

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

DANIELA PAMELA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA BUTAMBEN/2-HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA/LIPOSSOMA FURTIVO E SEU EFEITO NA
EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2017

DANIELA PAMELA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA BUTAMBEN/2-HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA/LIPOSSOMA FURTIVO E SEU EFEITO NA
EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do Curso 2 de Licenciatura em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça

LONDRINA

2017

Espaço destinado a elaboração da ficha catalográfica sob responsabilidade exclusiva do Departamento de Biblioteca da UTFPR.

TERMO DE APROVAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA BUTAMBEN/2-HIDROXIPROPIL- β - CICLODEXTRINA/LIPOSSOMA FURTIVO E SEU EFEITO NA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

DANIELA PAMELA DOS SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no dia 08 dezembro de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de LICENCIADA EM QUÍMICA, pelo Curso de Graduação em Licenciatura em Química, Câmpus Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A discente foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça (UTFPR)

Orientador

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana (UTFPR)

Membro Titular

Profa. Dra. Vanessa Kienen (UTFPR)

Membro Titular

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me permitido a força para enfrentar as dificuldades decorrentes da graduação, por me conceder com saúde e por ouvir-me nos momentos difíceis.

Aos meus pais, irmão e namorado pelo amor e apoio incondicional, que nos momentos de desespero sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente, e que somos capazes de conseguir tudo que sonhamos.

Ao meu orientador Professor Dr. Luis Fernando Cabeça pela sua dedicação, paciência e oportunidade de trabalharmos juntos. Obrigado pelos momentos de aprendizado que vão além da conclusão desse trabalho.

Aos meus amigos de graduação, Ariane Beltrame, Gean Zapateiro, Julia Rossieri, Marlon Pegoraro e Thamires Silva, agradeço pela convivência, conselhos e apoio nos momentos em que mais precisei. Agradeço também aos participantes da Iniciação científica que me ajudaram em vários momentos da elaboração deste trabalho.

Aos professores que contribuíram para minha formação pessoal e profissional, sem dúvida vocês foram importantes para meu crescimento.

Agradeço aos pesquisadores e professores da banca examinadora pela atenção e contribuição dedicadas a este estudo.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, obrigado!

EPÍGRAGE

“Onde está a felicidade? No amor, ou na indiferença? Na obediência, ou no poder? No orgulho, ou na humildade? Na investigação, ou na fé? Na celebridade, ou no esquecimento? Na nudez, ou na prosperidade? Na ambição, ou no sacrifício? A meu ver, a felicidade está na doçura do bem, distribuído sem ideia de remuneração. Ou, por outra, sob uma fórmula mais precisa, a nossa felicidade consiste no sentimento da felicidade alheia, generosamente criada por um ato nosso”.

Rui Barbosa

RESUMO

SANTOS, Daniela Pamela dos. **Caracterização do sistema Butamben/2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina/Lipossoma furtivo e seu efeito na eficiência de encapsulação.** 2017. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Licenciatura em Química, Departamento Acadêmico de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR. Londrina, 2017.

O sistema de liberação controlada de fármacos é uma área de grande desenvolvimento, que abrange inúmeras tecnologias com o intuito de favorecer a biodisponibilidade dos produtos farmacológicos, inclusive dos anestésicos locais (AL). O sistema de liberação controlada de droga (drug delivery system) quando comparado com os sistemas convencionais de transporte e liberação de fármacos, demonstra inúmeras vantagens, principalmente a de liberar o princípio ativo na corrente sanguínea de forma constante por um período de tempo superior aos sistemas convencionais, resultando em uma maior eficiência terapêutica. Para que o processo de liberação de fármacos seja bem sucedido, a eficiência de encapsulação (EE) deve ser avaliada, assim as técnicas UV-Vis e CL foram escolhidas para monitorar a eficiência de encapsulação e a constante de associação (K_a) de complexos de inclusão butamben/HP- β -CD, butamben/lipossomas furtivos e butamben / HP- β -CD / lipossomas furtivos. Os valores de EE e K_a foram semelhantes para ambas as técnicas.

Palavras-chave: Drug delivery. Butamben. Ciclodextrinas. Lipossomas furtivos. CLAE.

ABSTRACT

SANTOS, Daniela Pamela dos. **Characterization of the Butamben/2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin / Furtive Liposome system and its effect on encapsulation efficiency.** 2017. 58 f. Final Paper (Teaching Certificate in Chemistry). Federal University of Technology – Paraná. Londrina, Paraná.

The drug delivery systems is an area exhibit a great development that cover many technologies to promote the bioavailability of pharmacological products, including local anesthetics (LA).The drug delivery system when compared with conventional systems of free dose of drugs has many advantages, mainly to release process of active principle in bloodstream constantly for longer period of time, resulting in greater therapeutic efficiency. For the drug delivery process to be successful, the encapsulation efficiency (EE) should be evaluated as well as the methods of analysis. The UV-Vis and LC techniques were choose to monitor the encapsulation efficient and associated constant (AC) of build complexes butamben/HP- β -CD, butamben/furtives liposomes and butamben/HP- β -CD/furtive liposomes. The dates of EE and AC were similar for both techniques.

Palavras-chave: Drug delivery. Butamben. Cyclodextrins. Furtives Liposomes furtivos. LC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos convencionais de multidose (a) e sistema de liberação controlada (b), sendo A a administração do fármaco.....	18
Figura 2- Características estruturais do lipossoma.....	19
Figura 3 - Representação 3D das moléculas de fosfolipídeos que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa.....	20
Figura 4 - Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas: Vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV), lipossomas multivesiculares (MVL), vesículas oligolamelares pequenas (SOV), vesículas oligolamelares grandes (LOV) e vesículas oligolamelares gigantes (GOV).	20
Figura 5 - Mini extrusor	21
Figura 6 - Lipossoma modificado: a) Lipossoma convencional; b) lipossoma furtivo.....	22
Figura 7 - Representação das superfícies da ciclodextrina.....	23
Figura 8 - Principais ciclodextrinas naturais: α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrinas (β -CD) e γ -ciclodextrinas (γ -CD).	24
Figura 9 - Molécula de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.	25
Figura 10 - Estrutura química do anestésico local Butamben.	26
Figura 11 - Cromatograma de absorção da solução de BTB (0,87 mM). Coluna C18 (150 x 4,6 mm, partícula de 5 μ m; fase móvel MetOH:H ₂ O a 30°C com λ =285 nm)	33
Figura 12- Curva de calibração de BTB pela técnica de CL	34

Figura 13 - Relação de absorção do BTB pela concentração de ciclodextrina.....	35
Figura 14 – Concentração de BTB por concentração de HP-β-CD.....	36
Figura 15 – Espectro de UV-vis para determinação do S0 do fármaco BTB.....	38
Figura 16 – Absorbância do BTB versus comprimento de onda	39
Figura 17 – Curva de calibração do BTB por espectrofotometria UV-vis	40
Figura 18 – Relação de absorção do BTB ela concentração de ciclodextrina	41
Figura 19 – Curva de solubilidade do BTB no complexo binário BTB/ HP-β-CD	42
Figura 20 – Cromatograma de absorção do complexo binário de BTB/LF. Coluna C18 (150 x 4,6 nm), com partícula de 5 μm; fase móvel MetOH:H ₂ O a 30°C com λ=285 nm	49
Figura 21 – Espectro de absorção do complexo binário BTB/ LF	50
Figura 22 – Espectro de absorção do complexo ternário BTB/ HP-β-CD/LF	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados utilizados para curva de calibração do BTB	37
Tabela 2 - Relação de BTB encapsulado variando a concentração de ciclodextrina: dados experimentais e estimados	39
Tabela 3 – Dados utilizados para curva de calibração do BTB por UV-vis	44
Tabela 4 – Relação de BTB encapsulado variando a concentração de Ciclodextrina	46

LISTA DE ABREVIATURAS

DSPE-PEG-2000	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolaminaN[metoxi(polietilenoglicol)]-2000
HP- β -CD	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
α -CD	α -ciclodextrinas
β -CD	β -ciclodextrinas
γ -CD	γ -ciclodextrinas
CD	Ciclodextrina
CHCl ₃	Clorofórmio
EE	Eficiência da encapsulação
EPC	Fosfatidilcolina de ovo
LF	Lipossoma furtivo
PEG	Polietilenoglicóis
BTB	Butamben
MLV	Vesícula multilamelar
MUV	Vesícula multiviscular
GUV	Vesícula unilamelar gigante
LUV	Vesícula unilamelar grande
SUV	Vesícula unilamelar pequena
Ka	Constante de associação
CL	Cromatografia líquida
UV-Vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	JUSTIFICATIVA	14
4	REFERENCIAL TEÓRICO	14
4.1	SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	14
4.2	LIPOSSOMAS FURTIVOS	16
4.3	CICLODEXTRINAS	20
4.4	ANESTÉSICOS LOCAIS NA FORMAÇÃO DE COMPLEXO	23
4.5	ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis	25
4.6	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (CL)	26
5	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1	TIPO DE PESQUISA	27
5.2	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	27
5.3	MÉTODOS	27
5.4.1	Preparação da solução BTB para curva de calibração	27
5.4.2	Preparação soluções de BTB para determinação da solubilidade máxima (S_0) em tampão fosfato de sódio pH 7,4	28
5.4.3	Preparação do complexo binário BTB/HP- β -CD	28
5.4.4	Preparação do complexo binário BTB/LF	28
5.4.5	Preparação do complexo ternário BTB/ HP- β -CD/LF	29
5.4.6	Determinação da eficiência de encapsulação	29
5.3.3	Determinação da Eficiência de Encapsulação do complexo BTB/LF e BTB/HP β CD/LF	30
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
6.1	ANÁLISE DO COMPLEXO BINÁRIO HP-B-CD/BTB	30
6.1.1	Análise por CL	31
6.1.2	Análise por espectrofotometria UV-Vis	36
6.2	ANÁLISE DOS COMPLEXOS FORMADOS COM LF: BTB/LF E BTB/HP-B -CD/LF .	43
6.2.1	Análise por CLAE	43
6.2.2	Análise por espectrofotometria UV-vis	44
7	CONCLUSÃO	47

1 INTRODUÇÃO

Há tempos aumenta-se o interesse em relação ao estudo do comportamento farmacocinético e farmacodinâmico de novos compostos ativos ou melhorias dos já existentes, com o intuito de aumentar o tempo de permanência do agente terapêutico na circulação, proporcionar maior solubilidade, e diminuir os efeitos colaterais intrínsecos às doses elevadas de fármacos em tratamentos de diversas doenças.

Com isso, surge na década de 1970 o conceito de “drug delivery system” (sistema de liberação de fármacos), em que os objetivos são a distribuição direcionada de quantidades apropriadas do fármaco aos locais desejáveis (tais como tumores, tecidos doentes, etc.), enquanto se minimiza os efeitos colaterais indesejados dos medicamentos sobre outros tecidos (TRAN et al., 2009). Para alcançar tais objetivos, é notório a utilização de ciclodextrinas e lipossomas como moléculas hospedeiras, cuja a principal função dessas micro/nanopartículas é encapsular o fármaco de interesse, impedindo uma rápida liberação do organismo.

Nesse aspecto, a realização de estudos sobre o uso dos sistemas de liberação controlada, juntamente com o encapsulamento de princípios ativos (medicamentos, vacinas, perfumes, corantes, etc.) dentro de moléculas hospedeiras têm atraído muita atenção das áreas da química, materiais, medicina, biologia, farmacologia e da nanotecnologia (ZUCKER, et al., 2009; YANG, et al., 2013).

Na literatura são encontrados diversos exemplos de sistemas de liberação controlada, como por exemplo as ciclodextrinas, o calixarenos (LIU, et al., 2004), lipossomas (BATISTA, et al., 2007), entre outros. O sistema que tem contribuído com a pesquisa envolvendo a liberação controlada de fármacos é a utilização de lipossomas com superfície de membrana modificada pela inclusão de polímeros biocompatíveis inertes como o PEG (polietilenoglicol), o qual cria uma barreira inerte e/ou uma estrutura aquosa ao redor dos lipossomas, protegendo-o contra as proteínas plasmáticas do corpo. Estes lipossomas de longo tempo de circulação, são também conhecidos como lipossomas furtivos (LF) (BOERMAN, et al., 2000).

