

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

**Estudos para Obtenção e Caracterização de Sistemas  
Nanoparticulados Contendo Ácido Valpróico e Avaliação  
da Penetração Deste Através da Barreira  
Hematoencefálica**

**ALUNO: RODRIGO JOSÉ FREDDO  
PROF<sup>a</sup> ORIENTADORA: DR<sup>a</sup> TERESA C. T. DALLA COSTA  
PROF<sup>a</sup> CO-ORIENTADORA: DR<sup>a</sup> SILVIA S. GUTERRES**

Porto Alegre, novembro de 2009.



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

Estudos para Obtenção e Caracterização de Sistemas  
Nanoparticulados Contendo Ácido Valpróico e Avaliação  
da Penetração Deste Através da Barreira  
Hematoencefálica

Tese apresentada por  
**Rodrigo José Freddo** para  
obtenção do **Título de**  
**Doutor** em Ciências  
Farmacêutica

Porto Alegre, novembro de 2009.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 02 de setembro de 2009, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck  
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Solange Garcia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

F852s Freddo, Rodrigo José  
Estudos para obtenção e caracterização de sistemas nanoparticulados contendo ácido valpróico e avaliação da penetração deste através da barreira hematoencefálica / Rodrigo José Freddo. – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xviii, 124 p. : il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Ácido valpróico. 2. Nanocápsulas. 3. Quitosana. 4. Polietilenoglicol. 5. Microdiálise. 6. Farmacocinética. 7. Hepatotoxicidade. 8. Penetração cerebral. I. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa. II. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres III. Título.

CDU: 615.2.015.4

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à presença constante da minha família em minha vida. Pai, mãe, muitíssimo obrigado por tudo!

À Michele, minha esposa, por estar do meu lado quando mesmo eu não gostaria de estar. Obrigado pelo seu amor, carinho e apoio incondicional;

À minha irmã e meu cunhado Jocemar, obrigado por estarem presente e me lembrarem de que a vida pode ser menos complicada;

À minha cunhada Daiane e Aurélio, muito obrigado por seguidas vezes me abrigarem e me ajudarem em tempos de dificuldades;

Aos meus sogros, José e Maria Daisi, muito obrigado por nos acolherem de braços abertos;

À professora Dra. Teresa Dalla Costa, gostaria de exprimir minha gratidão, meu respeito e minha admiração. Obrigado por me orientar por mais uma jornada minha na vida acadêmica. Sou muitíssimo grato por isso;

À professora Dra. Silvia Guterres, quero simplesmente dizer que foi um enorme prazer trabalhar com suas orientações e auxílios. Sou muito grato e minha admiração por seu trabalho, caráter e personalidade é enorme;

À banca examinadora, composta pelos professores: Dra. Adriana Raffin Pohlmann, Dra. Solange Cristina Garcia, Dr. Helder Teixeira, Dr. Pedro Fröelich e Dr. Ruy Beck. Muitíssimo obrigado pela disposição em ler e avaliar meu trabalho;

À todos os grandes amigos do Laboratório 405, em especial à minha comadre Bibiana, à Vitória, à Dani, à Sandra, à Flávia, à “loira” Clarissa, ao Moa. Esse trabalho tem o nome de todos vocês. Ao Leandro, ao Liberato, à Karina, à Nataly, à Renata, à Denise, à Letícia Colomé e a todos os outros que fazem parte deste grande laboratório;

Aos meus “irmãos” em Porto Alegre: Fernando Rafalski e Larissa; Clerson, obrigado por abrigarem quando precisei de auxílio. Nunca conseguirei retribuir tamanho

altruísmo e irmandade. Muito obrigado pelos grandes momentos ao “Doctor, doctor” Richard e ao André;

À professora Dra. Stella Rates por abrir as portas de seu laboratório para meus estudos e, acima de tudo, por ter me dado privilégio a satisfação de trabalhar com uma grande pessoa... Mariana Pranke, este trabalho também tem teu nome, muito obrigado por tudo;

Ao meu amigo Márcio e sua esposa Simone. Muito obrigado por tão valiosa amizade. Onde estiverem, podem contar sempre comigo;

A toda a Faculdade de Farmácia da UFRGS e seus funcionários e ao Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Agradeço por ser tão bem acolhido e agradeço da mesma forma por me permitir o convívio com pessoas tão ricas e únicas que me enriqueceram como pessoa.

À Deus, por fim, mas não menos importante. Muito obrigado por ser quem sou.

## RESUMO

### **Estudos Para Obtenção e Caracterização de Sistemas Nanoparticulados Contendo Ácido Valpróico e Avaliação da Penetração Deste pela Barreira Hematoencefálica**

A epilepsia é normalmente a associação de pré-disposição genética e doença ou uma lesão cerebral. Aproximadamente 1 entre 50 a 100 pessoas apresentam essa pré-disposição à convulsões. Um dos fármacos mais prescritos e utilizados para o tratamento de convulsões é o ácido valpróico (AV), tornando-se a medicação de primeira escolha no tratamento da epilepsia infantil por apresentar um amplo espectro de ação, embora apresente efeitos colaterais bastante conhecidos como pancreatite e a hepatotoxicidade, que pode ser fatal. Sistemas nanoparticulados como nanocápsulas, obtidas a partir da utilização de polímeros biodegradáveis como o polietilenoglicol (PEG) e macromoléculas naturais como a quitosana (QS), que proporcionam hidrofília e bioadesividade, têm sido estudadas com o objetivo de aumentar a penetração cerebral e reduzir a dosagem do fármaco. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar físico-quimicamente nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo AV e revestidas com QS (NCQ) e/ou com PEG 6000 (NCP e NCQP), investigar a farmacocinética plasmática, a penetração do AV através da barreira hematoencefálica (BHE) por microdiálise e a hepatotoxicidade em ratos Wistar. Nanocápsulas revestidas com QS (NCQ) foram obtidas pelo método de nanoprecipitação do polímero pré-formado seguido do revestimento com adição de 5 mL de solução de QS a 1%. Para a preparação de NCP, foi utilizada metodologia similar adicionando 0,7% de PEG 6000 na fase aquosa. Para a preparação de NCQP, as nanocápsulas preparadas com a adição de 0,35% de PEG 6000 e revestidas posteriormente com solução de QS a 1% (2,5 mL). As formulações foram caracterizadas físico-quimicamente avaliando-se o tamanho das partículas, potencial zeta, pH e taxa de incorporação. As nanocápsulas foram visualizadas por MET e a estabilidade foi investigada por retroespalhamento de luz (Turbiscan Lab<sup>®</sup>). As formulações (AV 5 mg/mL) apresentaram um pequeno tamanho de partícula ( $144,2 \pm 2,0$  nm,  $153,2 \pm 1,8$  nm, e  $231,3 \pm 15,6$  nm, para NCQ, NCP e NCQP, respectivamente), com baixo índice de polidispersão, alta taxa de incorporação (95 a 98 %), pH ácido, potencial zeta positivo para NCQ ( $+8,7 \pm 0,4$

mV) e negativo para NCP ( $- 6,6 \pm 0,8$  mV) e NCQP ( $- 2,8 \pm 1,3$  mV). As fotomicrografias mostraram partículas de forma esférica e as formulações demonstraram boa estabilidade durante 24h de análise a 40°C. As concentrações plasmáticas foram investigadas em ratos Wistar (15 mg/kg via i.v. de AV) para todas as formulações e valproato sódico (grupo controle). A análise farmacocinética compartimental apresentou uma distribuição muito rápida para o AV em NCQ e a  $ASC_{0-\infty}$  aproximadamente duas vezes menor em comparação à NCP, NCQP e o fármaco livre ( $3874 \pm 1775$ ;  $8280 \pm 2136$ ;  $7849 \pm 1021$  e  $7978 \pm 3622$   $\mu\text{g/mL/min}$ , respectivamente). O *clearance* do AV aumentou significativamente para NCQ ( $0,284 \pm 0,156$  L/h/kg) ( $\alpha = 0,05\%$ ). A penetração do AV através da BHE foi realizada em ratos Wistar acordados por microdiálise (MD) cerebral, no córtex frontal utilizando sondas CMA/12 (3 mm). Os experimentos de MD mostraram um aumento de 5 vezes no fator de penetração cerebral após a administração de NCQ em comparação com o fármaco em solução (0,110 and 0,021, respectivamente), demonstrando a viabilidade da utilização de QS como polímero de revestimento objetivando a BHE. A NCP demonstrou um aumento de 1,7 vezes no fator de penetração cerebral e NCQP não demonstrou qualquer diferença na penetração. A investigação da hepatotoxicidade do AV foi realizada após cinco dias de tratamento (dose de 30 mg/kg q12h de AV) em solução ou em nanocápsulas (NCQ ou NCP) com grupo controle de solução salina. Os níveis séricos de asparto aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamilttransferase (GGT), fosfatase alcalina (FAL), creatinina (CRE) e uréia foram determinados. Os resultados mostram a manutenção dos níveis normais de enzimas hepáticas como a ALT e FAL para NCQ ( $54,2 \pm 11,2$  UI/mL and  $149 \pm 26$  UI/mL) demonstrando um efeito hepatoprotetor não observado para os outros grupos. Análises histológicas do fígado dos animais não apresentaram a formação de esteatose microvesicular para NCQ em comparação com a formação de esteatoses em todos os outros grupos, incluindo o grupo controle. Ao final, os resultados indicaram que NCQ possa ser uma formulação em potencial, necessitando ser investigada pelo aumento da penetração cerebral de AV e efeito hepatoprotetor observados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ácido valpróico, nanocápsulas, quitosana, polietilenoglicol, farmacocinética, microdiálise, penetração barreira hematoencefálica, hepatotoxicidade.



## ABSTRACT

### **Obtention and characterization of nanoparticulated systems loaded with valproic acid and evaluation of its blood-brain barrier penetration**

Epilepsy is usually a combination of genetic pre-disposition and a disease or a brain damage. About 1 in 50 to 100 people has this genetic predisposition to seizures. One of the world's most prescribed drugs to treat epileptic seizures is valproic acid (VA), which is the first choice drug to treat epilepsy in childhood due to its broad spectrum of action, although its well known side effects such as pancreatitis, hepatotoxicity can be fatal. Nanoparticulated systems such as nanocapsules, obtained from biodegradable polymers like polyethylene glycol and natural macromolecules like chitosan, who gives the system hidrophilicity and bioadhesivity, have been used to increase brain penetration and reduce drug doses. In this context, the present work aimed to develop and physicochemically characterize poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules loaded with VA and coated with chitosan (NCQ) and/or polyethylene glycol (PEG) 6000 (NCP and NCQP), and to investigate their plasma pharmacokinetics, VA blood-brain barrier penetration (BBB) by microdialysis and hepatotoxicity in Wistar rats. Nanocapsules coated with chitosan were obtained by nanoprecipitation of preformed polymer followed by coating with 1% chitosan solution added prior to final adjustments at a volume of 5 mL. For NCP preparation, similar methodology was used adding 0.7% PEG 6000 in the aqueous phase. For NCQP preparation, the nanocapsules prepared with PEG 6000 (0.35% w/v) was further coated with chitosan 1% in solution adding 2.5 mL prior to the final adjustments. The formulations were physicochemical characterized by particle size, zeta potential, pH, incorporation efficiency. The particles were visualized by MET and the stability investigated by backscattering (Turbiscan Lab<sup>®</sup>). The formulations (VA 5 mg/mL) presented small particle sizes ( $144.2 \pm 2.0$  nm,  $153.2 \pm 1.8$  nm, and  $231.3 \pm 15.6$  nm, for NCQ, NCP and NCQP, respectively), with low polydispersion index, high incorporation efficiency (95 to 98 %) and acid pH. The zeta potential was positive for NCQ ( $+8.7 \pm 0.4$  mV) and negative for NCP ( $- 6.6 \pm 0.8$  mV) and NCQP ( $- 2.8 \pm 1.3$  mV). The photomicrography of all formulations showed spherically shaped particles. The formulations showed good stability during 24 hours investigation at 40 °C. Plasma concentrations were investigated in Wistar rats after 15 mg/kg i.v. dosing of

all formulations and sodium valproate solution (control group). The pharmacokinetic compartmental analysis showed a very rapid distribution of VA when incorporated in NCQ in comparison to the other formulations and the  $AUC_{0-\infty}$  about two times lower in comparison to NCP, NCQP and the drug alone ( $3874 \pm 1775$ ;  $8280 \pm 2136$ ;  $7849 \pm 1021$  and  $7978 \pm 3622$   $\mu\text{g/mL/min}$ , respectively). VA clearance was significantly increased after NCQ dosing ( $0.284 \pm 0.156$  L/h/kg) ( $\alpha = 0.05$  %). Drug penetration through BBB was performed in awaken Wistar rats by brain microdialysis at the frontal cortex using CMA/12 probes (3 mm). The microdialysis experiments showed a five times increase in VA brain penetration factor after NCQ administration in comparison to drug alone (0.110 and 0.021, respectively), demonstrating the viability of chitosan as coating polymer to aim the BBB. NCP showed only a 1.7 times increase in brain penetration factor and NCQP did not showed any difference in comparison to drug alone. The investigation of drug hepatotoxicity was conducted after 5 days i.v. dosing of VA 30 mg/kg q12h as solution or nanocapsules (NCQ or NCP). A saline control group was also investigated. Serum levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, alkaline phosphatase, creatinin and urea were determined. The results showed the maintenance of normal levels of hepatic enzymes such as alanine aminotransferase and alkaline phosphatase for NCQ ( $54.2 \pm 11.2$  IU/mL and  $149 \pm 26$  IU/mL) showing a hepatoprotective effect not observed in the other groups investigated. Histological analysis of animals livers showed no microvesicular steatosis formation when NCQ was administered in comparison with the formation of steatosis in all other groups including control. Overall the results indicate that NCQ is a potential formulation to be investigated for the treatment of epilepsy due to its increase in VA brain penetration and hepatoprotective effect observed.

**KEYWORDS:** Valproic acid, nanocapsules, chitosan, polyethylene glycol, pharmacokinetics, microdialysis, blood-brain barrier penetration, hepatotoxicity

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina Aminotransferase  
AST – Aspartato Aminotransferase  
AV – Ácido Valpróico  
BHE – Barreira Hematoencefálica  
BrMMc - 4-(Bromometil)-7-metoxicumarina  
CECC – Células Endoteliais de Capilares Cerebrais  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
CRE – Creatinina  
FAL – Fosfatase Alcalina  
FCE – Fluido Cerebroespinal  
FDA – *Food and Drug Administration*  
GABA – Ácido  $\gamma$ -Aminobutírico  
GGT -  $\gamma$ -Glutamilttransferase  
LPP – Ligação a Proteína Plasmática  
LS – Lipossomas  
MD – Microdiálise  
MRP – Proteína Multiresistente  
NC – Nanocápsulas  
NCP – Nanocápsulas Revestidas com Polietilenoglicol 6000  
NCQ – Nanocápsulas Revestidas com Quitosana  
NCQP – Nanocápsulas Revestidas com Quitosana e Polietilenoglicol 6000  
NE – Nanoesferas  
NLS – Nanopartículas Lipídicas Sólidas  
PCL – Poli( $\epsilon$ -caprolactona)  
PEG – Polietilenoglicol  
PgP – Glicoproteína P  
PHDCA – Poli(cianoacrilato de hexadecila)  
QS – Quitosana  
RD – Recuperação Relativa por Retrodiálise  
Receptor-LDL – Receptor de Lipoproteínas de Baixa Densidade  
RR – Recuperação Relativa por Diálise

SFM – Sistema Fagocitário Mononuclear

SNC – Sistema Nervoso Central

TEA - Trietilamina

UDFGTs – Uridina Difosfato Glicuronil Transferases

VS – Valproato Sódico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do ácido valpróico.....	16
<b>Figura 2.</b> Transportadores e receptores específicos da barreira hematoencefálica.....	24
<b>Figura 3.</b> Representação gráfica da relação permeabilidade cerebrovascular/coeficiente de partição n-octanol:água de algumas substâncias .....	25
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do etilenoglicol.....	29
<b>Figura 5.</b> Estrutura química da quitina.....	32
<b>Figura 6.</b> Estrutura química da quitosana.....	33
<b>Figura 7.</b> Esquema para a reação de derivatização do AV (A) com BrMMc (B) formando o derivado fluorescente (C).....	53
<b>Figura 8.</b> Representação da reação de obtenção do valproato sódico.....	54
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão para a formulação NCQ. (a) aumento de 100.000 vezes e (b) aumento de 200.000 vezes.....	62
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão para a formulação NCP 6000. (a) aumento de 100.000 vezes e (b) aumento de 200.000 vezes.....	63
<b>Figura 11.</b> Gráfico de retroespalhamento obtido por Turbiscan® da formulação NCQ a 40 °C por 24h. a) representa o fundo da cubeta, b) representa a parte de cima da cubeta.....	64
<b>Figura 12.</b> Gráfico de retroespalhamento obtido por Turbiscan® da formulação NCP a 40 °C por 24h. a) representa o fundo da cubeta e b) representa a parte superior da cubeta.....	65
<b>Figura 13.</b> Gráfico de retroespalhamento obtido por Turbiscan® da formulação NCQP a 40 °C por 24h. a) representa o fundo a cubeta e b) representa a parte superior da cubeta.....	66
<b>Figura 14.</b> Perfis de concentração plasmática por tempo do AV livre, formulação NCQ, em formulação NCP e NCQP após administração de uma dose i.v. de 15 mg/kg do fármaco .....	67
<b>Figura 15.</b> Determinação das taxas de recuperação das sondas de MD por retrodiálise (RD) – para as concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL para 3 velocidades	

de perfusão e por diálise (RR) – para as concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL para 3 velocidades de perfusão.....	74
<b>Figura 16.</b> Perfis de concentração tecidual livre do fármaco por tempo obtidos por MD cerebral em ratos Wistar acordados após administração i.v. do AV livre, na formulação NCQ e na formulação NCP e NCQP em uma dose equivalente a 15 mg/kg.....	76
<b>Figura 17.</b> Cortes histológicos de fígados de ratos tratados com a) formulação branca (sem presença do fármaco). Os espaços que aparecem em branco são causados por degeneração gordurosa (esteatose hepática) em menor grau. b) solução salina, apresenta esteatose microvesicular em grau mais avançado. c) valproato sódico em solução, apresenta esteatose hepática em grau mais avançado. d) NCP. Esteatose hepática em um grau menor. e) NCQ. Evidencia-se a manutenção da estrutura normal dos hepatócitos não apresentando esteatose hepática.....	84
<b>Figura 18.</b> Cromatograma obtido para a solução em acetonitrila (branco) contendo os reagentes para derivatização (triethylamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina).....	106
<b>Figura 19.</b> Cromatograma obtido para a solução em acetonitrila da curva de calibração contendo AV na concentração de 4 µg/mL e os reagentes para derivatização (triethylamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina).....	107
<b>Figura 20.</b> Cromatograma obtido para a solução em acetonitrila contendo AV na amostra de formulação NCP 6000 e os reagentes para derivatização (triethylamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina) – determinação do teor de fármaco na formulação.....	107
<b>Figura 21.</b> Média das 6 curvas de calibração confeccionadas para validação de metodologia de análise de AV em solução de acetonitrila.....	108
<b>Figura 22.</b> Cromatograma obtido para amostra de plasma (branco) contendo os reagentes para derivatização (triethylamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina).....	112
<b>Figura 23.</b> Cromatograma obtido para amostra de plasma da curva de calibração contendo AV na concentração de 100 µg/mL (a) e padrão interno na concentração de 100 µg/mL (b) e os reagentes para derivatização (triethylamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina).....	113
<b>Figura 24.</b> Cromatograma obtido para amostra de plasma contendo AV (a) após administração de dose de 15 mg/kg e coletado aos 180 min contendo padrão interno	

na concentração de 100 µg/mL (b) e os reagentes para derivatização (triethylamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina).....113

**Figura 25.** Média das 6 curvas de calibração confeccionadas para validação de metodologia de análise de AV em plasma.....114

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Doses de AV recomendadas em crianças de diferentes idades e pesos ( $C_{\min}^{SS} \cong 60 \mu\text{g/mL}$ ) tratadas em monoterapia.....	19
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros farmacocinéticos plasmáticos de VS em ratos após administração oral de 100 mg/kg associado ou não ao salicilato de sódio (via i.v.) e ácido salicílico (via oral) na dose de 100 mg/kg.....	20
<b>Tabela 3.</b> Outros efeitos farmacodinâmicos do Valproato.....	21
<b>Tabela 4.</b> Propriedades físico-químicas de diferentes tipos de nanopartículas de quitosana (QS) contendo Z-DEVD-FMK.....	31
<b>Tabela 5.</b> Composição quali e quantitativa das formulações de NC investigadas	43
<b>Tabela 6.</b> Caracterização físico-química das formulações NCQ, NCP e NCQP...	59
<b>Tabela 7.</b> Avaliação não-compartimental dos perfis plasmáticos do AV livre e nanoencapsulado após a administração de uma dose de 15 mg/kg de fármaco pela via intravenosa.....	68
<b>Tabela 8.</b> Avaliação compartimental da farmacocinética do AV livre e nanoencapsulado em plasma após administração de uma dose de 15 mg/kg de fármaco pela via intravenosa.....	70
<b>Tabela 9.</b> Taxa de recuperação das sondas de MD determinadas por recuperação relativa por retrodiálise (RD).....	73
<b>Tabela 10.</b> Taxa de recuperação das sondas de MD determinadas por recuperação relativa por diálise (RR).....	73
<b>Tabela 11.</b> Parâmetro farmacocinéticos obtidos por avaliação não-compartimental dos perfis cerebrais de AV após a administração da solução e das nanocápsulas na dose de 15 mg/kg via i.v. <i>bolus</i> .....	76
<b>Tabela 12.</b> Análise bioquímica da função hepática após a administração de AV em solução e nanoencapsulado pela via i.v. <i>bolus</i> em dose equivalente de 30 mg/kg, solução salina e formulação branca a cada 12h.....	79
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros fisiológicos de ratos Wistar machos como valores de referência.....	81
<b>Tabela 14.</b> Valores de precisão intra-dia - desvio padrão relativo – Dia 1.....	108
<b>Tabela 15.</b> Valores de precisão intra-dia - desvio padrão relativo – Dia 2.....	109
<b>Tabela 16.</b> Valores de precisão inter-dia - desvio padrão relativo.....	109



<b>Tabela 17.</b> Valores de exatidão calculados para os pontos controle das curvas de calibração.....	110
<b>Tabela 18.</b> Valores de precisão intra-dia - desvio padrão relativo – Dia 1.....	115
<b>Tabela 19.</b> Valores de precisão intra-dia - desvio padrão relativo – Dia 2.....	115
<b>Tabela 20.</b> Valores de precisão inter-dia - desvio padrão relativo.....	115
<b>Tabela 21.</b> Valores de exatidão calculados para os pontos controle das curvas de calibração.....	116

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>01</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>09</b>
	<b>2.1 Objetivos Gerais.....</b>	<b>11</b>
	<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
	<b>3.1 A Epilepsia.....</b>	<b>15</b>
	<b>3.2 O Ácido Valpróico (AV).....</b>	<b>16</b>
	3.2.1 Farmacocinética.....	17
	3.2.2 Farmacodinâmica.....	20
	3.2.3 Hepatotoxicidade.....	21
	<b>3.3 A Barreira Hematoencefálica (BHE).....</b>	<b>22</b>
	<b>3.4 Novas Tecnologias para Liberação de Fármacos Através da BHE.....</b>	<b>26</b>
	3.4.1 Polietilenoglicol.....	28
	3.4.2 Quitosana.....	32
	<b>3.5 Avaliação da Passagem de Fármacos pela BHE.....</b>	<b>34</b>
	3.5.1 Cultura de células.....	34
	3.5.2 Microdiálise.....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
	<b>4.1 Materiais.....</b>	<b>41</b>
	4.1.1 Componentes da formulação.....	41
	4.1.2 Componentes e reagentes analíticos.....	41
	4.1.3 Componentes, soluções e animais para experimentos de microdiálise.....	41
	4.1.4 Componentes, soluções e animais para experimentos farmacocinéticos em plasma.....	42
	<b>4.2 Aparelhos e Equipamentos.....</b>	<b>42</b>
	<b>4.3 Métodos.....</b>	<b>43</b>

4.3.1	Obtenção e caracterização físico-química das nanocápsulas (NC).....	43
4.3.2	Purificação da quitosana.....	45
4.3.3	Caracterização das nanocápsulas de AV.....	45
4.3.3.1	Diâmetro de partícula e potencial zeta.....	45
4.3.3.2	Forma das partículas.....	45
4.3.3.3	Taxa de associação do AV às nanocápsulas.....	47
4.3.3.4	Análises de espalhamento múltiplo.....	47
4.3.3.5	Determinação do pH.....	47
4.3.3.6	Comparação estatística dos parâmetros físico-químicos das formulações.....	47
4.3.4	Farmacocinética no plasma e avaliação da penetração do AV no tecido cerebral de ratos.....	47
4.3.4.1	Experimentos farmacocinéticos.....	48
4.3.4.2	Experimentos de MD cerebral.....	48
4.3.4.3	Determinação dos parâmetros farmacocinéticos.....	50
4.3.4.5	Análise Estatística.....	51
4.3.5	Avaliação da hepatotoxicidade e nefrotoxicidade do AV livre e nanoencapsulado em ratos.....	51
4.3.6	Metodologia analítica para quantificação do AV por CLAE.....	52
4.3.7	obtenção do valproato sódico a partir do ácido valpróico.....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
	<b>5.1 Caracterização Físico-Química das Suspensões de Nanocápsulas Contendo Ácido Valpróico.....</b>	<b>59</b>
	5.1.1 Parâmetros físico-químicos.....	59
	5.1.2 Estabilidade das formulações.....	63
	<b>5.2. Farmacocinética do AV Livre e Encapsulado no Plasma.....</b>	<b>66</b>
	<b>5.3. Penetração Cerebral do AV.....</b>	<b>72</b>
	<b>5.4 Análise da Função Hepática e Renal.....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>

<b>ANEXOS.....</b>	<b>105</b>
<b>Anexo 1: Validação de Metodologia Analítica em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Determinação de AV em Solução.....</b>	<b>105</b>
<b>Anexo 2: Validação de Metodologia Analítica em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Determinação de AV em Plasma.....</b>	<b>111</b>
<b>Anexo 3: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS.....</b>	<b>117</b>
<b>Anexo 4: Perfis Farmacocinéticos Plasmáticos em Função do Tempo Individuais Modelados pelo Programa <i>Scientist 2. 0</i><sup>®</sup>.....</b>	<b>121</b>

## **1. Introdução e Justificativa**



A epilepsia é uma alteração na atividade elétrica do cérebro, temporária e reversível, que produz manifestações motoras, sensitivas, sensoriais, psíquicas ou neurovegetativas (disritmia cerebral paroxística), podendo provocar graves conseqüências, incluindo morte súbita, ferimentos, problemas psicológicos e transtornos mentais. Também se associa a problemas sociais e econômicos, podendo ser considerada um problema de saúde pública significativo. A presença de epilepsia é definida pela recorrência de crises epiléticas (pelo menos duas) espontâneas (não provocadas por febre, drogas ou desequilíbrios toxicometabólicos graves) (MARCHETTI *et al.*, 2005).

A causa da epilepsia é usualmente uma combinação de predisposição genética e algum tipo de doença ou dano cerebral, sendo que a porcentagem de pacientes com epilepsia determinada geneticamente é pequena, ainda que genes responsáveis por esta condição tenham sido identificados. Deste modo, a grande maioria dos estados epiléticos é determinada por fatores externos em conjunção com traços genotípicos (SANDER, 1996). Pode-se dizer que cerca de 1 a cada 50 a 100 pessoas tem predisposição hereditária à epilepsia (GUYTON e HALL, 1996).

Os fatores mais comuns para o surgimento de convulsões epiléticas são danos cerebrais pré-natais (8%), trauma craniano (6%), tumores cerebrais (4%), doenças degenerativas cerebrais (3,5%) e infecções (2,5%), além de derrames (11%) (BEN-MENACHEM, HENRIKSEN, JOHANSSSEN, 1999). Ainda que qualquer local do tecido cerebral possa desencadear estados convulsivos por hiperexcitação, o monitoramento a partir de um eletroencefalograma aponta para ativação anormal do tálamo, bem como do córtex cerebral e do próprio sistema ativador (GUYTON e HALL, 1996).

Cerca de cinquenta milhões de pessoas são acometidas no mundo, sendo que desse número, quarenta milhões encontram-se vivendo em países em desenvolvimento. Pessoas de todas as raças, sexos, condições socioeconômicas e regiões são acometidas. Apesar desse cenário alarmante, a Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que 70% dos novos casos diagnosticados podem ser tratados com sucesso, desde que a medicação seja usada de forma correta (SCOTT *et al.*, 2001).

Para o tratamento das crises convulsivas, um dos fármacos mais utilizados é o ácido valpróico (AV) que, mesmo apresentando graves efeitos adversos como pancreatite, hepatotoxicidade e alopecia, continua a ser prescrito no mundo todo (FISCHER e JO, 2002). Este fármaco também é muito utilizado como terapia de primeira escolha no tratamento da epilepsia infantil, devido ao seu amplo espectro de ação, sendo eficaz em convulsões generalizadas, de ausência e mioclônicas (SERRANO *et al.*, 1999).

Um dos problemas da terapêutica utilizando AV reside na alta variabilidade das concentrações necessárias para que se apresente o efeito esperado, pois a mesma dose usual (15 mg/kg/dia) pode apresentar uma variação nas concentrações plasmáticas interpacientes entre 50 a 100 µg/mL. Com os aumentos na dose usual para atingir as concentrações terapêuticas podem ocorrer problemas maiores de toxicidade, uma vez que a taxa de ligação a proteínas plasmáticas, que é de 80 a 95 %, tende a diminuir com o aumento das concentrações plasmáticas (MONOGRAFIA DO FÁRMACO, 2005).

Outro problema relatado para o AV é a sua alta velocidade de efluxo a partir da barreira hematoencefálica (BHE) ( $k = 0,712 \text{ min}^{-1}$ ), em comparação com a água ( $k = 0,572 \text{ min}^{-1}$ ), determinada por Cornford e colaboradores (1985) a partir da sua penetração no tecido cerebral. Esse processo de efluxo de fármacos a partir do sistema nervoso central (SNC) compromete a manutenção de níveis efetivos do fármaco nesse local e está diretamente ligado a transportadores de membrana presentes na BHE como a glicoproteína-P (PgP) e a proteína multi-resistente à fármacos (MRP) (MERTSCH e MAAS, 2002).

Desse modo, a efetividade e segurança terapêutica do AV são comprometidas, primeiramente porque as concentrações efetivas alcançadas no SNC não se relacionam diretamente com as concentrações plasmáticas obtidas a partir da administração da dose usual, demonstrando que o monitoramento terapêutico das concentrações plasmáticas é insuficiente para garantir o sucesso da terapia. Em segundo lugar, o processo de passagem do fármaco através da BHE e sua velocidade de efluxo podem vir a acarretar em ineficácia do AV no tratamento das crises convulsivas.



Adicionalmente, as crises convulsivas epiléticas afetam as funções normais do tecido cerebral, sendo fator determinante para o rompimento da integridade da BHE, facilitando a passagem de substâncias tóxicas endógenas e exógenas que podem afetar ainda mais o funcionamento normal do cérebro, agravando o quadro clínico (CORNFORD, 1999).

