



BRUNO VILELA MUNIZ

**EFEITOS DA ARTICAÍNA LIVRE E ASSOCIADA A
LIPOSSOMAS COM GRADIENTE DE pH TRANSMEMBRANAR
SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO DE IL-6 EM
QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)**

Piracicaba

2014



**Universidade Estadual De Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

BRUNO VILELA MUNIZ

**EFEITOS DA ARTICAÍNA LIVRE E ASSOCIADA A
LIPOSSOMAS COM GRADIENTE DE pH TRANSMEMBRANAR
SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO DE IL-6 EM
QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)**

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Volpato

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Bruno Vilela Muniz e orientado pela Prof^a Dr^a Maria Cristina Volpato

Assinatura do Orientador

Piracicaba
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

M925e Muniz, Bruno Vilela, 1988-
Efeitos da articaína livre e associada a lipossomas com gradiente de pH transmembranar sobre a viabilidade celular e expressão de IL-6 em queratinócitos humanos (HaCaT) / Bruno Vilela Muniz. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Cristina Volpato.
Coorientador: Francisco Carlos Groppo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carticaína. 2. Lipossomas. 3. Sobrevivência celular. 4. Interleucina-6. 5. Anestésicos locais. I. Volpato, Maria Cristina, 1962-. II. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The effects of plain and liposome-associated articaine with transmembrane pH gradient on human keratinocytes (HaCaT) viability and IL-6 expression

Palavras-chave em inglês:

Carticaine

Liposomes

Cell survival

Interleukin-6

Anesthetics, local

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Maria Cristina Volpato [Orientador]

Rogério Heládio Lopes Motta

Michelle Franz Montan Braga Leite

Data de defesa: 30-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 30 de Maio de 2014, considerou o candidato BRUNO VILELA MUNIZ aprovado.

Handwritten signature of Maria Cristina Volpato.

Profa. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO

Handwritten signature of Rogério Heládio Lopes Motta.

Prof. Dr. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA

Handwritten signature of Michelle Franz Montan Braga Leite.

Profa. Dra. MICHELLE FRANZ MONTAN BRAGA LEITE

RESUMO

A articaína não encapsula em proporção significativa em lipossomas sem gradiente de pH transmembranar. O objetivo deste estudo foi preparar e realizar a caracterização inicial de formulação de articaína associada a lipossomas unilamelares (400nm) com gradiente de pH transmembranar, com sulfato de amônia como tampão interno sobre a viabilidade celular em culturas de queratinócitos humanos (HaCaT) e sobre a liberação de uma interleucina pró-inflamatória (IL-6), comparando com formulações de articaína livre. As células foram expostas às formulações de articaína nas concentrações 0,1%, 0,2% e 0,3% na forma de solução e em suspensão lipossomal (lipossomas unilamelares), além dos controles (soro fisiológico, suspensão lipossomal e meio de cultura). A avaliação da viabilidade celular (redução do MTT - espectrofotometria) foi realizada após 10 min e 4h e a quantificação da IL-6 (imunoensaio de ELISA) após 4h da exposição às formulações. Os resultados foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn (viabilidade celular) e de Student-Newman-Keuls (IL-6) com significância de 5%. As vesículas lipossomais mantiveram-se integras após a encapsulação de articaína, apresentando 18,95% de eficiência de encapsulação. A polidispersão dos lipossomas sem anestésico foi de $0,2 \pm 0,0$, enquanto a dos liposomas contendo articaína variou de $0,56 \pm 0,03$ a $0,66 \pm 0,10$. O potencial Zeta variou de $-10,5 \pm 0,9$ a $-21,2 \pm 0,9$ mV. O tamanho das vesículas variou de $622 \pm 71,5$ a $796 \pm 111,95$ nm. A viabilidade celular foi diminuída após 10 min de exposição às formulações lipossomais (com e sem articaína) em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$); as formulações lipossomais não diferiram entre si ($p > 0,05$). Não houve diferenças entre os demais tratamentos ($p > 0,05$), os quais não alteraram a viabilidade nesse tempo de exposição. Após exposição por 4h houve diminuição na viabilidade em todas as formulações lipossomais e nas formulações de articaína livre 0,2% e 0,3% ($p < 0,05$), à exceção dos grupos controle e articaína 0,1% ($p > 0,05$). A liberação de IL-6 não foi afetada

pelas formulações lipossomais ($p > 0,05$); a articaína livre em todas as concentrações testadas aumentou a liberação de IL-6, tanto em relação ao controle, quanto às formulações lipossomais com a mesma concentração de articaína ($p < 0,05$). Conclui-se que a utilização de lipossomas com gradiente de pH transmembranar aumentou a encapsulação de articaína, entretanto, apresentou toxicidade intrínseca no modelo avaliado.