Quando os anestésicos locais, substâncias químicas que tem a função de bloquear reversivelmente a transmissão de estímulos nervosos ao local ao qual for aplicado, são encapsulados em um sistema lipossomal de LF, a liberação do princípio ativo ocorre de forma lenta, provocando um aumento no tempo da ação

terapêutica, a diminuição da toxicidade, e a redução do número de administração do fármaco (ARAÚJO, 2003).

Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho é estudar a eficiência de encapsulação do complexo binário formado entre o anestésico local butamben (BTB) e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) quando são encapsulados em lipossomas furtivos, formando um complexo ternário (BTB/ HP- β -CD/LF). Para tal objetivo serão realizados experimentos envolvendo as técnicas de UV-Vis e CL.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é preparar o sistema ternário butamben (BTB), 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e lipossomas furtivos (LF), e analisar a eficiência de encapsulação do fármaco nos complexos utilizando como ferramenta básica a espectrofotometria UV-Vis e CL.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Preparar a estrutura vesicular dos lipossomas com membrana modificada (lipossomas furtivos) através do uso de lipídios de fosfatidilcolina de ovo (EPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[metoxi(poli(etileno)glicol)]-2000 (DSPE-PEG-2000) e colesterol;
- ✓ Preparar o complexo de inclusão do anestésico local butamben em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, (BTB/HP- β -CD);
- ✓ Preparar o complexo de sistema ternário entre os lipossomas furtivos e o complexo (BTB/HP- β -CD), ([BTB/HP- β -CD]/LF);
- ✓ Comparar os valores de eficiência de encapsulação nos complexos, bem como a fase solúvel do complexo e a constante de associação obtidos por UV-Vis e CL.

3 JUSTIFICATIVA

Diante do grande interesse da aplicação de materiais nanoestruturados em diversas áreas científicas e tecnológicas, nota-se que a utilização de nanopartículas em sistemas em liberação controlada de fármacos envolve pesquisas desde o século XX, e caracteriza-se como um vasto campo de estudos que promove novas estratégias para o transporte mais eficiente dos agentes terapêuticos (ALLEN; CULLIS, 2013; AZEVEDO, 2005). As ciclodextrinas e os lipossomas são exemplos de micro/nanopartículas utilizadas nos sistemas de liberação controlada de fármacos, e apresentam resultados satisfatórios quando envolvem o encapsulamento de anestésicos locais (AL), geralmente moléculas de baixa massa molecular.

Quando comparado aos sistemas convencionais de administração de AL, o sistema de liberação controlada de fármacos oferece várias vantagens, principalmente a de manter a concentração do fármaco no nível terapêutico por um tempo prolongado, o que acarreta em uma diminuição dos efeitos colaterais, menor número de administração, e um direcionamento mais efetivo aos locais de ação do fármaco (HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006).

Dessa forma, para que o sistema de liberação controlada seja aplicado é de fundamental importância determinar parâmetros de eficiência de encapsulação bem como a escolha de técnicas para realizar essa caracterização.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Sistema de liberação controlada

Atualmente, as pesquisas na área farmacêutica têm dado enfoque aos sistemas de liberação de fármacos, em que os sistemas de administração convencionais, como spray, injeção e pílulas, veem apresentando desvantagens. Isso se deve ao fato de que logo que após a administração do fármaco, há a liberação de uma alta concentração de dosagem no sangue, que sofre logo em seguida um declínio na concentração conforme o tempo de ação do fármaco (ROSSI-BERGMANN, 2008; MOREIRA, 2013; RODRIGUES, 2012; LYRA et al., 2007; MACHADO; GNOATTO; KLÜPPEL, 2007). Além disso, somente uma fração

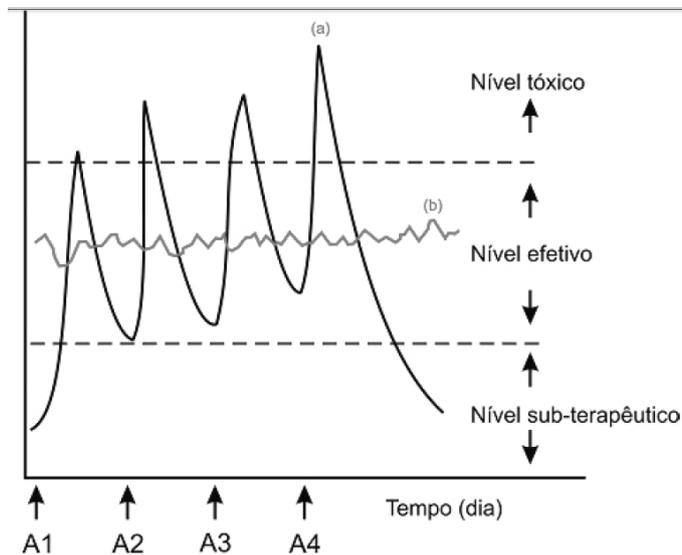
da dose atinge o tecido alvo, sendo o restante da dose distribuída a tecidos que não são de interesse terapêutico (AZEVEDO, 2005).

Diante desse fato, e com o objetivo de melhorar e prolongar o controle de administração dos fármacos, surge o conceito de “drugs delivery systems”, ou sistema de liberação controlada, que se caracteriza como um setor promissor da nanotecnologia. Nos sistemas de liberação controlada, ocorre basicamente a interação entre o fármaco com uma molécula carregadora, que segundo Santana, Martins e Alves (2008) as moléculas mais utilizadas pela indústria farmacêutica para a encapsulação de fármacos são as nanopartículas poliméricas, as ciclodextrinas e nanopartículas lipídicas, dendrímeros ou nanotubos de carbono (HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006; MACHADO; GNOATTO; KLÜPPEL, 2007).

Os primeiros testes para obter um sistema transportador de fármacos eficaz ocorreram no início do século XX, quando biomoléculas foram encapsuladas em vesículas de nylon e outros polímeros sintéticos. Porém, esse estudo não foi satisfatório, pois notou-se que os polímeros não biodegradáveis não eram eliminados pelo organismo, e acabavam sendo acumulados (AZEVEDO, 2005). Assim, a utilização eficaz de um sistema transportador de fármacos só ocorreu no ano de 1971, com Gregory Gregoriadis, onde ele estabeleceu o conceito de que lipossomas poderiam encapsular fármacos e ser utilizados como sistemas de administração dos mesmos. (ALLEN; CULLIS, 2013; AZEVEDO, 2005).

Dessa forma, objetivo principal dos sistemas de liberação controlada é manter um comportamento contrário dos sistemas convencionais de administração de fármacos, e para isso espera-se que a partir de uma única dosagem, a concentração do fármaco seja mantida constante por maior tempo, o que proporcionará um aumento na eficácia terapêutica e diminuição significativa da toxicidade (Figura 1) (LYRA, et al., 2007; HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006; AZEVEDO, 2005).

Figura 1 - Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos convencionais de multidosagem **(a)** e sistema de liberação controlada **(b)**, sendo **A** a administração do fármaco.



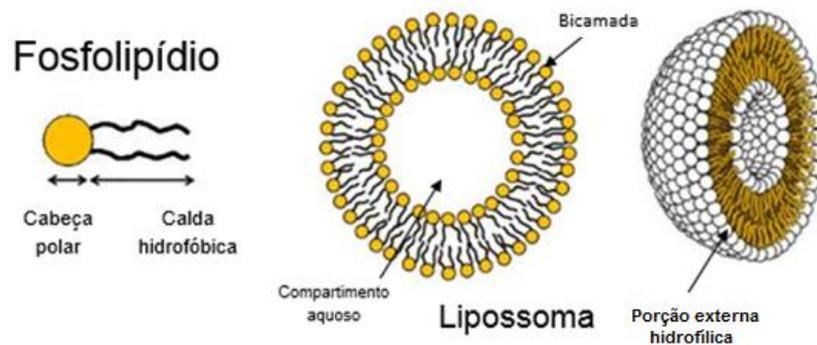
FONTE: (LYRA, et al., 2007)

4.2 Lipossomas furtivos

Em meados de 1965 Alec Bangham desenvolveu e caracterizou um sistema de vesículas fosfolipídicas que em soluções aquosas poderiam formar estruturas fechadas em bicamadas, ao qual foi dado o nome de lipossomas. Porém, os primeiros resultados foram um tanto negativos quanto à instabilidade físico-química, e biológica dos lipossomas, além da baixa eficiência na encapsulação de fármacos, que mais tarde foi melhor estudada (MACHADO; GNOATTO; KLÜPPEL, 2007).

Assim, lipossomas são vesículas esféricas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, onde as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana (Figura 2).

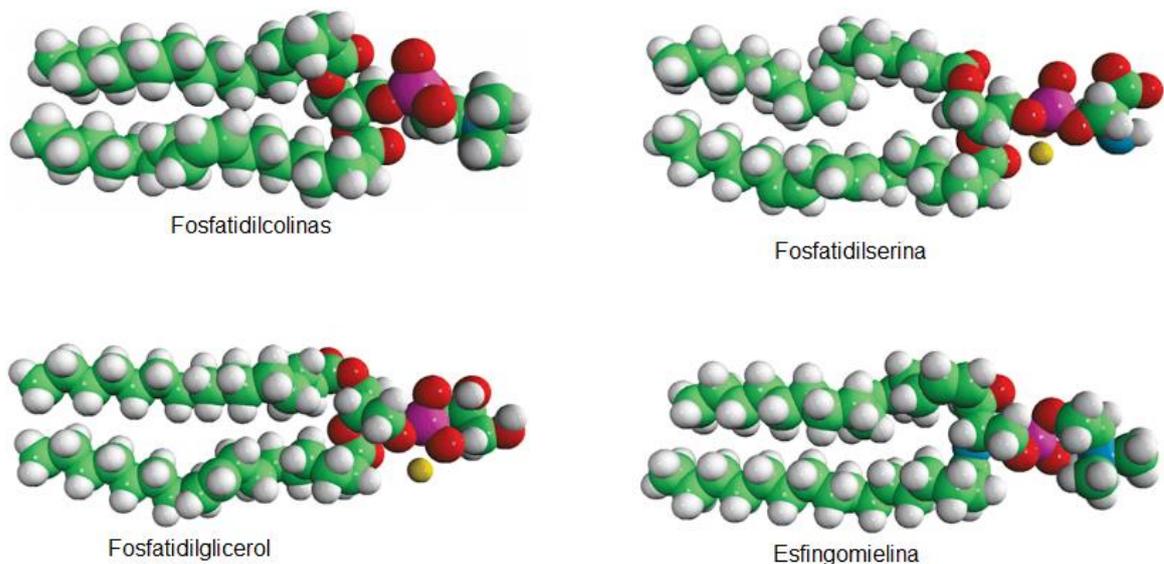
Figura 2 - Características estruturais do lipossoma



FONTE: (SKANDANI; ZEINELDIN, 2012).

Estas vesículas são constituídas basicamente por fosfolípidos de natureza natural ou sintética, onde os lípidos mais utilizados em suas formulações são os que apresentam uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline (Figura 3), que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa (BATISTA,2007). Mas por apresentarem grande estabilidade as variações de pH ou concentração do sal no meio, as fosfatidilcolinas acabam sendo a mais utilizada na formulação de lipossomas. (FRÉZARD et al., 2005).

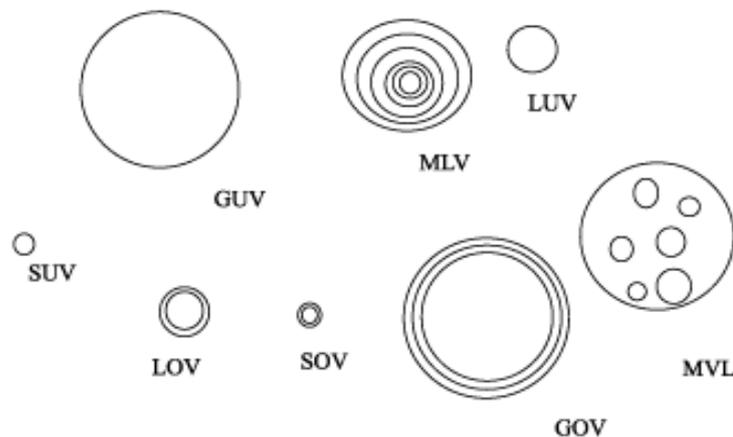
Figura 3 - Representação 3D das moléculas de fosfolípidos que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa



FONTE: (AVANT LIPIDS ,2017)

Os lipossomas podem ser classificados quanto suas vesículas (Figura 4), sendo então multilamelares (MLV), constituídas por várias bicamadas lipídicas, as espécies unilamelares pequenas ou SUV (diâmetro: 45 a 80 nm), vesículas unilamelares grandes ou LUV (diâmetro superior a 100 nm) e lipossomas ultivesiculares ou MVL que são subdivididos em pequenos, grandes e gigantes (SOV, LOV e GOV) (MACHADO; GNOATTO; KLÜPPEL, 2007).