Para a proteção do SNC contra a penetração de substâncias exógenas, sua microcirculação é regulada por interações parácrinas de todo o tipo de células, tais como células endoteliais de capilares cerebrais, astrócitos, perócitos, microglia e neurônios. Como a distância entre estas células é de aproximadamente 20 nm, esta proximidade faz com que neurônios influenciem as células endoteliais a formarem uma barreira rígida (MERTSCH e MAAS, 2002). A BHE é uma barreira membranosa que separa eficientemente o cérebro do sangue circulante, sendo formada por células endoteliais rigidamente justapostas com total ausência de atividade pinocítica e restringindo trocas moleculares somente por transporte transcelular (CALVO *et al.*, 2001). Esta barreira fisiológica limita o acesso de fármacos como antibióticos, antineoplásicos, neuropeptídeos, entre outros, principalmente compostos hidrofílicos ao tecido cerebral e, mais precisamente, aos locais de ação dentro desse impedindo muitas vezes o tratamento terapêutico de doenças que atingem o SNC (KREUTER, 2001; LOHMAN, HÜWEL e GALLA, 2002).

Para que fármacos em geral possam alcançar de forma mais eficaz os respectivos locais de ação no SNC, iniciou-se o desenvolvimento e a avaliação de sistemas nanoparticulados como lipossomas, nanopartículas e nanocápsulas, obtidas utilizando-se polímeros biodegradáveis ou macromoléculas naturais (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000).

Diversos estudos relatados na literatura demonstram a eficiência da utilização de nanopartículas para promover a passagem de agentes anestésicos como a dalargina e a citorfina, através da BHE. Estes anestésicos foram escolhidos para estudo por exibirem efeitos terapêuticos somente quando administrados diretamente no SNC. Se a administração do fármaco livre fosse periférica, os mesmos não apresentariam efeitos anestésicos. Porém, quando incorporados às nanocápsulas, foram hábeis para transpor a BHE e apresentar efeito farmacológico (LOCKMAN *et al.*, 2002).

Um dos problemas mais comuns da utilização de sistemas nanoparticulados está relacionado com o processo de opsonização que se refere ao reconhecimento e captura das nanopartículas, uma vez ligadas às proteínas plasmáticas, pelos macrófagos do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM), retirando-as mais rapidamente da circulação e, assim, determinando um tempo menor de exposição do fármaco encapsulado no local de ação (OWENS III e PEPPAS, 2006).

Com o intuito de diminuir este processo de “captura” das nanopartículas pelo SFM e, conseqüentemente, melhorar a chegada desses sistemas ao local de ação, novas estratégias tecnológicas foram propostas na literatura, como o revestimento destas estruturas com, por exemplo, polietilenoglicol, que confere características hidrofílicas ao sistema e, assim, não reduz efetivamente seu reconhecimento pelos macrófagos, possibilitando que as partículas alcancem outros tecidos no organismo, aumentando o seu tempo de meia-vida de circulação (CALVO *et al.*, 2001). De outro modo, mas com o mesmo objetivo quando da utilização de polietilenoglicol, isto é, objetivando alcançar concentrações mais efetivas em tecidos alvo, pode-se utilizar a quitosana, um polímero natural que confere carga positiva às nanopartículas, aumenta a estabilidade das mesmas além de garantir maior bioadesividade a mucosas e epitélios (CALVO *et al.*, 1997).

Para fins de quantificação da passagem de substâncias pela BHE a microdiálise (MD) tem sido utilizada com sucesso na área de neurociências (DEGUCHI e MORIMOTO, 2001). Esta técnica de amostragem *in vivo* permite a quantificação da fração livre do fármaco no local de ação, o que proporciona melhor avaliação da potencialidade de ação. Como a sonda de MD não causa mudanças significativas na fisiologia do tecido ou órgão em que se encontra inserida, sua utilização garante resultados equivalentes à situação fisiológica normal (HAMMARLUND- UDENAES, PAALZOW e de LANGE, 1997).

A MD cerebral é realizada através da implantação, em local específico do tecido cerebral, de uma sonda dotada de membrana semi-permeável que é continuamente irrigada e permite, por processo de difusão, a coleta de solutos presente no tecido. A inserção da sonda no cérebro do animal anestesiado em experimentação é feita através de processo cirúrgico com o auxílio de aparelho

estereotáxico. Após um período de recuperação do animal, que varia de 48 a 72 h, o experimento de MD é conduzido com o animal acordado e em movimento por períodos de tempo pré-determinados, que possibilitam monitorar todo o processo cinético da substância em investigação (BICKEL, 2005). A MD permite, portanto, a avaliação da penetração de fármacos em diversas regiões do cérebro, podendo ser utilizada para comparar diferenças na distribuição e eliminação de moléculas administradas livres ou nanoencapsuladas.

Diante de problemas relatados para o AV, fármaco utilizado para o tratamento da epilepsia, como sua conhecida hepatotoxicidade, sua baixa penetração e seu problema de efluxo a partir do SNC dificultando o alcance de concentrações efetivas do mesmo no local e ainda sua alta variabilidade interpacientes, o objetivo da presente tese de doutorado foi desenvolver sistemas nanoparticulados contendo AV revestidos com polietilenoglicol ou quitosana estáveis e avaliá-los tanto do ponto de vista tecnológico quanto farmacocinético, visando determinar se as nanopartículas alteram a disposição do fármaco no plasma e no cérebro. Esses novos sistemas visam o aumento da penetração do fármaco no SNC, que será avaliada por MD cerebral em animais acordados.

Cabe ressaltar que o objetivo de empregar nanocápsulas é manter concentrações maiores, mais efetivas e por mais tempo do AV no SNC, com redução da dose total administrada visando minimizar os efeitos colaterais e tóxicos pronunciados deste fármaco e assim, contribuir para o planejamento de nova forma farmacêutica para administração deste fármaco que apresente características de eficácia e segurança.



## **2. Objetivos**



## **2.1 Objetivos Gerais**

- Desenvolver e avaliar suspensões de nanocápsulas revestidas com quitosana (NCQ) e nanocápsulas peguiladas (NCP) contendo ácido valpróico (AV) com a finalidade de aumentar a penetração deste pela barreira hematoencefálica.

## **2.2 Objetivos Específicos**

- Preparar e caracterizar sistemas nanoparticulados, contendo AV revestidos com quitosana ou com poli(etilenoglicol);
- Avaliar o perfil farmacocinético plasmático do AV em roedores após a administração intravenosa das suspensões de nanocápsulas selecionadas;
- Avaliar a penetração cerebral do AV administrado em nanocápsulas, através de microdiálise cerebral em ratos acordados;
- Avaliar a hepatotoxicidade em ratos, após o tratamento com o fármaco livre e nanoencapsulado.





### **3. Revisão da Literatura**



### 3.1 A Epilepsia

Segundo Anderson e Kissane (1982), a epilepsia é definida como um estado funcional anormal que se caracteriza por descargas neuronais incontroláveis e, segundo o ponto de vista clínico, por crises convulsivas com ou sem perda de consciência. Em sua forma idiopática, que tanto pode ser chamada de primária ou essencial, apresenta como alterações somente as ligadas à hipóxia que acompanham os ataques. Na forma secundária (sintomática) de epilepsia, podem estar associadas à uma grande variedade de doenças que afetam o SNC. Em ambas as formas observa-se perda de células no setor de Sommer do hipocampo associada a uma astrocitose reativa.

A convulsão epilética apresenta descargas elétricas de alta voltagem sincrônicas que são típicas da fase tônica do processo e que ocorrem por todo o córtex ao mesmo tempo nos dois hemisférios cerebrais. Isto comprova que o circuito neuronal anormal responsável pelo ataque implica fortemente as regiões basais do cérebro que impulsionam o córtex (GUYTON & HALL, 1996).

Esta excitação anormal das células cerebrais no foco epileptogênico e ao redor deste pode ser notada no início da convulsão se a atividade epilética permanece localizada por algum tempo. Os pacientes podem, portanto, apresentar sintomas motores, somatosensitivos, autonômicos ou outros sintomas sensoriais ou psíquicos dependendo da localização do foco epilético (BEN-MENACHEM, HENRIKSEN, JOHANNESSEN, 1999).

A crise convulsiva ainda apresenta o efeito de aumentar a permeabilidade do endotélio cerebral e modificar as propriedades restritivas da BHE, podendo fazer com que haja a passagem de substâncias tóxicas para o SNC (BEN-MENACHEM, HENRIKSEN, JOHANNESSEN, 1999).

### 3.2 O Ácido Valpróico (AV)

Quimicamente designado como ácido 2-propilvalérico ou ácido 2-propilpentanóico, o ácido valpróico (Figura 1) é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de diferentes estados convulsivos (MARTINDALE, 1999). Por sua estrutura química apresentar-se inteiramente diferente em relação aos outros fármacos anticonvulsivantes, não pode ser classificado juntamente com nenhum desses (COMMITTEE ON DRUGS, 1982).

O ácido valpróico (AV) apresenta-se como um líquido quase incolor e de odor característico, com ponto de ebulição de 219,5 °C, densidade relativa de 0,9215 g/mL, pKa de 4,6 e peso molecular de 144,21 g/mol. É bastante solúvel em solventes orgânicos e também solúvel em água (1,3 mg/mL). A Dose Letal 50 (LD<sub>50</sub>) em ratos é de 670 mg/kg. Foi comercializado inicialmente pelos Laboratórios ABBOTT® sob o nome comercial de Depakene®, apresentando-se também na forma de sais de sódio e de magnésio.

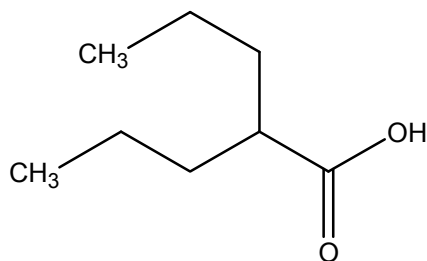


Figura 1. Estrutura química do ácido valpróico.

O AV é indicado como terapia de primeira escolha em crises epiléticas parciais secundariamente generalizadas, em crises generalizadas de ausência, crises mioclônicas, tônicas, clônicas e tônico-clônicas. Como terapia de segunda escolha, está indicado para casos de convulsões parciais com generalização (FUCHS, WANNMACHER e FERREIRA, 2004; BEN-MENACHEM, HENRIKSEN e JOHANSEN, 1999).

O AV é um fármaco importante no tratamento da epilepsia infantil. Por apresentar amplo espectro terapêutico e perfil de segurança minimamente aceitável frente a sua efetividade, torna-se de primeira escolha em pacientes pediátricos para

o tratamento de crises múltiplas e espasmos infantis (BEN-MENACHEM, HENRIKSEN e JOHANSEN, 1999).

O FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou seu uso e de seus derivados para o tratamento de episódios de mania associados ao distúrbio bipolar e para o tratamento, em monoterapia ou em associação, de pacientes com convulsões parciais complexas, de ausência ou simples e para profilaxia da enxaqueca (DeVANE, 2003). O problema da sua utilização reside na alta variabilidade na relação entre dose e concentrações plasmáticas alcançadas, que é atribuído a diferenças interpacientes na depuração do fármaco, e na ocorrência de graves efeitos colaterais (SERRANO *et al.*, 1999).

### 3.2.1 Farmacocinética

O AV é comercializado na forma de cápsulas gelatinosas moles e é rapidamente absorvido pela via oral, alcançando picos de concentração plasmática em torno de 4 h, sendo que a absorção pode ser retardada pela alimentação. Em adultos, a terapia inicia usualmente com doses diárias de 10 a 15 mg/kg que podem ser aumentadas lentamente até um máximo de 30 a 60 mg/kg, dependendo de cada paciente. As concentrações plasmáticas alcançadas, em geral, não apresentam uma correlação nem com o controle das crises epiléticas nem com a toxicidade, embora muitos pacientes necessitem concentrações plasmáticas acima de 50 µg/mL para obter efetividade no tratamento (COMMITTEE ON DRUGS, 1982).

O fármaco é extensamente biotransformado no fígado (12 metabólitos identificados em humanos e 16 metabólitos identificados em animais), em grande parte pela glicuronidação, sendo que outros fármacos podem induzir as enzimas microsossomais hepáticas e aumentar sua biotransformação. É excretado majoritariamente pela urina na forma de seus metabólitos (YU *et al.*, 1995; LÖSCHER, 1999). A biotransformação é mediada por enzimas conhecidas como uridina difosfato glicuronil transferases (UDFGTs), sendo que aproximadamente 50% da dose administrada é excretada na urina como conjugado glicuronídeo. Apenas dois metabólitos (4-eno-valproato e 2,4-dieno-valproato) são produzidos pelo complexo citocromo P-450 e são potencialmente hepatotóxicos. Outra rota de biotransformação é a  $\beta$ -oxidação mitocondrial (40% da dose de AV) que produz os

metabólitos 2-eno-valproato e 3-oxo-valproato, este último com atividade anticonvulsivante, porém em concentrações insignificantes determinadas no plasma (DeVANE, 2003). Apesar do AV apresentar uma estrutura molecular simples o processo de biotransformação do mesmo é bastante complexo, mostrando-se menos intenso na Fase I, onde o fármaco é biotransformado pelas enzimas do complexo citocromo P450, em suas isoformas CYP2C9, CYP2A6 e CYP2B6, mas em menos de 10 % da dose inicial. Já a fase II de biotransformação responde pela maior quantidade de metabólitos formados divididos entre os processos de glicuronidação (30 a 50 %) e  $\beta$ -oxidação mitocondrial (aproximadamente 40 %) (SILVA *et al.*, 2008).

Como a ligação às proteínas plasmáticas (LPP) é concentração dependente, quando se alcançam concentrações plasmáticas totais ( $C_{p\text{Total}}$ ) de 50  $\mu\text{g/mL}$  a taxa de ligação varia em torno de 90 a 95%, decaindo com  $C_{p\text{Total}}$  acima de 100  $\mu\text{g/mL}$ , para 80 a 85%. Como a faixa de concentração plasmática terapêutica do AV varia de indivíduo para indivíduo e situa-se entre 40 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , para uma dose oral de 15 mg/kg em adultos, é importante entender que quanto maior for a dose necessária para obter concentrações eficazes, maior é o risco de surgirem efeitos adversos relacionados ao fármaco. O volume de distribuição é de 0,1 a 0,2 L/kg, o tempo de meia-vida varia entre 5 a 20 h e a depuração é de aproximadamente 11,4 mL/min (MONOGRAFIA DO FÁRMACO, 2005; ZACCARA *et al.*, 1988). Em crianças, o tempo de meia-vida varia em torno de 6 a 18 h (COMMITTEE ON DRUGS, 1982).

Uma vez que esse fármaco é muito utilizado na terapêutica da epilepsia em crianças, Serrano e colaboradores (1999) publicaram um estudo no qual foram avaliadas 255 crianças que utilizavam AV, com variação de idade e sexo, utilizando ou não carbamazepina como medicação concomitante. Os resultados obtidos por estes pesquisadores encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1. Doses de AV recomendadas em crianças de diferentes idades e pesos ( $C_{min}^{SS} \cong 60 \mu\text{g/mL}$ ) tratados em monoterapia.

Idade (anos)	Peso Médio (kg)	Dose (mg/kg/dia)	Depuração (CL)		$C_{min}^{SS}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
			(L/h)	(mL/h/kg)	
2	12	35	0,212	17,67	60,51 $\pm$ 23,22
4	18	27	0,262	14,56	60,05 $\pm$ 22,54
6	21	25	0,286	13,62	60,51 $\pm$ 22,46
8	25	22	0,311	12,44	59,30 $\pm$ 22,03
10	32	20	0,361	11,28	60,82 $\pm$ 22,10
12	40	17	0,403	10,08	59,33 $\pm$ 21,63
14	50	16	0,463	9,26	61,46 $\pm$ 21,87

$C_{min}^{SS}$  – Concentração plasmática mínima no *steady state*. Adaptado de Serrano *et al.*, 1999.

O estudo demonstrou a necessidade de monitoramento terapêutico do AV devido a variabilidade de sua depuração, que gradualmente decresce com o aumento da idade do paciente. A associação da carbamazepina ao tratamento faz com que se obtenha um aumento na depuração de AV de aproximadamente 36% (SERRANO *et al.*, 1999).

Dados de farmacocinética do AV em ratos foram relatados por Ohshiro e colaboradores (2003), que compararam alguns parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração de valproato sódico (VS) via oral em ratos Sprague-Dawley machos (n = 5), na dose 100 mg/kg, associado ou não ao salicilato de sódio via i.v. ou ácido salicílico via oral. Os resultados obtidos para pico de concentração máxima ( $C_{MAX}$ ), tempo para pico de concentração máxima ( $t_{MAX}$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e área sob a curva ( $ASC_{0-\infty}$ ) estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos plasmáticos de valproato sódico em ratos após administração oral de 100 mg/kg associado ou não ao salicilato de sódio (via i.v.) e ácido salicílico (via oral) na dose de 100 mg/kg.

Tratamento	$t_{MÁX}$ (h)	$C_{MÁX}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$t'_{1/2}$ (h)	$ASC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g/mL/h}$ )
VS	0,44 $\pm$ 0,04	139,6 $\pm$ 15,9	0,53 $\pm$ 0,13	152,4 $\pm$ 14,3
VS + salicilato de sódio	0,35 $\pm$ 0,06	59,7 $\pm$ 15,7	0,36 $\pm$ 0,05	65,6 $\pm$ 15,9
VS + ácido salicílico	0,30 $\pm$ 0,05	88,1 $\pm$ 8,3	0,33 $\pm$ 0,04	72,6 $\pm$ 5,2

Adaptado de Oshihiro *et al.*, 2003.

Este estudo demonstrou que a associação do valproato sódico com salicilato de sódio ou com ácido salicílico acarreta em uma diminuição de todos os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos do VS, em comparação com sua administração sem associação. A associação do AV com doses repetidas de ácido acetilsalicílico faz com que haja um aumento da fração livre do fármaco entre 30 e 60%, o que pode causar um aumento de sua toxicidade (MICROMEDEX, 2001).

### 3.2.2 Farmacodinâmica

Apesar de vários trabalhos relatarem que o AV apresenta um mecanismo de ação relacionado ao aumento das concentrações do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), agindo sob o seu metabolismo, o papel desta atividade ainda permanece obscura (OWENS e NEMEROFF, 2003).

Existem pelo menos três mecanismos principais pelos quais o AV pode aumentar as concentrações de GABA: inibindo sua degradação, aumentando sua síntese ou, ainda, diminuindo a circulação do GABA. Evidências sugerem que o AV tenha uma atividade inibitória sobre a GABA transaminase (GABA-T) neuronal, muito maior do que sobre a GABA-T glial, confirmando a elevada concentração de GABA na fenda sináptica, o que determina sua atividade anticonvulsivante (LÖSCHER, 1999).

Com relação à farmacodinâmica do AV, Löscher (1992), em artigo de revisão, listou alguns trabalhos de outros autores que demonstram algumas ações distintas que esse fármaco pode apresentar. Tais ações farmacodinâmicas estão listadas na Tabela 3.



Tabela 3. Outros efeitos farmacodinâmicos do Valproato

Efeito farmacológico	Espécie em estudo	Referências
Ansiolítico	Rato	Lal and Shearman <sup>(1)</sup>
Sedativo	Rato, camundongo e cão	Löscher <sup>(2)</sup>
Antidistônico	Hamster (distônico)	Fredow and Löscher <sup>(3)</sup>
Comportamento semelhante a abstinência de morfina	Rato	De Boer e colaboradores <sup>(4)</sup> Cowan and Watson <sup>(5)</sup>
Antidopaminérgico	Rato	Kuruvitla and Uretsky <sup>(6)</sup>
Antinociceptivo	Camundongo	Shuto and Nishigaki <sup>(7)</sup>
Imunoestimulante	Rato	Löscher and Vetter <sup>(8)</sup>
	Coelho e Camundongo	Carraz and Fiorina <sup>(9)</sup> De Souza-Queiroz and Mullen <sup>(10)</sup>
Antihipertensivo	Rato	Rotiroli e colaboradores <sup>(11)</sup>

Adaptado de Löscher, 1992.

Mais recentemente foi demonstrado que o AV também altera a atividade do fator estimulador da corticotrofina, confirmando a sua ação como agente estabilizador do humor (STOUT *et al.*, 2001).

### 3.2.3 Hepatotoxicidade

Como relatado anteriormente, existem dois metabólitos do AV provenientes de sua biotransformação pelo complexo citocromo P-450 que podem ser

1 Lal, H. and Shearman, G. T. (1980) Effect of valproic acid on anxiety-related behaviours in the rat. *Brain Res. Bull.* 5(Suppl.2), 575-577.

2 Löscher, W. (1985) Valproic acid. In: *Antiepileptic Drugs*, pp. 507-536. Eds. H.-H. Frey and D. Janz. Springer Verlag, Berlin.

3 Fredow, G. and Löscher, W. (1991) Effects of pharmacological manipulation of GABAergic neurotransmission in a new mutant hamster model of paroxysmal dystonia. *Eur. J. Pharmac.* 192,207-219.

4 De Boer, T., Metselaar, H. J. and Briunvels, J. (1977) Suppression of GABA-induced abstinence behaviour in naive rats by morphine and bicuculline. *Life Sci.* 20, 933-942.

5 Cowan, A. and Watson, T. (1978) Lysergic acid diethylamide antagonizes shaking induced in rats by five chemically different compounds. *Psychopharmacology* 57, 43-46.

6 Kuruvitla, A. and Uretsky, N. J. (1981) Effect of sodium valproate on motor function regulated by the activation of GABA receptors. *Psychopharmacology* 72, 167-172.

7 Shuto, K. and Nishigaki, T. (1970) The pharmacological studies on sodium dipropylacetate anticonvulsant activities and general pharmacological actions. *Pharmacometrics* 4, 937-949.

8 Löscher, W. and Vetter, M. (1985) In vivo effects of aminooxyacetic acid and valproic acid on nerve terminal (synaptosomal) GABA levels in discrete brain areas of the rat. Correlation to pharmacological activities. *Biochem. Pharmac.* 34, 1747-1756.

9 Carraz, G. and Fiorina, S. (1967) Activation de la formation d'anti corps par le système réticuloendothélial. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 76, 187.

10 De Souza Queiroz, M. L. and Mullen, P. W. (1980) The effects of phenytoin, 5-(parahydroxy phenyl)-5-phenylhydantoin, and valproic acid on humoral immunity in mice. *Int. J. Immunopharmac.* 2, 224-225.

11 Rotiroli, D., Palella, B., Losi, E., Nistico, G. and Caputi, A. P. (1982) Evidence that a GABAergic mechanism influences the development of DOCA-salt hypertension in the rat. *Eur. J. Pharmac.* 83, 153-154.

hepatotóxicos - 4-eno-valproato e 2,4-dieno-valproato. Com relação ao metabólito 4-eno-valproato, foi confirmado que seja um indutor de injúrias hepáticas, e também um inibidor da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (TONG *et al.*, 2005). As evidências histológicas típicas destas injúrias são esteatoses microvesiculares acompanhadas de necrose dos hepatócitos. A maioria dos casos relatados de hepatotoxicidade causados pela utilização de AV ocorreu em crianças menores de dois anos que apresentavam defeitos físicos ou neurológicos. A hipótese aventada para explicar esse achado é que a hepatotoxicidade aconteça devido à presença de doenças mitocondriais pré-existentes ou erros inatos do metabolismo que ocorrem concomitantemente (ANDERSON, 2002).

O AV, portanto, não é indicado para pacientes com problemas hepáticos. Os que fazem uso desta medicação devem periodicamente monitorar as funções hepáticas bem como o tempo de protrombina, que podem estar alterados (MARTINDALE, 1999). Estima-se que 1 a cada 500 crianças abaixo de 2 anos de idade utilizando AV em politerapia possam apresentar hepatopatia fatal e, em monoterapia, 1 a cada 7.000 crianças (SIEMES *et al.*, 1993).

### **3.3 A Barreira Hematoencefálica (BHE)**

Esta barreira fisiológica que “separa” o sangue circulante dos líquidos cefalorraquidiano e intersticial cerebral não permite a passagem de algumas macromoléculas que normalmente circulam por outros órgãos e tecidos corporais. Em geral, essa barreira é altamente permeável à água, ao dióxido de carbono, ao oxigênio e à maioria das substâncias lipossolúveis como o álcool e anestésicos; ligeiramente permeável aos eletrólitos e quase totalmente impermeável às proteínas e às macromoléculas orgânicas não lipossolúveis, o que faz com que freqüentemente impossibilite a obtenção de concentrações eficazes de fármacos com ação no SNC, que se concentram no líquido cefalorraquidiano e no parênquima cerebral (GUYTON e HALL, 1996).

A BHE é formada por células endoteliais dos capilares cerebrais (CECC) unidas por estreitas junções e equipadas com vários sistemas para o transporte de fármacos e também de nutrientes endógenos e produtos do metabolismo. Tais

transportes incluem o sistema de transporte mediado por carreadores, o sistema mediado por lipídios e também o sistema mediado por transcitose receptora/adsortiva (CORNFORD, 1999). A função desses sistemas de transporte é principalmente regular a concentração de fármacos no fluido intersticial cerebral, onde esse se liga aos seus receptores específicos e/ou enzimas (DEGUCHI e MORIMOTO, 2001).

Outros fatores que podem condicionar a passagem de fármacos pela BHE são: a resistência elétrica extremamente alta do endotélio, em torno de 1500 a 2000  $\Omega\text{cm}^2$ , a presença de uma membrana basal contendo perócitos que ajudam na função de defesa e, na superfície mais externa da base membranosa, os astrócitos, que secretam um fator de crescimento solúvel que estabelece e mantém o fenótipo das células endoteliais cerebrais (FRICKER e MILLER, 2004). Os processos de transporte ao nível de BHE podem ser melhor visualizados a partir do esquema apresentado na Figura 2.

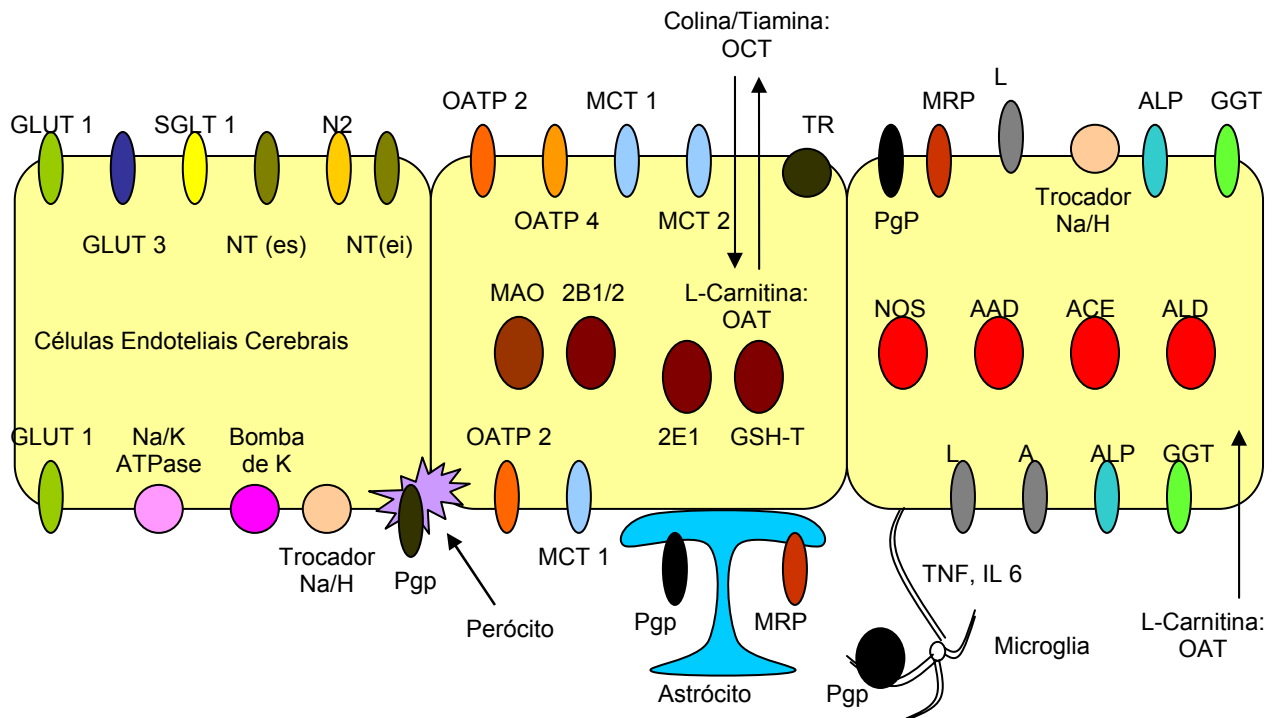


Figura 2. Transportadores e receptores específicos na BHE - GLUT 1 - Transportador de glicose; SGLT 1 - Transportador de glicose dependente de potássio; N2, NT(es) e NT(ei) - Transportadores nucleosídicos; OATP 2 - Polipeptídeo transportador de ânion orgânico (em ratos); OATP - A - Polipeptídeo A transportador de ânion orgânico (em humanos); MCT 1,2 - Transportadores de ácidos monocarboxílicos; TR - Receptores para transferrina, insulina, leptina, lecitinas e IGF's; Pgp - P - Glicoproteína (MDR 1) MRP - Proteína Multi-Resistente; Trocador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  - Trocador de sódio protonado; ALP - Fosfatase alcalina; GGT -  $\gamma$  - Glutamil transpeptidase; OCT - Transportador de cátion orgânico; OAT - Transportador de anion orgânico;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase - Sódio-potássio ATPase; Bomba de  $\text{K}^+$  - Bomba de sódio;  $\text{TNF}\alpha$ , IL 6 - citosinas; MAO - monoaminoxidase; 2B1/B2 e 2E1 - Enzimas CYP; GSH T e GSH S - transferases; NOS - Óxido nítrico sintetase; AAD - Ácido aromático descarboxilase; ACE - Enzima conversora de angiotensina; ALD - Aldeído desidrogenase (Adaptado de MERTSCH e MAAS, 2002).

Os transportadores mais importantes presentes na BHE são também os responsáveis pelo processo de efluxo de fármacos e outras substâncias a partir do SNC. Entre eles pode-se destacar a Pgp e a MRP, que podem ou não estar associados a astrócitos (MERTSCH e MAAS, 2002).

As membranas celulares da BHE são lipóides na sua natureza, característica esta que rege os processos de difusão passiva de substâncias de características lipofílicas através dessas membranas. Portanto, é importante o conhecimento do

coeficiente de partição (log K) das substâncias para se determinar seu potencial de distribuição no SNC (FRANKHEIMER e BROWN, 1992).

Na Figura 3 pode-se avaliar graficamente a relação entre coeficiente de partição e a permeabilidade cerebrovascular de substâncias que apresentam massa molecular inferior a 1.000 daltons.

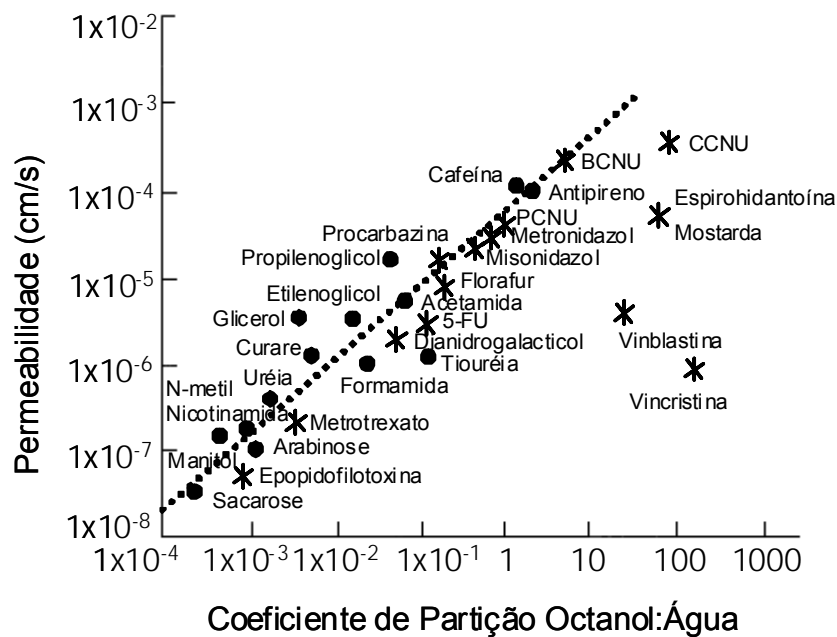


Figura 3. Representação gráfica da relação permeabilidade cerebrovascular/coeficiente de partição n-octanol:água de algumas substâncias (\*representa fármacos antineoplásicos) (Adaptado de FRANKHEIMER e BROWN, 1992).

