadelphia: W.B. Saunder;. 2002, p. 78-96.
- YOUNG, S.; SCHWARTZ, R.; SHERIDAN, M. EMLA® Cream as a Topical Anesthetic Before Office Phlebotomy in Children. *Southern Medical Journal*, v.89, p. 1184-1187, 1996.



ZATZ, J. L. Aumento da Penetração Cutânea. *Cosmeics & Toiletries*, v. 7, p. 52-58, 1995

## **8. ANEXOS**



---

---

## 8.1 Validações das Metodologias Analíticas para Quantificação dos Fármacos

A validação analítica objetiva demonstrar a adequabilidade e confiabilidade de um método ou processo para a análise pretendida (BRASIL, 2003). Tal procedimento deve apresentar especificidade, linearidade, precisão e exatidão adequadas à análise. No presente trabalho, estes parâmetros foram avaliados:

- ❖ Linearidade: avaliaram-se cinco níveis de concentração através de três curvas padrão preparadas e analisadas no mesmo dia. Determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação.
- ❖ Exatidão: determinou-se através do teste de recuperação de uma quantidade de substância ativa de referência adicionada a amostra. Os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação.
- ❖ Precisão: determinou-se através do desvio padrão relativo (DPR) a precisão intermediária e a repetibilidade. A repetibilidade foi realizada através da análise de oito amostras contendo a mesma concentração de fármacos no mesmo dia. Para a determinação da precisão intermediária avaliaram-se seis amostras de mesma concentração de fármaco durante três dias consecutivos. Todas as determinações foram submetidas às mesmas condições experimentais.
- ❖ Especificidade: determinou-se através da análise de formulações sem a presença da(s) substância(s) ativa(s)

### Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à habilidade em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de substância ativa em exame, em um determinado intervalo de concentração (BRASIL, 2003; USP 28, 2005).

Avaliou-se a linearidade do método para quantificação dos ativos A (Tabela A1) e B (Tabela A2). Os valores obtidos na avaliação da linearidade demonstram uma correlação linear ente as áreas dos picos e as concentrações de fármacos, no intervalo estudado de 2,5 a 30 µg/mL. O coeficiente de correlação obtido para o fármaco A foi de 0,9994 e o fármaco B de 0,9999. Sendo assim esses resultados demonstram uma boa correlação entre os valores experimentais obtidos.

Tabela A1. Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão do fármaco A, por CLAE.

Curva padrão do fármaco A					
Concentração (µg/mL)	Áreas absolutas*			Média ± d.p	DPR %
2,5	394340	377371	372277	386329 ± 8175	2,12
5,0	805554	824827	807830	812737 ± 10694	1,32
10,0	1692741	1793059	1786036	1777278 ± 20620	1,16
15,0	2647498	2676963	2615573	2646678 ± 28828	1,09
20,0	3670250	3650750	3656265	3659088 ± 34862	0,95
25,0	4486300	4537676	4515058	4513011 ± 27412	0,61
30,0	5319182	5343990	5342450	5335207 ± 34721	0,73

\*cada valor representa a média de três determinações  
DPR %: desvio padrão relativo

Através da análise de variância foi possível obter um valor de F para a regressão de 14059,74, enquanto o valor de F tabelado é de 2,65 ( $p < 0,05$ ) para o fármaco A. Tais resultados demonstram a existência de regressão linear entre as variáveis relacionadas.

Tabela A2. Valores experimentais obtidos na determinação da curva padrão do fármaco B, por CLAE.

Curva padrão do fármaco B					
Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Áreas absolutas*			Média $\pm$ d.p	DPR %
2,5	379379	365995	374444	373271 $\pm$ 6642	1,78
5,0	834054	833839	844025	834387 $\pm$ 9373	1,12
10,0	1718425	1777833	1744417	1746967 $\pm$ 29843	1,71
15,0	2622494	2637913	2630549	2630319 $\pm$ 7772	0,30
20,0	3626150	3593282	3564967	3601388 $\pm$ 19697	0,55
25,0	4434680	44146944	448118	4474738 $\pm$ 32253	0,72
30,0	5462371	5351735	5528491	5440066 $\pm$ 73117	1,34

\*cada valor representa a média de três determinações  
DPR %: desvio padrão relativo

Através da análise de variância foi possível obter um valor de F para a regressão de 11373,50, enquanto o valor de F tabelado é de 2,65 ( $p < 0,05$ ) para o fármaco B. Tais resultados demonstram a existência de regressão linear entre as variáveis relacionadas.

A representação da curva padrão e a equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados estão ilustradas nas Figuras A1 e A2.