Figura 4 - Representação esquemática dos vários tipos de lipossomas: Vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV), lipossomas multivesiculares (MVL), vesículas oligolamelares pequenas (SOV), vesículas oligolamelares grandes (LOV) e vesículas oligolamelares gigantes (GOV).



FONTE: (CABEÇA, 2009)

Para a preparação dos lipossomas, os componentes lipídicos são dissolvidos em um solvente que pode ser facilmente removido, como por exemplo o clorofórmio (CHCl_3), que após sua remoção total, obtém-se um filme lipídico bem fino que é hidratado com uma solução tampão ou água. Em seguida, a solução é submetida a vários ciclos de agitação, obtendo-se uma suspensão de MLV, que será utilizada para obter o lipossoma de interesse, passando então por mais um processo, como por exemplo, o LUV através do processo extrusão (MACHADO; GNOATTO; KLÜPPEL, 2007).

Para a extrusão, utiliza-se um extrusor com pressão a base de nitrogênio, onde a pressão é aplicada sobre os lipossomas MLV forçando-os através de filtros, que normalmente são de policarbonato, com diâmetros de poros adequados para o diâmetro de lipossoma desejado. Além disso, o processo de extrusão também pode ser realizado utilizando-se um mini-extrusor, como na Figura 5, onde a pressão

exercida pelo usuário no êmbolo da seringa, força a passagem das vesículas lipossômicas MLV de uma seringa para outra através de filtros com diâmetro desejado.

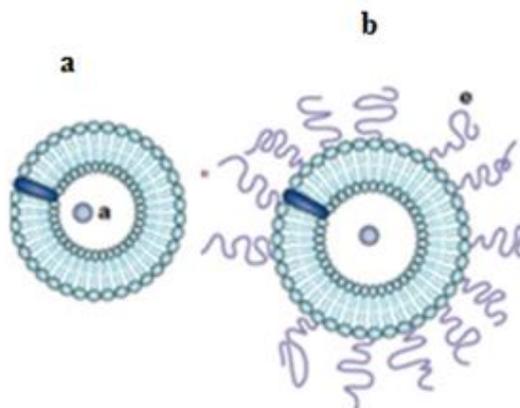
Figura 5 - Mini extrusor



FONTE: AVANTI LIPIDS (2017)

Entretanto, lipossomas apresentam também desvantagens como sistemas carreadores, como por exemplo, o curto tempo de meia vida na circulação sanguínea. Para amenizar esse problema foi desenvolvido uma nova geração de lipossomas que possuem superfície de membranas alterada pela inclusão de polímeros biocompatíveis inertes como o PEG (polietilenoglicol). Essa nova geração de lipossomas com PEG em sua formação cria uma barreira e/ou uma estrutura aquosa ao redor dos lipossomas, o que os protege contra as proteínas plasmáticas do corpo (MACHADO; GNOATTO; KLÜPPEL, 2007) aumentando seu tempo de permanência na circulação sanguínea (Figura 6).

Figura 6 - Lipossoma modificado: a) Lipossoma convencional; b) lipossoma furtivo



FONTE: Adaptado (SOUZA, 2013)

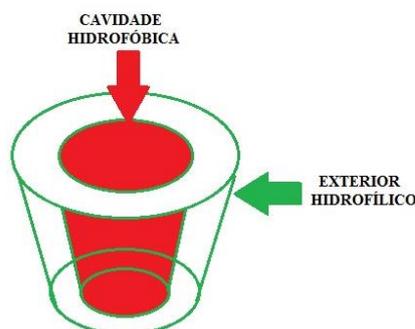
A utilização de transportadores lipossomais no ramo farmacêutico requer alto teor de estabilidade, devendo ser evitados problemas como perda do fármaco encapsulado, alterações estruturais, incluindo tamanho de partículas, e instabilidade química como reações entre lipídeos e fármacos encapsulados.

4.3 Ciclodextrinas

Em 1891 o cientista francês A. Villiers notou durante a fermentação do amido, a formação de uma substância cristalina, denominada por ele como de 'cellulosine', a qual foi profundamente estudada por Franz Schardinger no ano de 1903. A partir desta data, tem-se o descobrimento das macromoléculas ciclodextrinas (CDs), sendo isoladas por ele duas substâncias, como α -ciclodextrina e β -ciclodextrina. (CARVALHO, 2013)

As CDs são oligossacáridos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas α (1,4), que são obtidas a partir da degradação enzimática do amido. Geralmente sua estrutura em formato de cone cuja as duas extremidades são abertas, possui a face mais larga formada pelas hidroxilas secundárias (C₂ e C₃) e a face mais estreita formada pelas hidroxilas primárias (C₆) (TAKAHASHI, 2009; GUZZO, 2007; OLIVEIRA; SANTOS; COELHO, 2009). A Figura 7 apresenta o resultado dessa conformação, onde a superfície externa confere caráter hidrofílico, e a cavidade interna caráter hidrofóbico. Ou seja, as CDs são capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas. (CUNHA-FILHO; BARRETO-SÁ 2007; FRACETO et al., 2007; MACHADO et al., 2008; LYRA et al., 2010).

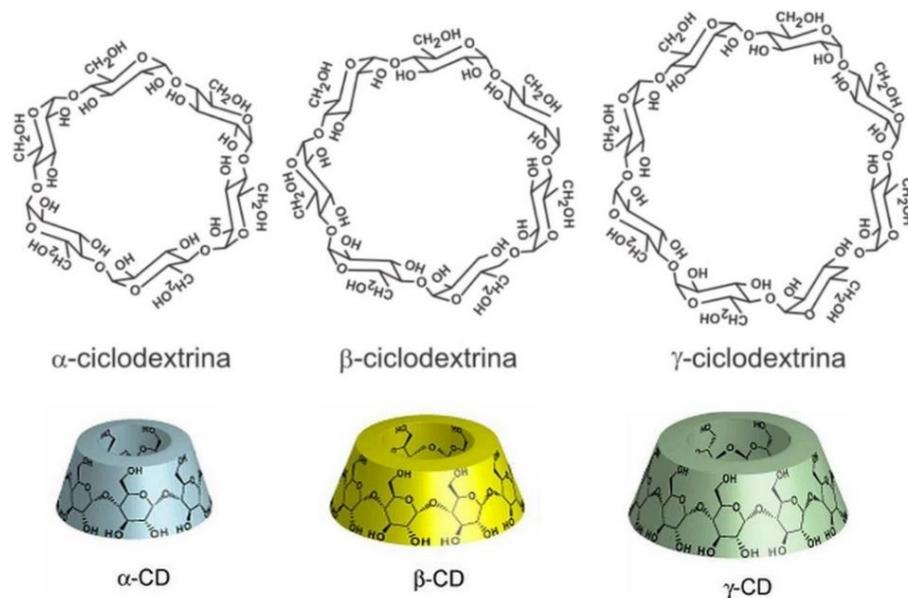
Figura 7 - Representação das superfícies da ciclodextrina



FONTE: Autoria própria

As três principais ciclodextrinas naturais são formadas por seis, sete ou oito unidades de D-(+)-glucopirranose, sendo denominadas de α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrinas (β -CD) e γ -ciclodextrinas (γ -CD) respectivamente (Figura 8). (BRITTO; NASCIMENTO JUNIOR; SANTOS, 2004; GUEDES et al., 2008). Entretanto, as ciclodextrinas naturais, em particular a β -ciclodextrina, possui solubilidade aquosa limitada (16,4 mM ou 18,6 mg.mL⁻¹), o que resulta na formação de complexos com compostos lipofílicos geralmente uma precipitação dos complexos sólidos, se o limite de solubilidade for atingido (RAJEWSKI; STELLA, 1996).

Figura 8 - Principais ciclodextrinas naturais: α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrinas (β -CD) e γ -ciclodextrinas (γ -CD)

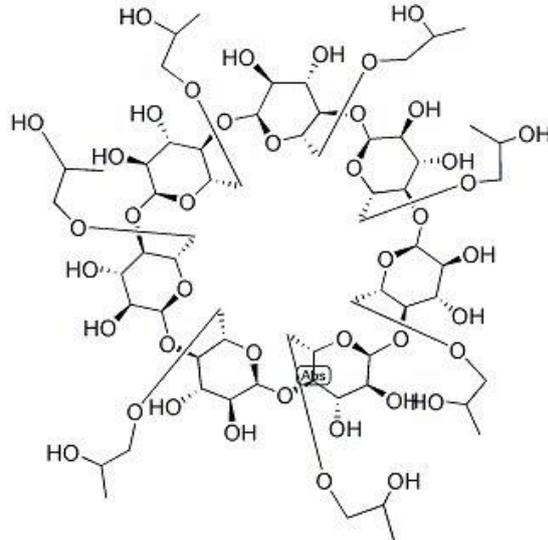


FONTE: Adaptado (MACHADO et al., 2008).

Para amenizar esse problema de solubilidade as ciclodextrinas naturais (α CD, β CD e γ CD) vem sendo gradativamente substituído, ao longo dos anos, pelos seus derivados semi-sintéticos que oferecem maior capacidade de inclusão, solubilidade aquosa, estabilidade e menor toxicidade, devido às alterações das suas propriedades físico-químicas originais. Atualmente, existem centenas de derivados,

mas apenas alguns são de maior interesse farmacêutico. Entre eles, os derivados hidroalquilados, isto é, os derivados hidroxipropil da β CD e γ CD (HP β -CD e HP γ -CD, que derivam da substituição dos grupos hidroxílicos em C₂, C₃ e C₆ por substituintes 2-hidroxipropil.

Figura 9 - Molécula de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.



FONTE: ChemicalBook

Atualmente as CDs são empregadas na indústria alimentícia, pois aumenta a estabilidade de componentes dos alimentos que são susceptíveis à ação da luz, da temperatura e da oxidação, podendo também diminuir a velocidade de perda dos compostos voláteis presentes. Além disso, são principalmente empregadas na indústria farmacêutica, que devido às suas propriedades complexantes, seu uso pode aumentar: a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco solúveis em água, sua biodisponibilidade e estabilidade, diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos, diminuir ou eliminar odores ou sabores desagradáveis, e prevenir interações entre diferentes fármacos. (OLIVEIRA; SANTOS; COELHO, 2009).

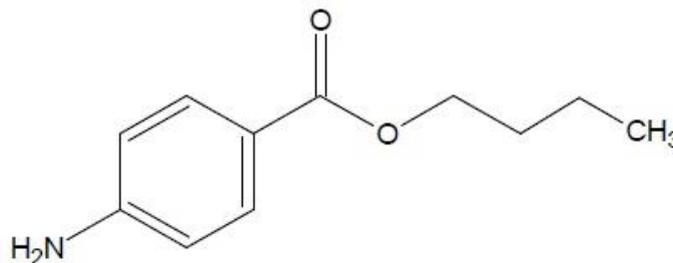
4.4 Anestésicos locais na formação de complexo

Os anestésicos locais (AL) são substâncias químicas que tem o objetivo de bloquear reversivelmente a transmissão de estímulos nervosos no local ao qual for aplicado, sobretudo para o bloqueio da sensação de dor. Esses fármacos têm ação sob qualquer parte do sistema nervoso e em qualquer tipo de fibra nervosa (SANTAELLA, 2011; FERREIRA et al., 2006; ALVES, 2013). Os AL são utilizados desde tratamentos odontológicos, queimaduras e pequenos cortes, até injeções durante procedimentos obstétricos e grandes cirurgias. Ou seja, seu uso se dá em

grande escala na área médica e odontológica.

No presente trabalho foi utilizado o AL 4-aminobenzoato de butila ($C_{11}H_{15}NO_2$) (Figura 10), também chamado de Butamben (BTB). O BTB é empregado no tratamento de dores crônicas e apresenta uma solubilidade intermediária em meio aquoso (ARAUJO et al., 2003). Uma alternativa para potencializar a solubilidade do BTB é formando complexos de inclusão com HP- β -CD (BTB/HP- β -CD) em solução, que além de aumentar a solubilidade do BTB, resultará na diminuição da toxicidade do fármaco.