Pode-se observar, a partir de uma análise da Figura 3, que existe um aumento proporcional de permeabilidade com o aumento do coeficiente de partição, levando-se em conta uma faixa de peso molecular definido. Assim como o coeficiente de partição influencia na permeabilidade, esse parâmetro físico-químico também pode influenciar no processo de transposição da BHE (FRANKHEIMER e BROWN, 1992).

O AV, de massa molar bastante inferior a 1.000 daltons e com coeficiente de partição (Log P) de 2,8 poderia, dessa forma, apresentar certa facilidade de transposição da BHE e, assim, manter concentrações no tecido cerebral em níveis mais elevados. Essa manutenção dos níveis teciduais, no entanto, não acontece, pois a velocidade de efluxo do fármaco é muito alta ( $k = 0,712 \text{ min}^{-1}$ ) (CORNFORD, DIEP e PARDRIDGE, 1985).

Em relação a esse processo de efluxo do AV a partir do SNC, que parece ser mediado por diferentes e caracterizadas expressões da MRP e PgP, os pesquisadores parecem não entrar em consenso.

Em estudo *in vitro* realizado por Gibbs e colaboradores (2003) utilizando células endotéliais de microcapilares cerebrais de bovinos em cultura, foi demonstrado que o AV pode ser capturado pela MRP, utilizando-se indometacina e probenecida como substratos para essa proteína. Na ausência de um ou outro substrato, a quantidade de AV capturado pela MRP era ligeiramente maior do que quando na presença dos substratos.

Baltes e colaboradores (2006), utilizando substratos como verapamil e probenecida, tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*, objetivaram determinar se haveria ou não alguma evidência conclusiva de que o AV fosse substrato para a MRP. Para os experimentos *in vivo*, a técnica de microdiálise foi a ferramenta utilizada para avaliar a concentração de AV alcançada no cérebro de ratos Wistar machos após a administração deste concomitante ou não à administração de verapamil, conhecido substrato para a PgP, ou probenecida, substrato para a MRP. Em conclusão, os pesquisadores não constataram nenhuma responsabilidade desta proteína no efluxo do fármaco em estudo, pois não foi demonstrada nenhuma diferença significativa nas concentrações alcançadas no cérebro nas duas situações. Sendo assim, o sistema de transporte do AV para o SNC permanece inexplicado.

### **3.4 Novas Tecnologias para Liberação de Fármacos através da BHE**

Como a manutenção de níveis teciduais cerebrais efetivos de alguns fármacos utilizados para o tratamento de doenças que afetam o SNC é dificultada devido à monocamada de células endoteliais de capilares cerebrais (CECC) que formam a BHE, torna-se necessário estudar novas alternativas para que esses compostos alcancem o SNC de forma mais efetiva. Compostos hidrofílicos só permeiam a BHE através dos espaços intercelulares entre as células adjacentes. Os compostos lipofílicos, por sua vez, facilmente atravessam essa barreira, mas esse transporte pode ser prejudicado pelas proteínas responsáveis pelo efluxo ativo reduzindo seu acesso ao SNC (LOHLMANN, HÜWEL e GALLA, 2002).

Sistemas nanoparticulados como nanocápsulas (NC), nanoesferas (NE), lipossomas (LS) ou ainda nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) que variam de tamanho entre 10 a 1000 nm, podem apresentar uma grande vantagem na liberação de fármacos através da BHE. Nesses sistemas o fármaco é incorporado na forma de solução ou dispersão, adsorvido ou ainda quimicamente ligado. Esses carreadores nanoparticulados fazem uso dos sistemas de transporte bioquímico na BHE, entre os quais se pode citar o sistema receptor-LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e o sistema de transcitose de transferrina que são, geralmente, processos de transporte diferentes daqueles utilizados quando o fármaco é administrado na forma livre (KREUTER, 2001). O uso dessas estratégias tecnológicas para liberação de fármacos no SNC pode aumentar a penetração de fármacos e, portanto, aumentar sua eficácia (LOCKMAN *et al.*, 2002).

O método de obtenção de suspensão de nanocápsulas mais simples foi o proposto por Fessi e colaboradores (1989) e se baseia na deposição interfacial do polímero pré-formado em um processo que tem a presença de uma fase denominada orgânica que contém o fármaco a ser encapsulado, o óleo, o tensoativo de baixo EHL e o polímero solubilizados em solvente orgânico miscível com a fase aquosa que é composta de tensoativo hidrofílico e água. No momento que a fase orgânica é vertida com o auxílio de um funil sobre a fase aquosa, contendo um tensoativo de elevado EHL, a formação das nanocápsulas ocorre instantaneamente, sendo o diâmetro das partículas obtidas de aproximadamente 200 nm, apresentando ainda baixa polidispersão (FESSI *et al.*, 1989; COUVREUR *et al.*, 2002).

As nanopartículas chamadas "furtivas" são aquelas que apresentam um revestimento hidrofílico. As nanopartículas poliméricas contendo o fármaco e revestidas com polietilenoglicol (nanopartículas *peguiladas*) conferem a capacidade de aumentar o tempo de meia-vida de circulação por serem parcialmente invisíveis ao sistema fagocitário mononuclear (SFM) devido à esse revestimento e, assim, permitir um maior tempo de circulação do fármaco vetorizado no organismo e, facilitar seu acesso ao local de ação e ainda, reduzindo de modo significativo a formação de metabólitos tóxicos (CALVO *et al.*, 2001). Outra estratégia empregada para aumentar a penetração no SNC é a utilização de polisorbato 80 (Tween<sup>®</sup> 80) na formulação, que facilita o processo de passagem de sistemas nanoparticulados ou

fármacos pelo rompimento parcial e temporário da BHE (FISCHER e HO, 2002; GÖPPERT e MÜLLER, 2003).

Com relação à incorporação de AV em sistemas nanoparticulados e sua distribuição no tecido cerebral, Darius e colaboradores (2000) desenvolveram formulações constituídas de poli(cianocrilato de butila) com a presença de dextrano, tween<sup>®</sup> 80 ou tween<sup>®</sup> 85 como tensoativos e compararam a distribuição desses sistemas do AV em relação ao fármaco em questão administrado isoladamente por via intravenosa. Os pesquisadores observaram que nenhuma das formulações apresentou diferenças significativas em relação ao AV isolado no que diz respeito à penetração no SNC. Observaram, no entanto, uma diminuição do processo de  $\beta$ -oxidação mitocondrial do fármaco incorporado em nanopartículas, pois, na avaliação da farmacocinética em plasma do AV e seus metabólitos, houve uma diminuição da presença no plasma de isômeros Z (ácido 2-*n*-propil-(Z)-2-pentenóico e ácido 2-*n*-propil-(Z)-3-pentenóico), que são metabólitos sabidamente hepatotóxicos.

Brigger e colaboradores (2002) desenvolveram nanopartículas de poli(cianoacrilato de hexadecila) (PHDCA) revestidas ou não (formulação controle) com PEG 2000 e estudaram a distribuição das duas formulações em diversos tecidos de ratos Fischer, inclusive no tecido cerebral, após a implantação de um gliosarcoma. Comparando-se as duas formulações foi possível concluir que a formulação revestida com PEG concentrou-se no gliosarcoma em uma quantidade 3,1 vezes maior e, no tecido cerebral, 4 a 8 vezes mais que a formulação controle. Esse resultado se deve ao fato de o revestimento com polietilenoglicol tornar a nanocápsula mais hidrofílica e assim, diminuir a captura dessa pelo SFM, aumentando o tempo de circulação e diminuindo a concentração em órgãos como fígado, baço e pulmão.

#### 3.4.1 Polietilenoglicol (PEG)

Essa substância é formada a partir da polimerização de cadeias de polietileno com água e apresenta fórmula estrutural  $H(OCH_2CH_2)_nOH$  e sua estrutura química é representada na Figura 4, onde *n* pode variar de 4 a 180 e, assim, se apresentar com massas moleculares que variam de 190 a 7000, na forma de líquido claro à



sólido esbranquiçado. É solúvel na maioria dos solventes orgânicos e é utilizado com agente plastificante e umectante, entre outras funções. O monômero óxido de etileno está representado na Figura 4.

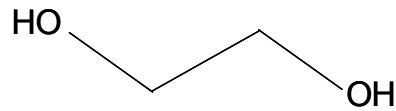


Figura 4. Estrutura química do etilenoglicol.

O polietilenoglicol é utilizado em um processo chamado *peguilação*, que foi desenvolvido e estudado a partir de 1970 por Abuchowsky e colaboradores. Este processo consiste na ligação covalente de uma substância ativa (um fármaco, por exemplo) ou uma nanoestrutura às cadeias poliméricas de PEG, que tanto podem ser linear como ramificada, resultando na diminuição da hidrofobicidade da superfície do complexo formado (OWENS III e PEPPAS, 2006). Este processo tinha inicialmente o objetivo de proteger substâncias ativas como proteínas terapêuticas que são facilmente retiradas de circulação pelo SFM (HARRIS, MARTIN e MODI, 2001).

Depois do processo de *peguilação* ser introduzido no âmbito científico, a gama de suas aplicações foi aumentada consideravelmente. Uma das aplicações é a *peguilação* de lipossomas que demonstra importantes modificações na farmacocinética e, por consequência, na farmacodinâmica dos agentes terapêuticos incorporados sem as limitações dos lipossomas clássicos, como curto tempo de circulação, baixa estabilidade e baixa taxa de incorporação de fármacos (HARRIS, MARTIN e MODI, 2001).

Existem na literatura relatos de obtenção de lipossomas *peguilados* e sua relação com a BHE. Pode-se citar o trabalho de Visser e colaboradores (2005) que utilizando esse tipo de lipossomas, contendo peroxidase de raiz forte e marcados com transferrina, obtidos a partir da técnica de pós-inserção no lipossoma pré-formado, avaliaram a penetração destas substâncias em uma cultura de CECC. Os lipossomas *peguilados* marcados com transferrina apresentaram uma interação de aproximadamente 3 a 4 vezes maior às células em cultura, em comparação com os lipossomas sem PEG. Este resultado demonstra que existe um aumento da afinidade desse tipo de lipossoma pela BHE, pelo menos *in vitro*.

No caso de *peguilação* de nanocápsulas pode ser utilizada a técnica desenvolvida por Gref e colaboradores (2000) que consiste na obtenção do dibloco poli(etilenoglicol)-*b*-poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PEG-*b*-PCL) ou poli(etilenoglicol)-*b*-poli(lactídeo) (PEG-PLA) dissolvendo PEG e cada monômero (PCL ou PLA) em xileno na presença de octanoato estanhoso como catalisador da reação a 110 °C por 2 horas. Após esta etapa, o solvente é evaporado e o copolímero é dissolvido em diclorometano, precipitado em éter e levado a secura sob vácuo. Os diblocos PEG-*b*-PCL ou PEG-*b*-PLA são então solubilizados em solvente orgânico adequado, procedendo-se a obtenção de nanocápsulas a partir do método descrito por Fessi e colaboradores (1989).

Soppimath e colaboradores (2001) apresentam outra metodologia para obtenção das nanocápsulas *peguiladas* que consiste simplesmente em dissolver os copolímeros em solvente adequado (diclorometano, clorofórmio ou acetato de etila) e proceder à técnica de emulsificação, vertendo a fase orgânica em uma fase aquosa contendo um agente emulsificante como o álcool polivinílico.

Outra abordagem para o processo de *peguilação* de sistemas nanoparticulados, aventada por Moghimi (2003), seria a simples adição e incubação de PEG's de cadeia longa no processo de obtenção de nanocápsulas para interação com o polímero constituinte das nanopartículas por adsorção.

Em um estudo feito por Calvo e colaboradores (2001) utilizando nanocápsulas de poli(cianoacrilato de n-hexadecila) preparadas conjuntamente com metoxi-PEG e incorporando sacarose, mostrou como resultado, em comparação com as nanoestruturas sem a presença de PEG, um aumento da passagem pela BHE não só da sacarose, mas também das nanoestruturas propriamente ditas. Esse fato foi comprovado utilizando um núcleo fluorescente na obtenção das nanocápsulas e avaliando através de observações de secções horizontais de algumas partes do cérebro em microscopia.

A utilização de PEG associado à outro polímero, a quitosana, para o desenvolvimento de nanopartículas funcionalizadas com o anticorpo monoclonal OX26 e utilizando streptavidina (SA) e biotina (BIO) foi avaliada por Aktas e colaboradores (2005) com o objetivo de transportar o peptídeo Z-DEVD-FMK até o

cérebro pois este é capaz de inibir a enzima 3-caspase e assim, aumentar a sobrevivência de células neuronais após isquemia cerebral. Os resultados da eficiência de incorporação (EI %) de Z-DEVD-FMK, tamanho de partícula e potencial zeta ( $\xi$ ) são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas de diferentes tipos de nanopartículas de quitosana (QS) contendo Z-DEVD-FMK.

Tipo de nanopartícula	Tamanho (nm)	$\xi$ (mV)	EI %
Quitosana – branco	339,03 $\pm$ 5,67	+28,39 $\pm$ 0,18	–
Quitosana	383,43 $\pm$ 4,60	+ 20,25 $\pm$ 4,60	7,87 $\pm$ 0,77
Quitosana-Polietilenoglicol	149,73 $\pm$ 1,85	+16,06 $\pm$ 3,43	31,13 $\pm$ 1,61
Quitosana-Polietilenoglicol-Biotina	590,47 $\pm$ 2,17	+17,38 $\pm$ 4,94	23,52 $\pm$ 1,03
Quitosana-Polietilenoglicol-Biotina-Streptavidina/OX26	636,69 $\pm$ 2,26	+18,23 $\pm$ 4,06	23,52 $\pm$ 1,03

Adaptado de Aktas e colaboradores, 2005.

Os resultados demonstram uma maior eficiência de incorporação do peptídeo pela formulação que apresenta concomitantemente quitosana e polietilenoglicol, obtendo-se uma incorporação do fármaco superior a 30 %, em contraste com as outras formulações que apresentaram valores variando entre 7 a 23 % aproximadamente. Para a avaliação da interação/distribuição das diferentes formulações no tecido cerebral, os pesquisadores utilizaram camundongos Swiss, onde administrou-se, pela via i.v., uma dose de cada formulação para os animais divididos entre os distintos grupos, marcadas com isotiocianato de fluoresceína, contendo o complexo Z-DEVD-FMK (em uma quantidade de 80 ng), considerada suficiente para apresentar ação terapêutica. Duas horas após a administração, os cérebros dos animais foram retirados, tratados e avaliou-se por microscopia de fluorescência a distribuição das formulações no tecido cerebral. Os resultados demonstraram que, nesse caso, a combinação PEG-QS (polietilenoglicol-quitosana) não foi hábil para alcançar o tecido cerebral, necessitando da funcionalização do sistema com OX26, anticorpo este que apresenta afinidade pelo receptor de transferrina.

A utilização de quitosana nesse, e em outros estudos, justifica-se pelo fato de que esse polímero biodegradável que apresenta características de

mucoadesividade, que é mediada pela interação eletrostática da quitosana (postivamente carregada) e da mucina, presente na mucosa dos epitélios (negativamente carregada), pela capacidade de promoção de permeação de macromoléculas através de epitélios bem organizados, por apresentar baixa toxicidade e biocompatibilidade (EI-SHABOURI, 2002; GRENHA, SEIJO e REMUÑAN-LÓPEZ, 2005).

### 3.4.2 Quitosana (QS)

Quimicamente conhecida como  $\beta$ -[1 $\rightarrow$ 4]-2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (Figura 6) a quitosana é um polissacarídeo linear positivamente carregado, apresentando características bioadesivas. É obtida a partir de um processo de desacetilação da quitina (Figura 5), presente na casca de crustáceos (BODNAR, 2005).

Para ser utilizada no processo de revestimento de nanoestruturas, a quitosana deve apresentar um índice de desacetilação maior que 80 % que indica o grau de pureza e biocompatibilidade. Outra característica importante é a viscosidade apresentada pela solução de quitosana a 1% em ácido acético, que deve apresentar um valor em torno de 14 cP, o que facilita o processo de obtenção de nanocápsulas com tamanho e forma mais homogêneos (CALVO, 1997).

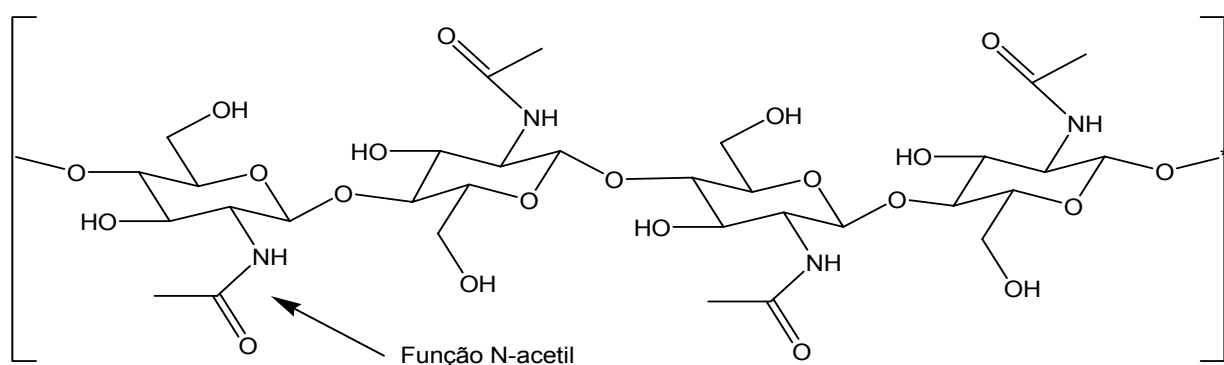


Figura 5. Estrutura química da quitina.

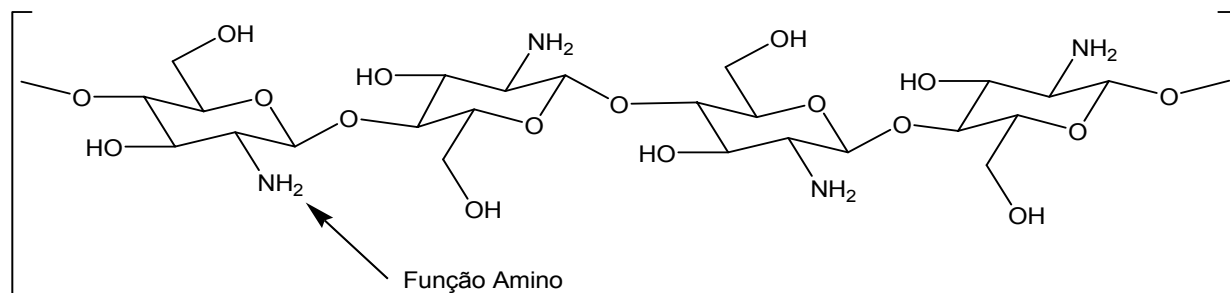


Figura 6. Estrutura química da quitosana.

Para a preparação de nanocápsulas revestidas com QS, Calvo e colaboradores (1997) apresentaram uma modificação da metodologia de deposição interfacial descrita primeiramente por Fessi e colaboradores (1989), através da adição de QS em solução na fase aquosa, em concentrações menores do que 0,2%, para otimização das condições de estabilidade do sistema. A adição da quitosana em solução é feita previamente à evaporação dos solventes. Utilizando esse processo foram obtidas nanocápsulas contendo diazepam que apresentaram um potencial zeta ( $\xi$ ) positivo entre +37,14 a +61,30 mV, dependendo da viscosidade da solução de quitosana empregada. O potencial zeta positivo, além de poder determinar um melhor controle da liberação do fármaco, confere a capacidade de interação com mucosas e epitélios de carga elétrica negativa.

Outros estudos foram conduzidos para avaliar a capacidade da quitosana de formar complexos estáveis com polímeros como o PCL e PLA. De Campos e colaboradores (2003) avaliaram a penetração *ex vivo* em córnea de coelhos de nanocápsulas de PCL contendo rodamina com ou sem revestimento de quitosana e na presença de L- $\alpha$ -lecitina de soja e Poloxamer<sup>®</sup> 188 como tensoativos hidrofílicos e lipofílicos, respectivamente. Diferenças nos valores de  $\xi$  e tamanho das nanopartículas foram verificadas. Sem o revestimento, o potencial zeta apresentado foi de  $-35,2 \pm 2,9$  mV com um tamanho médio de partícula de  $161 \pm 5$  nm, enquanto que as partículas revestidas com quitosana apresentaram um potencial zeta de  $+33,2 \pm 2,2$  mV e tamanho de partícula de  $465 \pm 31$  nm. Ficou evidente, nesse trabalho, que a quitosana interagiu com a PCL fazendo com que houvesse uma inversão de potencial zeta de carga negativa para carga positiva, ocasionando um aumento de tamanho de partícula de aproximadamente 3 vezes. De acordo com os autores, essas características conjugadas fizeram com que as nanopartículas

revestidas com quitosana apresentassem uma maior efetividade de transporte da rodamina através das células epiteliais da córnea em comparação com as nanopartículas sem revestimento.

Em um trabalho anterior que pode auxiliar na discussão dos resultados apresentados nos estudos acima descritos, os resultados obtidos por Artursson e colaboradores (1994) em cultura com células Caco-2 demonstraram que a quitosana aumenta o processo de transporte de fármacos polares através da membrana pela rápida abertura das junções das células epiteliais. Esse processo deve-se à interação da quitosana com o ácido siálico presente na Pgp, expressada nas células Caco-2 e também presentes na barreira hematoencefálica.

### **3.5 Avaliação da Passagem de Fármacos pela BHE**

#### **3.5.1. Cultura de células**

Existem várias metodologias disponíveis para se avaliar o transporte de fármacos através da BHE. As metodologias *in vitro* são baseadas em culturas de CECC (DEGUCHI e MORIMOTO, 2001) e também cultura de células Caco-2, provenientes de adenocarcinoma humano, comumente empregadas para avaliar processos de absorção de fármacos (LOHMANN, HÜWEL e GALLA, 2002).

Para a preparação *in vitro* de uma cultura de células que simule a BHE faz-se necessário primeiramente o isolamento dos capilares e posterior cultura de células endoteliais de capilares cerebrais isoladas, sozinhas ou em combinação com astrócitos. Estas células podem ser isoladas a partir da massa cinzenta de cérebros humanos, bovinos ou ratos, principalmente. Essas células, no processo de isolamento e cultura, passam por processos mecânicos e enzimáticos que têm por objetivo a manutenção da integridade da membrana celular, bem como o aumento do tempo de vida das mesmas (de BOER e GAILLARD, 2002).

Lohmann e colaboradores (2002) compararam a cultura de células Caco-2 com a cultura de CECC, para prever a passagem, através da monocamada de células, de alguns fármacos como ciclosporina A, diazepam, propranolol e morfina.

Concluíram que mesmo com os resultados apontando para uma boa correlação entre as duas metodologias, as células Caco-2 não possuem as mesmas propriedades de transporte de fármacos que a BHE e que as CECCs podem mimetizar melhor, *in vitro*, as condições observadas *in vivo*. Além disso, outro problema para ambas culturas de células é que estas alcançam valores de condutância menores, em torno de 600 a 1200  $\Omega\text{cm}^2$ , em comparação com a condutância normal da BHE, que pode alcançar até 2000  $\Omega\text{cm}^2$ . Este fato poderia explicar diferenças nos resultados *in vitro* e *in vivo*.

Gibbs e colaboradores (2004), investigaram *in vitro*, utilizando a técnica de cultura de CECC, quais os receptores de membrana que estariam envolvidos no processo de passagem do AV através da monocamada de células. A partir dos resultados obtidos os pesquisadores concluíram que a proteína multi-resistente presente nesta cultura de células, bem como na BHE, está associada ao processo de transporte do AV bem como da sua alta velocidade de efluxo, anteriormente descrita (CORNFORD, DIEP e PARDRIDGE, 1985).

### 3.5.2. Microdiálise (MD)

A MD é uma metodologia que avalia concentrações de fármacos na forma livre no tecido cerebral *in vivo* bem como em outros tecidos, sem causar mudanças fisiológicas importantes no local. Esta técnica consiste na implantação de uma sonda de MD em uma região cerebral específica de escolha que é perfundida com solução de Ringer ou com solução que simula o fluído cerebrospinal (FCE). No local onde a sonda encontra-se implantada cria-se um gradiente de concentração que permite a difusão e coleta no dialisado do fármaco livre presente no tecido (SAWCHUK e ELMQUIST, 2000).

Sabe-se que, em teoria, a sonda de MD imita as funções passivas de um capilar sanguíneo, sendo que a membrana semi-permeável da sonda permite a passagem de substâncias de baixo peso molecular, possibilitando o monitoramento das concentrações livres do fármaco no local de ação em tempos pré-determinados e continuamente (JOHANSEN, NEWMAN, MADDEN, 1997).

Utilizando a MD para avaliar a distribuição tecidual de alguns fármacos como o baclofeno e o metotrexato, os resultados demonstraram que as concentrações livres alcançadas no cérebro são, geralmente, muito menores que as concentrações livres correspondentes no plasma, independentemente da substância ser lipofílica ou hidrofílica, demonstrando que o sistema que regula o transporte e o efluxo de fármacos na BHE torna difícil uma predição de concentrações livres no tecido cerebral a partir de dados plasmáticos. Fato este que não foi comprovado para a carbamazepina, uma vez que a relação concentração livre tecido / concentração livre plasma foi mantida (HAMMARLUND-UDENAES, PAAZLOW e de LANGE, 1997).

Com o intuito de avaliar a função da glicoproteína-P no efluxo de fármacos anticonvulsivantes a partir do SNC, Postchka e colaboradores (2002) utilizaram a MD cerebral em camundongos para determinar a influência desta proteína para a manutenção de níveis teciduais cerebrais constantes de fenobarbital, lamotrigina e felbamato. A sonda de MD foi implantada no córtex frontal, por ser considerado principal foco epileptogênico e por apresentar uma maior expressão de glicoproteína-P. Os fármacos foram administrados aos animais em estudo, em monoterapia e em associação ao verapamil, que é um inibidor da ação da glicoproteína-P. Foi observado um aumento de concentração dos três fármacos no SNC quando administrados em associação com verapamil, evidenciando a importante função de efluxo deste carreador de membrana.

A utilização de MD associada ao AV é relatada no trabalho de Sayin e colaboradores (1995) que avaliaram em ratos o papel do AV (200 mg/kg) na diminuição dos níveis de GABA no SNC após a indução de crise convulsiva com a administração de pentilentetrazol. Os resultados demonstraram a capacidade do AV de bloquear a crise convulsiva 30 min após sua administração, pela manutenção dos níveis de GABA extracelular, o que corrobora com uma das teorias para o seu mecanismo de ação.

A MD também foi utilizada para estudar a disposição do valproato sódico no fluido cérebroespinal (FCE) em humanos, após administração oral de uma dose de 600 mg/dia e chegou-se a conclusão, comparando-se os dados de concentração plasmática obtidos, que as concentrações livres no FCE são ligeiramente inferiores



às concentrações plasmática livres, demonstrando a dificuldade de se estabelecer no local de ação concentrações maiores e mais efetivas, por mais tempo, devido ao processo de efluxo que o fármaco pode sofrer a partir do SNC (LINDBERGER *et al.*, 2001).

Portanto, a MD se torna importante para estudos de liberação e transporte de fármacos para o SNC, uma vez que possibilita quantificar e qualificar o processo de transporte, bem como o efluxo de fármacos *in vivo*. Permite também, correlacionar concentrações do fármaco no fluído intersticial com a ação central, determinar o tempo de meia-vida no fluído intersticial cerebral e correlacionar com dados de tempo de meia-vida no plasma e assim, conhecer passos limitantes na liberação do fármaco e sua eliminação do SNC. Esses parâmetros são importantes para fármacos anestésicos e anticonvulsivantes (HAMMARLUND-UDENAES, 2000).



## **4. Materiais e Métodos**



## 4.1 Materiais

### 4.1.1 Componentes das formulações

- Ácido Valpróico - AV (Gentilmente cedido pelo Laboratório Cristália);
- Acetona (Quimex<sup>®</sup>);
- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q<sup>®</sup>);
- Epikuron 170<sup>®</sup> (Lucas Meyer<sup>®</sup>);
- Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) P.M. 60.000 g/mol (Aldrich<sup>®</sup>);
- Poli(etilenoglicol) 6000 (PEG 6000) (Synth<sup>®</sup>);
- Quitosana purificada (Polymar<sup>®</sup>, grau de desacetilação de 87%);
- Tween 80<sup>®</sup> (Delaware<sup>®</sup>).

### 4.1.2 Componentes e reagentes analíticos

- Ácido 3,5-dimetilbenzóico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>);
- Acetato de sódio anidro (Reagen<sup>®</sup>);
- Ácido acético glacial (Merck<sup>®</sup>);
- Acetonitrila (Media<sup>®</sup>);
- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q<sup>®</sup>);
- Coluna cromatográfica  $\mu$ Bondapak<sup>®</sup> C18 (125 Å 10  $\mu$ m) 3,9 x 300 mm (Waters<sup>®</sup>);
- Filtros Ultrafree<sup>®</sup> - GPMC 10.000 NMWL (Millipore<sup>®</sup>);
- Pré-coluna com material de enchimento  $\mu$ Bondapak<sup>®</sup> C18/Corasil (37-50  $\mu$ m, Waters<sup>®</sup>);
- 4-(Bromometil)-7-metoxicumarina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>);
- Trietilamina (Synth<sup>®</sup>).

### 4.1.3 Componentes, soluções e animais para experimentos de microdiálise

- Hidrato de cloral (Acros<sup>®</sup>);

- Heparina sódica 5.000 UI/mL (Liquemine<sup>®</sup> - Roche<sup>®</sup>);
- Lidocaína (Xylocaina<sup>®</sup>);
- Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (Basa<sup>®</sup>);
- Solução de Ringer Modificada (em mmol/L):
 

NaCl (Merck <sup>®</sup> )	140,0
KCl (Synth <sup>®</sup> )	4,0
CaCl <sub>2</sub> (Reagen <sup>®</sup> )	1,2
MgCl <sub>2</sub> (Merck <sup>®</sup> )	1,0
Água destilada q.s.p.	1000 mL
- Sonda de MD – (CMA<sup>®</sup>/12 (3 mm), *cutoff* de 10.000 daltons);
- Ratos machos da raça Wistar com peso entre 250 a 300 g;
- Tubos *Eppendorf*<sup>®</sup> (0,5 mL).

#### 4.1.4 Componentes, soluções e animais utilizados em experimentos farmacocinéticos em plasma

- Heparina sódica 5.000 UI/mL (Liquemine<sup>®</sup> - Roche<sup>®</sup>);
- Solução salina (em g/mL):
 

NaCl (Merck <sup>®</sup> )	9,0
Água destilada q.s.p.	100 mL
- Ratos machos da raça Wistar com peso entre 250 a 350 g;
- Tubos *Eppendorf*<sup>®</sup> (1,5 mL).