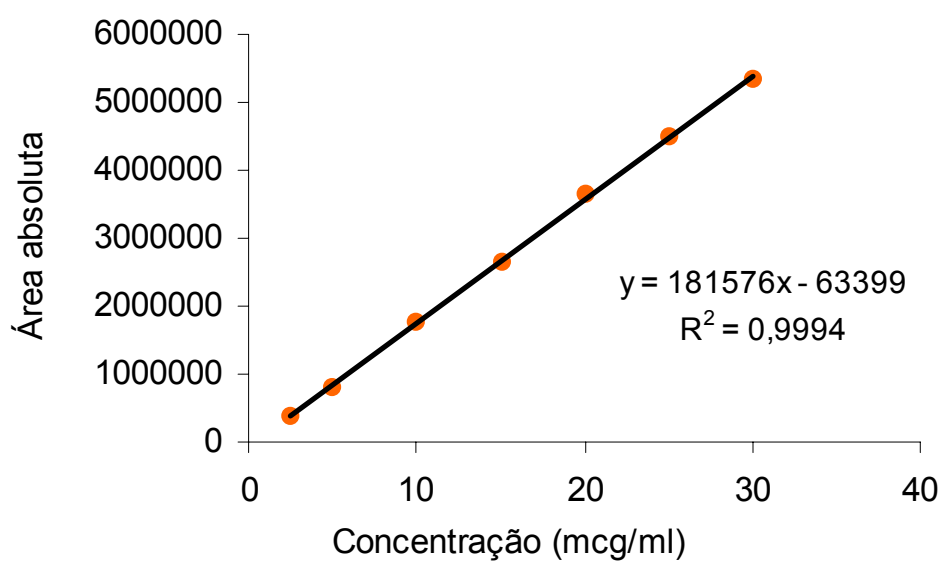


Figura A1. Representação gráfica da curva padrão média do fármaco A, obtida por CLAE.

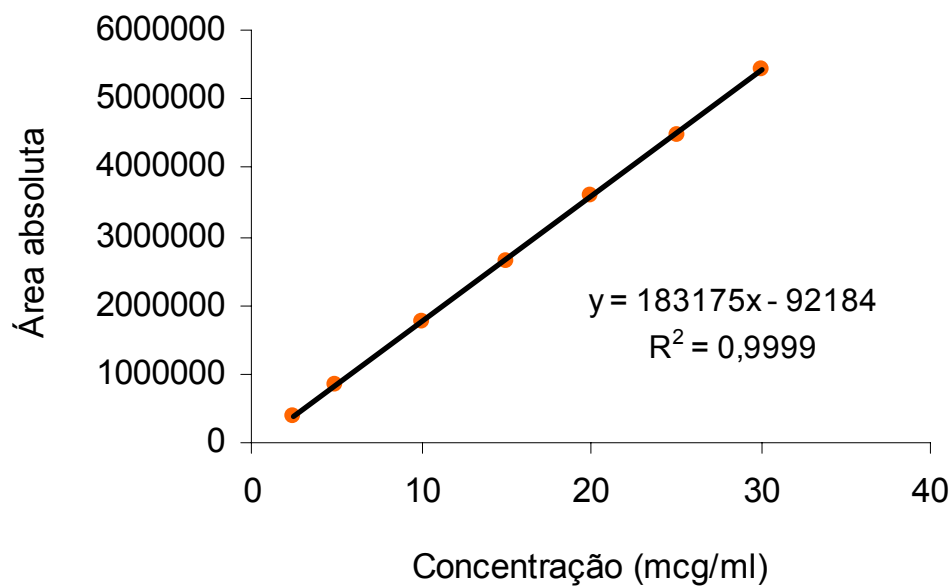


Figura A2. Representação gráfica da curva padrão média do fármaco A, obtida por CLAE.

*Precisão*

A precisão de um método avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra que pode ser considerada em três níveis: repetibilidade (intradia), precisão intermediária (interdia) e reprodutibilidade. A precisão do método analítico foi expressa como desvio padrão relativo de uma série de medidas. Nesse trabalho avaliou-se a repetibilidade e a precisão intermediária do método analítico empregado CLAE para a suspensão contendo as nanoestruturas (Tabela A3 e A4), assim como para as formulações semi-sólidas contendo diferentes componentes (Tabela A5, A6, A7 e A8) (BRASIL, 2003, USP 28, 2005).

Tabela A3. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária e repetibilidade do fármaco A.

Precisão intermediária e repetibilidade para o fármaco A			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Fármaco A mg /mL	15,30	15,29	15,27
Teor (%)	102	102	102
DPR intra-dia (%)	1,7	0,34	1,87
Média geral %	102		
DPR % entre dias	1,30		

Tabela A4. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária e repetibilidade do fármaco B.