Figura 10 - Estrutura química do anestésico local Butamben



FONTE: (BEEKWILDER, 2008)

Entretanto, quando complexos fármacos/ciclodextrinas são injetados intravenosamente uma rápida dissociação ocorre, quer por diluição ou por deslocamento do fármaco por outros componentes do sangue. Desta forma, as ciclodextrinas aumentam a disponibilidade, sem haver alteração farmacocinética do fármaco de interesse (MCCORMACK et al., 1998).

Dessa forma, uma maneira de reduzir a toxicidade das ciclodextrinas, realiza-se o encapsulamento do sistema binário, em lipossomas furtivos (LF), o qual resulta na formação de um novo complexo (BTB/HP- β -CD/LF), que apresenta como vantagem a liberação da concentração do fármaco constante, prolongando a duração do efeito terapêutico e a redução da toxicidade para os sistemas cardiovascular e nervoso central.

4.5 Espectrofotometria UV-Vis

As técnicas espectroscópicas de análise, em geral, têm como objetivo estudar a interação da radiação eletromagnética emitida ou absorvida por uma espécie química. A espectrofotometria UV-Vis (ultravioleta-visível) é um dos métodos analíticos mais utilizados nas determinações analíticas quantitativas de uma ampla variedade de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas, em diversas áreas (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

Geralmente, a faixa considerada do espectro ultravioleta é de 200 a 400 nm, e a região do visível entre 400 a 800 nm (VINADÉ, VINADÉ, 2005). As energias correspondentes a essas regiões são ao redor de 150 a 72 kcal.mol⁻¹ na região ultravioleta, e 72 a 36 kcal.mol⁻¹ para a região visível (SILVERSTEIN et al., 2006).

Basicamente, quando um feixe de luz incide sobre uma amostra tem-se uma fração desta luz absorvida por ela, e cujo princípio é expresso pela Lei de Lambert-Beer (Equação 1). A Lei de Beer diz que essa fração deve ser sempre a mesma, ou seja, estabelece que a absorvância (A) é diretamente proporcional ao caminho que a luz percorre na amostra (b), à concentração (c) e a absorvidade molar (ϵ).

$$A = \epsilon cb \quad \text{Eq.(1)}$$

Assim, quando há formação de complexos de inclusão pode ocorrer mudanças no modo com que a molécula inclusa, no caso o fármaco, absorve a radiação UV devido à mudança do ambiente de solvatação e às interações entre o fármaco e a molécula carregadora. Essas mudanças podem ser visualizadas por alterações na intensidade e/ou deslocamento das bandas de absorção (LYRA et al., 2010; DODZIUK, 2006).

Neste trabalho, a utilização da espectrometria na região do ultravioleta (UV-Vis), tem como princípio a relação proporcional existente entre a quantidade de luz absorvida e a concentração de butamben tanto no complexo binário quanto ternário.

4.6 Cromatografia Líquida (CL)

A cromatografia é um método de separação muito eficiente que se aplica a diversos ramos da ciência, que permitem a separação e identificação de componentes muito semelhantes entre si (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009). Na análise cromatográfica a amostra é transportada por uma fase móvel. Essa fase móvel é forçada a passar por uma fase estacionária imiscível e fixa, no interior de uma coluna ou sobre uma superfície sólida.

Segundo Holler e colaboradores (2009), os compostos que são retidos mais fortemente na fase estacionária movem-se mais lentamente pela coluna. Em contrapartida, os compostos que interagem mais fracamente com a fase estacionária movem-se mais rapidamente. Em função dessas velocidades de migração diferentes os componentes da amostra são separados em bandas ou zonas discretas, que podem ser analisadas tanto qualitativamente como quantitativamente.

A Cromatografia Líquida (CL), do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), utiliza pequenas colunas cheias de materiais especialmente preparados, capazes de proporcionar separações muito eficientes; e fase móvel submetida a altas pressões para forçar sua passagem pela coluna (CIENFUEGOS, VAITSMAN, 2000; HARRIS, 2008).

O dispositivo para CLAE consiste basicamente, em um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador para controlar o sistema e apresentar os resultados (HARRIS, 2008). Os resultados podem ser observados através de cromatogramas que mostram a resposta do detector em função do tempo de eluição (passagem do líquido pela coluna cromatográfica).

Nos sistemas de liberação controlada de fármacos a técnica de CL é amplamente utilizada para a avaliação da eficiência de encapsulação de complexos com ciclodextrinas (Flood et al., 2000; Kim et al., 2010).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Tipo de pesquisa

A pesquisa referente a este trabalho tem como objetivo quantificar o teor de encapsulação, bem como o aumento da solubilidade do fármaco Butamben quando complexado em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e lipossoma de longa circulação (lipossoma furtivo – LF) através da técnica de UV-Vis e CLAE.

5.2 Materiais e equipamentos

Os solventes, o AL butamben e a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina foram adquiridos da Sigma Aldrich. Amostras de fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol e o 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)]-2000 (DSPE-PEG-2000) foram adquiridos da Avant Lipids. Os presentes reagentes fosfato de sódio heptahidratado, fosfato de sódio monohidratado, metanol, foram adquiridos via recursos do Projeto Universal CNPq Processo: 448908/2014-0.

Os equipamentos utilizados para realização das técnicas de UV-Vis e CLAE são espectrofotômetro UV-Vis marca Femto, modelo 800XI, e Cromatografo Líquido Thermo scientific modelo Ultimate 3000.

5.3 Métodos

5.4.1 Preparação da solução BTB para curva de calibração.

Para o preparo da curva de calibração foram preparadas amostras de BTB em solução tampão fosfato pH 7,4 variando a concentração de 0,14 a 0,66 mM. As amostram foram levadas para análise por CL e UV-Vis.

5.4.2 Preparação soluções de BTB para determinação da solubilidade máxima (S_0) em tampão fosfato de sódio pH 7,4

Para a determinação da solubilidade máxima do BTB em tampão fosfato de sódio pH 7,4 foi utilizada a metodologia disponibilizada na Farmacopéia Brasileira 5ª Edição (ANVISA, 2010). A preparação das soluções consistiu na adição de excesso de fármaco (BTB) (5, 10, 20, 30,40 50 mM) a volumes constantes de solvente (3mL), visando à obtenção de uma solução saturada. Conforme o procedimento determinado pela Farmacopéia foi determinado o conteúdo total de soluto nas soluções po UV-Vis e CL.

5.4.3 Preparação do complexo binário BTB/HP- β -CD

O complexo binário BTB/HP- β -CD foi preparado em uma solução tamponada em pH 7,4 (tampão fosfato de sódio) no volume de 3mL, adicionando a massa correspondendo a 10mM de BTB e 10mM de HP- β -CD. Essa solução foi agitada durante 2 horas, em seguida foi filtrada em membrana de policarbonato (millex filter, Millipore, USA com poro de 0,45 μ m).

5.4.4 Preparação do complexo binário BTB/LF

Os lipossomas furtivos foram preparados utilizando fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol e DSPE-PEG-2000 a uma razão molar de (54:41:5) no volume de 1 mL de clorofórmio. Adicionou-se ao mesmo recipiente a concentração de 10mM de Butamben que foi solubilizado com auxílio de agitação em Vortex. Em seguida, evaporou-se a temperatura ambiente todo o solvente gerando um filme nas paredes do recipiente (HAERI, et al., 2013).

Este filme lipídico foi hidratado com 1 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 7,4 e agitou-se por aproximadamente 5 minutos. Após, essa solução foi extrusada por 13 passadas entre a membrana de policarbonato de 400 nm em um mini-extrusor Avanti.

5.4.5 Preparação do complexo ternário BTB/ HP-β-CD/LF

O complexo ternário foi preparado a partir da hidratação (1 mL) do filme lipídico de LF, nas mesmas razões molares citadas anteriormente. A solução tampão de hidratação (pH 7,4) era formada pelo complexo binário BTB/HP-β-CD em concentrações de 10mM. A solução foi agitada em Vortex. Em seguida, a solução foi extrusada em membrana de policarbonato de 400 nm em um mini-extrusor Avanti.

5.4.6 Determinação da eficiência de encapsulação

O complexo formado entre o fármaco e a 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) foi preparado em uma solução tamponada em pH 7,4 (tampão fosfato de sódio), variando as concentrações de HP-β-CD 5 a 100 mM com um excesso de BTB (150 mM). As soluções foram deixadas em mesa agitadora por 5 dias. As amostras foram filtradas em membrana de policarbonato (millex filter, Millipore, USA com poro de 0,45 μm) e levadas para análise de UV-Vis e CL.

A concentração de BTB foram determinadas por espectrofotometria de UV-Vis fazendo uma varredura de 200 a 350nm (Spectrometer Lambda 25), sendo que o maior sinal de absorbância foi em λ=282nm. As mesmas amostras foram injetadas no CL utilizando uma fase estacionária, C18 (150 x 4,6 mm com partícula de 5 μm) a uma temperatura de 30°C, utilizando como fase móvel MetOH:H₂O, para determinar de cromatografia líquida para determinar também as concentrações de BTB.

Através dos valores de concentração foi possível determinar a constante de associação (Ka), utilizando o valor de coeficiente angular da relação linear entre a concentração molar de butamben em meio solúvel *versus* a concentração molar de HP-β-CD de acordo com a Equação 3 (HIGUCHI;CONNORS,1965):

$$Ka = \frac{\text{slope}}{S_0(1-\text{slope})} \quad \text{Eq.(3)}$$

onde S₀ é solubilidade aquosa da BTB na ausência de HPβCD.

A eficiência de encapsulação (EE) do fármaco foi determinada a partir dos dados da curva de solubilidade de fase de acordo com a equação:

$$EE = \frac{\text{slope}}{(1-\text{slope})} \quad \text{Eq.(4)}$$

E a razão fármaco/ciclodextrina (HP-β-CD: BTB) de acordo com a equação:

$$\text{HP}\beta\text{CD: BTB} = 1: 1 + \frac{1}{EE} \quad \text{Eq.(5)}$$

5.3.3 Determinação da Eficiência de Encapsulação do complexo BTB/LF e BTB/HPβCD/LF

Para a determinação da eficiência de encapsulação do sistema BTB/LF e ternário (BTB/HP-β-CD/LF), uma alíquota de 400 μL de cada complexo foi levada a ultrafiltração/ultracentrifugação (Ultrafree 10.000 D) durante o período de 1h. O filtrado (quantidade livre de fármaco) foi diluído em 3mL de tampão fosfato de sódio e quantificado utilizando a técnica de UV-Vis e CL.

A quantificação utilizando espectrofotometria de UV-Vis e CL foi a 282nm. O cálculo de eficiência foi realizado através da Equação 6 (MAESTRELLI, et al. 2010).

$$EE\% = \frac{[BTB \text{ pesado}] - [BTB \text{ não encapsulada}]}{[BTB \text{ pesado}]} \times 100\% \quad \text{Eq.(6)}$$

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Análise do complexo binário HP-β-CD/BTB

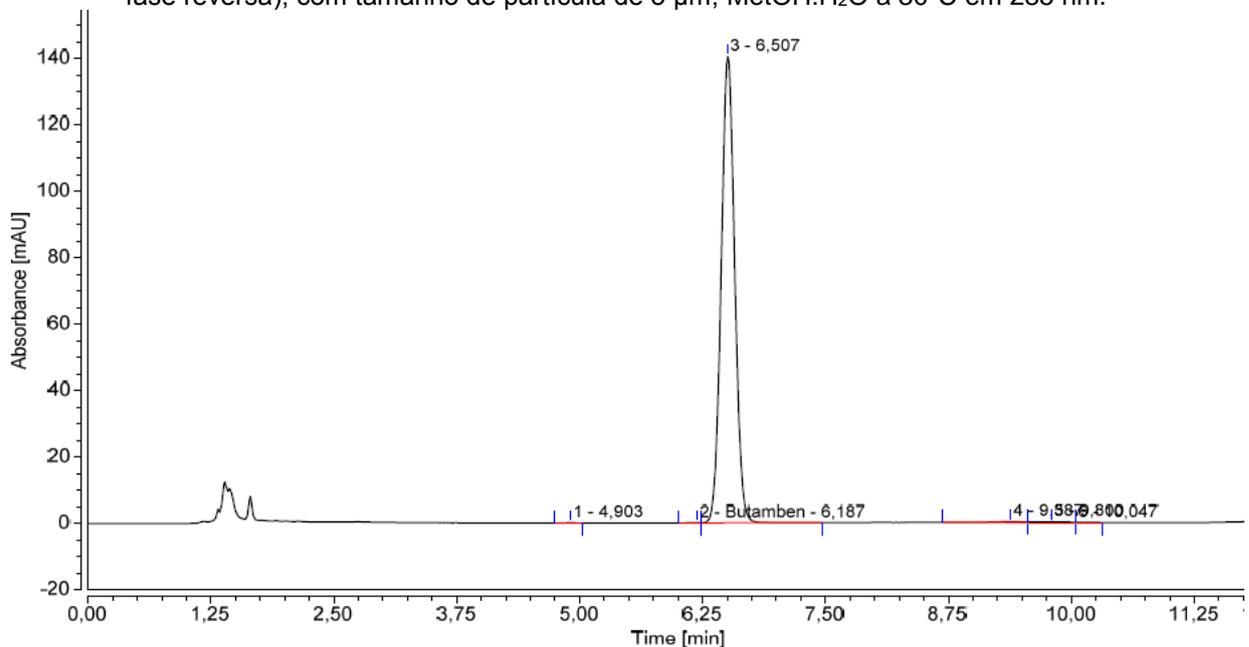
Um dos objetivos principais do trabalho é determinar a eficiência de encapsulação (EE) e a constante de afinidade (Ka) dos complexos em estudos. Para tanto foram utilizados dois métodos: Espectrofotometria UV-Vis e a Cromatografia Líquida (CL).