## 4.2 Aparelhos e Equipamentos

- Aparelho de evaporação rotatório (BÜCHI<sup>®</sup> Waterbath B-480 e Rotavapor R-114);
- Centrífuga *Eppendorf Centrifuge* 5417 R;
- Centrífuga Sigma<sup>®</sup> 4K15;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu SCL 10Avp sistema controlador/ LC10ADvp cromatógrafo líquido/ SIL 10ADvp Auto Injetor) (CLAE);
- Detector de Fluorescência (Shimadzu RF10AXL) (DF);
- Equipamento para MD (Bomba MD – 1020 Bee Hive Controller – BAS, Módulo para Seringa MD – 1001 Baby Bee Serynge Drive – BAS);

- Cuba e suporte para manutenção de animais em microdiálise (BAS);
- Estereotáxico (ASI Instruments<sup>®</sup>, USA)
- Microscópio Eletrônico de Transmissão (Jeol<sup>®</sup> JEM 1200 ExII);
- pHmetro de Bancada Micronal<sup>®</sup> B474;
- Zetasizer<sup>®</sup> Nano-ZS (Malvern<sup>®</sup> Instruments);
- Turbiscan Lab<sup>®</sup> (Formulaction<sup>®</sup>, Toulouse, France).

### 4.3 Métodos

#### 4.3.1 Obtenção e caracterização físico-química das nanocápsulas (NC)

Para a obtenção de nanocápsulas revestidas com quitosana (NCQ) foi utilizada a técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado descrita por Fessi e colaboradores (1989) e adaptada por Prego e colaboradores (2005). A composição da formulação encontra-se descrita na Tabela 5.

Tabela 5. Composição quali e quantitativa das formulações de nanocápsulas investigadas

Componentes	NCQ	NCP	NCQP
<b>Fase Orgânica</b>			
Epikuron 170 <sup>®</sup> (g)	0,190	0,190	0,190
Poli(ε-caprolactona) (g)	0,250	0,250	0,250
Ácido valpróico (mL)	0,136	0,136	0,136
Acetona (mL)	67	67	67
<b>Fase Aquosa</b>			
Tween 80 <sup>®</sup> (mL)	0,190	0,190	0,190
Água Milli-Q (mL)	128	128	128
<b>Revestimento</b>			
Solução de Quitosana 1 % (mL)	5	—	2,5
PEG 6000 (g)	—	0,250	0,125

\* A concentração final de ácido valpróico em todas as formulações foi de 5 mg/mL;

\*NCQ = nanocápsulas com quitosana; NCP = nanocápsulas com PEG 6000; NCQP = nanocápsulas com quitosana e PEG 6000

Primeiramente os constituintes da fase orgânica da formulação foram pesados e colocados juntamente com a acetona em um béquer, sem a presença do fármaco, a fim de se obter total solubilização dos componentes no solvente orgânico,

para depois se adicionar o AV na sua forma líquida e solúvel em acetona. Esta fase orgânica foi submetida a aquecimento a  $37 \pm 1$  °C e agitação magnética controlada para solubilização dos componentes. Em paralelo, a fase aquosa, composta de água e Tween 80<sup>®</sup>, foi colocada em agitação para homogeneização do sistema. Após esta etapa, o fármaco, com o volume devidamente corrigido a partir da sua densidade ( $d = 0,9215$  g/mL) (INDEX MERCK, 2001), foi adicionado à fase orgânica e então, verteu-se a fase orgânica sobre a fase aquosa através de funil de plástico e manteve-se o sistema em agitação por 10 minutos. O sistema formado teve a acetona e o excesso de água removidos em evaporador rotatório, com aquecimento do balão a  $37 \pm 3$  °C, sendo que o volume restante permaneceu igual ou menor do que 20 mL. Por fim, foram adicionados 2,5 mL da solução de quitosana purificada a 1 % à formulação e água Milli-Q, se necessário, para se alcançar o volume final de 25 mL e a formulação final foi mantida em agitação por 1 h. Finalizada esta etapa, obteve-se as nanocápsulas de PCL contendo ácido valpróico (concentração final de 5 mg/mL) revestidas com quitosana (NCQ)

Para a obtenção das nanocápsulas revestidas com PEG (NCP) foi utilizada metodologia adaptada de De Campos e colaboradores (2003) e os componentes da formulação estão descritos na tabela 5. Onde o polímero PEG 6000 foi adicionado diretamente na fase aquosa a uma concentração de 0,7 % e procedeu-se da mesma forma como descrito para se obter a formulação NCQ, excetuando-se o passo final de adição de solução de quitosana. A concentração final do fármaco na formulação foi mantida em 5 mg/mL.

No processo de obtenção das nanocápsulas revestidas concomitantemente com PEG 6000 e quitosana foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente para a obtenção de nanocápsulas revestidas com PEG 6000, adicionando-o na fase aquosa na concentração de 0,35 %. Uma vez obtidas as nanocápsulas, procedeu-se da mesma forma como descrito na metodologia para obtenção de nanocápsulas revestidas de quitosana, adicionando um volume de 1,25 mL de solução de quitosana a 1 % à formulação e esta foi mantida em agitação por 1 h, obtendo-se assim, nanocápsulas revestidas com PEG 6000 e quitosana concomitantemente (NCQP) com o fármaco mantido na concentração de 5 mg/mL.



### **4.3.2 Purificação da quitosana**

A purificação da quitosana foi realizada a partir da adaptação da metodologia descrita por Sebben e colaboradores (2004), onde 2 g de quitosana foram solubilizadas, durante 24 h, em uma solução aquosa de ácido acético 2 % (v/v). Esta solução foi filtrada sob vácuo, em filtro de papel comum, precipitando o filtrado com a adição de solução de NaOH a 10 % até obter-se um pH 14. A quitosana precipitada foi filtrada em funil de vidro sinterizado (G3) lavando-se primeiramente com água Milli-Q<sup>®</sup> e depois com soluções 70:30, 80:20 e 90:10 (v/v) de etanol em água. Os grumos de quitosana obtidos foram secos em dessecador com sílica-gel (Merck<sup>®</sup>).

### **4.3.3 Caracterização das nanocápsulas de AV**

#### **4.3.3.1 Diâmetro de partícula e potencial zeta**

As formulações NCQ, NCP e NCQP foram avaliadas quanto ao tamanho de partícula (diâmetro) em suspensão através de espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons) a partir da observação da luz espalhada a 90° utilizando o aparelho Zetasizer<sup>®</sup> Nano-ZS, diluindo-se a amostra em água Milli-Q<sup>®</sup>. No mesmo equipamento, foi feita também a avaliação do potencial zeta ( $\zeta$ ) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Cada formulação foi amostrada em triplicata através de alíquotas de 1 mL diluídas em 9 mL de uma solução de NaCl (0,056 mg/mL) para que se procedesse a determinação do diâmetro e do potencial zeta.

#### **4.3.3.2 Forma das partículas**

A forma das partículas obtidas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (Jeol<sup>®</sup> JEM 1200 ExII, Centro de Microscopia da UFRGS) operando a 80 kV, para as formulações NCQ e NCP que foram previamente diluídas e depositadas em suporte de cobre com Formwar Carbon e contrastadas com solução de acetato de uranila (2 % m/v).

#### 4.3.3.3 Taxa de associação do AV às nanocápsulas

Para a avaliação da taxa de incorporação do fármaco procedeu-se de acordo com técnica descrita na literatura (GUTERRES *et al.*, 1995), utilizando filtros Ultrafree<sup>®</sup> Millipore<sup>®</sup> (*cutoff* 10.000 Da) para ultrafiltração das suspensões, durante 5 min a 10.285,6 g. A quantidade do fármaco não incorporado às nanocápsulas foi determinada no ultrafiltrado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a determinação da quantidade total do fármaco presente na formulação foi realizada a dissolução dos componentes das nanocápsulas em acetonitrila e se utilizou a metodologia descrita para análise do AV em CLAE no item 4.3.6. A partir da diferença entre a quantidade total de fármaco na formulação e a quantidade presente no ultrafiltrado, determinou-se a taxa de associação do fármaco às nanocápsulas.

#### 4.3.3.4 Análises de espalhamento múltiplo

As suspensões de nanocápsulas foram avaliadas por um Turbiscan Lab (Formulation<sup>®</sup>, França). O sistema de detecção do Turbiscan Lab é composto por um feixe de luz no infravermelho próximo ( $\lambda = 880$  nm) e dois detectores: um de transmissão (T) e outro de *backscattering* (BS). O detector (T) recebe a luz que atravessa a amostra (a 180° do feixe incidente), enquanto o detector BS, recebe a luz espalhada e refletida pela amostra (a 45° do feixe de luz incidente). O sistema detector realiza uma varredura do fundo ao topo da cubeta que contém a amostra adquirindo dados de transmissão (T) e *backscattering* (Dihang *et al.*, 2005). O princípio da medida baseia-se na variação de fração volumétrica ou diâmetro da partícula, resultando em uma variação dos sinais de T e BS. Para partículas que não absorvem luz no comprimento de luz utilizado (880 nm), a intensidade de transmissão e *backscattering* é essencialmente dependente da concentração de partículas, diâmetro de partícula e índice de refração da mistura.

As formulações foram colocadas dentro de uma cubeta de vidro transparente (20 mL) e analisadas a 40 °C por 24 horas, para simular condições de estresse que poderiam levar ao surgimento de fenômenos físicos de instabilidade das formulações.

#### 4.3.3.5 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado logo após a preparação das mesmas com o auxílio de potenciômetro previamente calibrado, com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0. Os resultados apresentados representam à média de três determinações.

#### 4.3.3.6 Comparação estatística dos parâmetros físico-químicos das formulações

As formulações NCQ, NCP e NCQP foram comparadas e avaliadas estatisticamente quanto ao tamanho de partícula, pH, índice de polidispersão utilizando ANOVA seguido de Tukey, com nível de significância de 0,05 %, como teste confirmatório.

#### 4.3.4 Farmacocinética no plasma e avaliação da penetração do AV no tecido cerebral de ratos

Para a realização deste projeto, as normas do Conselho Canadense de Proteção aos Animais<sup>2</sup> foram seguidas, de acordo com as condições laboratoriais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (nº 2005407).

Para experimentos de microdiálise (MD) foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do biotério da Fundação Estadual para Pesquisa e Produção em Saúde (FEPPS), com peso variando entre 250 e 350 g que foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia, com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso a água e alimento (ração certificada Nuvilab CR1<sup>®</sup>) e foram mantidos em gaiolas com no máximo 5 animais.

O número de animais por grupo ( $n = 6$ ) foi determinado de acordo com cálculo estatístico utilizando ANOVA, com o auxílio do programa SigmaStat<sup>®</sup> versão 2.0, utilizando como parâmetro farmacocinético a concentração plasmática máxima ( $C_{MÁX}$ ) alcançada pelo AV após a administração via oral de uma dose de 100 mg/kg

---

<sup>2</sup> Disponível em <<http://www.ccac.ca>>

em ratos ( $C_{MÁX} = 139,6 \pm 15,9 \mu\text{g/ml}$ ) descrito no trabalho de Ohshiro e colaboradores (2003).

Os animais foram divididos em quatro grupos que receberam doses equivalente a 15 mg/kg do AV em solução (concentração equivalente de valproato sódico dissolvido em solução salina 0,9 %) (grupo 1) como NCQ (grupo 2), como NCP (grupo 3) e como NCQP (grupo 4). Nesses animais procedeu-se somente as coletas de sangue. Outros quatro grupos receberam o mesmo tratamento (grupos 5, 6, 7 e 8) e foram procedidos os experimentos de MD cerebral. A dose utilizada no estudo baseou-se em recomendações de dosagem diária de AV para pacientes adultos (15 mg/kg) (DeVane, 2003).

#### 4.3.4.1 Experimentos farmacocinéticos

Para os grupos utilizados para a avaliação do perfil plasmático os animais foram mantidos acordados e se administrou, pela veia caudal, o fármaco livre, em NCQ, NCP e NCQP. Para tanto, os animais foram colocados em gaiolas de contenção com a cauda exposta para facilitar tanto a administração quanto a coleta de amostras de sangue. As coletas foram feitas em tempos pré-determinados (0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 min) respeitando-se um tempo de coleta superior a três tempos de meia-vida do fármaco em ratos (OSHIHIRO *et al.*, 2003). As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados e foram submetidas a centrifugação a 14.811,3 g por 10 min em temperatura ambiente, para obtenção do plasma. As amostras de plasma foram congeladas a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e posteriormente tratadas e analisadas como descrito no item 4.3.6.

#### 4.3.4.2 Experimentos de MD cerebral

A microdiálise foi utilizada para determinação da concentração livre do fármaco em estudo no tecido cerebral. Estudos preliminares foram realizados para determinar a calibração das sondas *in vitro* e *in vivo*, seguindo-se a técnica de calibração por diálise e retrodiálise descrita por Sayin e colaboradores (1995). Para a calibração *in vitro* foi feita a determinação da recuperação do fármaco pela sonda (amostra de dialisado) quando inserida em solução de concentração conhecida de

AV e perfundida com solução de Ringer isenta do fármaco. Também foi avaliada *in vitro* a perda do AV a partir da perfusão da sonda com solução de Ringer com concentração conhecida do fármaco para um meio isento do mesmo (retrodiálise). Esta avaliação foi feita com concentrações de 0,1; 0,5 e 1 µg/mL de AV e com velocidades de fluxo de 1, 2 e 3 µL/min para a otimização das condições de MD. As amostras coletadas em triplicata em cada experimento foram avaliadas por CLAE.

A calibração por retrodiálise *in vivo* foi realizada com a implantação da sonda de MD no animal em experimentação, perfundindo solução de Ringer modificado com concentração de 1 µg/mL do fármaco e velocidade de fluxo de 2 µL/min e avaliou-se a perda deste para o tecido cerebral. Depois de feita a calibração, a sonda foi irrigada com solução de Ringer isenta de fármaco e, respeitou-se um tempo de 1 h para o início do experimento. A calibração *in vivo* foi realizada em três animais. O valor de recuperação médio obtido foi utilizado para a determinação das concentrações livres teciduais dos experimentos com MD cerebral.

Para os experimentos de MD os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg) administrado intraperitonealmente e logo após, foi feita a administração subcutânea, no local da cirurgia, de 0,2 mL de lidocaína/epinefrina a 2 %, com a finalidade de diminuir o sangramento decorrente do procedimento cirúrgico utilizando equipamento estereotáxico. Neste equipamento, o animal anestesiado foi imobilizado e, de acordo com coordenadas de profundidade de 1,0 mm, anterioridade de 2,0 mm e lateralidade de 3,2 mm obtidas a partir do bregma (conjunção das linhas sagital e occipital do crânio do animal) (PAXINOS e WATSON, 1986) procedeu-se a cirurgia e implantação e fixação da cânula guia. No dia do experimento, a cânula guia foi retirada e a sonda de MD foi inserida no córtex frontal (POTSCHKA *et al.*, 2002). Para que estes animais fossem utilizados em experimentos de microdiálise cerebral, respeitou-se o tempo de 2 dias para a recuperação dos mesmos após a cirurgia. Fez-se então, a estabilização da sonda por 1 hora seguida da administração do fármaco livre ou encapsulado pela veia caudal. As amostras de microdialisado foram coletadas de 20 em 20 minutos até um tempo de 6 h, utilizando-se uma velocidade de fluxo para perfusão de solução de Ringer modificado de 2 µL/min para os quatro grupos em estudo. As amostras de MD foram inicialmente congeladas e analisadas posteriormente conforme descrito em 4.3.6.

Ao final de cada experimento, os animais utilizados foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Os mesmos foram acondicionados em sacos plásticos apropriados e depositados em freezer especial da Faculdade de Farmácia, sendo posteriormente recolhidos pelo Serviço de Coleta Especial da Prefeitura Municipal de Porto Alegre. Este serviço de coleta/recolhimento ocorre uma vez por semana.

#### 4.3.4.3 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos do AV em ratos foram determinados a partir dos perfis individuais de concentração plasmática e tecidual para todos os grupos investigados, utilizando as equações não-compartimentais descritas por GIBALDI e PERRIER (1982). A análise não-compartimental dos dados foi realizada utilizando-se a planilha eletrônica Excel<sup>®</sup> versão 7.0 (Microsoft<sup>®</sup>) e os parâmetros determinados foram área sob a curva (ASC<sub>0-∞</sub>), constante de eliminação (λ), tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>), volume de distribuição no estado estável (Vdss), depuração (Cl) e tempo de residência médio (MRT) para os dados plasmáticos. Para os dados teciduais, foram determinados os parâmetros de ASC<sub>0-∞</sub>, λ, t<sub>1/2</sub>, MRT e o fator de penetração tecidual (FPT).

Para a análise compartimental dos níveis plasmáticos do AV foi utilizado o programa de regressão não-linear Scientist<sup>®</sup> versão 2.01 (MicroMath<sup>®</sup>, Utah, USA), e o modelo de dois compartimentos utilizando a equação 1. Os parâmetros farmacocinéticos determinados por este modelo foram as velocidades de absorção e eliminação (a e b, respectivamente), as constantes de absorção e eliminação (α e β, respectivamente), ASC<sub>inf</sub><sup>0</sup>, Vdss, volume no compartimento central (Vc), Cl, tempo de meia-vida de eliminação (t<sub>1/2β</sub>) e as microconstantes (k<sub>12</sub>, k<sub>21</sub> e k<sub>10</sub>). Para a avaliação da adequação do modelo matemático aos dados experimentais foi utilizados o Critério de Seleção de Modelo (MSC), a correlação de Pearson (r) e a avaliação visual dos gráficos fornecidos pelo programa.

$$C_p = a \cdot e^{-\beta \cdot t} + b \cdot e^{-\alpha \cdot t}$$

Equação 1

Onde  $a$  e  $\alpha$ , são intercepto e constante de distribuição, respectivamente. E  $b$  e  $\beta$ , são intercepto e constante de eliminação, respectivamente.

#### 4.3.4.5 Análise estatística

A avaliação comparativa da penetração cerebral do AV livre e nanoencapsulado, foi realizada comparando-se estatisticamente os parâmetros farmacocinéticos determinados a partir da análise não-compartimental das concentrações teciduais livres dos quatro grupos de animais em experimentação com MD, utilizando teste ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ). Do mesmo modo, os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos do AV nos quatro grupos foram comparados por teste ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ), assim como para o experimento de avaliação histopatológica de fígado de ratos descrito no item 4.3.5.

#### **4.3.5. Avaliação da hepatotoxicidade e nefrotoxicidade do AV livre e nanoencapsulado em ratos**

Com o intuito de avaliar se os efeitos nocivos que o AV pode apresentar como a formação de esteatose microvesicular no tecido hepático poderiam surgir em animais em tratamento por um período de tempo determinado, foi realizado o experimento de avaliação histopatológica e análise bioquímica de enzimas presentes no fígado como a fosfatase alcalina, alanino e aspartato aminotransferase e gama glutamiltransferase. Para além da avaliação de alterações bioquímicas e histológicas no tecido hepático, foi realizada também a avaliação da funcionalidade renal, a partir da análise dos níveis de creatinina e uréia presente no plasma de ratos. Esse experimento foi conduzido a partir de metodologia adaptada de Espandiari e colaboradores (2007) e consistiu em tratamento dos animais divididos em 5 grupos distintos ( $n = 10$ ) onde os animais receberam tratamentos como solução salina (grupo 1), solução de valproato sódico (grupo 2), formulação branco (onde não há a presença do fármaco ou dos polímeros utilizados para revestimento) (grupo 3), NCQ (grupo 4) e NCP (grupo 5). Para os grupos 1 e 3 foi administrado aos animais em teste um volume de solução salina e formulação branco, respectivamente, em um volume diário igual ao administrado aos animais tratados

nos outros grupos. Para os grupos 2, 4 e 5, a quantidade diária administrada de valproato sódico ou ácido valpróico contido nas formulações foi de 60 mg/Kg dividido em 2 doses diárias a cada 12h de 30 mg/Kg. A dose foi determinada como sendo a maior dose que poderia ser administrada levando-se em conta as limitações do volume de administração e concentração do fármaco nas formulações a serem testadas. Todos os animais, em todos os grupos foram tratados com o mesmo regime de administração por 5 dias e a administração foi realizada pela veia caudal. O tempo de tratamento de 5 dias foi determinado pelo surgimento de lesões causadas nos animais e a impossibilitando a continuação do mesmo.

Após o 5º. dia de tratamento, os animais foram sacrificados por guilhotinagem e foram recolhidas amostras de sangue em tubos heparinizados, para posterior separação do plasma e amostras de fígado.

As amostras de fígado foram colocadas em solução conservante de formaldeído a 30% e levadas ao laboratório Zanol para posteriormente serem tratadas pelo processo de coloração hematoxilina-eosina para verificar a presença de esteatoses microvesiculares. Estas foram visualizadas utilizando microscópio ótico no aumento de 40x com câmera fotográfica digital acoplada.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 5.290 g por 15 min para separação do plasma e as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, onde foram analisadas, utilizando-se kits comerciais da marca LabTest® para alanino e aspartato aminotransferase, para fosfatase alcalina, para gama glutamiltransferase, para creatinina e uréia. Os resultados obtidos da análise bioquímica foram comparados estatisticamente entre os grupos para avaliar possíveis danos hepáticos ou renais.

#### 4.3.6 Metodologia analítica para quantificação do AV por CLAE

O AV foi quantificado nas amostras de plasma, após precipitação das proteínas plasmáticas com adição de acetonitrila, na proporção de 2:1 e centrifugação por 10 min a 14.811,3 g; no dialisado de tecido cerebral e nas suspensões de nanocápsulas através de metodologia adaptada de Zhong e



colaboradores (2006). A detecção do AV foi realizada após processo de derivatização do fármaco com o composto 4-(Bromometil)-7-metoxicumarina (BrMMc) na presença de trietilamina (TEA). O tratamento, tanto das amostras de plasma, quanto as de suspensão de nanocápsulas, foi realizado utilizando-se uma alíquota equivalente a 100 µL adicionando-se 30 µL de uma solução a 10 % de TEA e 20 µL de uma solução de BrMMc (0,5 mg/mL) que foram submetidas a ausência de luz e à temperatura de aproximadamente 45 °C por 20 min, para que ocorresse a reação de derivatização (Figura 7).

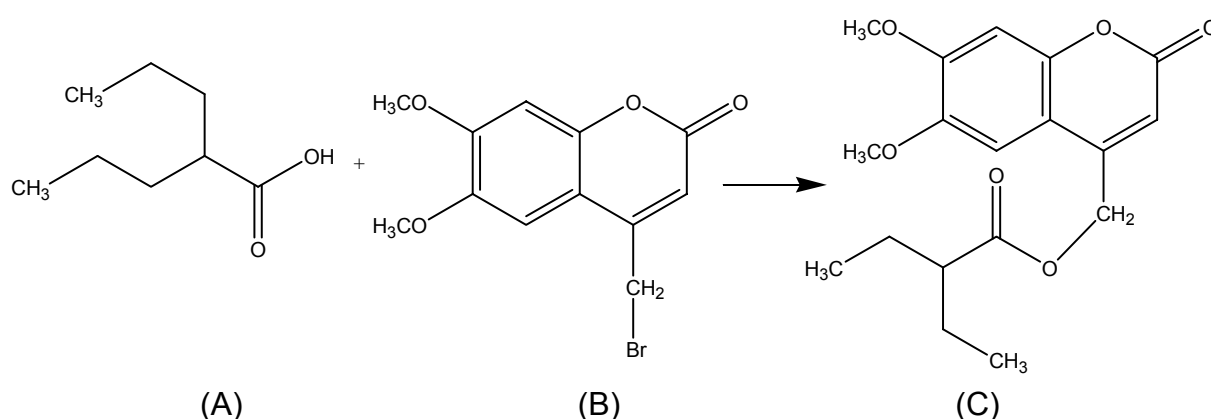


Figura 7. Esquema para a reação de derivatização do AV (A) com BrMMc (B) formando o derivado fluorescente (C) (ZHONG *et al.*, 2006).

Com relação às amostras de dialisado de tecido o processo de derivatização para posterior análise das amostras manteve-se o mesmo, a não ser pelo volume de amostra obtida que foi de 40 µL e os volumes adicionado de TEA a 10 % e de solução de BrMMc (0,5 mg/mL) que foram de 12 e 8 µL, respectivamente.

A fase móvel se constituiu de uma mistura de acetonitrila:tampão acetato sódico 30 mM (70:30 v/v) com pH ajustado a 4,8 com ácido acético glacial. A velocidade de fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min, o volume de injeção da amostra de 50 µL e a coluna cromatográfica de fase reversa µBondapak<sup>®</sup> C18 (Waters<sup>®</sup>) com pré-coluna do mesmo material. O detector de fluorescência teve o comprimento de onda ( $\lambda$ ) de excitação fixado em 325 nm e o  $\lambda$  de emissão em 398 nm. A validação da metodologia, para todas as amostras, foi feita de acordo com normas da Resolução RE n° 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>3</sup> (2003)

<sup>3</sup> Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>>

avaliando-se os parâmetros linearidade, precisão, exatidão e limite inferior de quantificação e limite de detecção.

Os resultados para validação da metodologia analítica são mostrados nos Anexo 1 (para as formulações) e Anexo 2 (para a matriz biológica plasma).

#### 4.3.7 obtenção do valproato sódico a partir do ácido valpróico

Com o intuito de se obter valproato sódico para melhor solubilização em veículo aquoso para os experimentos de microdiálise utilizando a solução de Ringer modificado como líquido de perfusão foi realizada uma reação química na proporção 1:1 (mol/mol) tomando-se os pesos moleculares dos reagentes envolvidos no processo químico. Para o AV e para o hidróxido de sódio (NaOH) as massas molares são, respectivamente 144, 21 g e 40 g.

O meio reacional conteve 14,4 g de AV e 4,4 g de NaOH em metanol (20 mL), adicionando-se 5 mL de água em um balão, mantido sob agitação utilizando agitador magnético. Após 15 min, o meio reacional foi levado a secura para se obter o sal sódico a partir do ácido valpróico. Esse sal foi levado ao dessecador por 48 h afim de se retirar o restante de água residual do processo e foi posteriormente lavado com óxido de dietileno seco e guardado em dessecador. A identificação do sal obtido foi feita com base no ponto de fusão do valproato sódico (300 °C)<sup>4</sup>

O processo de reação química realizada está representado na figura 8 abaixo.

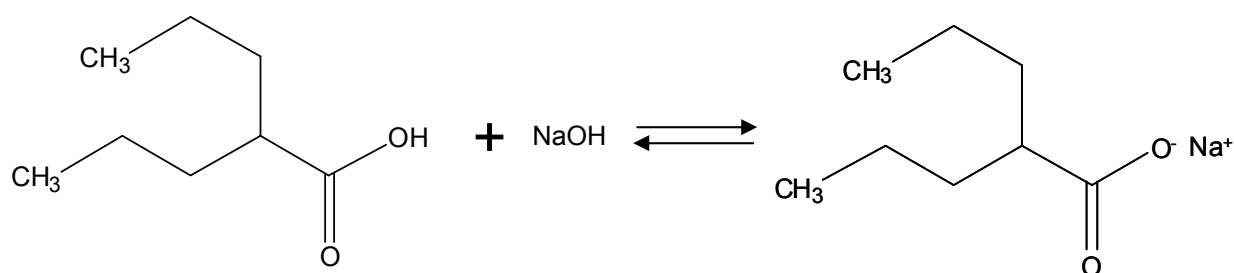


Figura 8. Representação da reação de obtenção do valproato sódico

<sup>4</sup> <[www.chemblink.com/products/](http://www.chemblink.com/products/)>

Para avaliar o rendimento do processo de transformação do AV em valproato sódico utilizou-se uma curva de calibração em plasma e metodologia analítica conforme descrito em 4.3.6.



## **5. Resultados e Discussão**



## 5.1 Caracterização Físico-Química das Suspensões de Nanocápsulas Contendo Ácido Valpróico

### 5.1.1. Parâmetros físico-químicos

A Tabela 6 apresenta os resultados da caracterização físico-química das formulações de nanocápsulas (NC) de PCL contendo ácido valpróico revestidas com quitosana (NCQ), com polietilenoglicol 6000 (PEG) (NCP) e com a associação dos dois revestimentos (NCQP).

Tabela 6. Caracterização físico-química das formulações NCQ, NCP e NCQP

Parâmetros	NCQ	NCP	NCQP
<b>Diâmetro (nm)</b>	144,2 ± 2,0	153,2 ± 1,8 <sup>a</sup>	231,3 ± 15,6 <sup>a,b</sup>
<b>Potencial zeta (mV)</b>	+8,7 ± 0,4	- 6,6 ± 0,8	- 2,8 ± 1,3
<b>Polidispersão</b>	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,40 ± 0,06 <sup>b</sup>
<b>Taxa de associação (%)</b>	98 ± 5	95 ± 7	98 ± 10
<b>Doseamento (mg/mL)</b>	4,5 ± 0,3	4,9 ± 0,2	4,8 ± 0,3
<b>pH</b>	4,26 ± 0,02	4,79 ± 0,04	4,80 ± 0,11

Formulações preparadas para concentração final de 5 mg/mL de AV; n = 3/formulação. <sup>a</sup> diferença estatisticamente significativa em relação a NCQ e <sup>b</sup> diferença estatisticamente significativa em relação a NCP (ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ).

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram que a formulação NCQ apresenta um tamanho de partícula reduzido (144,2 ± 2,0 nm) e a distribuição de tamanho de partículas apresenta-se homogênea (0,17 ± 0,004), com índice de polidispersão inferior a 0,20, caracterizando, portanto, sistemas coloidais com distribuição estreita de tamanho de partículas. Pode-se visualizar uma inversão de potencial zeta, de negativo para positivo, em NCQ comparando-a com as outras formulações. Isso confirma o revestimento por quitosana, pois o polímero primário, a poli( $\epsilon$ -caprolactona), utilizado para obter a suspensão de nanocápsulas, confere um potencial zeta negativo, quando empregado na formulação, enquanto a quitosana, sendo um polímero catiônico, é capaz de promover uma inversão de potencial zeta no processo de revestimento das nanocápsulas (De Campos *et al.*, 2003).

A inversão de potencial zeta é descrita na literatura por Calvo e colaboradores (1997), quando da utilização de soluções de quitosana com, no mínimo 14 cP de viscosidade, um grau maior de 80 % de desacetilação e na dependência da concentração. Essas características reunidas facilitam a adesividade à mucosas e epitélios. Com respeito à formulação NCQ, o grau de desacetilação apresentado pela quitosana utilizada foi de 86 % e viscosidade de 16 cP. Quanto à taxa de associação do fármaco às nanocápsulas na formulação NCQ, essa se apresentou alta. Esse resultado pode ser explicado pelas características do AV, que é um fármaco que se apresenta no estado físico líquido e bastante lipofílico ( $\log P = 2,8$ ). Essas características fazem dele um excelente candidato para constituir o núcleo oleoso das nanocápsulas *per si*, não havendo a necessidade da adição de um veículo oleoso (como Mygliol 870<sup>®</sup>), como em várias suspensões de nanocápsulas descritas na literatura, que utilizam a deposição interfacial do polímero pré-formado como metodologia para obtenção desses sistemas nanoparticulados.

A formulação NCP, assim como a formulação NCQ apresentou tamanho de partícula diminuto e homogêneo ( $153,2 \pm 1,8$  nm), com índice de polidispersão de  $0,18 \pm 0,01$  e, da mesma forma que para a formulação anterior, o resultado de taxa de associação denotou a afinidade do fármaco pelas nanocápsulas. Diferentemente da formulação NCQ, a formulação NCP apresentou potencial zeta negativo, em parte devido à PCL e, em parte, devido à presença de PEG 6000, que auxiliou na manutenção desse potencial negativamente carregado.

No trabalho realizado por De Campos e colaboradores (2003), podemos observar que a inversão de potencial zeta foi alcançada, quando se utilizou quitosana para revestimento das nanoestruturas. Sem o revestimento de quitosana, as nanoestruturas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) apresentaram um potencial zeta de aproximadamente -35 mV e um tamanho de partícula de aproximadamente 246 nm. Utilizando-se a quitosana como material de revestimento, as nanocápsulas apresentaram um potencial zeta de aproximadamente +33,2 mV e um tamanho de partícula em torno de 465 nm. Essa intensa inversão apresentada e também o aumento de tamanho de nanoestrutura em torno de 2 x em comparação com os resultados obtidos no nosso trabalho ( $\xi = +8,7 \pm 0,4$  mV;  $d = 144,2 \pm 2,0$  nm). Isso pode ser explicado pela concentração de quitosana utilizada nos dois estudos.