Precisão intermediária e repetibilidade para o fármaco B			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Fármaco B mg /mL	15,27	15,04	15,08
Teor (%)	102	100	101
DPR intra-dia (%)	1,58	1,99	1,56
Média geral %	101		
DPR % entre dias	1,71		

Tabela A5. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária e repetibilidade do fármaco A presente na formulação 24.

Precisão intermediária e repetibilidade para o fármaco A presente na formulação 24			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Fármaco A mg /mL	15,28	15,70	15,60
Teor (%)	102	105	104
DPR intra-dia (%)	1,46	1,45	2,01
Média geral %	103,5		
DPR % entre dias	0,74		

Tabela A6. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária e repetibilidade do o fármaco B presente na formulação 24.

Precisão intermediária e repetibilidade para o fármaco B presente na formulação 24			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Fármaco B mg/mL	15,6	15,2	15,3
Teor (%)	104,3	101,6	102
DPR intra-dia (%)	1,71	1,89	1,56
Média geral %	102,7		
DPR % entre dias	0,66		



Tabela A7. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária e repetibilidade do fármaco A presente na formulação 4.

Precisão intermediária e repetibilidade para o fármaco A presente na formulação 4			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Fármaco A mg /mL	14,6	14,6	14,5
Teor (%)	96,8	96,8	97,3
DPR intra-dia (%)	1,88	1,95	1,73
Média geral %	97,13		
DPR % entre dias	1,34		

Tabela A8. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária e repetibilidade do fármaco B presente na formulação 4.

Precisão intermediária e repetibilidade para o fármaco B presente na formulação 4			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Fármaco B mg/mL	15,03	15,4	15,24
Teor (%)	100,2	102,7	101,6
DPR intra-dia (%)	2,04	1,7	1,32
Média geral %	101,5		
DPR % entre dias	1,30		

Os resultados obtidos demonstram adequabilidade do método analítico no que tange a precisão para a o fármaco A quanto para o fármaco B na solução de acetonitrila e nas formulações de semi-sólidos, uma vez que o desvio padrão relativo (DPR %) foi abaixo de 2,0 % para todas as análises.

*Exatidão*

A exatidão de um método analítico prevê a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao verdadeiro valor (BRASIL, 2003, USP 28, 2005).

Os resultados obtidos nos testes de recuperação por CLAE dos fármacos em questão tanto em acetonitrila, quanto nos semi-sólidos estão apresentados nas Tabelas A9, A10, A11, A12, A13 e A14.

Tabela A9. Valores experimentais do teste de recuperação para o fármaco A em acetonitrila.

Quantidade de SQR		% Recuperação	DPR %
Adicionada (µg/mL)	Recuperada (µg/mL)		
3,0	2,95	98,2	1,20
6,0	5,97	99,54	
9,0	9,05	100,6	

\*cada valor representa a média de três determinações  
DPR %: desvio padrão relativo

Tabela A10. Valores experimentais do teste de recuperação para o fármaco B em acetonitrila.

Quantidade de SQR		% Recuperação	DPR %
Adicionada (µg/mL)	Recuperada (µg/mL)		
3,0	2,96	98,5	1,10
6,0	6,01	100,3	
9,0	9,05	100,6	

\*cada valor representa a média de três determinações  
DPR %: desvio padrão relativo

Tabela A11. Valores experimentais do teste de recuperação para o fármaco A presente no semi-sólido 24.

Quantidade de SQR		% Recuperação	DPR %
Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
3,0	3,21	107	2,05
6,0	6,48	108	
9,0	9,27	103	

\*cada valor representa a média de três determinações  
DPR %: desvio padrão relativo

Tabela A12. Valores experimentais do teste de recuperação para o fármaco B presente no semi-sólido 24.

Quantidade de SQR		% Recuperação	DPR %
Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
3,0	3,21	107	2,07
6,0	6,54	109	
9,0	9,36	104	

\*cada valor representa a média de três determinações  
DPR %: desvio padrão relativo

Tabela A13. Valores experimentais do teste de recuperação para o fármaco A presente no semi-sólido 4.

Quantidade de SQR		% Recuperação	DPR %
Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )		
3,0	3,0	100	1,19
6,0	5,88	98	
9,0	9,09	101	

\*cada valor representa a média de três determinações  
DPR %: desvio padrão relativo

Tabela A14. Valores experimentais do teste de recuperação para o fármaco B presente no semi-sólido 4.