6.1.1 Análise por CL

Amostras de BTB (solução preparadas adicionando um excesso de BTB com volume fixo em pH 7,4 como descrito em materiais e métodos) foram analisadas e quantificadas por CL. Calculou-se a solubilidade de BTB sem adição de HP- β -CD em tampão fosfato de sódio pH 7,4. O resultado foi S_0 de $0,72 \times 10^{-3} M$.

A Figura 11 mostra o cromatograma obtido, onde o pico proveniente de uma amostra de BTB a 0,87 mM preparada para determinação do S_0 pode ser identificado em um tempo de retenção de 6,29 min.

Figura 11 - Cromatograma de absorção da solução de BTB (0,87 mM). Coluna C18 (150 x 4,6 mm de fase reversa), com tamanho de partícula de 5 μm ; MetOH:H₂O a 30°C em 285 nm.



FONTE: Autoria própria, (2017)

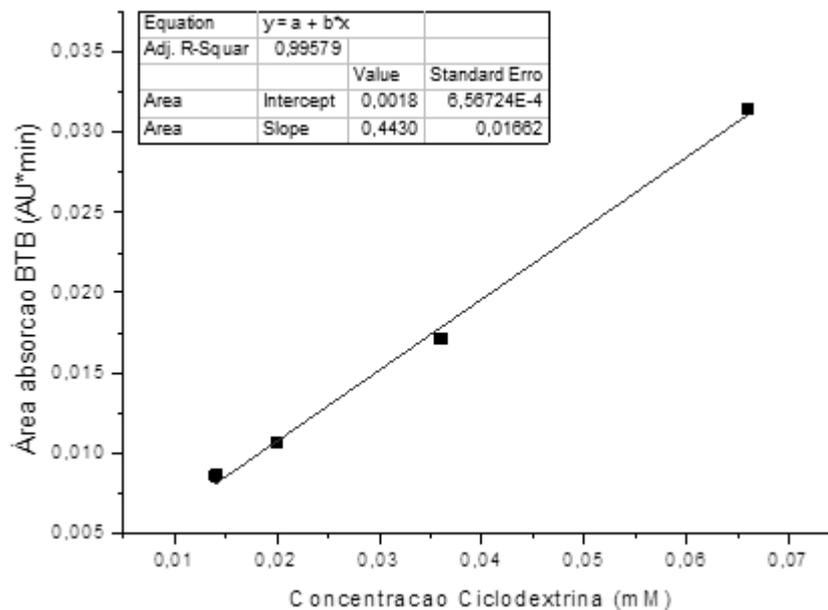
A fim de determinar a EE e K_a , é necessário fazer uma curva de calibração do fármaco BTB. Para tanto foram feitas amostras com concentração variadas (0,014 a 0,066 mM) (Tabela 1 e Figura 12).

Tabela 1- Dados utilizados para da curva de calibração do BTB

Concentração BTB (mM)	ÁREA de absorção do BTB (AU*min)
0,014	0,008599
0,02	0,010621
0,036	0,017112
0,066	0,0314385

FONTE: Autoria própria, (2017)

Figura 12- Curva de calibração de BTB por CL



FONTE: Autoria própria, (2017)

A curva de calibração com $r^2 = 0,99579$ forneceu a seguinte equação da reta (Eq. 7).

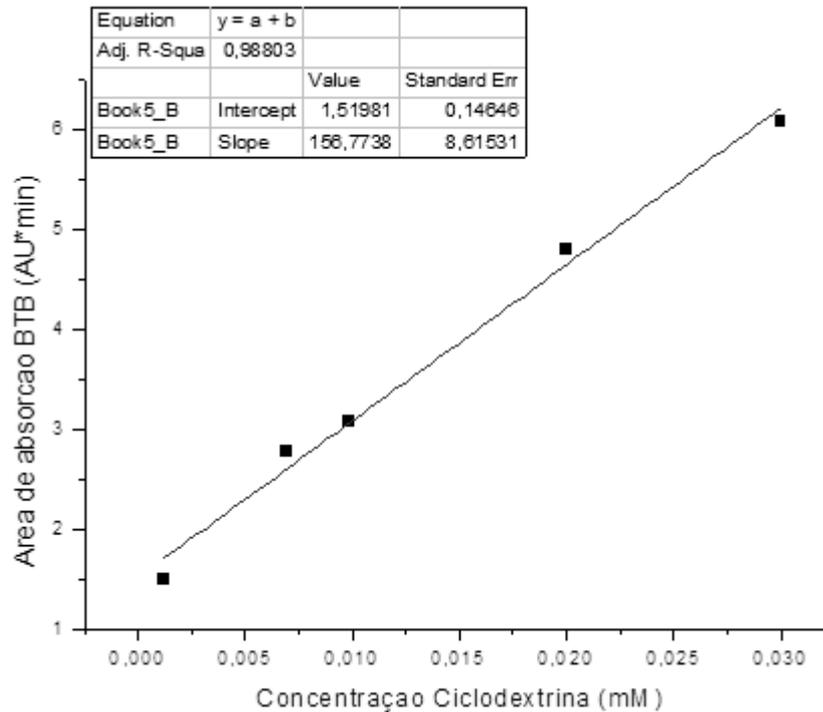
$$y = a + bx$$

$$y(\text{área BTB}) = 0,0018 + 0,4430[\text{BTB}] \quad \text{Eq.(7)}$$

Soluções contendo o complexo BTB/HP- β -CD foram preparadas como descrito em material e métodos (variando HP- β -CD com excesso de BTB) e foram

levadas para análise de CL fornecendo a Figura 8 que representa um aumento da área de absorção do BTB conforme o aumento da concentração de ciclodextrina.

Figura 13 - Relação de absorção do BTB pela concentração de ciclodextrina



FONTE: Autoria própria, (2017)

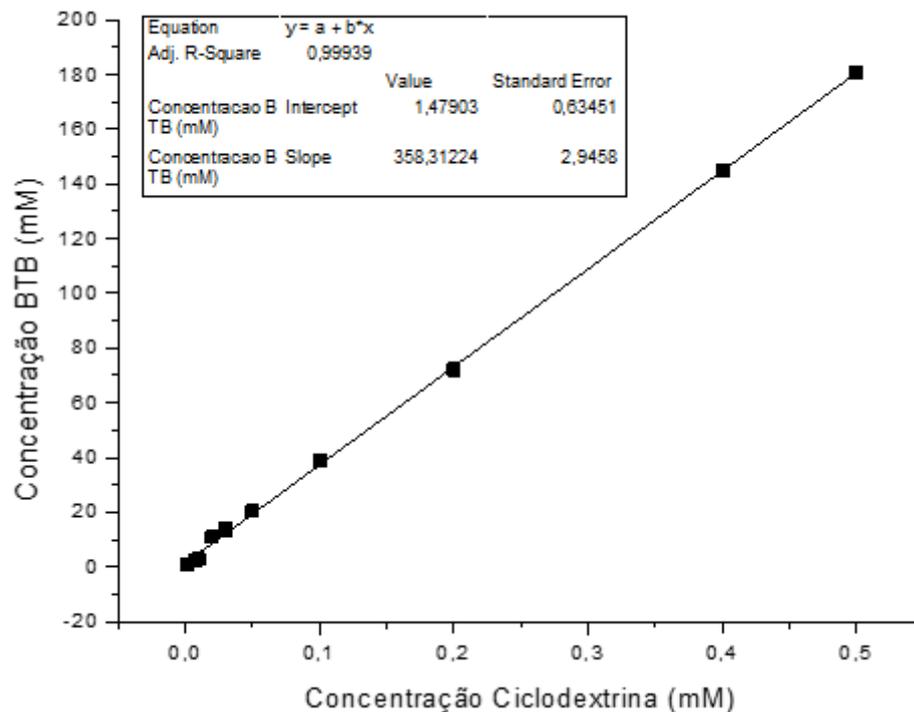
Utilizando os valores da área de absorção do BTB da Figura 13 e a Equação 7 da reta da curva de calibração do BTB tem-se a concentração do fármaco encapsulado em HP- β -CD (Tabela 2). A Figura 14 mostra que a medida que a concentração de HP- β -CD aumenta, ocorre um aumento da solubilidade de BTB.

Tabela 2 - Relação de BTB encapsulado variando a concentração de ciclodextrina. Dados experimentais e estimados.

CONCENTRACAO CICLODEXTRINA (mM)	CONCENTRACAO BTB (mM)
0,0012	0,68
0,0069	2,2
0,0098	2,89
0,02	10,85
0,03	13,72
0,05	20,31
0,1	38,81
0,2	72,2
0,4	144,98
0,5	180,37

FONTE: Autoria própria, (2017)

Figura 14 – Curva de solubilidade do BTB em ciclodextrina



FONTE: Autoria própria, (2017)

Higuchi e Connors (1965) descrevem que a primeira verificação da formação de complexos de inclusão em solução é observando o diagrama de solubilidade, ou seja, a partir da Figura 14 referente à curva de solubilidade do BTB, nota-se que a concentração do fármaco butamben encapsulado aumentou conforme aumentou-se

a concentração da Ciclodextrina, mostrando que o fármaco se tornou mais solúvel após a formação do complexo binário BTB/HP- β -CD.

Além disso, utilizando os dados da curva de solubilidade (Figura 14) é possível determinar o valor de K_a que se refere à capacidade das ciclodextrinas formarem complexos de inclusão com fármacos apropriados, aplicando os valores nas Equações 3 e 4 respectivamente, e o valor da eficiência de encapsulação (EE) do complexo binário:

$$K_a = \frac{0,3583}{0,72 \times 10^{-3}(1 - 0,3583)}$$

$$K_a = 775 M^{-1}$$

$$EE = \frac{0,3583}{1 - 0,3583}$$

$$EE = 0,558$$

A fase solúvel do fármaco BTB em solução de HP- β -CD em pH 7,4 demonstrou um tipo de curva linear com valor de $R^2 = 0,99939$ em que a equação da reta encontrada foi $[BTB] = 1,47903 + 358,31[HPBCD]$ (Figura 14).

Sendo assim, o valor que representa a eficiência de encapsulação (EE) do BTB em HP- β -CD foi de 0,558 calculada através da equação (1). (Araujo *et al.*, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2011). Segundo Barbosa (2012) quanto maior a eficiência de encapsulação, menor a quantidade de ciclodextrina necessária para a solubilização do fármaco, ou seja, quanto mais próximo de 1 melhor a EE. De acordo com Loftsson e Brewster (1996) alguns estudos necessitam do uso de uma maior concentração de CD para complexar uma pequena quantidade de AL.