Enquanto no estudo de De Campos se utiliza uma concentração de 0,2 % de quitosana, no presente estudo utiliza-se uma concentração final de quitosana de 0,05 %.

O doseamento do AV, feito ao final do processo de obtenção de cada formulação apresentou valores próximos à concentração do fármaco adicionada no início do processo, evidenciando estabilidade do fármaco durante esse processo e índice de perdas do fármaco praticamente negligenciáveis.

As três formulações obtidas apresentaram valores de pH ácidos. Para NCQ o valor de pH determinado foi de 4,3, aproximadamente, enquanto que para as formulações NCP e NCQP foi de 4,8, aproximadamente. Esse resultado pode ser explicado pelo caráter ácido do fármaco, pela poli( $\epsilon$ -caprolactona), a qual pode apresentar hidrólise parcial levando a traços de ácido poli( $\epsilon$ -hidróxi-capróico) na formulação (Calvo *et al.*, 1996), ou ainda pela presença de ácido acético, utilizando em uma solução de 0,001% para a solubilização da quitosana.

A partir da avaliação estatística realizada podemos inferir que, mesmo apresentando uma diferença estatística significativa para o diâmetro das NC nas formulações NCQ e NCP, os valores apresentam-se aproximados e demonstrando que o processo escolhido para obtenção dos sistemas nanoparticulados foi bem controlado, tornando essa diferença estatística menos relevante. Para o índice de polidispersão, os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa, demonstrando que as NC formadas nos dois processos distintos apresentam pequena variação de tamanhos.

Por sua vez, a formulação NCQP apresentou os maiores resultados em relação ao tamanho de partícula em comparação com as outras duas formulações elaboradas ( $231,3 \pm 15,6$  nm) evidenciando um aumento de diâmetro que pode ser explicado pela utilização conjunta dos revestimentos de quitosana e PEG 6000. Quanto ao potencial zeta, este apresentou-se negativo, mas em um valor negativamente menor em módulo (-2,8 mV) quando em comparação com a formulação NCP e isso pode ser explicado devido a quantidade adicionada de quitosana que poderia determinar a inversão de potencial de negativo para positivo.

Nessa condição, o índice de polidispersão apresentou-se com valores maiores em comparação com as outras formulações elaboradas (0,40) o que indica uma variabilidade de tamanhos de partículas obtidas por esta metodologia.

As Figuras 8 e 9 mostram as fotomicrografias registradas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão para as formulações NCQ e NCP, respectivamente.

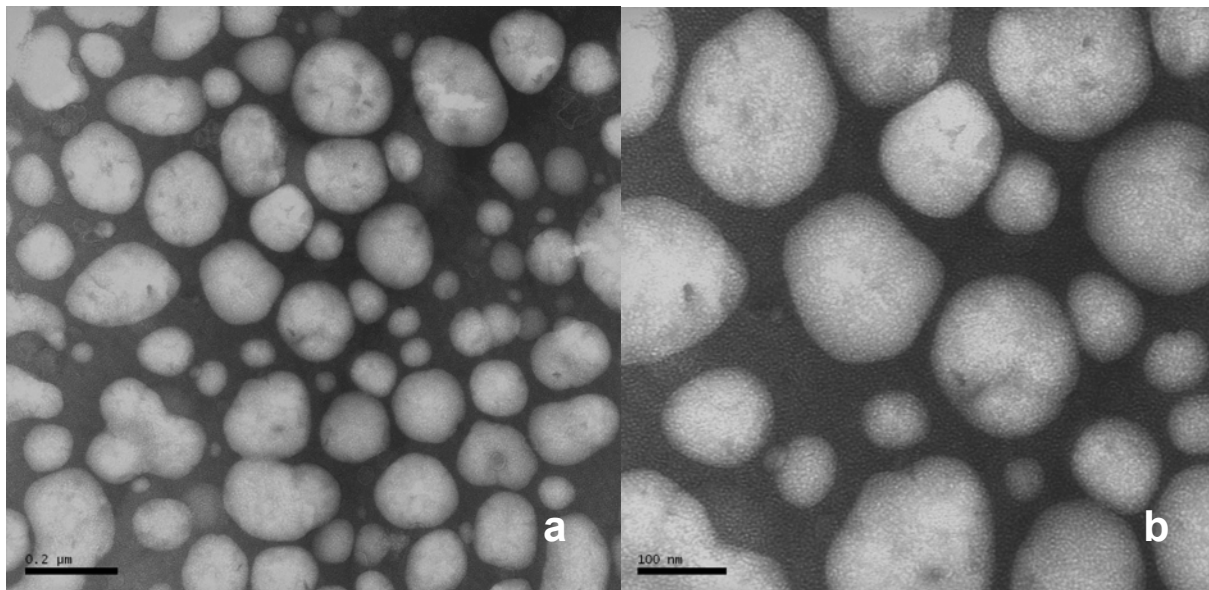


Figura 9. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão para a formulação NCQ. (a) aumento de 100.000 vezes e (b) aumento de 200.000 vezes.

Na Figura 9, pode-se observar que as nanocápsulas são esféricas e apresentam homogeneidade de tamanho de partícula, bem como ausência de aglomerados na formulação NCQ, em aumentos de 100.000 e 200.000 vezes, confirmando os resultados apresentados na Tabela 6.

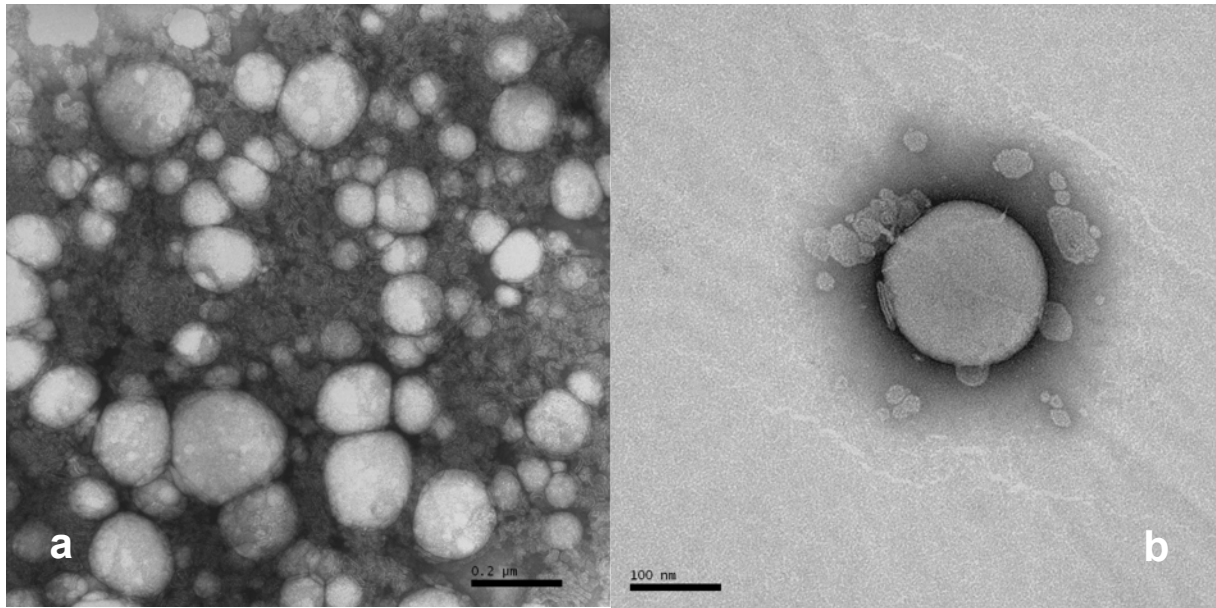


Figura 10. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão para a formulação NCP. (a) aumento de 100.000 vezes e (b) aumento de 200.000 vezes.

Na Figura 10 podemos visualizar nanocápsulas (NCP) igualmente esféricas e com o mesmo padrão de distribuição homogênea de tamanho de partícula, além da presença de alguns aglomerados, nos mesmos aumentos anteriores.

#### 5.1.2. Estabilidade das formulações

Como preditor de estabilidade das formulações foram realizadas avaliações das mesmas pelo Turbiscan<sup>®</sup>, equipamento que utiliza o retroespalhamento de luz para determinar se ocorrem processos de instabilidade físico-química como sedimentação/floculação, coalescência ou cremagem por indução de altas temperaturas em função do tempo. Nos gráficos de retroespalhamento obtidos por Turbiscan<sup>®</sup>, a área de leitura é relacionada ao volume de amostra contida na cubeta (20 mL) em tempos pré-determinados e, a sobreposição das leituras em função do tempo auxilia na verificação da desestabilização da formulação. A leitura dos gráficos obtidos pelo restroespalhamento de luz é feita da esquerda (fundo da cubeta) para a direita (superfície da cubeta).

Nas Figuras 11, 12 e 13 pode-se visualizar os gráficos de referência de retroespalhamento de luz resultantes das avaliações a 40 °C por 24 h das formulações NCQ e NCP e NCQP, respectivamente.

Para a formulação NCQ pode-se observar (Figura 11) um processo de sedimentação pouco intenso no fundo da cubeta uma vez que a variação positiva de *backscattering* é menor do que 1 % (área em evidência – a). Essa pequena tendência a sedimentação confirma-se na superfície da cubeta onde se pode visualizar uma variação de *backscattering* negativa menor do que 2 %, indicando um processo de clarificação no topo da cubeta de análise (área em evidência – b). Ainda que essa pequena tendência à sedimentação seja visualizada, cabe ressaltar que a formulação apresenta uma boa estabilidade pelo período de tempo avaliado na condição de estresse de temperatura, uma vez que as variações de *backscattering* não são superiores a 2 %. Na área relativa ao corpo da cubeta, verifica-se um ligeiro aumento na intensidade do espalhamento, o que corresponde a um ligeiro aumento do diâmetro das partículas. Esses resultados sugerem que a formulação apresenta estabilidade em longo prazo, para condições ideais de armazenagem a temperatura ambiente.

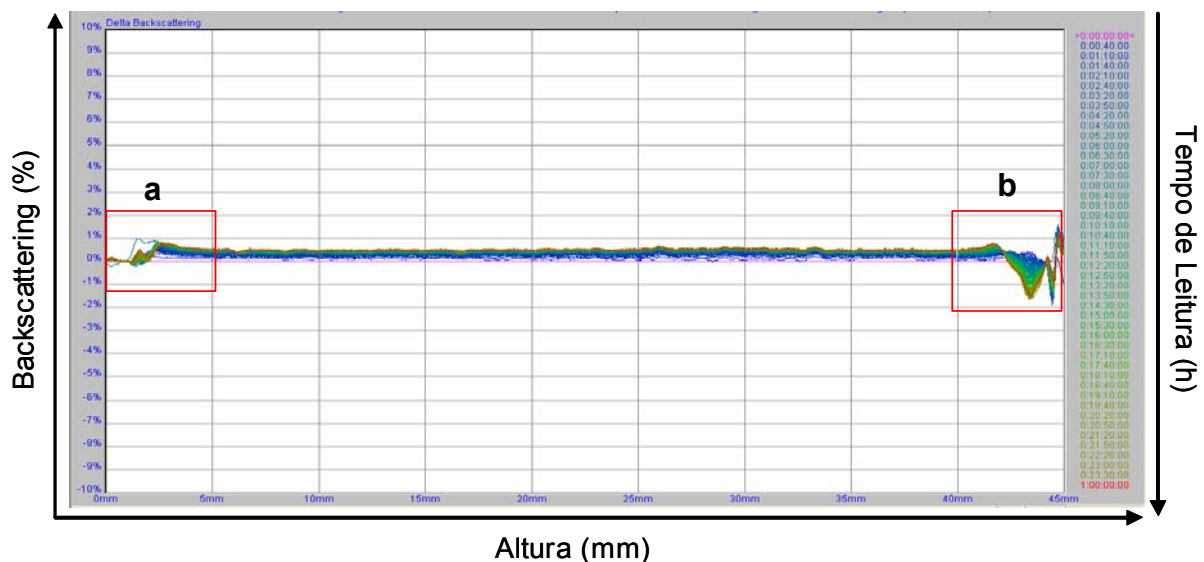


Figura 11. Gráfico de retroespalhamento obtido por Turbiscan<sup>®</sup> da formulação NCQ a 40 °C por 24h. a) representa o fundo da cubeta, b) representa a parte de cima da cubeta.

Para a formulação NCP (Figura 12) o mesmo experimento demonstrou uma variação inferior a 1 % no *backscattering* negativa no fundo da cubeta (área em

evidência – a) que é interpretado como uma leve tendência à sedimentação. Já ao meio da cubeta, não visualizou-se variações de *backscattering* demonstrando maior estabilidade quanto a mudanças nos tamanhos de partículas quando comparada à formulação NCQ. Já na área que corresponde à parte superior da cubeta (área em evidência – b) pode-se visualizar uma tendência a sedimentação ou cremagem, uma vez que observou-se variações de *backscattering* entre -3 e 5 %. O fenômeno evidenciado em a, determina uma pequena instabilidade nas condições de temperatura do estudo, que pode ser devido a um processo de separação de fases. Esse fenômeno não foi confirmado pela visualização macroscópica da amostra no momento final do experimento, e retirada da mesma do aparelho.

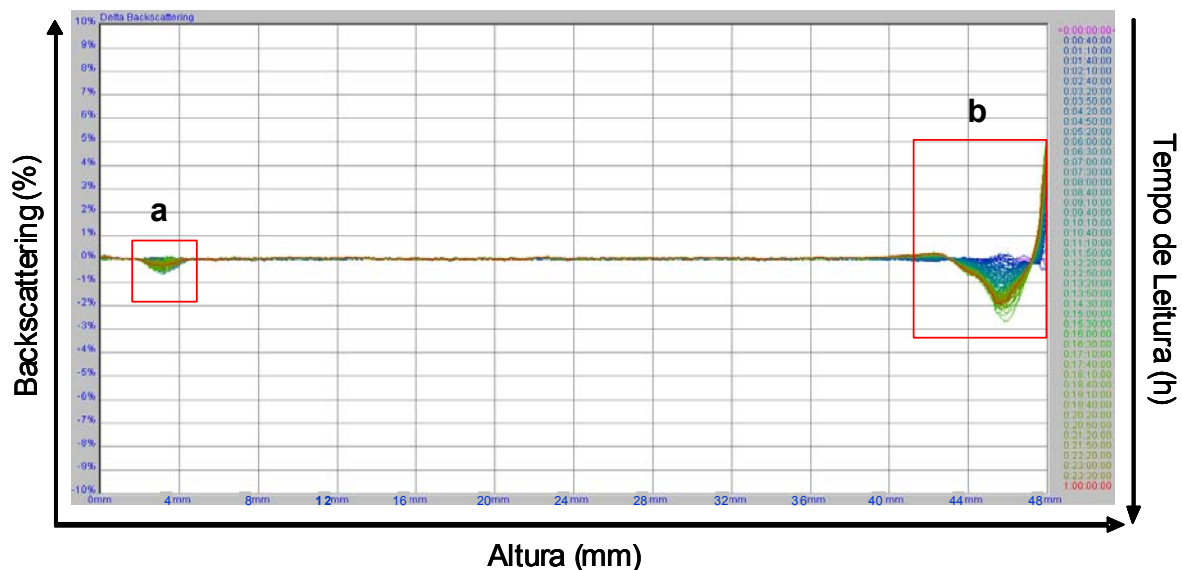


Figura 12. Gráfico de retroespalhamento obtido por Turbiscan<sup>®</sup> da formulação NCP a 40 °C por 24h. a) representa o fundo da cubeta e b) representa a parte superior da cubeta.

Com relação ao gráfico de variação de retroespalhamento da formulação NCQP, pode-se visualizar (Figura 13) que a utilização de quitosana concomitantemente com PEG 6000 demonstra existir um processo de sedimentação pela variação positiva do *backscattering* (área em evidência – a) em torno de 5 %. Já na superfície da cubeta, pode-se visualizar variações de *backscattering* positiva e negativa, em torno de 3% indicando uma pequena tendência à sedimentação e cremagem nas condições de temperatura do estudo. Ainda assim, a formulação contendo concomitantemente quitosana e PEG 6000 demonstra relativa

estabilidade, mesmo que essa utilização conjunta de polímeros tenha aumentado o tamanho e o índice de polidispersão das nanocápsulas.

Na figura 13 podemos visualizar a análise por retroespalhamento de luz para a formulação NCQP.

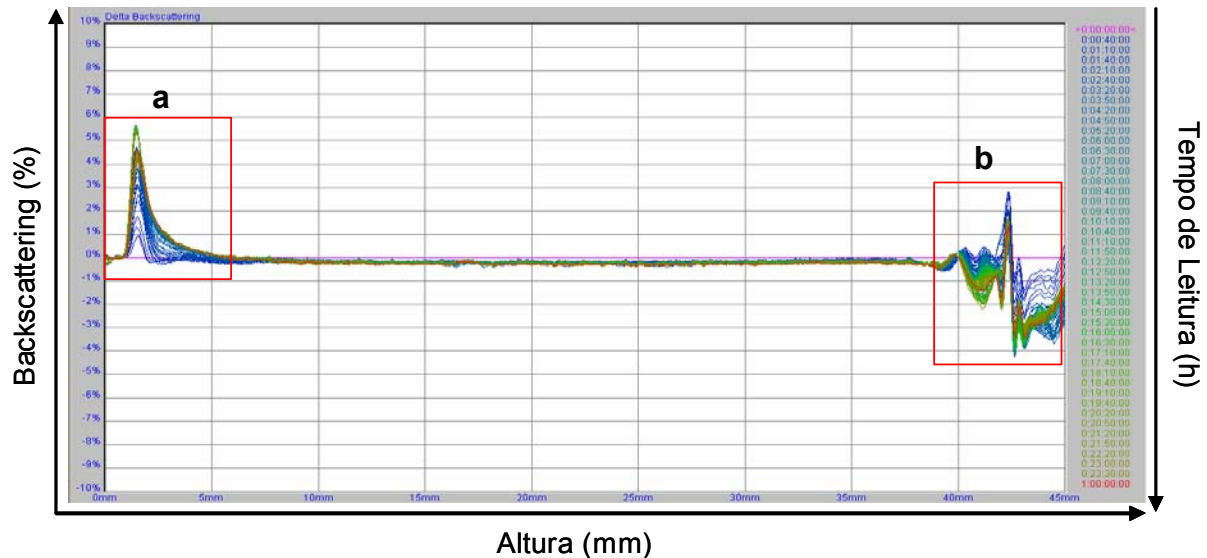


Figura 13. Gráfico de retroespalhamento obtido por Turbiscan<sup>®</sup> da formulação NCQP a 40 °C por 24h. a) representa o fundo a cubeta e b) representa a parte superior da cubeta.

Os resultados apresentados pela análise do retroespalhamento de luz de todas as formulações demonstram uma boa estabilidade, uma vez que o estresse de temperatura representa as condições extremas de armazenagem e pode prever a estabilidade a longo prazo das formulações, ainda que os resultados evidenciem tendências de aumento de tamanho de partículas e sedimentação.

## 5.2. Farmacocinética do AV Livre e Encapsulado no Plasma

Os perfis de concentração plasmática *versus* tempo, tanto para o fármaco livre quanto para o fármaco nanoencapsulado, obtidos após administração intravenosa de uma dose equivalente a 15 mg/kg de AV a ratos Wistar encontram-se dispostos na Figura 14. Pode-se observar que as fases de distribuição e eliminação estão bem definidas para o fármaco presente na formulação NCQ. Essa definição entre as distintas fases não se apresenta de modo tão claro para o fármaco livre e para as formulações NCP e NCQP, mas ainda assim, o modelo aberto de dois

compartimentos para administração via intravenosa, foi o que melhor descreveu os perfis plasmáticos do AV em ambos os casos. O critério de seleção de modelo (MSC) determinado pelo programa Scientist<sup>®</sup> 2.0 para definir a adequação do modelo matemático aos dados experimentais apresentou valores superiores a 2 para todas as modelagens realizadas, demonstrando que o modelo de dois compartimentos é o mais adequado para descrever os perfis farmacocinéticos médios e individuais dos animais investigados.

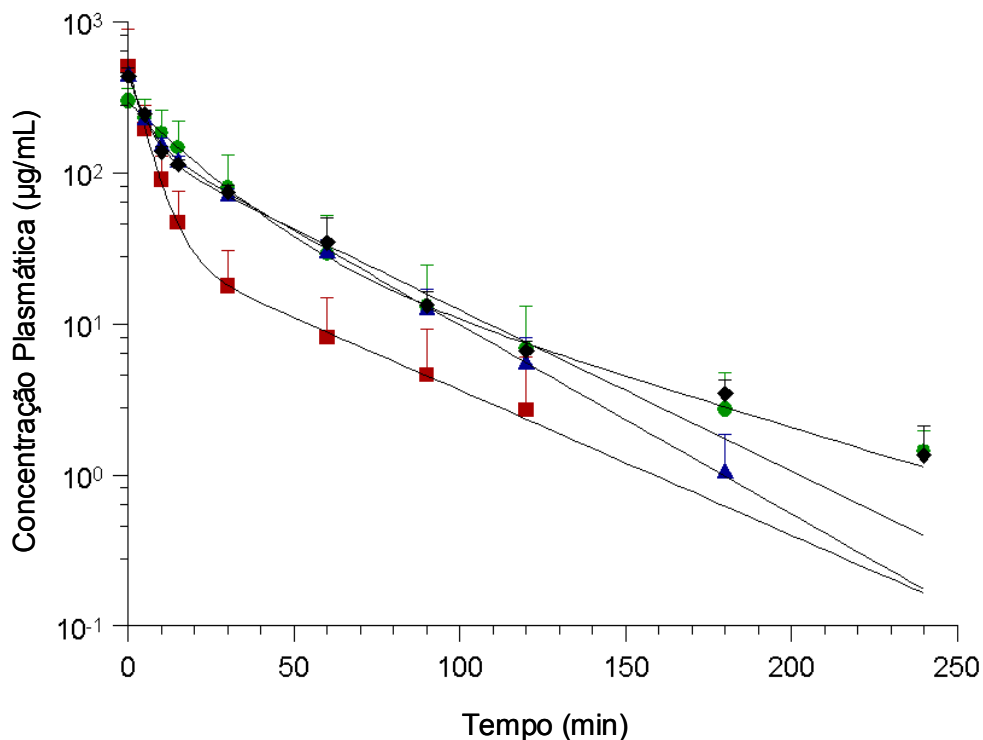


Figura 14. Perfis de concentração plasmática por tempo do AV livre (●) (n = 6), formulação NCQ (■) (n = 7), em formulação NCP (▲) (n = 6) NCQP (◆) (n = 6) após administração de uma dose i.v. de 15 mg/kg do fármaco (média + dp).

O AV na formulação NCQ apresentou concentrações plasmáticas abaixo do limite de quantificação em menos de 150 min, o que não ocorre para o fármaco nanoencapsulado em NCP, que pode ser quantificado até 180 min e para o fármaco livre e em NCQP, que pode ser quantificado até o tempo de 240 min.

A avaliação farmacocinética dos dados plasmáticos foi realizada por abordagem compartimental e não-compartimental nos 04 grupos investigados. A partir da análise não-compartimental individual dos perfis plasmáticos do fármaco

livre em solução e das formulações NCQ, NCP e NCQP foi possível determinar os parâmetros farmacocinéticos mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Avaliação não-compartimental dos perfis plasmáticos do valproato livre e nanoencapsulado após a administração de uma dose de 15 mg/kg de fármaco pela via intravenosa.

Parâmetros	AV	NCQ	NCP	NCQP
$\lambda$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,012 $\pm$ 0,006	0,025 $\pm$ 0,012 <sup>a</sup>	0,026 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,011 $\pm$ 0,002 <sup>b,c</sup>
$t_{1/2}$ (h)	1,4 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,2
ASC <sub>0-∞</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ )	8660 $\pm$ 2915	3954 $\pm$ 1756 <sup>a</sup>	8334 $\pm$ 882 <sup>b</sup>	7777 $\pm$ 730 <sup>b</sup>
Vd <sub>ss</sub> (L/kg)	0,080 $\pm$ 0,036	0,101 $\pm$ 0,058	0,051 $\pm$ 0,003	0,084 $\pm$ 0,005
CL <sub>tot</sub> (L/h/kg)	0,117 $\pm$ 0,047	0,284 $\pm$ 0,156 <sup>a</sup>	0,109 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup>	0,116 $\pm$ 0,010 <sup>b</sup>
MRT (h)	0,68 $\pm$ 0,11	0,38 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	0,47 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Diferença estatística em relação ao valproato de sódio; <sup>b</sup> Diferença estatística em relação a NCQ; <sup>c</sup> Diferença estatística em relação a NCP (ANOVA,  $\alpha = 0,05$  %; seguida de Tukey).

Comparando-se a constante de velocidade de eliminação entre os quatro grupos determinou-se diferença estatisticamente significativa do grupo AV em relação à NCQ e NCP, bem como do NCQP em relação à NCQ e NCP ( $\alpha = 0,05$ ). O resultado evidencia uma velocidade maior de eliminação do fármaco a partir da circulação quando nanoencapsulado, confirmando as diferenças visualizadas nos perfis médios apresentados na Figura 14. Quanto aos tempos de meia-vida, o AV apresentou eliminação em 1,4  $\pm$  0,4 h enquanto às formulações NCQ e NCP eliminaram o fármaco mais rapidamente, com meias-vidas de 0,6  $\pm$  0,3 h e 0,4  $\pm$  0,1 h, respectivamente, apesar dessa diferença ter se mostrado significativa apenas para a formulação NCP, devido a grande variabilidade farmacocinética do AV.

Para a área sob a curva, a análise estatística revelou diferença estatisticamente significativa para a formulação NCQ em relação a todos os outros grupos estudados, uma vez que o valor de ASC<sub>0-∞</sub> dessa formulação foi aproximadamente 2x menor do que para as outras duas formulações e para o fármaco em solução. A diferença na ASC<sub>0-∞</sub> e no tempo de meia-vida está relacionada a alteração do *clearance* do fármaco, que foi significativamente maior na formulação revestida com quitosana (0,284  $\pm$  0,156 L/h/kg) do que na formulação com PEG 6000 (0,109  $\pm$  0,011 L/h/kg), na solução controle (0,117  $\pm$  0,047 L/h/kg) e



mesmo na formulação com quitosana e PEG 6000 ( $0,116 \pm 0,010$  L/h/kg). Pode-se aventar a possibilidade de nanopartículas revestidas com quitosana serem eliminadas do organismo mais rapidamente que as outras formulações ou em comparação com o fármaco livre, em função do revestimento. Como o *clearance* do fármaco foi maior para a formulação NCQ pode-se, também, aventar a hipótese de que essa formulação seja eficiente em se concentrar na BHE e, com isso, diminuir as concentrações plasmáticas do fármaco e aumentar as concentrações teciduais cerebrais do mesmo.

A avaliação do volume de distribuição não mostrou diferença significativa em entre os grupos investigados ( $\alpha = 0,05$  %), apesar do  $V_{dss}$  da formulação NCP ( $0,051 \pm 0,003$  L/kg) ter se mostrado inferior ao determinado para as demais formulações (NCQ =  $0,101 \pm 0,058$  L/kg e NCQP  $0,084 \pm 0,005$  L/kg) e solução do fármaco ( $0,080 \pm 0,036$  L/kg).

Quanto ao MRT, a análise estatística mostrou uma redução significativa no tempo de residência médio do AV quando nanoencapsulado e revestido com quitosana ( $0,38 \pm 0,23$  h) do que quando livre ( $0,68 \pm 0,11$  h) ou nanoencapsulado e revestido com quitosana e PEG 6000 ( $0,72 \pm 0,03$  h). As nanocápsulas revestidas somente com PEG 6000, apresentaram um tempo de residência médio superior ao da formulação NCQ, porém esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa. Esse resultado confirma o observado para o tempo de meia-vida, indicando uma eliminação aproximadamente 2x mais rápida para o fármaco quando encapsulado e revestido com quitosana (NCQ).

A avaliação compartimental dos perfis individuais permitiu a determinação dos parâmetros farmacocinéticos que são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Avaliação compartimental da farmacocinética do valproato livre e nanoencapsulado em plasma após administração de uma dose de 15 mg/kg de fármaco pela via intravenosa.

<b>Parâmetros</b>	<b>AV</b>	<b>NCQ</b>	<b>NCP</b>	<b>NCQP</b>
<b>a (µg/ml)</b>	279,7 ± 59,9	486,5 ± 377,8	430,5 ± 284,5	594,6 ± 252,1
<b>b (µg/ml)</b>	48,5 ± 70,3	33,1 ± 24,7	157,9 ± 25,7 <sup>a,b</sup>	125,2 ± 64,1 <sup>b</sup>
<b>α (min<sup>-1</sup>)</b>	0,11 ± 0,13	0,20 ± 0,06	0,23 ± 0,15	0,31 ± 0,17
<b>β (min<sup>-1</sup>)</b>	0,009 ± 0,007	0,024 ± 0,012 <sup>a</sup>	0,028 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,021 ± 0,007 <sup>a</sup>
<b>Vc (L/kg)</b>	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
<b>Vd<sub>ss</sub> (L/kg)</b>	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
<b>k<sub>12</sub> (min<sup>-1</sup>)</b>	0,04 ± 0,08	0,05 ± 0,03	0,10 ± 0,08	0,17 ± 0,10
<b>k<sub>10</sub> (min<sup>-1</sup>)</b>	0,05 ± 0,02	0,14 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,04
<b>k<sub>21</sub> (min<sup>-1</sup>)</b>	0,03 ± 0,05	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,07 ± 0,04
<b>ASC<sub>0-∞</sub> (µg*min/mL)</b>	7978 ± 3622	3874 ± 1775 <sup>a</sup>	8280 ± 2136 <sup>b</sup>	7849 ± 1021 <sup>b</sup>
<b>CL<sub>tot</sub> (L/h/kg)</b>	0,15 ± 0,10	0,29 ± 0,15	0,11 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,02
<b>t<sub>1/2β</sub> (h)</b>	1,9 ± 1,0	0,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>MSC</b>	4,00 a 2,02	4,47 a 2,03	5,51 a 1,88	5,35 a 4,31
<b>R</b>	1,00 a 0,97	0,998 a 0,975	0,999 a 0,974	0,999 a 0,997

<sup>a</sup> Diferença estatística em relação ao valproato de sódio, <sup>b</sup> Diferença estatística em relação a NCQ, (ANOVA, α = 0,05 %; seguida de Tukey).

Na Tabela 8 pode-se observar a grande variabilidade encontrada na determinação das constantes híbridas (a, b, α, β) da modelagem para os grupos investigados. Mesmo assim, foi possível determinar uma diferença significativa (α = 0,05) em relação a constante de velocidade de eliminação (β), que foi maior para as formulações NCQ (0,024 ± 0,012 h<sup>-1</sup>), NCP (0,028 ± 0,004 h<sup>-1</sup>) e NCQP (0,021 ± 0,007 h<sup>-1</sup>) em comparação com a solução de AV (0,009 ± 0,007 h<sup>-1</sup>). Quanto ao tempo de meia-vida de eliminação (t<sub>1/2β</sub>) do fármaco, esse se apresentou significativamente maior para o grupo AV (115,0 ± 59,6 min) em relação a todos os outros grupos em estudo. Desse modo, a nanoencapsulação levou a uma rápida eliminação plasmática do fármaco, reduzindo o tempo de meia-vida em aproximadamente 4 vezes.