Quantidade de SQR		% Recuperação	DPR %
Adicionada (µg/mL)	Recuperada (µg/mL)		
3,0	3,03	101	0,92
6,0	6,00	100	
9,0	9,18	102	

\*cada valor representa a média de três determinações  
DPR %: desvio padrão relativo

Os resultados obtidos demonstram uma exatidão satisfatória para a metodologia analítica empregada. A recuperação média em solução de acetonitrila foi de 98,8 % e 99,8 %, para a formulação 24, de 106 % e 106 % e, para a formulação 4, foi de 99,7 % e 101 % para os o fármaco A e B, respectivamente.

### *Especificidade*

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

Avaliou-se a especificidade através de diluições dos semi-sólidos sem a presença do fármaco, portanto avaliou-se uma possível interferência dos componentes da matriz sobre o método analítico.

Os cromatogramas apresentados na Figura A3 e A4 demonstram a especificidade do método para a quantificação dos o fármaco A e B, em semi-sólidos, de tal forma que não há interferência dos excipientes presentes nas formulações.

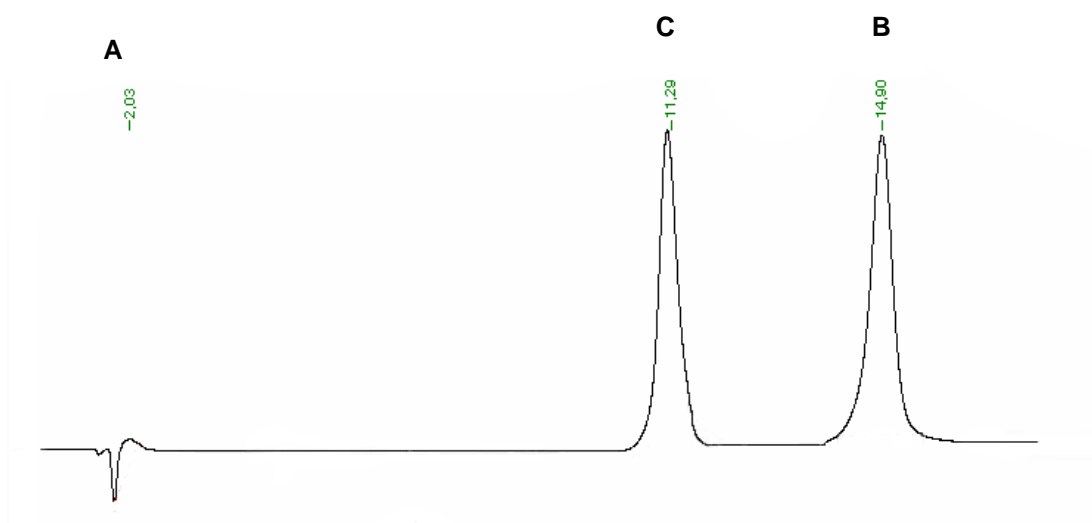


Figura A3. Perfil cromatográfico do fármaco A (B) e do fármaco B (C) obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde A: solvente.

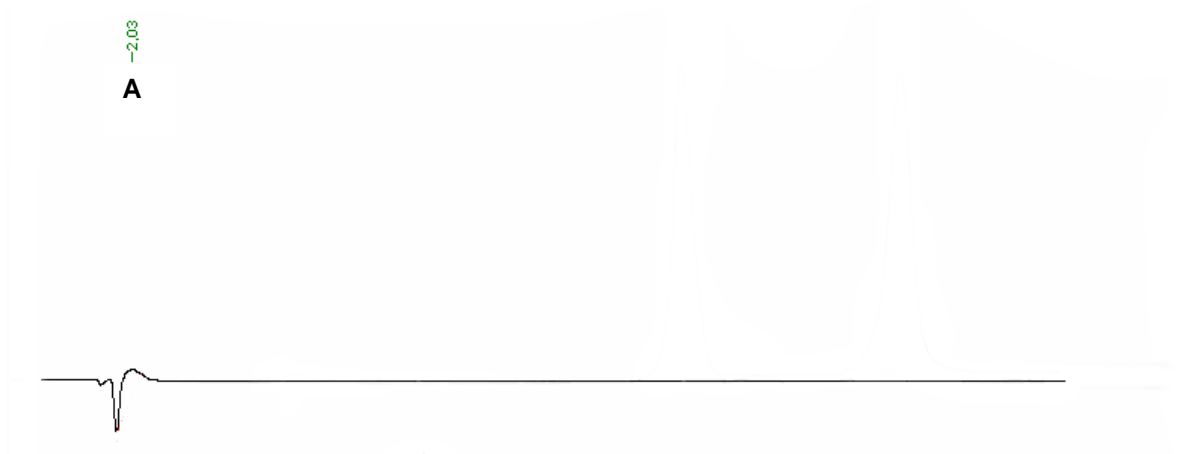


Figura A4. Cromatograma referente ao estudo de especificidade do método, onde A: solvente.