O valor da constante de associação (K_a) determinado foi de $775 M^{-1}$ em pH 7,4 (onde o S_0 utilizado foi $0,72 \times 10^{-3} M$). O valor da constante de associação (K_a) é usado para comparar a afinidade do fármaco com a HP- β -CD e mede também a extensão das modificações físico químicas ocorridas após a complexação. Estes valores podem variar entre $10 M^{-1}$ e $1000 M^{-1}$, e esta unidade é válida somente para complexos com estequiometria 1:1 (JUNIOR, 2010). Além disso, estudos de Moraes *et al.*, (2007) apontam que anestésicos locais amino-ésteres apresentam valores de constante de formação maiores, como por exemplo, $K_a = 549 M^{-1}$ para a benzocaína, $K_a = 351 M^{-1}$ para a tetracaína. Assim, esses resultados estão em concordância com

a literatura. Maestrelli e colaboradores (2010) encontraram valores de constante de solubilidade da ordem de 273 M^{-1} em pH 5, ou seja, este valor depende tanto do fármaco utilizado como o meio em que este está formando o complexo com a molécula carregadora.

Assim, pode se calcular a solubilidade total do fármaco (S_t) em presença da HP- β -CD através da Equação 8 (MAESTRELLI, et al 2010):

$$S_t = S_o + \frac{K_a \cdot S_o}{1 + K_a \cdot S_o} \cdot [HPBC] \quad \text{Eq.(8)}$$

$$S_t = (0,72 \times 10^{-3}) + \frac{(775)(0,72 \times 10^{-3})}{1 + (775)(0,72 \times 10^{-3})} \cdot [0,03 \times 10^{-3}]$$

$$S_t = 0,73 \times 10^{-3} \text{ M}$$

O aumento de solubilidade de BTB em HP- β -CD foi de 0,73 mM. Comparando com o valor de S_o , observa-se que houve um pequeno aumento quando o fármaco foi complexado com HP- β -CD em solução tampão fosfato de sódio pH 7,4. Esse resultado pode ser explicado levando em consideração o uso de baixa concentração de HP- β -CD. Altos valores de HP- β -CD exibem valores altos de absorção de BTB encapsulado e acabam por extrapolar os limites de detecção. Além disso, o fármaco BTB já apresenta uma solubilidade razoável mesmo na ausência da molécula carregadora.

A razão HP- β -CD: BTB também foi calculada de acordo com a Equação 5 e o resultado foi 1:3. Esse resultado mostra que para formar o complexo de inclusão 1:1 (HP- β -CD: BTB), é necessário que estejam presentes uma molécula de HP- β -CD e três moléculas de BTB (Loffsson et al., 2007).

$$\text{HP}\beta\text{CD: BTB} = 1: 1 + \frac{1}{0,558}$$

$$\text{HP}\beta\text{CD: BTB} = 3$$

6.1.2 Análise por espectrofotometria UV-Vis

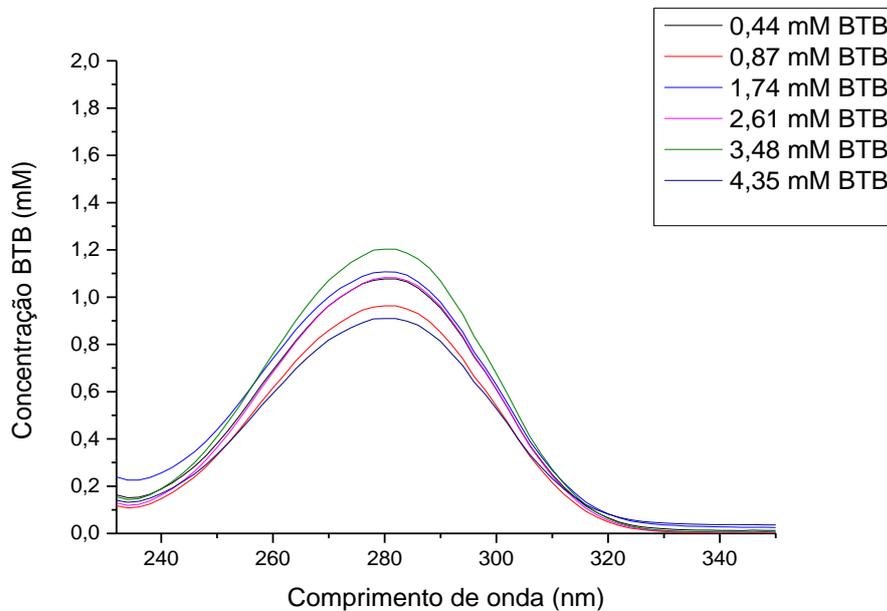
Para observar confirmar os valores encontrados por CL, foi realizado os mesmos experimentos com UV-Vis. Em primeiro lugar foi verificado a solubilidade

padrão da BTB (S_0) em solução tampão pH 7.4, sendo as mesmas soluções utilizadas no experimento de CL. O resultado obtido foi S_0 de $0,66 \times 10^{-3}$ M.

Como a absorvância é uma propriedade inerente de cada substância, em que diferentes materiais podem absorver radiações em comprimentos de onda distintos, foram obtidos os espectros de absorção na região do UV tanto para a determinação do S_0 como para a curva analítica do BTB.

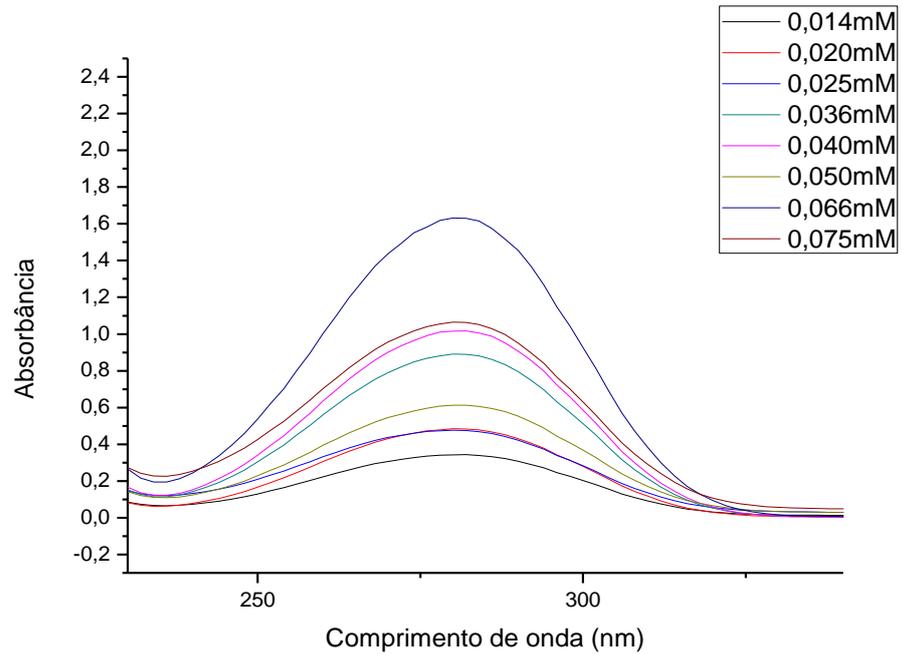
A Figura 15 mostra um espectro de UV-Vis realizado para determinação do S_0 do BTB em tampão fosfato de sódio 7,4, onde nota-se que a absorção máxima ocorreu em $\lambda=282\text{nm}$.

Figura 15 – Espectro de UV-Vis para determinação do S_0 do fármaco BTB



FONTE: Autoria própria, (2017)

Em seguida, foi realizado a curva de calibração utilizando a técnica de UV-Vis. A Figura 16 mostra a absorvância do BTB, onde a maior intensidade de absorção também ocorreu no comprimento de onda de $\lambda=282\text{ nm}$.

Figura 16 - Gráfico de absorvância BTB *versus* comprimento de onda

FONTE: Autoria própria, (2017).

A partir da Figura 16 foi elaborada a curva de calibração construída somente com alguns valores de concentrações e suas respectivas absorvâncias (Tabela 3).

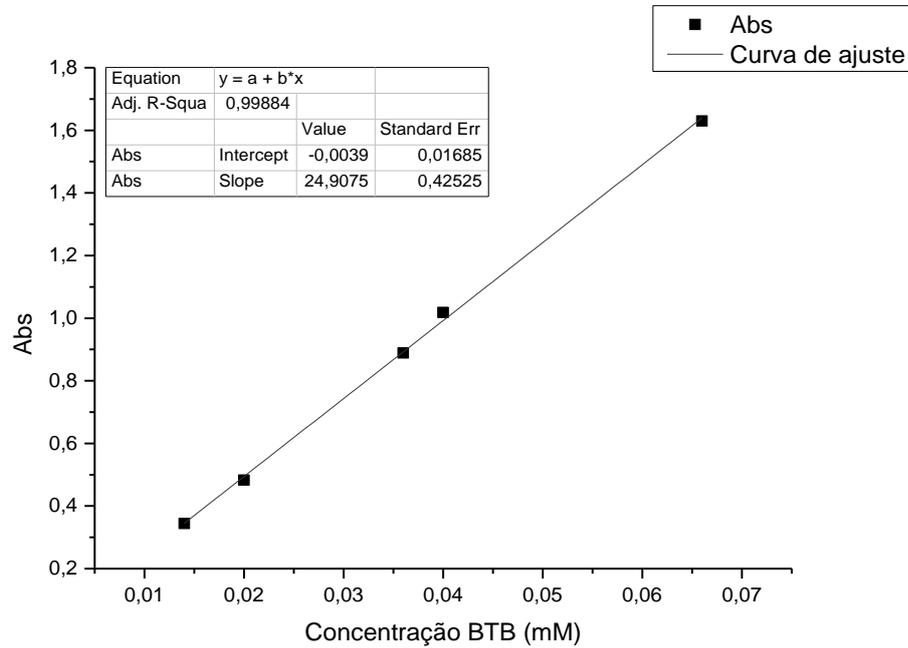
Tabela 3 - Dados utilizados para construção da curva de calibração do BTB por UV-vis

Concentração de BTB (mM)	Abs
0,014	0,344
0,02	0,483
0,036	0,889
0,04	1,018
0,066	1,63

FONTE: Autoria própria, (2017)

Os dados da Tabela 6 foram plotados e forneceu a curva de calibração da Figura 17.

Figura 17 - Curva de calibração do BTB por espectrofotometria UV-vis



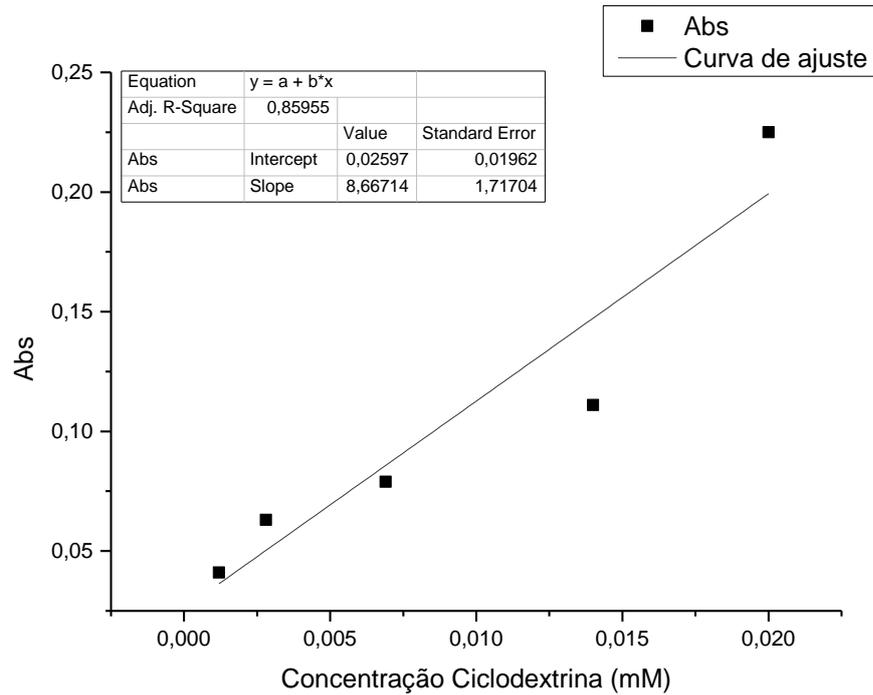
FONTE: Autoria própria, (2017)

A curva de calibração com $R^2 = 0,99884$ forneceu a seguinte equação da reta.

$$y(\text{abs BTB}) = -0,0039 + 24,9075[\text{BTB}] \quad \text{Eq. (9)}$$

Através da análise experimental do complexo BTB/HP- β -CD obteve-se um gráfico da relação absorbância do BTB pela concentração da ciclodextrina (Figura 18).