A variabilidade observada para o tempo de meia-vida do AV, quando administrado sob a forma de solução, bem como para a ASC foi previamente descrita na literatura em estudo com roedores (LÖSCHER, 1993). Esse autor mostra em seu trabalho que o tempo de meia-vida em ratos para o AV pode variar entre 2 e 5 horas, semelhante ao encontrado no presente trabalho.

A análise estatística não mostrou diferença significativa para o  $V_c$  e o  $V_{d_{ss}}$  nos grupos investigados, corroborando os resultados da análise não-compartimental e confirmando que a nanoencapsulação não alterou a distribuição do fármaco para os tecidos onde a distribuição ocorre apenas por difusão.

A avaliação do *clearance* total mostrou uma tendência de aumento para a NCQ em relação aos outros três grupos que se mostrou significativa apenas em relação ao grupo NCP ( $\alpha = 0,05 \%$ ), provavelmente devido à grande variabilidade desse parâmetro. Como observado para a análise não-compartimental, a diferença de tempo de meia-vida pode ser atribuída ao maior *clearance* do fármaco quando nanoencapsulado.

Relatos na literatura demonstram que o revestimento de sistemas nanoparticulados com polietilenoglicol confere hidrofiliabilidade às nanoestruturas, aumentando o tempo de circulação das mesmas no organismo pelo seu não reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) (BRIGGER *et al.*, 2002; HARRIS, MARTIN e MODI, 2001). O Tween 80, juntamente com PEG, favorecem o aumento do tempo de circulação das nanopartículas pelo organismo, por formarem o que se denomina “nanocápsulas furtivas”, ou seja, não facilmente reconhecidas pelo SFM devido a hidrofília conferida pelo revestimento da superfície das partículas (FISCHER e HO, 2002; GÖPPERT e MÜLLER, 2003). Os resultados obtidos para as NCP e NCQP demonstram que não houve um aumento nesse tempo de circulação uma vez que estas formulações contendo PEG 6000 apresentaram *clearances* semelhantes ao apresentado para o AV quando administrado livre.

### 5.3. Penetração Cerebral do AV

A MD é uma técnica que permite o monitoramento *in situ* e em tempo real do fármaco em estudo, sem que haja maiores mudanças fisiológicas no local de implantação da sonda de MD que, quando perfundida com líquido biologicamente compatível como solução de Ringer ou fluido cerebrospinal, consegue, por formação de um gradiente de concentração em torno da sonda semi-permeável implantada no tecido, que o fármaco livre difunda para a sonda e seja recolhido no dialisado e analisado (JOHANSEN, NEWMAN, MADDEN, 1997; SAWCHUK e ELMQUIST, 2000).

Para possibilitar a determinação das reais concentrações teciduais livres do AV no cérebro através da MD, foi necessário determinar a taxa de recuperação das sondas juntamente com as condições adequadas para velocidade de fluxo do líquido de perfusão. A velocidade de fluxo de perfusão deve ser suficientemente alta para permitir a coleta de amostra em volume adequado e em intervalos de tempo pequenos, mas deve ser, também, suficientemente baixa para que não provoque mudanças ou lesões teciduais significativas.

A taxa de recuperação *in vitro* das sondas foi determinada por duas técnicas diferentes. Uma avaliando a perda do fármaco presente no líquido de perfusão através da sonda inserida em solução de Ringer modificado isento de fármaco, chamada de recuperação relativa por retrodiálise (RD) e a outra, avaliando o ganho de fármaco pela sonda quando inserida em solução de Ringer modificado contendo concentração conhecida do mesmo, chamada de recuperação relativa por diálise (RR).

Os resultados da calibração *in vitro* são mostrados nas Tabelas 9 e 10 para calibração por perda (RD) e por ganho (RR), respectivamente.

Tabela 9. Taxa de recuperação das sondas de MD determinadas por recuperação relativa por retrodiálise (RD).

		<b>Taxa de Recuperação (%)</b>		
<b>Conc. AV (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>		<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>
<b>Fluxo de perfusão (<math>\mu\text{L/min}</math>)</b>				
<b>1,0</b>		80,5 $\pm$ 3,8	88,0 $\pm$ 1,8	79,6 $\pm$ 4,9
<b>2,0</b>		60,6 $\pm$ 4,4	66,1 $\pm$ 2,3	61,4 $\pm$ 3,0
<b>3,0</b>		47,8 $\pm$ 3,6	52,1 $\pm$ 2,4	48,1 $\pm$ 1,2

ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ; experimentos realizados em triplicata.

Tabela 10. Taxa de recuperação das sondas de MD determinadas por recuperação relativa por diálise (RR).

		<b>Taxa de Recuperação (%)</b>		
<b>Conc. AV (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>		<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>
<b>Fluxo de perfusão (<math>\mu\text{L/min}</math>)</b>				
<b>1,0</b>		78,7 $\pm$ 4,0	84,6 $\pm$ 4,7	80,7 $\pm$ 4,0
<b>2,0</b>		60,4 $\pm$ 4,8	71,8 $\pm$ 3,2	66,0 $\pm$ 6,1
<b>3,0</b>		47,4 $\pm$ 3,7	52,3 $\pm$ 1,5	50,2 $\pm$ 3,8

ANOVA,  $\alpha = 0,05$ , experimentos realizados em triplicata.

Na Figura 15 pode-se visualizar a relação entre a taxa de recuperação por RD e RR e o fluxo de perfusão para as três concentrações de AV investigadas (0,1; 0,5 e 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ).

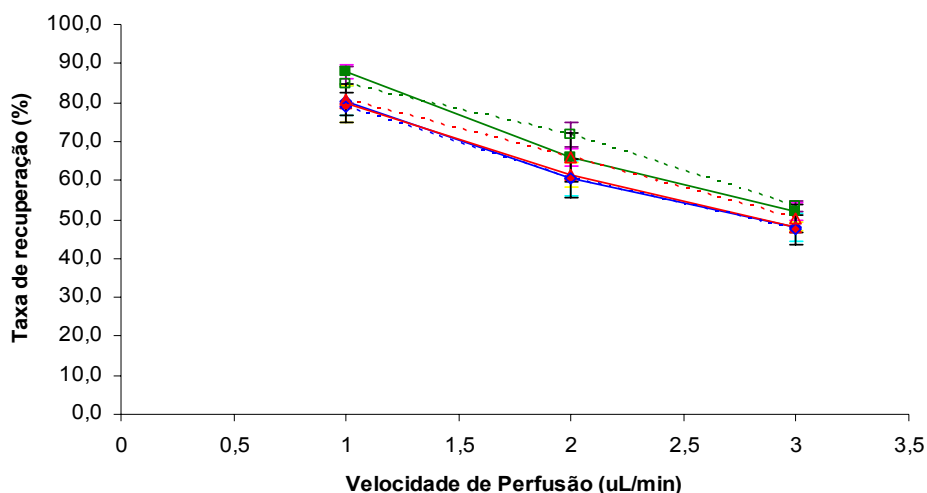


Figura 15. Determinação das taxas de recuperação das sondas de MD por retrodiálise (RD) – para as concentrações de 0,1 (-♦-); 0,5 (-■-) e 1,0 µg/mL (-▲-) para 3 velocidades de perfusão e por diálise (RR) – para as concentrações de 0,1 (--♦--); 0,5 (--■-- e 1,0 µg/mL (--▲--)) para 3 velocidades de perfusão (experimento realizado em triplicata).

Os resultados mostram que os dois métodos de recuperação utilizados para a calibração das sondas de MD não apresentam diferença estatisticamente significativa para as 3 diferentes concentrações investigadas em uma mesma velocidade de fluxo, nos 3 fluxos de perfusão avaliados. Dessa forma, evidencia-se que a recuperação do fármaco pela sonda não é influenciada pela concentração do mesmo, mas sim pelo fluxo do líquido de perfusão, ocorrendo uma diminuição da recuperação à medida que o fluxo aumenta.

Antes do início dos experimentos *in vivo*, foi escolhida a velocidade de perfusão de 2,0 µL/min por apresentar uma taxa de recuperação *in vitro* de aproximadamente 60 % e ainda permitir coletas de amostras em intervalos de tempo de 30 min, com um volume razoável (40 µL) e sem alterar de forma significativa o funcionamento normal do tecido cerebral.

Como se sabe, a inserção da sonda de MD é feita em biofases como tecidos e órgãos, que não apresentam a mesma facilidade de difusão do fármaco para a sonda como ocorre *in vitro*, devido a presença das células. Com isso, o processo de recuperação é dificultado *in vivo*. Deve-se, portanto, avaliar a taxa de recuperação das sondas de MD também *in vivo*, visando posterior determinação das concentrações livres do fármaco no local sob investigação.

A taxa de recuperação *in vivo* foi determinada por RD, sendo a sonda implantada no córtex frontal direito em um grupo de animais ( $n = 3$ ), irrigada com solução de Ringer modificado com concentração de  $1,0 \mu\text{g/mL}$  de fármaco. A perda de parte da concentração do fármaco da solução para o tecido cerebral foi analisada no dialisado, determinando-se uma taxa de recuperação de  $58,1 \pm 6,5 \%$ . Desse modo, pode-se concluir que a taxa de recuperação do AV é igual *in vitro* e *in vivo*. Recuperação semelhante *in vitro* e *in vivo* foi relatada para o AV por Scism e colaboradores (2000) em experimentos de MD cerebral em coelhos, utilizando as mesmas metodologias de calibração.

Multiplicando-se os valores de concentração tecidual livre, determinados no dialisado da MD cerebral, pela taxa de recuperação média das sondas utilizadas, foi possível estimar a concentração livre tecidual real do fármaco a cada tempo de coleta de amostra, após a administração do AV para os diferentes grupos.

Na Figura 16 pode-se visualizar os perfis médios de concentração tecidual em função do tempo, obtidos por MD cerebral após a administração do fármaco em solução e nas formulações NCQ, NCP e NCQP na dose de  $15 \text{ mg/kg i.v. bolus}$ . Os parâmetros farmacocinéticos determinados por abordagem não-compartimental a partir desses perfis são apresentados na Tabela 11.

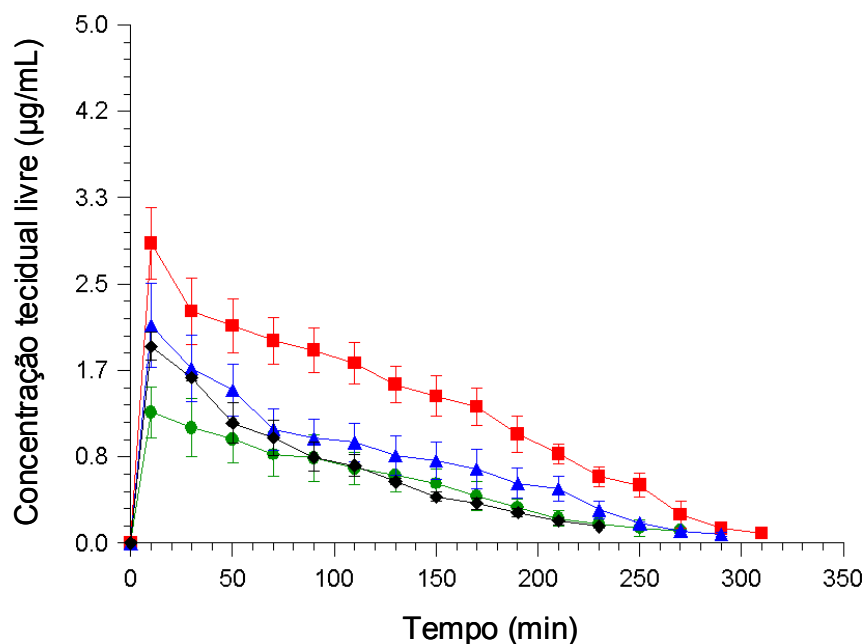


Figura 16. Perfis de concentração tecidual livre do fármaco por tempo obtidos por MD cerebral em ratos Wistar acordados após administração i.v. do AV livre (●), na formulação NCQ (■) e na formulação NCP (▲) (n = 7) e NCQP (◆) (n = 6) em uma dose equivalente a 15 mg/kg.

Tabela 11. Parâmetro farmacocinéticos obtidos por avaliação não-compartimental dos perfis cerebrais de valproato após a administração da solução e das nanocápsulas na dose de 15 mg/kg via i.v. *bolus*.

Parâmetros	AV	NCQ	NCP	NCQP
$\lambda$ (min <sup>-1</sup> )	0,016 ± 0,004	0,014 ± 0,006	0,015 ± 0,004	0,015 ± 0,003
t <sub>1/2</sub> (min)	46,1 ± 8,9	53,2 ± 15,9	48,1 ± 13,2	47,8 ± 9,1
ASC <sub>0-∞</sub> (µg•mL/min)	169 ± 38	419 ± 44 <sup>a</sup>	238 ± 55 <sup>a,b</sup>	187 ± 9 <sup>b,c</sup>
Fator de Penetração	0,021	0,110	0,030	0,024
MRT (min)	99,6 ± 4,6	114,9 ± 6,9 <sup>a</sup>	109,9 ± 7,9	85,6 ± 1,3 <sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Diferença estatística em relação ao valproato sódico; <sup>b</sup>Diferença estatística em relação à NCQ, <sup>c</sup>Diferença estatística em relação a NCP (ANOVA,  $\alpha = 0,05$  % seguida de Tukey). Fator de Penetração = ASC<sub>0-∞</sub> livre tec/ ASC<sub>0-∞</sub> plasma total.

Observando-se a Figura 16 pode-se visualizar uma marcada diferença entre as concentrações teciduais livres obtidas pelo fármaco quando administrado em solução e quando administrado nanoencapsulado na formulações NCQ e NCP. Esses resultados demonstram a viabilidade de utilização de nanocápsulas revestidas por quitosana ou polietilenoglicol 6000 como vetORIZADORES DO AV PARA O tecido cerebral.



A  $ASC_{0-\infty}$  apresentou-se significativamente maior para a formulação NCQ ( $419 \pm 44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}/\text{min}$ ), sendo aproximadamente duas vezes maior do que para o grupo AV ( $169 \pm 38 \mu\text{g}\cdot\text{mL}/\text{min}$ ) e para NCQP ( $187 \pm 12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}/\text{min}$ ). Com relação à formulação NCP esse valor se apresentou aproximadamente 1,5 vezes maior ( $238 \pm 55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}/\text{min}$ ) em relação ao fármaco em solução (grupo controle) e em relação à NCQP. A penetração cerebral, obtida pela relação  $ASC_{0-\infty}$  livre cerebral /  $ASC_{0-\infty}$  plasma total, mostrou uma penetração 5 vezes maior para o AV quando na formulação NCQ e 1,7 vezes maior quando na formulação NCP do que quando em solução. A formulação NCQP não alterou de modo relevante a penetração cerebral do AV.

Outra constatação feita a partir dos resultados apresentados refere-se ao tempo de residência médio (MRT) do fármaco no tecido cerebral. A análise estatística mostrou diferenças estatisticamente significativas para esse parâmetro quando se compara o grupo NCQ com os grupos AV e NCQP, revelando um MRT maior para o fármaco em NCQ ( $114,9 \pm 6,9 \text{ min}$ ) e, ligeiramente maior, mas sem diferença estatisticamente significativa, em comparação com NCP ( $109,9 \pm 7,9 \text{ min}$ ). Esse resultado, indica que o fármaco, quando veiculado em NCQ, apresenta uma tendência a permanecer no local de ação por mais tempo, o que em hipótese indicaria, não só um aumento efetivo das concentrações alcançadas no SNC, mas também um tempo maior de ação do fármaco.

A diferença observada entre os perfis médios de concentração tecidual livre do fármaco pode ser explicada em partes, por trabalhos anteriores descritos na literatura. Com relação à formulação NCQ, Artursson e colaboradores (1994) comprovaram, em um estudo *in vitro* utilizando cultura de células Caco-2, que a quitosana facilita a passagem de compostos polares pela BHE por interação com o ácido siálico da glicoproteína-P, tornando-a temporariamente inativa e, dessa forma, produzindo uma rápida abertura de passagem pelas células da barreira. Cabe ressaltar que o potencial zeta positivo também favorece a bioadesividade do sistema nanoparticulado (CALVO *et al.*, 2005; De CAMPOS *et al.*, 2003).

No que se refere às formulações contendo PEG, estudos relatados na literatura demonstram que esse polímero, quando apresenta cadeia longa, pode

facilitar o processo de passagem de substâncias para o tecido cerebral por relaxar, de forma temporária, a junção das células epiteliais que formam a BHE, diminuindo a condutância elétrica normal que as mantém unidas (LOHMANN *et al.*, 2002; CALVO *et al.*, 2001). Ainda, a presença do tensoativo hidrofílico Tween 80<sup>®</sup> favorece a passagem de substâncias pela BHE por rompimento parcial da mesma (BRIGGER *et al.*, 2002; HARRIS, MARTIN e MODI, 2001).

Dessa forma, os resultados apresentados corroboram a hipótese de que, no caso do revestimento com quitosana, o processo de interação com a BHE esteja facilitando a manutenção de maiores concentrações teciduais e também aumentando o tempo de permanência do fármaco nesse local. Com relação ao revestimento com PEG 6000 pode-se inferir que o polímero tenha facilitado o processo de passagem do fármaco, aumentando sua penetração cerebral.

Com relação à formulação NCQP, pode-se observar que não houve efetivamente uma interação entre quitosana e PEG, o que levou a um aumento não significativo nas concentrações cerebrais livres do AV, muito embora essas concentrações fossem inicialmente maiores que as alcançadas pelo fármaco administrado em solução. Para explicar esse resultado não satisfatório pode se aventar a hipótese de não efetividade quando da utilização conjunta dos revestimentos de quitosana e PEG 6000 pela diminuição a metade das concentrações utilizadas desse polímeros quando utilizados separadamente nas formulações NCQ e NCP. Outro fator que pode ter contribuído para esta ineficácia é a negatividade e proximidade a zero do potencial zeta alcançado (-2,8 mV), não empregando à formulação características de mucoadesividade e, em hipótese, impossibilitando uma interação com a PgP da BHE.

Não foi realizada a fotomicrografia da formulação NCQP, pois esta foi descartada após a realização dos experimentos farmacocinéticos de plasma e tecido cerebral.

## 5.4 Análise da Função Hepática e Renal

Para a avaliação da função hepática seguiu-se o tratamento conforme descrito em 4.3.5 no capítulo de materiais e métodos para a metodologia adaptada de Natarajan e colaboradores (2006). Onde foram avaliadas as formulações obtidas (NCQ e NCP) sendo avaliados também animais que receberam solução salina como tratamento (controle negativo) e uma formulação sem a presença do fármaco e sem os revestimentos utilizados (formulação Branco) com os animais recebendo um volume de administração igual aos grupos das formulações. Ainda, outro grupo de animais recebeu uma dose do fármaco em estudo, na forma de solução, na mesma concentração e volume dos grupos anteriores. É importante lembrar que a dose diária administrada (60 mg/kg) é a dose máxima alcançada devido à concentração do fármaco nas formulações obtidas (5 mg/mL) e devido a limitação do volume de administração.

Cabe ressaltar que, assim como não foi realizada a fotomicrografia da formulação NCQP, por esta ser descartada pelos resultados de caracterização físico-química e pela ineficiência de aumentar significativamente as concentrações do fármaco livre no tecido cerebral, também esta não foi avaliada na análise da função hepática. Os resultados da análise bioquímica estão listados na Tabela 12.

Tabela 12. Análise bioquímica da função hepática após a administração de AV em solução e nanoencapsulado pela via i.v. *bolus* em dose equivalente de 30 mg/kg, solução salina e formulação branca a cada 12h.

<b>Tratamento</b>	<b>Salina (n = 10)</b>	<b>Branco (n = 10)</b>	<b>AV (n = 10)</b>	<b>NCQ (n = 10)</b>	<b>NCP (n = 9)</b>
<b>Bioquímica</b>					
ALT (UI/L)	82,2 ± 9,2	66,9 ± 4,3 <sup>a</sup>	69,0 ± 12,4 <sup>a,b</sup>	54,2 ± 11,2 <sup>a</sup>	74,9 ± 4,6 <sup>b</sup>
AST (UI/L)	302 ± 53	277 ± 42	281 ± 56	266 ± 82	285 ± 46
GGT (UI/L)	1,77 ± 1,51	0,82 ± 0,57	1,56 ± 0,90	1,42 ± 0,67	1,25 ± 0,43
FAL (UI/L)	296 ± 50	276 ± 83 <sup>a</sup>	270 ± 36 <sup>a,b</sup>	149 ± 26 <sup>a</sup>	241 ± 47 <sup>b</sup>
CRE (mg/dL)	0,37 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,14	0,32 ± 0,04 <sup>b</sup>
Uréia (mg/dL)	49,9 ± 5,1 <sup>b</sup>	49,4 ± 5,4 <sup>b</sup>	44,6 ± 3,7 <sup>b</sup>	80,2 ± 26,1	46,8 ± 10,2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Diferença estatística em relação a salina, <sup>b</sup> Diferença estatística em relação a NCQ (ANOVA,  $\alpha = 0,05$  %; seguida de Student Newman Keuls). ALT (alanina aminotransferase); AST (aspartato aminotransferase); FAL (fosfatase alcalina); GGT (gama glutamiltransferase); CRE (creatinina).

Os resultados encontrados na análise bioquímica dos marcadores enzimáticos para a função hepática demonstraram, após uma avaliação estatística, que os valores determinados de ALT para o grupo em tratamento com NCQ ( $54,2 \pm 11,2$  UI/L) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos AV ( $69,0 \pm 12,4$  UI/L), Salina ( $82,2 \pm 9,2$  UI/L) e NCP ( $74,9 \pm 4,6$  UI/L) o que pode, em hipótese, demonstrar um efeito hepatoprotetor em relação à manutenção de níveis desta enzima abaixo dos níveis encontrados para os outros grupos em estudo.

Efeito semelhante é determinado para a fosfatase alcalina (FAL), onde se pode averiguar, após análise estatística dos resultados que o grupo NCQ ( $149 \pm 26$  UI/L) tem resultado estatisticamente diferente de todos os outros grupos em estudo, demonstrando um nível menor de expressão desta enzima. Da mesma forma que ocorreu com a avaliação de ALT, os níveis de FAL determinados para os animais em estudo no grupo NCQ foram menores que os níveis encontrados, para os outros grupos em estudo, demonstrando a possibilidade da formulação apresentar efeito hepatoprotetor.

Para melhor se estabelecer uma relação de comparação entre os resultados obtidos nesse trabalho e assim, categorizar as discussões e conclusões sobre os efeitos da administração do ácido valpróico, tanto livre quanto nanoencapsulado sobre o tecido hepático e sobre as enzimas anteriormente citadas, faz-se importante conhecer alguns trabalhos já relatados na literatura que apresentam resultados que nos servem de parâmetros.

Como em estudo feito por Dantas e colaboradores (2006) que determinaram os níveis de AST, ALT, FAL, creatinina e uréia em ratos Wistar machos após jejum de 15 horas, sem administração de qualquer substância ou veículo à estes animais. Ao final, os animais foram anestesiados com pentobarbital na dose de 40 mg/kg, tendo seu sangue coletado por punção de veia cava inferior, objetivando estabelecer valores de referência para outros estudos subseqüentes. Os resultados obtidos estão listados na Tabela 13.

Tabela 13. Parâmetros fisiológicos de ratos Wistar machos como valores de referência

<b>Parâmetro (unidade)</b>	<b>Média ± dp</b>
ALT (UI/L)	51,0 ± 12,3
AST (UI/L)	81,0 ± 11,7
FAL (UI/L)	124,0 ± 6,1
CRE (mg/dL)	0,5 ± 0,07
Uréia (mg/dL)	48,0 ± 7,6

Adaptado de Dantas e colaboradores, 2006.

Comparando-se os resultados do presente estudo para ALT e FAL com os apresentados na Tabela 13 pode-se observar que somente o grupo NCQ apresentou valores próximos aos valores basais, sendo que os outros grupos em estudo apresentam valores superiores. Quanto aos níveis de AST, a comparação demonstra que todos os grupos em estudo apresentaram, com valores superiores aos basais. Já para a creatinina, pode-se observar que os valores apresentam-se abaixo do normal para todos os grupos investigados, exceto para NCQ, em comparação com o relato da literatura, o mesmo ocorrendo com os níveis de uréia, que foram duas vezes maiores após uso de NCQ.

Esses marcadores bioquímicos da função hepática também podem traduzir possíveis danos causados pela utilização de medicamentos de forma crônica uma vez que esse dano pode ser hepatocelular, levando a um aumento das transaminases (AST e ALT) ou colestático, levando a um aumento da fosfatase alcalina e da GGT (Espandiari *et al.*, 2007).

Quanto aos resultados determinados para creatinina (CRE) e uréia, pode-se observar, após análise estatística, que existe uma diferença entre NCQ (0,53 ± 0,14 mg/dL) e todos os outros grupos em estudo, sendo que estes apresentaram valores de CRE em torno de 0,35 mg/dL. Esse resultado demonstra uma possível diminuição da função renal, diminuindo o *clearance* de creatinina, podendo determinar uma possível dificuldade de eliminação dos metabólitos do fármaco pela via renal quando na formulação NCQ.

Já a determinação dos valores de uréia no soro dos animais tratados para todos os grupos é concordante com os resultados obtidos para a creatinina. Onde para o grupo NCQ ( $80,2 \pm 26,1$  mg/dL) a diferença apresentou-se estatisticamente significativa em relação aos outros grupos que apresentaram valores de uréia próximos à 47 mg/dL. O resultado indica que a função renal pode estar comprometida uma vez que aumentou a concentração de uréia no soro para os animais tratados com NCQ o que tornaria difícil a eliminação desta substância via renal.

A comparação dos resultados obtidos no presente estudo com valores basais de marcadores bioquímicos de ratos em condição de não-manipulação pode, no entanto, ser inadequada. Supõe-se que o tratamento invasivo que os animais do presente estudo foram submetidos, 2 doses i.v. diárias por 5 dias, pode causar alterações em marcadores de função renal e hepática. Nenhum trabalho encontrado na literatura, no entanto, apresentou dados que permitissem comparação com os apresentados no presente trabalho.

Na Figura 17 são apresentados os cortes histológicos de tecido hepático de um animal tratado representando cada grupo investigado ( $n = 10$ ), que foram feitos visando observar o surgimento de degenerações gordurosas (esteatoses hepáticas) que são evidências reais do processo de toxicidade que o ácido valpróico pode apresentar quando administrado em doses altas e de forma crônica (Natarajan *et al.*, 2006).

Quanto aos resultados determinados para creatinina (CRE) e uréia, pode-se observar, após análise estatística, que existe uma diferença entre NCQ ( $0,53 \pm 0,14$  mg/dL) e todos os outros grupos em estudo, sendo que estes apresentaram valores de CRE em torno de 0,35 mg/dL. Esse resultado demonstra uma possível diminuição da função renal, diminuindo o *clearance* de creatinina, podendo determinar uma possível dificuldade de eliminação do fármaco pela via renal quando na formulação NCQ. Esse resultado não é corroborado nem pela avaliação farmacocinética não-compartimental quanto pela abordagem compartimental, pois os maiores valores de *clearance* foram determinados para o AV quando presente em NCQ.

Já a determinação dos valores de uréia no soro dos animais tratados para todos os grupos é concordante com os resultados obtidos para a creatinina. Onde para o grupo NCQ ( $80,2 \pm 26,1$  mg/dL) a diferença apresentou-se estatisticamente significativa em relação aos outros grupos que apresentaram valores de uréia próximos à 47 mg/dL. O resultado indica que a função renal pode estar comprometida uma vez que aumentou a concentração de uréia no soro para os animais tratados com NCQ o que tornaria difícil a eliminação desta substância via renal.

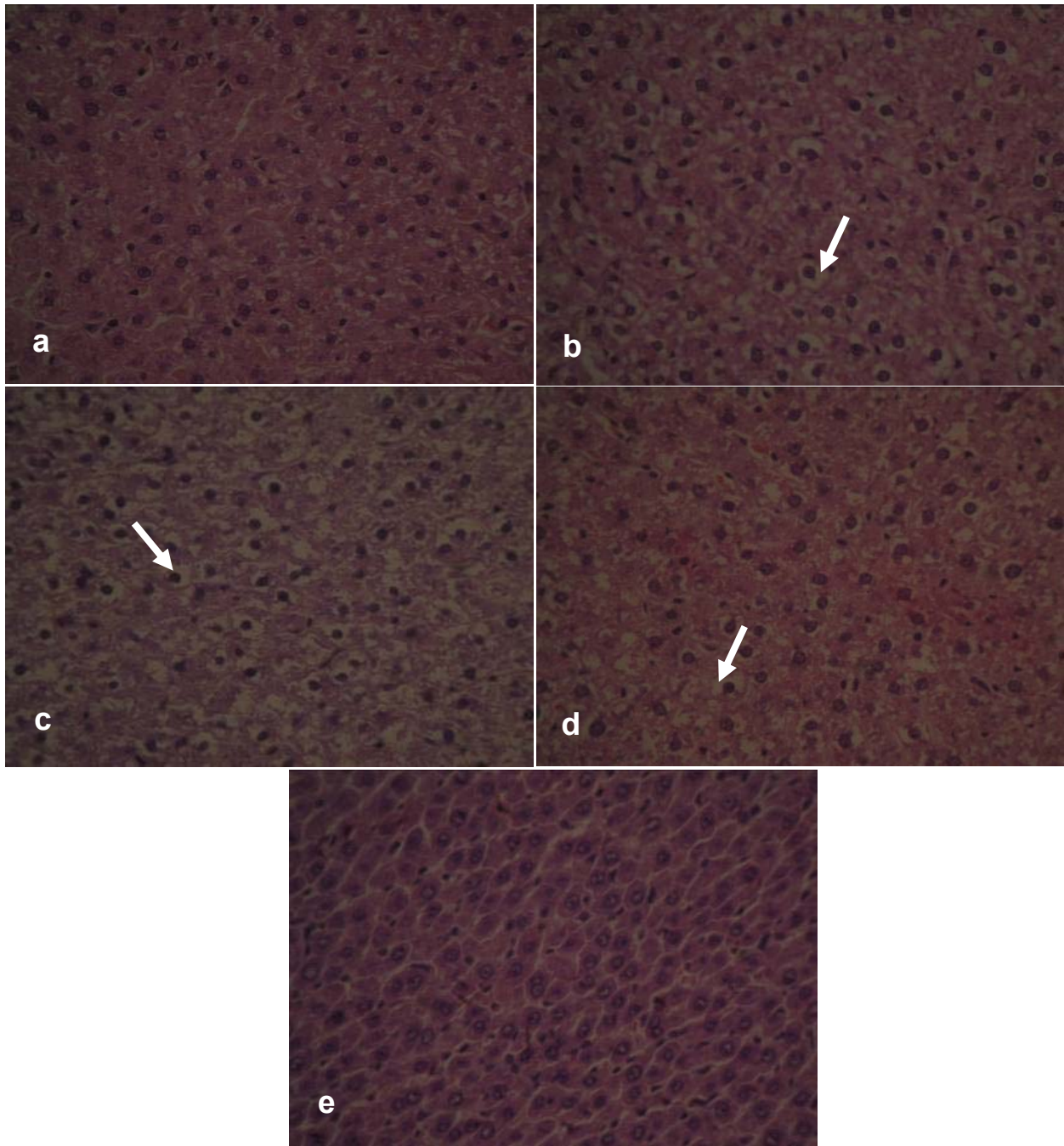


Figura 17. Cortes histológicas de fígados de ratos tratados com a) formulação branca (sem presença do fármaco ou revestimento). Os espaços que aparecem em branco são causados por degeneração gordurosa (esteatose hepática) em menor grau. b) solução salina – apresenta esteatose microvesicular em grau mais avançado. c) valproato sódico em solução, apresenta esteatose hepática em grau mais avançado. d) NCP. Esteatose hepática em um grau menor. e) NCQ. Evidencia-se a manutenção da estrutura normal dos hepatócitos não apresentando esteatose hepática.



O surgimento de esteatoses microvesiculares em todos os grupos tratados, exceto no grupo tratado com NCQ, pode ser explicado pelo simples processo de estresse causado pelo tratamento invasivo utilizado nos animais (administração de 12h/12h via intravenosa por 5 dias consecutivos) nos animais. O estresse pode levar à deposição de gordura hepática para a produção de energia e, com isso, facilitar a formação de degenerações gordurosas no local (McGAVIN e ZACHARY, 2007). Ainda que o tratamento não pudesse ter sido conduzido por pelo menos sete dias e tivéssemos uma limitação de dose para o fármaco, na sua forma nanoencapsulada, os resultados demonstram uma promissora vantagem da formulação NCQ em comparação aos outros grupos estudados.

O não surgimento de esteatose microvesicular no grupo tratado com NCQ pode ser explicado a partir de estudo realizado por LeHoux e Grondin (1993), que demonstrou haver um decréscimo de aporte de colesterol ao fígado de ratos, quando estes foram tratados com uma dieta hiperlipêmica, conjuntamente com quitosana em concentração de 7,5 %, por 7 dias consecutivos. Essa diminuição de aporte lipídico poderia estar diretamente relacionada com o não surgimento de tumefações gordurosas no grupo tratado com NCQ evidenciando um efeito hepatoprotetor da quitosana.

Esse tipo de estresse vivenciado pelo animal pôde ter feito com que houvesse um rápido aporte de gordura (excesso de ácidos graxos) até o fígado para produção de energia e, com isso, pode ter ocorrido a formação de corpos cetônicos que determinam o processo de formação de degeneração gordurosa e, ainda, essa degeneração pode ocorrer pela não funcionalidade de  $\beta$ -oxidação mitocondrial o que pode levar a um acúmulo de ácidos graxos na forma de triglicerídeos e formação de pequenas gotas lipídicas no citosol dos hepatócitos (Natarajan *et al.*, 2006).

O único grupo em estudo (NCQ) em que os animais não apresentaram a formação de esteatoses microvesiculares, também apresentou os melhores resultados para a avaliação bioquímica dos marcadores enzimáticos de função hepática, uma vez que os valores para estes apresentaram diminuídos ou de acordo com a normalidade de seus níveis para estes animais para o grupo NCQ, com o mesmo não ocorrendo para os outros grupos em estudo. Esses resultados corroboram com a possibilidade de existir o efeito hepatoprotetor da quitosana,

diminuindo os eventuais danos causados pelo AV ou pelo tratamento em doses repetidas, por uma via altamente invasiva e por um período de 5 dias.

A possibilidade da formulação obtida a partir do revestimento com quitosana (NCQ) de se apresentar como uma potencial medicação deve ser considerada a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, sendo que mais testes devem ser feitos com esta formulação em escala piloto.

O conjunto de resultados da avaliação da hepato e nefroxicidade e penetração cerebral evidenciam esse potencial para a formulação NCQ de tornar-se um medicamento para o tratamento da epilepsia, com vantagens terapêuticas em relação a administração do valproato de sódio, com a possibilidade de redução de dose e evidente diminuição da hepatotoxicidade. A comprovação desse potencial exige ainda, estudos pré-clínicos mais aprofundados visando avaliação da formulação em modelos animais de epilepsia e a manutenção da atividade por outras vias de administração, mais convenientes para o tratamento de doenças crônicas.

O presente trabalho também traz como conceito o ineditismo da utilização de quitosana como revestimento para nanocápsulas e sua administração via intravenosa, que ainda não é descrita na literatura especializada e demonstrando ser possível o aumento das concentrações do fármaco em estudo no SNC, o que pode possibilitar futuramente que outros fármacos que atuem no tecido cerebral sejam estudados utilizando-se esse polímero como auxiliar na vetorização. Também podemos destacar que o fármaco em questão apresenta-se como um excelente fármaco teste na obtenção desses sistemas nanoparticulados uma vez que *per se*, ele forma o núcleo das nanocápsulas por seu caráter lipofílico, sem a necessidade de adição de veículo oleoso.

## **6. Conclusões**



- A formulação NCQ apresentou um tamanho de partícula reduzido, com distribuição de tamanho homogênea, com baixo índice de polidispersão e pH ácido, potencial zeta positivo em função da presença de quitosana, e elevada taxa de associação. Na avaliação por retroespalhamento de luz, mostrou pequena tendência à sedimentação após 24 h de análise a 40 °C, com ligeiro aumento do diâmetro das partículas;

- A formulação NCP apresentou tamanho de partícula diminuto e homogêneo, com baixo índice de polidispersão, pH ácido e alta taxa de associação, demonstrando a afinidade do fármaco pelas nanocápsulas. Diferentemente da formulação NCQ, a formulação NCP apresentou potencial zeta negativo. Na avaliação por retroespalhamento de luz (24 h a 40 °C), a formulação NCP demonstrou uma leve tendência à sedimentação;

- A formulação NCQP apresentou o maior tamanho de partícula em comparação com as outras duas formulações elaboradas e o potencial zeta apresentou-se negativo, porém menor em módulo do que o obtido pela formulação NCP, com pH ácido e alta taxa de associação. Na avaliação por retroespalhamento de luz (24 h a 40 °C), a utilização de quitosana concomitantemente com PEG 6000 resultou em processos de sedimentação e clarificação;

- Os perfis de concentração plasmática *versus* tempo, para o fármaco presente na formulação NCQ mostraram fases de distribuição e eliminação bem definidas, obtidos após administração intravenosa de uma dose equivalente a 15 mg/kg de AV a ratos Wistar. Para o fármaco livre e para as formulações NCP e NCQP os perfis não demonstraram essa definição, mas ainda assim, o modelo aberto de dois compartimentos foi o que melhor descreveu os perfis plasmáticos do AV em ambos os casos;

- Após administração intravenosa do ácido valpróico (15 mg/kg) em solução ou na forma nanoencapsulada pode-se determinar uma diminuição significativa na ASC de concentração plasmática do fármaco em NCQ, que foi aproximadamente duas vezes menor do que para as outras duas formulações investigadas ou fármaco em solução, sendo o *clearance* do fármaco significativamente maior nessa formulação ( $\alpha = 0,05$ ). Com relação às outras formulações investigadas (NCP e NCQP), não

foram observadas diferenças significativas na ASC ou *clearance* em relação ao fármaco livre.

- A avaliação da passagem do ácido valpróico através da barreira hematoencefálica, determinada por microdiálise em animais acordados, mostrou um aumento de cinco vezes no fator de penetração cerebral do fármaco quando incorporado em NCQ e de aproximadamente 1,7 vezes quando incorporado em NCP em relação ao fármaco livre. A formulação de NCQP não promoveu alteração significativa na penetração cerebral do fármaco. A formulação NCQ também causou aumento significativo na exposição cerebral do fármaco (MRT) em relação ao fármaco livre ( $\alpha = 0,05$ );

- A avaliação da hepatotoxicidade realizada através da determinação de níveis de marcadores bioquímicos no plasma dos animais após 5 dias de tratamento com dose 30 mg/kg q12h, mostrou manutenção dos níveis de ALT e FAL dentro da faixa de normalidade para o grupo NCQ, com alteração desses parâmetros para todos os outros grupos investigados (controle salina e NCP). Em relação à AST e GGT não foi averiguada nenhuma diferença estatística entre os resultados obtidos para os diferentes grupos investigados ( $\alpha = 0,05$ ), indicando um efeito hepatoprotetor da formulação de ácido valpróico revestida com quitosana;

- Na avaliação histológica dos fígados dos animais tratados com as formulações ou o fármaco livre (5 dias de tratamento, AV 30 mg/kg q12h) observou-se formação de esteatoses microvesiculares em todos os grupos tratados, exceto no grupo que recebeu NCQ, corroborando o efeito hepatoprotetor das nanocápsulas de ácido valpróico revestida com quitosana;

- O estudo mostrou a viabilidade da utilização de quitosana como material de revestimento de nanocápsulas de ácido valpróico, promovendo o aumento da penetração cerebral do fármaco e a redução de hepatotoxicidade do mesmo, indicando o potencial dessa formulação para o desenvolvimento de medicamento para tratamento de epilepsia.

## **7. Referências**





- AKTAS, Y.; YEMISCI, M.; ANDRIEUX, K.; GÜRISOY, R.N.; ALONSO, M.J.; FERNANDEZ-MEGIA, E.; NOVOA-CARBALLAL, R.; QUIÑOÁ, E.; RIGUEIRA, R.; SARGON, M.F.; CELIK, H.H.; DEMIR, A.S.; HINCAL, A.A.; DALKARA, T.; ÇAPAN, Y.; COUVREUR, P. Development and brain delivery of Chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconjugate Chem.* 16: 1503-1511 (2005).
- ANDERSON, G.D., Children *versus* adults: pharmacokinetic and adveser-effect differences. *Epilep.* 43 (supl. 3): 53-59 (2002).
- ANDERSON, W.A.D.; KISSANE, J.M. (eds.) *Patologia.* vol. 2 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (1982).
- ARTURSSON, P.; LINDMARK, T.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* 11(9): 1358-1361 (1994).
- BEN-MENACHEM, E.; HENRIKSEN, O.; JOHANNESSEN, S.I. Diagnosis and treatment of partial seizures. *CNS Drugs* 11(1): 23-29 Jan (1999).
- BENVENISTE, H., Brain microdialysis, *Neurochem.* 52(6): 1667-1679 (1989).
- BICKEL, U. How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *NeuroRx*<sup>®</sup> 2:15-26 (2005).
- BODNAR, M.; HARTMANN, J.F.; BORBELY, J. Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules.* 6: 2521-2527 (2005).
- BRIGGER, I.; MORIZET, J.; AUBERT, G.; CHACUN, H.; TERRIER-LACOMBE, M.J.; COUVREUR, P.; VASSAL, G. Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. 303(3): 928-936 (2002).
- CALVO, P.; REMUÑÁN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron emulsions. *Colloid. Polym. Sci.* 275: 46-53 (1997a).
- CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. *Int. J. Pharm.* 153:41-50 (1997b).
- CALVO, P.; GOURITIN, B.; CHACUN, H.; DESMAËLE, D.; D'ANGELO, J.; NOEL, J.-P.; GEORGIN, D.; FATAL, E.; ANDREUX, J.P.; COUVREUR, P. Long-circulating PEGylated polycyanocrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery, *Pharm. Res.* 18(8): 1157-1166 (2001).
- COMMITTEE ON DRUGS. Valproic acid: Benefits and risks. *Pediatrics.* 70(2): 316-319 (1982).
- CORNFORD, E.M.; DIEP, C.; PARDRIDGE, W.M. Blood-brain barrier transport of valproic acid. *J. Neurochem.* 44(5): 1541-1550 (1985).

- CORNFORD, E.M. Epilepsy and the blood brain barrier: Endothelial cell response to seizures. *Adv. Neurol.* 79: 845-862 (1999).
- COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsules technology: a review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19(2): 99-134 (2002).
- DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. *Maringá: Acta sci., Health sci.* V. 28, n. 2: 165-170 (2006).
- DARIUS, J.; MEYER, F.P., SABEL, B.A.; SCHROEDER, U. Influence of nanoparticles on the brain-to-serum distribution and the metabolism of valproic acid in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 1043-1047 (2000).
- De BOER, A.G.; GAILLARD, P.J. *In vitro* models of the blood-brain barrier: When to use which? *Curr. Med. Chem. – Central Nervous Systems Agents* 2: 203-209 (2002).
- De CAMPOS, A.M.; SÁNCHEZ, A.; GREF,R.; CALVO, P.; ALONSO, M.J. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug with the ocular mucosa. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 20: 73-81 (2003).
- DeVANE, C.L. Pharmacokinetics, drug interactions, and tolerability of valproate. *Psychopharm. Bull.* 37 (Supl. 2): 25-42 (2003).
- DEGUCHI, Y.; MORIMOTO, K. Application of na *in vivo* brain microdialysis technique to studies of drug transport across the blood-brain barrier. *Curr. Drug Metab.* 2: 411-423 (2001).
- EI-SHABOURI, M.H. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporine-A. *Int. J. Pharm.* 249: 101-108 (2002).
- ESPANDIARI, P.; ZHANG., J.; SCHNACKENBERG, L.K.; MILLER, T.J.; KNAPTON, A.; HERMAN , E.H.; BEGER, R.D.; HANIG, J.P. *J Appl Toxicol.* Age-related differences in susceptibility to toxic effects of valproic acid in rats. 28(5):628-37 (2008).
- FESSI, H.; PUISIUEX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formulation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55: R1-R4 (1989).
- FISCHER, R.S., HO, J. Potential new methods for antiepileptic drug delivery. *CNS Drugs.* 16(9): 579-593 (2002).
- FRICKER, G.; MILLER, D.S. Modulation of drug transporters at the blood-brain barrier. *Pharmacol.* 70: 169-176 (2004).

- FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. *Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional*. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2004).
- GARCIA-GARCIA, E.; GIL, S.; ANDRIEUX, K.; DESMAËLE, D.; NICOLAS, V.; TARAN, F.; GEORGIN, D.; ANDREUX, J.P.; ROUX, F.; COUVREUR, P. A relevant *in vitro* rat model for the evaluation of blood-brain barrier translocation of nanoparticles. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1400-1408 (2005).
- GIBALDI, M.; PERRIER, D. *Pharmacokinetics*. 2.ed. New York: Marcel Dekker (1982).
- GIBBS, J.P.; ADEYEYE, M.C.; YANG, Z.; SHEN, D. Valproic acid uptake by bovine microvessel endothelial cells: role of active efflux transport. *Epilepsy Res.* 58: 53-66 (2004).
- GÖPPERT, T.M.; MÜLLER, R.H. Plasma protein adsorption of tween 80 and poloxamer 188-stabilized solid lipid nanoparticles. *J. Drug Target.* 11(4): 225-231 (2003).
- GRAF, R.; LÜCK, M.; QUELLEC, P. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 18: 301-313 (2000).
- GRENHA, A.; SEIJO, B.; REMUÑÁN-LOPEZ, C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25: 427-437 (2005).
- GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRA, G.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. Poly(D, L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.* 113: 57-63 (1995).
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. (eds.) *Tratado de fisiologia médica* 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (1996).
- HAMMARLUND-UDENAES, M.; PAALZOW, L.K.; de LANGE, E.C.M. Drug equilibration across the blood-brain barrier – pharmacokinetic considerations based on the microdialysis technique. *Pharm. Res.* 14(2): 128-133 (1997).
- HAMMARLUND-UDENAES, M. The use of microdialysis in CNS drug delivery studies: Pharmacokinetics perspectives and results with analgesics and antiepileptics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45: 283-294 (2000).
- HARRIS, J.M.; MARTIN, N.E.; MODI, M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 40(7): 539-551 (2001).
- JOHANSEN, M.J.; NEWMAN, R.A.; MADDEN, T. The use of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacother.* 17(3): 464-481 (1997).

- Laboratórios ABBOTT® Monografia do ácido valpróico. Editora: Laboratórios ABBOTT® (2005).
- KLASKO, R.K. (ed.) Drugdex® System (versão eletrônica) Greenwood Village, USA: Thomson Micromedex (04/2006). Disponível em <www.thomsonhc.com>.
- KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Del. Rev.* 47: 65-81 (2001).
- LEHOUX, J.G. e GRONDIN, F. Some effects of chitosan on liver function in rats. *Endo.* 132(3): 1078-1084 (1993).
- LINDBERGER, M.; TOMSON, T.; WALLSTEDT, L.; STÄHLE, L. Distribution of valproate to subdural cerebrospinal fluid, subcutaneous extracellular fluid, and plasma in humans: A microdialysis study. *Epilep.* 42(2): 256-261 (2001).
- LOCKMAN, P.R.; MUMPER, R.J., KHAN, M.A.; ALLEN, D.D. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28(1): 1-12 (2002).
- LOHMANN, C.; HÜWEL, S.; GALLA, H.-J. Predicting blood-brain barrier permeability of drugs: Evaluation of different *in vitro* assays. *J. Drug Targ.* 10(4): 263-276 (2002).
- LÖSCHER, W. Valproate: A reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog. Neurobiol.* 58: 31-59 (1992).
- MALFARÁ, W.R.; UYEMURA, S.A.; QUEIRÓZ, R.H.C. Correlação entre dose/concentração plasmática e avaliação de alterações hepáticas e renais em ratos Wistar tratados com o esquema ROM. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* 38(2): 167-172, 2005.
- MARCHETTI, R.L.; CASTRO, A.P.W.; KURCGANT, D.; CREMONESE, E.; GALUCCI, N.J. Transtornos mentais associados à epilepsia. *Rev. Psiq. Clín.* 32 (3); 170-182 (2005).
- MERTSCH, K.; MAAS, J. Blood-brain barrier penetration and drug development from an industrial point of view. *Curr. Med. Chem. – Central Nervous Systems Agents* 2: 187-201 (2002).
- MYERS, R.K.; MCGAVIN, M.D. Cellular and tissue responses to injury . In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. *Pathologic basis of veterinary disease*. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. Cap.1, p.39-41.
- MOGHIMI, S.M. Chemical camouflage of nanospheres with a poorly reactive surface: towards development of stealth and target-specific nanocarriers *Biochimica et Biophysica Acta* 1590: 131– 139 (2002).
- MÜLLER, R.H., MEHNERT, W.; LUCKS, J.S.; SCHWARZ, C.; zur MÜHLEN, A.; WEYHERS, H.; FREITAS, C.; RÜHL, D. Solid lipid nanoparticles (SLN) – An

- alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41: 62-69 (1995).
- MÜLLER, R.H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 161-177 (2000).
- NATARAJAN, S.K.; EAPEN, C.E.; PULLIMOOD, A.B.; BALASSUBRAMANIAN, K.A. *J. of Gastroent. And Hepatol.* (21): 1240-1249 (2006).
- NEIL, M.J.O.; SMITH, A.; SENIOR, *The merck index.* 30<sup>th</sup> ed. USA: Merck & Co. Inc. (2001).
- OHSHIRO, S.; HOBARA, N.; SAKAI, M.; HOKAMA, N.; KAMEYA, H.; SAKANASHI, M. Effects of salicylate on the pharmacokinetics of valproic acid after oral administration of sodium valproate in rats. *Biog. Amines* 17(4-6): 401-407 (2003).
- OWENS, M.J.; NEMEROFF, C.B. Pharmacology of valproate. *Psychopharm. Bull.* 37 (supl.2): 17-24 (2003).
- OWENS III, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonization, distribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307: 93-102 (2006).
- PARFITT, K. (org.) *Martindale: The complete drug reference.* 32<sup>nd</sup> ed. London: Pharmaceutical Press (1999).
- POTSCHKA, H.; FEDROWITZ, M.; LÖSCHER, W. P-glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats. *Neurosci. Lett.* 327: 173-176 (2002).
- PREGO C., GARCÍA M., TORRES D., ALONSO M.J. Transmucosal macromolecular drug delivery. *J. of Control. Release* (101) 151–162 (2005).
- REYNOLDS, J.E.F. *Martindale: The extra pharmacopoeia.* Londres: Pharmaceutical Press, 30a. ed. (1999).
- SANDER, T. The genetics of idiopathic generalized epilepsy: Implications for the understanding of its aetiology. *Mol. Med. Today* 2: 173-180 (1996).
- SAWCHUK, R.J.; ELMQUIST, W.F. Microdialysis in the study of drug transportes in the CNS. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45: 295-307 (2000).
- SAYIN, U.; TIMMERMAN, V.; WESTERINK, B.H.C. The significance of extracellular GABA in the substantia nigra of the rat during seizures and anticonvulsant treatments. *Brain Res.* 669: 67-72 (1995).
- SCHAFFAZICK, S.R.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Química Nova.* 26(5): 726-737 (2003).

- SCOTT, R.A.; LHATOO, S.D.; SANDER, J.W. - The Treatment of Epilepsy in Developing Countries: Where do we go from Here? *Bull World Health Organ* 79(4):344-51 (2001).
- SEBBEN, M.; MERTINS, O.; POHLMANN, A.R.; SILVEIRA, N.P. Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compósitas de lecitina de soja e quitosana. *Espaço Química*. 1(1): 1-3 (2004).
- SERRANO, B.B.; GARCIA SANCHEZ, M.J.; OTERO, M.J.; BUELGA, D.S.; SERRANO, J.; DOMINGUEZ-GIL, A. Valproate population pharmacokinetics in children. *J. Clin. Pharm. Ther.* 24: 73-80 (1999).
- SILVA, M.F.B.; AIRES, C.C.P.; LUIS, P.B.M.; RUITER, J.P.M.; IJLST, L.; DURAN, M.; WANDERS, R.J.A.; TAVARES, I. DE A. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. *J. Inherit. Metab. Dis.* 31:205–216 (2008).
- SMITH, A. (Ed.) The Merck Index. 1a. ed., New Jersey (2001).
- SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanocapsules as drug delivery devices. *J. Control. Release*. 70: 1-20 (2001).
- STOUT, S.C.; OWENS, M.J.; LINDSEY, K.P.; KNIGHT, D.L.; NEMEROFF, C.B. Effects of sodium valproate on corticotrofin-releasing factor systems in rat brain,. *Neuropsychopharmacol.* 24: 624-631 (2001).
- TONG, V.; TENG, X.W.; CHANG, T.K.H.; ABBOTT, F.S. Valproic acid I: Time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicol. Sci.* 86(2): 427-435 (2005).
- VISSER, C.C.; STEVANOVIC, S.; VOORWINDEN, L.H.; VAN BLOOIS, L.; GAILLARD, P.J.; DANHOF, M.; CROMMELIN, D.J.; DE BOER, A.G. Targeting liposomes with protein drugs to the blood-brain barrier in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25(2-3):299-305 (2005).
- YU, D.; GORDON, J.D.; ZHENG, J.; PANESAR, S.K.; RIGGS, K.W.; RURAK, D.W.; ABBOTT, F.S. Determination of valproic acid and its metabolites using gas chromatography with mass-selective detection: application to serum and urine samples from sheep. *J. Chromatogr. B* 666: 269-281 (1995).
- ZACCARA, G.; MESSORI, A.; MORONI, F. Clinical pharmacokinetics of valproic acid. *Clin. Pharmacokinet.* 15: 367-389 (1988).
- ZARA, G.P.; BARGONI, A.; CAVALLI, R.; FUNDARÒ, A.; VIGHETTO, D.; GASCO, M.R. Pharmacokinetics and tissue distribution of idarubicin-loaded solid lipid nanoparticles after duodenal administration to rats. *J. Pharm. Sci.* 91(5): 1324-1333 (2002).

ZHONG, Y.; JIAO, Z.; YU, Y. Simultaneous determination of mycphenolic acid and valproic acid based on derivatization by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 20(4): 319-326 (2006).





**Anexos**



## ANEXO 1

### Validação de Metodologia Analítica em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Determinação de AV em Solução

A validação de metodologia analítica em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada avaliando-se parâmetros como: Linearidade, Precisão, Exatidão, Limite de Quantificação e Limite de Detecção.

Equipamento:

- Equipamento: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu SCL 10Avp sistema controlador/ LC10ADvp cromatógrafo líquido/ SIL 10ADvp Auto Injetor) (CLAE);
- Detector de Fluorescência (Shimadzu RF10AXL);
- Coluna cromatográfica  $\mu$ Bondapak<sup>®</sup> C18 (125 Å 10  $\mu$ m) 3,9 x 300 mm (Waters<sup>®</sup>);
- Pré-coluna com material de enchimento  $\mu$ Bondapak<sup>®</sup> C18/Corasil (37-50  $\mu$ m, Waters<sup>®</sup>).

Condições do cromatógrafo:

- Fase móvel:
  - Acetonitrila/tampão acetato sódico 30 mM (70:30 v/v) com pH ajustado a 4,8 com ácido acético glacial;
- Velocidade de fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min;
- Volume de injeção da amostra: 50  $\mu$ L;
- Comprimento de onda de excitação: 325 nm;
- Comprimento de emissão: 398 nm;
- Sensibilidade do detector: média;
- Ganho do detector: 1 x
- Resposta do detector: 1x;
- Tempo de corrida do cromatograma: em média 20 min.

O processo de validação foi realizado de acordo com as normas da Resolução RE nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>5</sup> (2003) sendo que o mesmo se realizou em dois dias consecutivos analisado-se 3 curvas de calibração a cada dia, preparadas a partir de diferentes soluções-mães, com concentrações de fármaco na matriz de 1; 2; 4; 6; 8 e 10 µg/mL e pontos controles preparados a partir de soluções-mães distintas às aquelas utilizadas para preparo das curvas de calibração, nas concentrações de 1,5; 5 e 7 µg/mL.

Nas Figuras 18, 19 e 20 podemos observar os cromatogramas de branco de solução, AV na concentração de 4 µg/mL e avaliação da concentração de AV em uma amostra de formulação (concentração de aproximadamente 4 µg/mL), respectivamente.

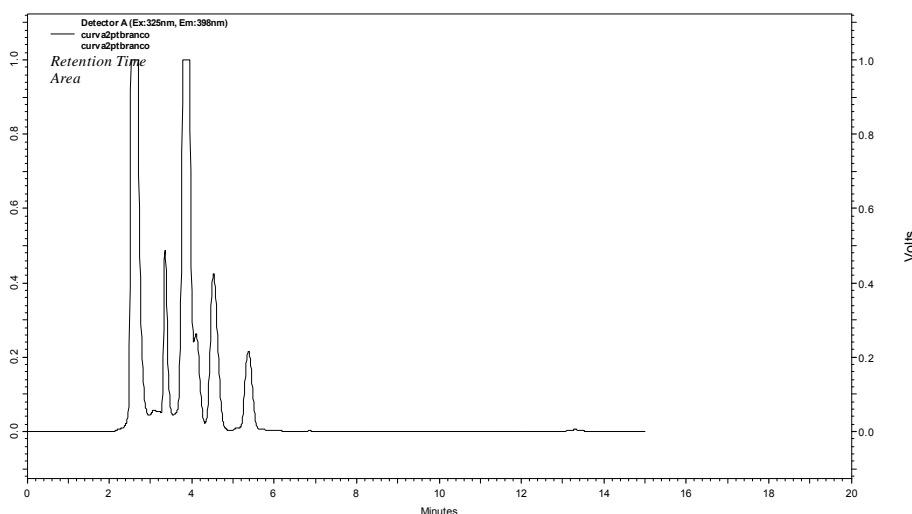


Figura 18. cromatograma obtido para a solução em acetonitrila (branco) contendo os reagentes para derivatização (trietilamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina).

<sup>5</sup> Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>>

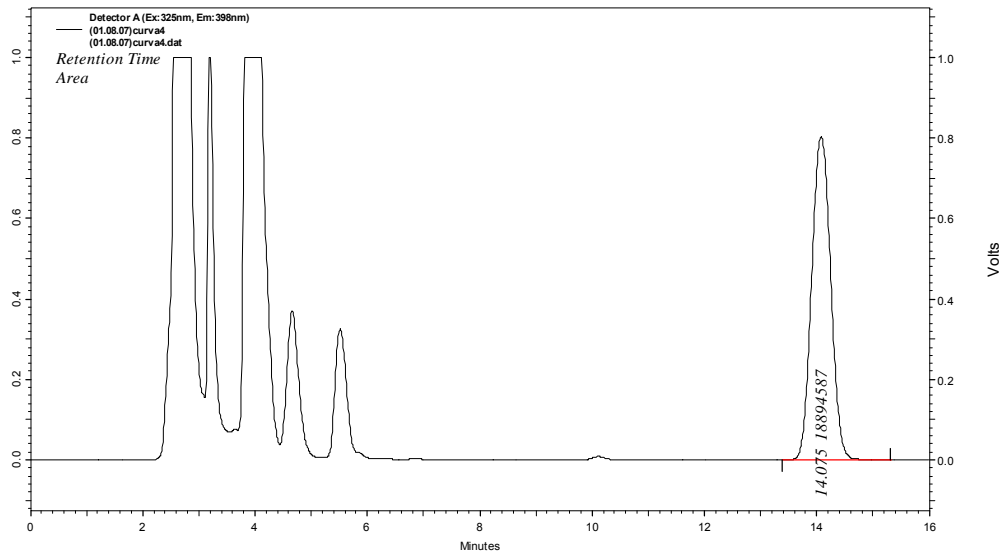


Figura 19. Cromatograma obtido para a solução em acetonitrila da curva de calibração contendo AV na concentração de 4 µg/mL e os reagentes para derivatização (trietilamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina).

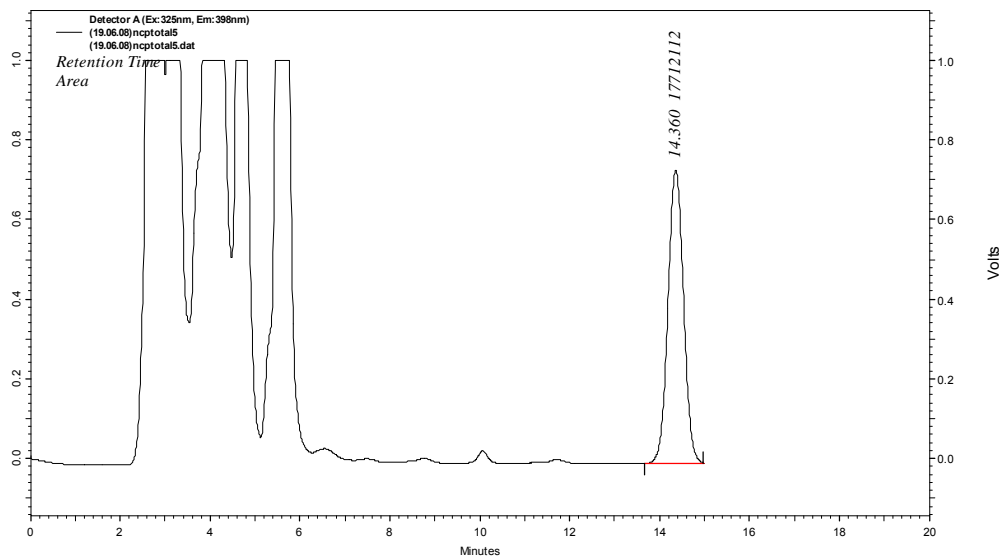


Figura 20. Cromatograma obtido para a solução em acetonitrila contendo AV na amostra de formulação NCP 6000 e os reagentes para derivatização (trietilamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina) – determinação do teor de fármaco na formulação.

### 1.1 Linearidade

Os resultados obtidos para a linearidade em termos de coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) são mostrados juntamente com a Figura 21.

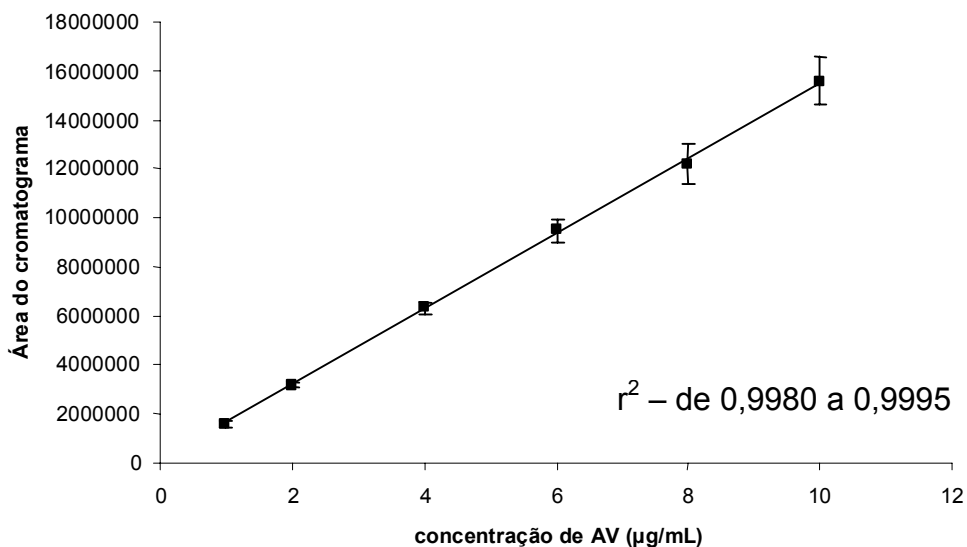


Figura 21. média das 6 curvas de calibração confeccionadas para validação de metodologia de análise de AV em solução de acetonitrila.