Figura 18- Relação de absorção do BTB pela concentração de ciclodextrina



FONTE: Autoria própria, (2017)

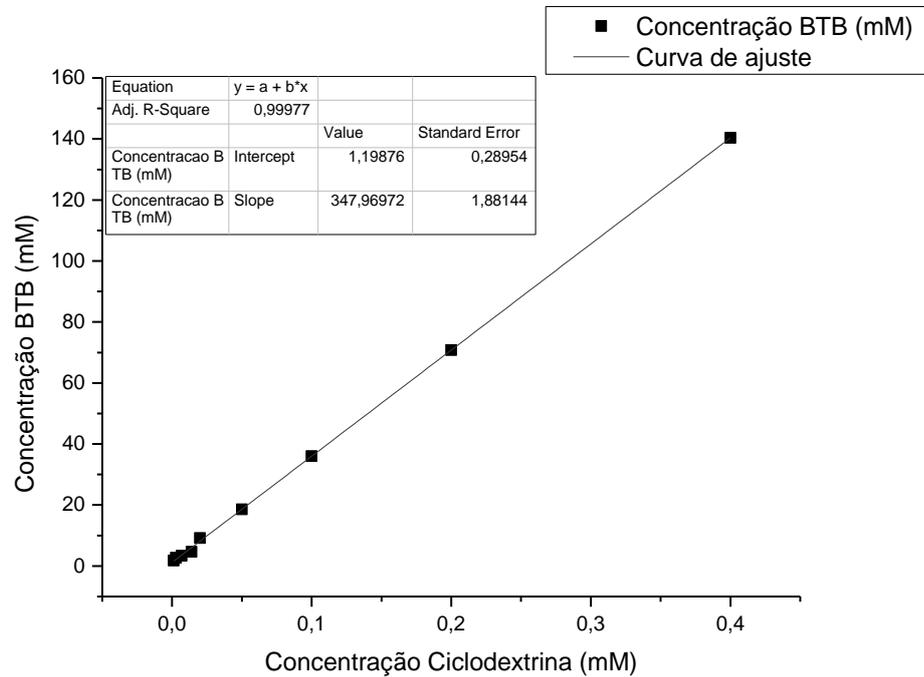
Substituindo os valores de absorbância do BTB da Figura 18 na equação da reta da curva de calibração obtida pela técnica de UV-Vis (Eq. 9) tem-se as concentrações de BTB no complexo BTB/HP- β -CD (Tabela 4) (Figura 19).

Tabela 4 - Relação de BTB encapsulado variando a concentração de ciclodextrina

CONCENTRACAO CICLODEXTRINA (mM)	CONCENTRACAO BTB (mM)
0,0012	1,8
0,0028	2,69
0,0069	3,33
0,014	4,62
0,02	9,19
0,05	18,59
0,1	35,99
0,2	70,79
0,4	140,39

FONTE: Autoria própria, (2017)

Figura 19 - Curva de solubilidade do BTB no complexo binário BTB/HP-β-CD. Dados experimentais e estimados.



Fonte: Autoria própria, (2017).

A partir da Figura 19 nota-se que há a formação do complexo binário fármaco e a ciclodextrina, pois o diagrama de solubilidade demonstra que o fármaco tornou-se mais solúvel conforme o aumento da concentração de HP-β-CD, o que vai de encontro com os estudos de Higuchi e Connors (1965).

Além disso, utilizando os dados da curva de solubilidade (Figura 19) é possível determinar o valor de K_a e a eficiência de encapsulação (EE) do BTB utilizando as Equações 3 e 4:

$$EE = \frac{0,3479}{1 - 0,3479}$$

$$EE = 0,534$$

$$K_a = \frac{347,96972 \times 10^{-3}}{0,66 \times 10^{-3} (1 - 347,96972 \times 10^{-3})}$$

$$K_a = 808 \text{ M}^{-1}$$

A fase solúvel da BTB em solução de HP- β -CD em pH 7,4 demonstrou um tipo de curva linear com regressão linear de $r^2 = 0,99977$ em que a equação da reta encontrada foi $[BTB] = 1,19876 + 0,34796972[HP\beta CD]$.

Sendo assim, o valor que representa a eficiência de encapsulação (EE) do BTB em HP- β -CD foi de 0,534 calculada através da equação (1) (Araujo *et al.*, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2011), o que demonstra uma eficiência de encapsulação razoável uma vez que quanto mais próximo de 1 melhor é a eficiência de encapsulação (BARBOSA, 2012).

Sabendo que os valores da constante de associação (K_a) podem variar entre 10 M^{-1} e 1000 M^{-1} para complexos com estequiometria 1:1 (JUNIOR, 2010), e que anestésicos locais amino-ésteres apresentam valores de constante de formação maiores, como por exemplo, $K_a = 549 \text{ M}^{-1}$ para a benzocaína (MORAES *et al.*, 2007), o Butamben se mostrou concordante com a literatura pois obteve um K_a igual a 808 M^{-1} em pH 7,4 (onde o S_o utilizado foi $0,66 \times 10^{-3} \text{ M}$). O valor da constante de associação (K_a) é usado para comparar a afinidade do fármaco com a HP- β -CD.

A solubilidade total do fármaco (S_t) em presença da HP- β -CD pode ser encontrada através da Equação 8 (MAESTRELLI *et al.* 2010):

$$S_t = S_o + \frac{K_a \cdot S_o}{1 + K_a \cdot S_o} \cdot [HPBC]$$

$$S_t = (0,66 \times 10^{-3}) + \frac{(808)(0,66 \times 10^{-3})}{1 + (808)(0,66 \times 10^{-3})} \cdot [0,02 \times 10^{-3}]$$

$$S_t = 0,67 \times 10^{-3} \text{ M}$$

O aumento de solubilidade de BTB em HP- β -CD foi de $0,67 \times 10^{-3} \text{ M}$, ou seja, a solubilidade do fármaco aumento uma vez com relação ao BTB livre em solução aquosa pH 7,4.

Utilizando o valor de EE e a equação 5 é possível determinar a razão HP- β -CD: BTB. O resultado foi 1:3, o que demonstra que para formar um complexo 1:1 (HP- β -CD: BTB) é necessário estar presente na solução uma molécula de HP- β -CD e três moléculas de BTB (LOTFSSON ET AL., 2007).

$$\text{HP}\beta\text{CD: BTB} = 1: 1 + \frac{1}{(0,534)}$$

$$\text{HP}\beta\text{CD: BTB} = 3$$

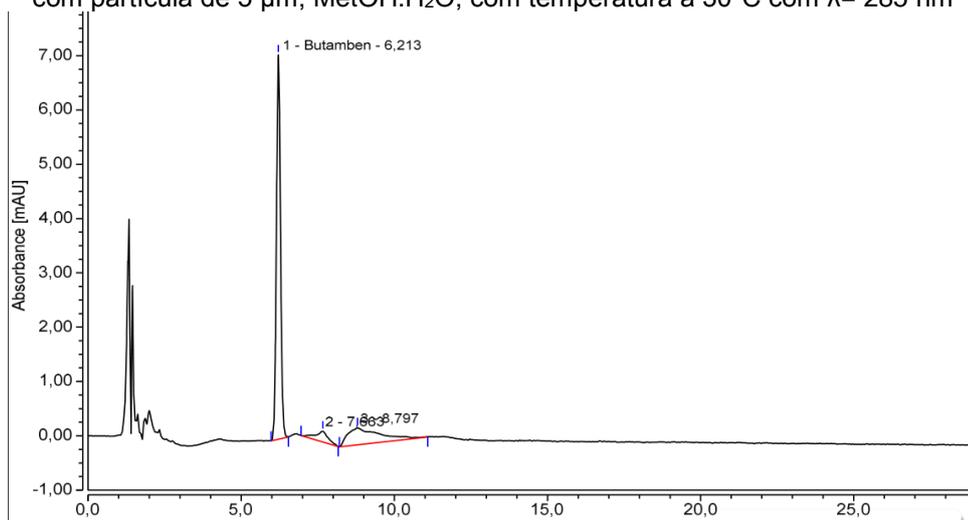
6.2 Análise dos complexos formados com LF: BTB/LF e BTB/HP- β -CD/LF

6.2.1 Análise por CLAE

Após ter centrifugado os complexos BTB/LF e BTB/HP- β -CD/LF, uma alíquota do filtrado foi diluída e levada para análise em cromatografia líquida. O objetivo foi verificar a eficiência de encapsulação do BTB em LF ou no sistema ciclodextrina e lipossoma furtivo.

A Figura 20 apresenta o cromatograma do complexo binário BTB/LF, onde o pico de absorbância pode ser identificado em um tempo de retenção de 6,21 min.

Figura 20 - Cromatograma de absorção do complexo binário de BTB/LF. Coluna C18 (150 x 4,6 nm) com partícula de 5 μ m; MetOH:H₂O; com temperatura a 30°C com λ = 285 nm



FONTE: Autoria própria.

O valor de área de absorção de BTB para o complexo binário BTB/LF foi substituído na equação da reta da curva de calibração obtida pelo método de CL (Equação 7). O dado obtido (1,48mM) foi utilizado na Equação 8, fornecendo a eficiência de encapsulação do BTB quando em complexo com o lipossoma furtivo.

$$EE\% = \frac{[0,010] - [0,00148]}{[0,010]} \times 100\%$$

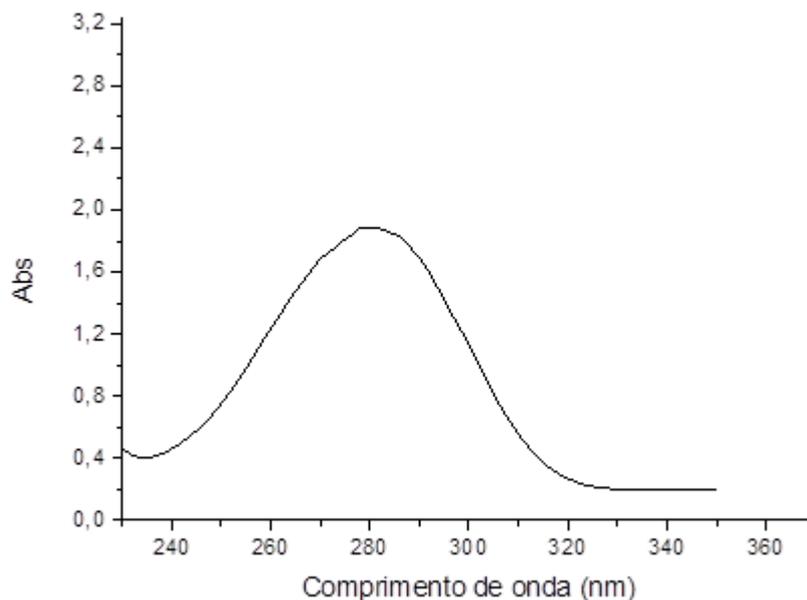
$$EE\% = 85,2\%$$

O valor obtido de EE para o complexo binário BTB/LF é de 85,2%. Entretanto, para o complexo ternário BTB/HP- β -CD/LF não foi possível fazer a determinação da EE uma vez que ao analisar a amostra em CL não se obteve nenhum cromatograma. O experimento será realizado novamente com outra amostra para tentar solucionar o problema.

6.2.2 Análise por espectrofotometria UV-vis

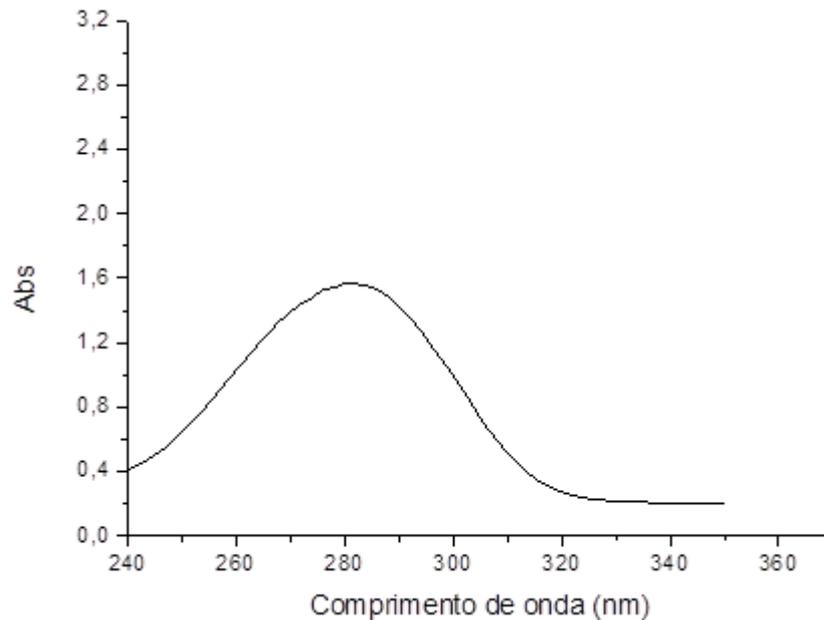
Afim de comparar os resultados da EE dos complexos com LF pelas duas técnicas, levou-se para análise de UV-Vis as mesmas amostras analisadas por CLAE. As Figuras 21 e 22 apresentam o espectro de absorbância *versus* concentração para os complexos BTB/LF e BTB/HP- β -CD/LF respectivamente, ambos apresentando o pico de absorbância no comprimento de onda da $\lambda=282\text{nm}$.

Figura 21 – Espectro de absorção do complexo binário BTB/LF



FONTE: Autoria própria.

Figura 22 – Espectro de absorção do complexo ternário BTB/HP-β-CD/LF



FONTE: Autoria própria.

Com os valores de absorbância máxima de cada um dos complexos analisados, e substituindo na equação da reta da curva de calibração do fármaco realizada pelo método de espectrofotometria UV-Vis (Eq.9), obtém-se a concentração do fármaco não encapsulado tanto no complexo binário, bem como no ternário.

Os valores de fármaco livre em solução são 1,89 e 1,58mM para os complexos BTB/LF e BTB/HP-β-CD/LF, respectivamente. Substituindo estes valores na Equação 6 obtém-se diretamente a EE em porcentagem.

$$BTB/LF : EE\% = \frac{[0,010] - [0,00189]}{[0,010]} \times 100\%$$

$$EE\% = 81,1\%$$

$$BTB/HPBCD/LF: EE\% = \frac{[0,010] - [0,00158]}{[0,010]} \times 100\%$$

$$EE\% = 84,2\%$$

Assim, os valores obtidos de EE são 81,1% para o complexo BTB/LF, e 84,2% BTB/HP-β-CD/LF. A encapsulação tanto no sistema BTB/LF como no sistema

ternário BTB/HP- β -CD/LF apresentaram valores altos, o que indica que o BTB está encapsulado na sua grande maioria. Testes serão feitos para mapear a cinética de liberação para avaliar qual sistema apresenta uma melhor liberação controlada.

Além disso, após a realização das análises dos complexos lipossomais pelas duas técnicas, é possível notar que os valores obtidos por CL e por UV-Vis para o complexo BTB/LF divergiram com uma pequena diferença de 4,1%, e para o complexo ternário só foi possível determinar a EE pela espectrofotometria de UV-vis, não sendo possível realizar a comparação dos valores do complexo BTB/HP- β -CD/LF pelas duas técnicas.

7 CONCLUSÃO

A partir da realização deste trabalho foi possível determinar a eficiência de encapsulação de complexos formados com o fármaco butamben, onde o mesmo foi complexado com ciclodextrina (HP- β -CD) e lipossoma furtivo (LF), e, por conseguinte na formação do complexo ternário BTB/HP- β -CD/LF.

A determinação da eficiência de encapsulação (EE) e da constante de associação (K_a) foi realizada a partir da espectrofotometria UV-Vis e CL. Os valores de EE e K_a foram similares em ambas as técnicas para o complexo binário BTB/HP- β -CD.

Os dados da eficiência de encapsulação do complexo binário BTB/LF obtidos pelas duas técnicas divergiram em 4,1%, e para o complexo ternário BTB/HP- β -CD/LF só foi possível a determinação pela espectrofotometria UV-Vis.

A aplicação das duas técnicas neste trabalho possibilitou um maior conhecimento prático das mesmas, uma vez que durante a graduação estudou-se somente os conceitos teóricos de cada técnica. Além disso, nota-se que a CL mesmo não apresentando dados referente uma das amostras estudadas, ela foi a técnica que apresentou maior praticidade, utilização de um menor volume das amostras, e facilidade no tratamento de dados.

REFERÊNCIAS

ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R.. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.36-48, jan. 2013.

SANTANA, Maria Helena Andrade; MARTINS, Fernanda; ALVES, Giuliana Piovesan. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**, São Paulo, v. 9, n. 50, p.44-50, fev. 2008.

ALVES, Rita Isabel Lourenço. **Anestésicos Locais**. 2013. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

ARAÚJO, Daniele Ribeiro de et al. Formulações de Anestésicos Locais de Liberação Controlada: Aplicações Terapêuticas. **Rev Bras Anesthesiol**, Botafogo, v. 53, n. 5, p.663-671, 2003.

AZEVEDO, Marcelo Mantovani Martiniano de. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, conseqüências e perspectivas**. 2005. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Departamento de Físico-química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BATISTA, Cinthia et al. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.2, p167-179, abr./jun. 2007.

BARBOSA, Marcelo Pacheco Lagares; BONI, Carlos Leonardo Alves; ANDRADE, Flávia Costa Junqueira de. Conduta na intoxicação por anestésicos locais. **Revista Médica de Minas Gerais**, Minas Gerais, v. 20, n. 4, p.24-30, jan. 2010.

BARBOSA, Jahamunna Abrantes Andrade. **Preparação e caracterização de complexos multicomponentes contendo ciclodextrinas com metotrexato**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

BEEKWILDER, Jeroen Petrus. **Butamben, a specific local anesthetic and a specific ion channel modulator**. 2008. 144 f. Tese (Doutorado), Universidade de Leiden, Leiden, 2008.

BRITTO, Marta A. F. O.; NASCIMENTO JUNIOR, Clebio S.; SANTOS, Hélio F. dos. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p.882-888, jul. 2004.

CABEÇA, Luis Fernando. **Topologia de complexos entre drogas/ β ciclodextrinas/lipossomas/células, aplicando técnicas de ressonância magnética nuclear**. 2009. 176 f. Tese (Doutorado) - Curso de Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade de Campinas - UNICAMP, Campinas-SP, 2009.

CARVALHO, Isabel Malta. **Ciclodextrinas: novas aplicações**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

CUNHA-FILHO, M.S.S; BARRETO-SÁ, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 1, p.1-9, jan. 2007.

FARIA, Flávio A.C. de; MARZOLA, Clóvis. *Farmacologia dos anestésicos locais – considerações gerais*. **BCI**, Curitiba, v. 8, n. 29, p. 19-30, jan./mar. 2001.

FERREIRA, Aurigena Antunes de Araújo et al. Anestésicos locais: revisando o mecanismo de ação molecular. **Infarma**, Brasília, v. 18, n. 5, p.15-18, jun. 2006.

FRACETO, Leonardo Fernandes et al. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p.1203-1207, jul. 2007.

FRÉZARD, Frédéric et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.511-518, jun. 2005. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/qn/v28n3/24144.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2017.

GIL, Victor M. S.; F.G.C.GERALDES, Carlos. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, métodos e aplicações**. 2. ed. Coimbra: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1012 p.

GUEDES, Francimary de Lima et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p.220-225, jun. 2008.

GUZZO, Mariana Rizzi. **Estudo da complexação de fisetina com ciclodextrina**. 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

HENRIQUE, Juliana Sanchez; FALCARE, Renata Sarnauskas; LOPES, Patrícia Santos. Sistemas de liberação controlada. **Pharmacia Brasileira**, Brasília, v. 56, p.22-22, nov/dezembro, 2006. Disponível em: <www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/11/22.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2017

HIGUCHI Takehu., CONNORS K.A. Phase solubility techniques. **Anal. Chem. Instrum.**n.4 p.117–212. 1965.

HOLLER, F. J.; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1056 p.

JUNIOR, Junior. **Influência da complexação com ciclodextrinas sobre a degradação fotolítica do pizotifeno em solução aquosa**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fármacos e medicamentos, Área de produção e controle farmacêuticos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KAPUR, Gurpreet S; CABRITA, Eurico J; BERGER, Stefan. The qualitative probing of hydrogen bond strength by diffusion-ordered NMR spectroscopy. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 41, n. 37, p.7181-7185, set. 2000.

LIU, Y.; YANG, Y.W.; YANG, E.C.; GUAN, X.D. Molecular Recognition Thermodynamics and Structural Elucidation of Interactions between Steroids and Bridged Bis(β -cyclodextrin)s. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n.20, p. 6590-6602, 2004.

LOFTSSON, Thorsteinn; BREWSTER, Marcus E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 85, n. 10, p.1017-1025, out. 1996. Elsevier BV.

LOFTSSON, Thorsteinn; HREINSDÓTTIR, Dagný; Másson, Már. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.** 2007, 57, 545.

LYRA, Magaly de et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal Of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 26, n. 5, p.784-793, 2007. Disponível em: <www.latamjpharm.org/trabajos/26/5/LAJOP_26_5_5_1_5NH237W57Y.pdf>.

Acesso em: 22 mai. 2017.

LYRA, Magaly de et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010. Disponível em: <serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/608/945>. Acesso em: 22 mar. 2017.

MACHADO, Livia Cristina; GNOATTO, Shildrey Anne; KLÜPPEL, Maria Lúcia W. LIPOSSOMAS APLICADOS EM FARMACOLOGIA: Uma revisão da literatura. **Estud. Biol.**, Curitiba, v. 29, n. 67, p.215-224, abr./jun. 2007.

MACHADO, Vanderlei Gageiro et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, p.360-368, fev. 2008.

MAESTRELLI, Francesca et al. New "drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes" formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics. **International Journal Of Pharmaceutics**. p. 222-231. 2010.

MO, H. P.; POCHAPSKY, T. C. Intermolecular interactions characterized by nuclear Overhauser effects. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 30, p. 1-38, 1997.

MORAES, Carolina Morales et al. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- β -ciclodextrina. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p.777-784, maio 2007.

MOREIRA, José Ranclenison Lopes. **A nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no tratamento do câncer de mama**. 2013. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

OLIVEIRA, Rita; SANTOS, Delfim; COELHO, Pedro. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, Porto, p.70-83, jun. 2009.

RAJEWSKI, Roger A.; STELLA, Valentino J. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 2. In Vivo Drug Delivery. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 11, p.1142-1169, nov. 1996.

RODRIGUES, Natália Ornellas Lobo. **Estudo da liberação controlada de fármacos por hidrogéis de PVA/ATAPULGITA**. 2012. 54 f. Projeto de TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Materiais, Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

RODRIGUES, Heitor Neto. **Estudo do complexo de inclusão entre anestésico local ropivacaína/2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em lipossomas furtivos**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR. Londrina, 2016.

ROSSI-BERGMANN, Bartira. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 2, p.54-57, abr/mai./jun. 2008.

SANTAELLA, Gustavo Machado. **Soluções anestésicas locais: uma revisão de literatura**. 2011. 61 f. TCC (Graduação) - Curso de Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7^a. ed., Editora LTC, Rio de Janeiro, 2006. 506 p.

SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig Barton. **Química Orgânica 1**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 648 p.

SOUZA, Ligia. **Mistura de lipossomas convencionais e furtivos: estudos farmacocinéticos em camundongos e otimização do processo de encapsulação do antimoniato de meglumina**. Dissertação (Mestrado), 2013. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte –MG, 2013.

TAKAHASHI, Andrea Ikeda. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas**. 2009. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

VINADÉ, Maria Elisabeth do Canto; VINADÉ, Elsa Regina do Canto. **Métodos Espectroscópicos de Análise Quantitativa**. Santa Maria: Editora Ufsm, 2005. 272.

SKANDANI, A. Alipour; ZEINELDIN, R.; AL-HAIK, M.. Effect of Chirality and Length on the Penetrability of Single-Walled Carbon Nanotubes into Lipid Bilayer Cell Membranes. **Langmuir**, v. 28, n. 20, p.7872-7879, 22 maio 2012.

YANG, Shuibing et al. Preparation and Characterization of Nanoliposomes Entrapping Medium-Chain Fatty Acids and Vitamin C by Lyophilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 19763-19773, 2013.

ZUCKER, Daniel; MARCUS, David; BARENHOLZ, Yechezkel; GOLDBLUM, Amiram. Liposome drug's loading efficiency: a working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. **Journal of Controlled Release**, v. 139, p.73–80, 2009.