Os valores para os coeficientes de correlação se apresentam próximos a 1,0 o que demonstra excelente linearidade para a metodologia adaptada e validada.

## 1.2. Precisão

A precisão foi avaliada para todas as curvas de calibração confeccionadas e mostraram resultados dentro dos limites estabelecidos pelas normas da Resolução RE n° 899. Nas Tabelas 14 e 15 podemos observar os resultados de precisão intra-dia para o dia 1 e para o dia 2 da validação, respectivamente, obtidos pela análise dos pontos controle para as curvas de calibração.

Tabela 14. Valores de precisão intra-dia - desvio padrão relativo – Dia 1.

Dia 1	Concentração calculada						
	Conc. Teórica (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	média	dp	dpr (%)
1,5	1,5	1,60	1,36	1,43	1,46	0,20	8,17
5,0	5,0	4,68	5,34	5,16	5,06	0,34	6,78
7,0	7,0	6,50	7,71	7,24	7,15	0,61	8,51

Tabela 15. Valores de precisão intra-dia - desvio padrão relativo – Dia 2.

<b>Dia 2</b>	<b>Concentração calculada</b>					
<b>Conc. Teórica (µg/mL)</b>	<b>Curva 1</b>	<b>Curva 2</b>	<b>Curva 3</b>	<b>média</b>	<b>dp</b>	<b>dpr (%)</b>
1,5	1,55	1,38	1,63	1,52	0,13	8,47
5,0	4,93	4,84	4,75	4,84	0,09	1,35
7,0	6,59	7,25	6,96	6,93	0,33	4,82

Na tabela 16 podemos observar os valores calculados para o desvio padrão relativo para avaliar a precisão interdia estão dentro dos limites determinados para validação de acordo com as normas da Resolução consultada.

Tabela 16. Valores de precisão inter-dia - desvio padrão relativo.

<b>Interdia</b>	<b>Concentração calculada</b>				
<b>Conc. Teórica (µg/mL)</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>média</b>	<b>dp</b>	<b>dpr (%)</b>
1,5	1,46	1,52	1,49	0,04	2,56
5,0	5,06	4,84	4,95	0,16	3,17
7,0	7,15	6,93	7,04	0,15	2,21

### 1.3. Exatidão

Na Tabela 17 podemos observar os valores de exatidão calculados para os pontos controle para as curvas de calibração.

Tabela 17. Valores de exatidão calculados para os pontos controle das curvas de calibração

Conc. Teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)						média	Exatidão (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6		
1,5	1,46	1,50	1,43	1,55	1,51	1,49	1,49	99,45
5,0	4,75	5,21	5,03	4,93	4,84	4,88	4,94	98,81
7,0	6,50	7,04	7,24	6,59	7,25	6,96	6,93	99,00

Pode-se observar que os valores calculados para exatidão encontram-se dentro dos limites propostos pela resolução seguida para validação de metodologia analítica.

#### 1.4. Limite de Inferior de Quantificação e Limite de Detecção

Para os limites inferior de quantificação e de detecção, os valores calculados foram:

- Limite Inferior de Quantificação (LIQ): 0,86 µg/mL;
- Limite de Detecção (LD): 0,26 µg/mL.



## ANEXO 2

### Validação de Metodologia Analítica em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Determinação de AV em Plasma

A validação de metodologia analítica em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada avaliando-se parâmetros como: Linearidade, Precisão, Exatidão, Limite de Quantificação e Limite de Detecção.

Equipamento:

- Equipamento: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu SCL 10Avp sistema controlador/ LC10ADvp cromatógrafo líquido/ SIL 10ADvp Auto Injetor) (CLAE);
- Detector de Fluorescência (Shimadzu RF10AXL);
- Coluna cromatográfica  $\mu$ Bondapak<sup>®</sup> C18 (125 Å 10  $\mu$ m) 3,9 x 300 mm (Waters<sup>®</sup>);
- Pré-coluna com material de enchimento  $\mu$ Bondapak<sup>®</sup> C18/Corasil (37-50  $\mu$ m, Waters<sup>®</sup>).

Condições do cromatógrafo:

- Fase móvel:
  - Acetonitrila/tampão acetato sódico 30 mM (70:30 v/v) com pH ajustado a 4,8 com ácido acético glacial;
- Velocidade de fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min;
- Volume de injeção da amostra: 50  $\mu$ L;
- Comprimento de onda de excitação: 325 nm;
- Comprimento de emissão: 398 nm;
- Sensibilidade do detector: alta;
- Ganho do detector: 1 x
- Resposta do detector: 1x;
- Tempo de corrida do cromatograma: em média 20 min.

O processo de validação foi realizado de acordo com as normas da Resolução RE n° 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>6</sup> (2003) sendo que o mesmo se realizou em dois dias consecutivos analisado-se 3 curvas de calibração a cada dia, preparadas a partir de diferentes soluções-mães, com concentrações de fármaco na matriz de 1; 10; 25; 50; 100; 200 e 300 µg/mL e pontos controles preparados a partir de soluções-mães distintas àquelas utilizadas para preparo das curvas de calibração, nas concentrações de 5; 75 e 250 µg/mL.

Nas Figuras 22, 23 e 24 podemos observar os cromatogramas de branco de plasma, AV na concentração de 100 µg/mL e padrão interno na concentração de 100 µg/mL e avaliação da concentração de AV em uma amostra de plasma coletado em 180 min após administração de fármaco e padrão interno na concentração de 100 µg/mL, respectivamente.

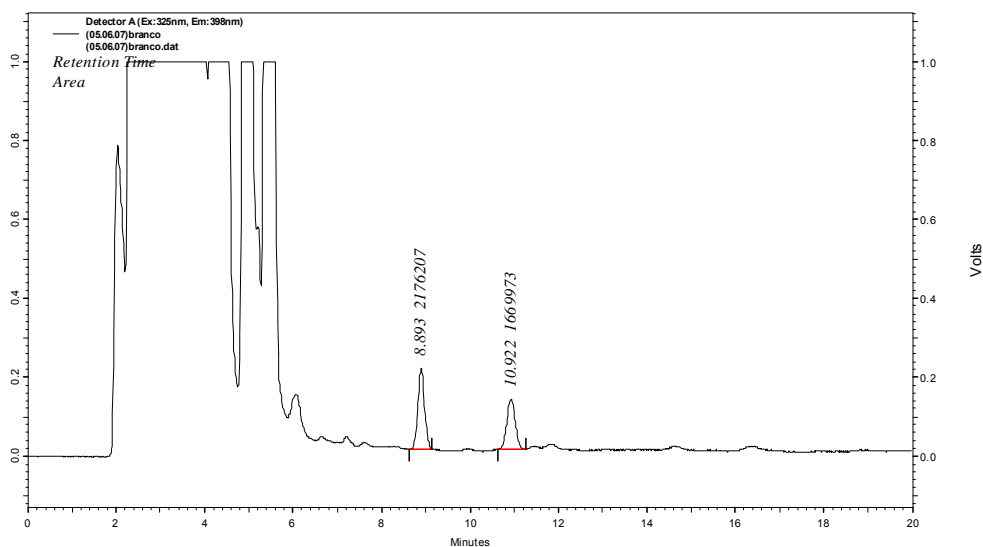


Figura 22. Cromatograma obtido para amostra de plasma (branco) contendo os reagentes para derivatização (trietilamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina).

<sup>6</sup> Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>>

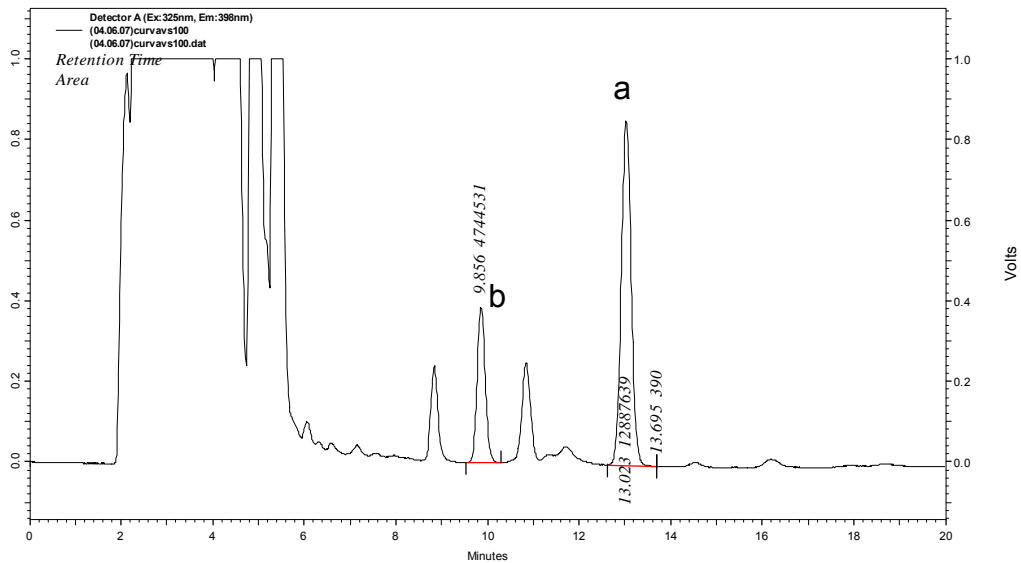


Figura 23. cromatograma obtido para amostra de plasma da curva de calibração contendo AV na concentração de 100 µg/mL (a) e padrão interno na concentração de 100 µg/mL (b) e os reagentes para derivatização (trietilamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina).

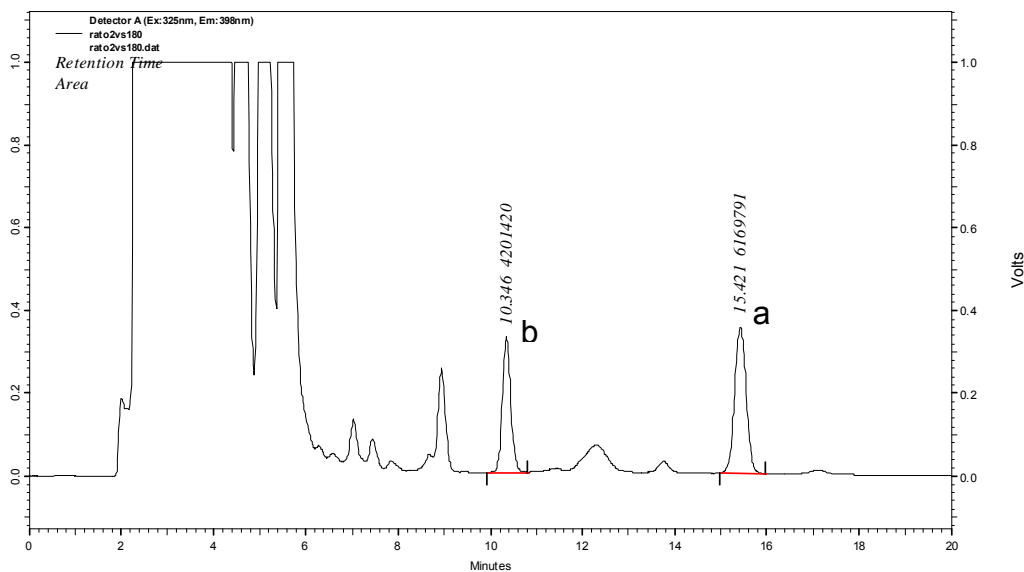


Figura 24. cromatograma obtido para amostra de plasma contendo AV (a) após administração de dose de 15 mg/kg e coletado aos 180 min contendo padrão interno na concentração de 100 µg/mL (b) e os reagentes para derivatização (trietilamina e 4-(Bromometil)-7-metóxicumarina).

## 2.1 Linearidade

Os resultados obtidos para a linearidade em termos de coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) são mostrados juntamente com a figura 25.

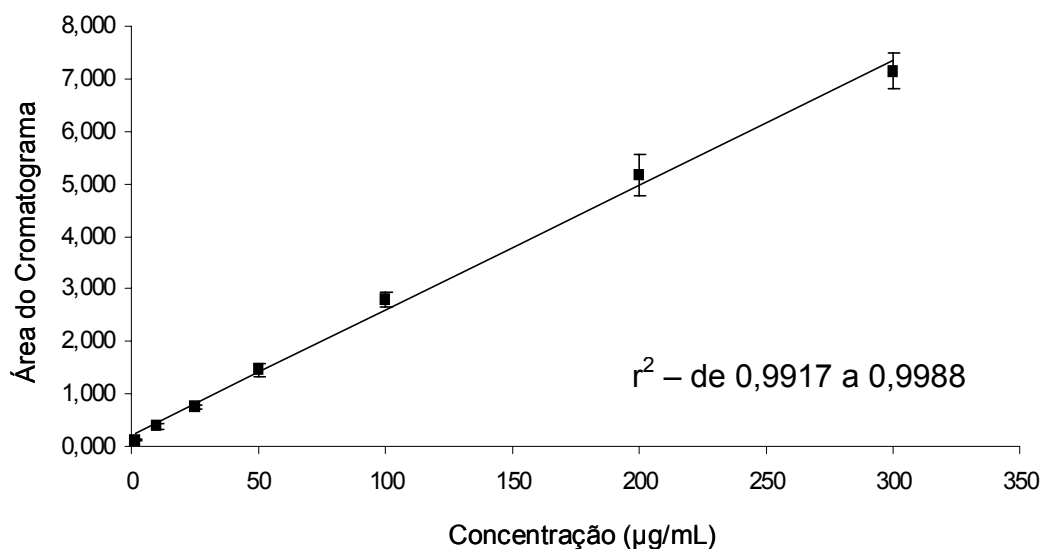


Figura 25. Média das 6 curvas de calibração confeccionadas para validação de metodologia de análise de AV em plasma.

Os valores para os coeficientes de correlação se apresentam próximos a 1,0 o que demonstra excelente linearidade para a metodologia adaptada e validada.

## 2.2. Precisão

A precisão foi avaliada para todas as curvas de calibração confeccionadas e mostraram resultados dentro dos limites estabelecidos pelas normas da Resolução RE n° 899. Nas Tabelas 18 e 19 podemos observar os resultados de precisão intra-dia, para o dia 1 e para o dia 2 da validação, respectivamente, obtidos pela análise dos pontos controle para as curvas de calibração.

Tabela 18. Valores de precisão intra-dia - desvio padrão relativo – Dia 1.

<b>Dia 1</b>	<b>Concentração calculada</b>					
<b>Conc. Teórica (µg/mL)</b>	<b>Curva 1</b>	<b>Curva 2</b>	<b>Curva 3</b>	<b>média</b>	<b>dp</b>	<b>dpr (%)</b>
5,0	4,85	5,39	5,47	5,24	0,34	6,46
75,0	73,20	77,91	72,79	74,64	2,85	3,81
250,0	267,03	242,94	244,28	251,42	13,53	5,38

Tabela 19. Valores de precisão intra-dia - desvio padrão relativo – Dia 2.

<b>Dia 2</b>	<b>Concentração calculada</b>					
<b>Conc. Teórica (µg/mL)</b>	<b>Curva 1</b>	<b>Curva 2</b>	<b>Curva 3</b>	<b>média</b>	<b>dp</b>	<b>dpr (%)</b>
5,0	5,49	4,42	5,97	5,29	0,79	14,92
75,0	74,27	80,51	77,91	77,57	3,13	4,04
250,0	247,18	260,98	259,46	255,87	7,56	2,96

Na tabela 20 podemos observar os valores calculados para o desvio padrão relativo para avaliar a precisão interdia estão dentro dos limites determinados para validação de acordo com as normas da Resolução consultada.

Tabela 20. Valores de precisão inter-dia - desvio padrão relativo.

<b>Interdia</b>	<b>Concentração calculada</b>				
<b>Conc. Teórica (µg/mL)</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>média</b>	<b>dp</b>	<b>dpr (%)</b>
5,0	5,24	5,29	5,26	0,04	0,77
75,0	74,64	77,57	76,10	2,07	2,72
250,0	251,42	255,87	253,64	3,15	1,24

### 2.3. Exatidão

Na Tabela 21 podemos observar os valores de exatidão calculados para os pontos controle para as curvas de calibração.

Tabela 21. Valores de exatidão calculados para os pontos controle das curvas de calibração

Conc. Teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)						média	Exatidão (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6		
5,0	4,85	5,39	5,47	5,49	4,42	5,97	5,61	112,29
75,0	73,20	77,91	72,79	74,27	80,51	77,91	76,70	102,27
250,0	267,03	242,94	244,28	247,18	260,98	259,46	249,86	99,94

Pode-se observar que os valores calculados para exatidão encontram-se dentro dos limites propostos pela resolução seguida para validação de metodologia analítica.

#### 2.4. Limite de Inferior de Quantificação e Limite de Detecção

Para os limites inferior de quantificação e de detecção, os valores calculados foram:

- Limite Inferior de Quantificação (LIQ): 0,68 µg/mL;
- Limite de Detecção (LD): 0,20 µg/mL.

## ANEXO 3

### Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CARTA DE APROVAÇÃO

proxpesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2005407

**Título :** Estudos para obtenção e caracterização de nanocápsulas e lipossomas contendo ácido valpróico e avaliação da passagem pela barreira hematoencefálica por microdiálise

**Pesquisador (es) :**

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
TERESA CRISTINA DALLA COSTA	PESQ RESPONSÁVEL		
ALEXANDRE DOS SANTOS CANTO	PESQUISADOR	cantoam@uol.com.br	
RODRIGO JOSÉ FREDDO	PESQUISADOR	freddo@farmacia.ufrgs.br	
SILVIA STANISCUASKI GUTERRES	PESQUISADOR	nanoc@farmacia.ufrgs.br	33165218

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 38 ,  
ata nº 59 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a  
Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quinta-feira, 30 de junho de 2005

  
\_\_\_\_\_  
**José Roberto Goldim**  
Coordenador do CEP-UFRGS

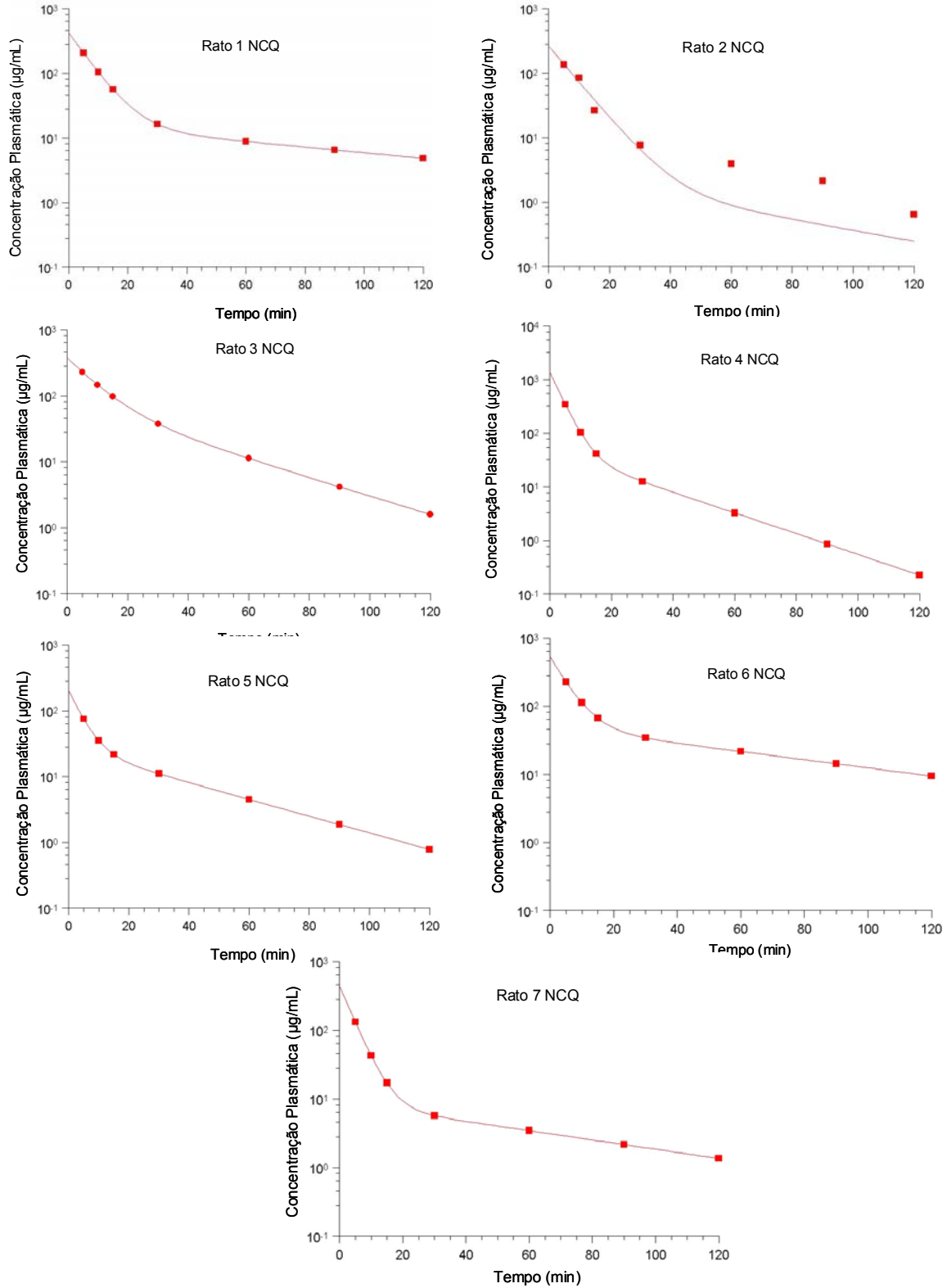




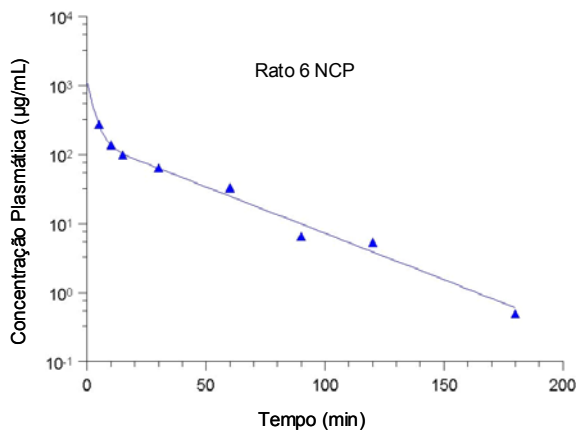
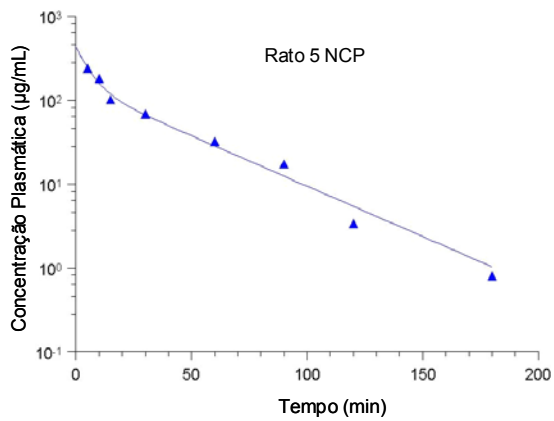
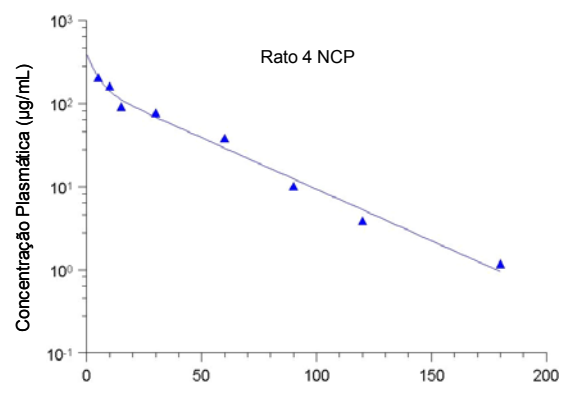
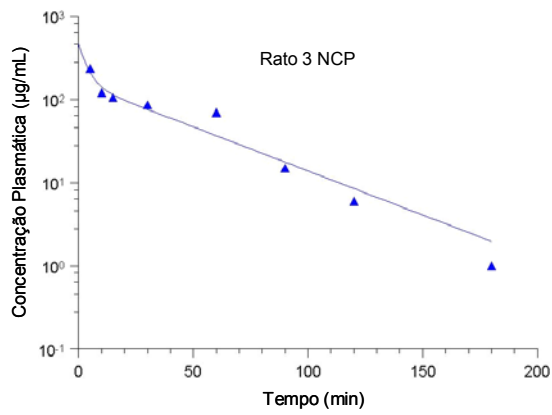
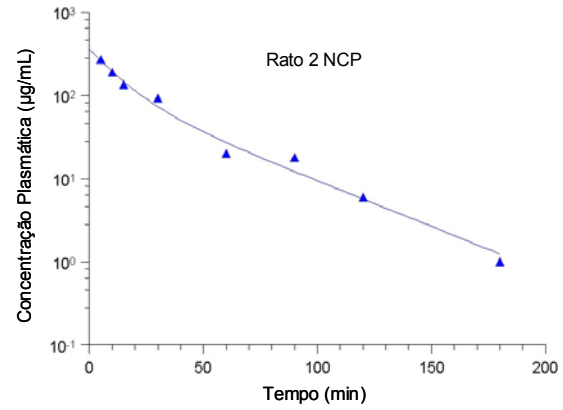
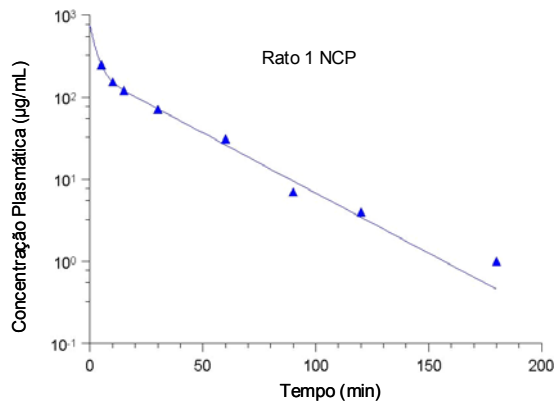
## ANEXO 4

### Perfis Farmacocinéticos Plasmáticos em Função do Tempo Individuais Modelados pelo Programa *Scientist 2.0*<sup>®</sup>

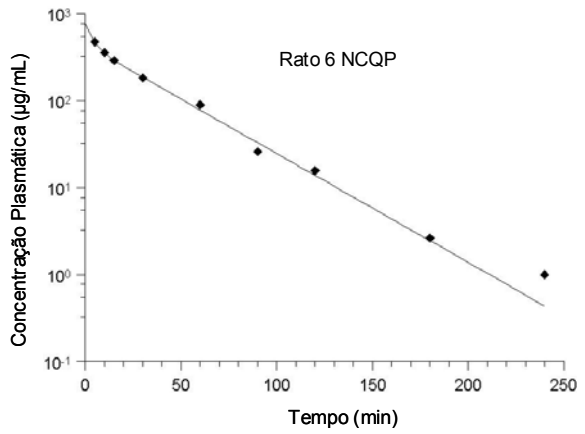
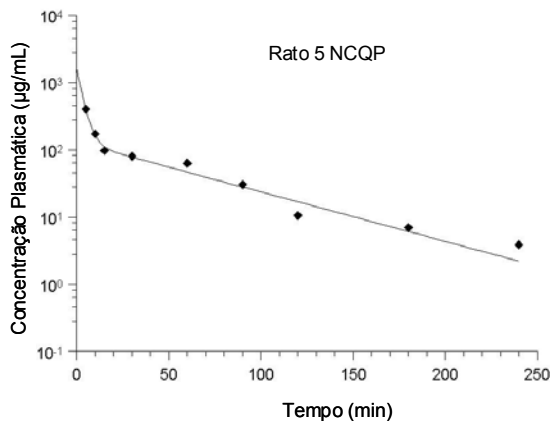
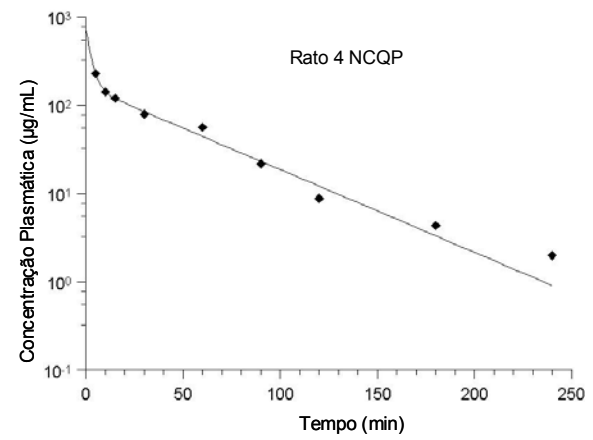
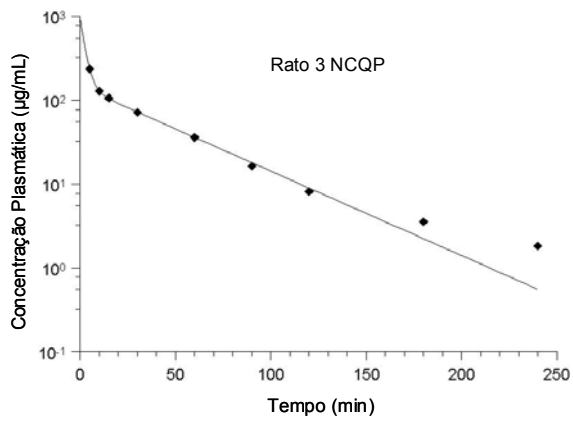
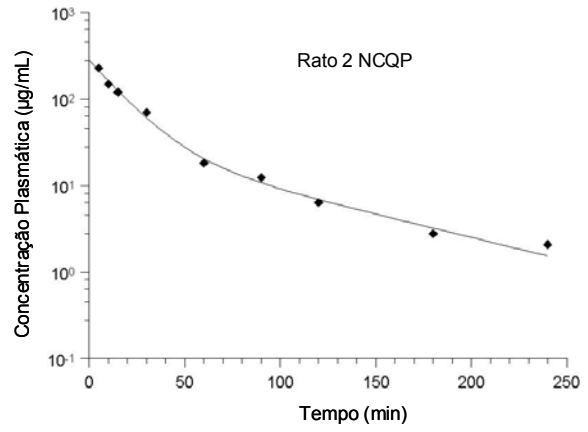
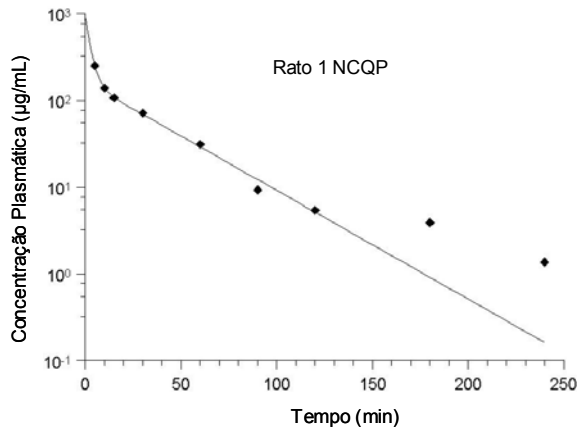
#### 4.1 Perfis individuais para ratos tratados com NCQ



## 4.2 Perfis individuais para ratos tratados com NCP



### 4.3 Perfis individuais para ratos tratados com NCQP



#### 4.4 Perfis individuais para ratos tratados com valproato sódico em solução