Palavras-chave: articaína, lipossoma, viabilidade celular, Interleucina-6, anestésicos locais, interleucinas, sistemas de liberação de drogas.

ABSTRACT

Articaine is not encapsulated in significant proportion in liposomes without transmembrane pH gradient. The aim of this study was to perform the initial characterization of a formulation of articaine in unilamellar liposome with transmembrane pH gradient and to observe its effects on human keratinocytes (HaCaT) regarding cellular viability and liberation of interleukin 6 (IL-6) in comparison to plain articaine. HaCaT cells were exposed to plain articaine solutions and liposomal suspensions (0.1%, 0.2% and 0.3% articaine concentrations) and to the controls (saline, liposomal suspension and culture medium). Cell viability (MTT reduction - spectrophotometry) was evaluated at 10 min and 4h after exposure to the treatments; IL-6 was determined after 4 h of cell treatments. Cell viability results were submitted to Kruskal-Wallis test, followed by Dunn post-hoc test; IL-6 results were analyzed by Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls tests. Significance was set at 5%. Liposome vesicles remained intact after articaine loading and presented encapsulation efficiency of 18.95%. Liposome without anesthetic presented polydispersity index of 0.2 ± 0.0 , while liposomes with articaine showed values of 0.56 ± 0.03 to 0.66 ± 0.10 . Zeta potentials varied from -10.5 ± 0.9 to -21.2 ± 0.9 mV and vesicle sizes from 622 ± 71.5 to 796 ± 111.95 nm. Cell viability decreased after 10 min exposure to the liposomal formulations (with and without articaine) in relation to the other treatments ($p < 0.05$); liposomal formulations did not differ from each other ($p > 0.05$). No differences were found among the other treatments ($p > 0.05$), which did not interfere in cell viability after this exposure time. After 4h exposure cell viability was diminished by all liposomal formulations and by 0.2% and 0.3% plain articaine ($p < 0.05$), except for control groups and 0.1% plain articaine ($p > 0.05$). IL-6 release was not affected by liposomal formulations ($p > 0.05$); all concentrations of plain articaine increased IL-6 release in relation to the controls and to each correspondent liposomal formulation ($p < 0.05$). In conclusion, liposome with transmembrane pH gradient increases articaine encapsulation in relation to that

described in the literature, however it presented intrinsic in the model evaluated.

Key words: articaine, liposome, cell viability, IL-6, local anesthetics, interleukins, drug release systems.

SUMÁRIO

Página

AGRADECIMENTOS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 ANESTÉSICOS LOCAIS.....	4
2.2 ARTICAÍNA.....	6
2.3 TOXICIDADE DOS ANESTÉSICOS LOCAIS.....	8
2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS – FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS.....	12
3 PROPOSIÇÃO.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 MATERIAL.....	20
4.2 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES LIPOSSOMAIS.....	20
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO.....	22
4.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação.....	23
4.3.2 Distribuição de tamanho: espalhamento quase-elástico de luz/polidispersão.....	24
4.3.3 Determinação do potencial Zeta das vesículas.....	24
4.3.4 Avaliação do tamanho, integridade e morfologia das vesículas.....	24
4.4 CULTURA CELULAR.....	25
4.5 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	25
4.5.1 Avaliação da viabilidade celular.....	28
4.5.2 Liberação de Interleucina 6 (IL-6)	28
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5 RESULTADOS.....	31

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS.....	31
5.1.1 Determinação da eficiência de encapsulação.....	
5.1.2 Distribuição de tamanho: espalhamento quase-elástico de luz/polidispersão; Potencial Zeta.....	31
5.1.3 Avaliação do tamanho, integridade e morfologia das vesículas.....	32
5.2 ENSAIOS “IN VITRO”	33
5.2.1 Viabilidade celular.....	33
5.2.2 Liberação de Interleucina 6 (IL-6)	36
6 DISCUSSÃO.....	39
7 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais queridos, Edson e Val, pelo amor incondicional, que é combustível para que eu possa seguir meus projetos, pela preocupação, pelo zelo, incentivo e orgulho. Pela atuação basilar nas decisões mais importantes da minha vida. Vocês me incentivaram a estar aqui e buscar sempre crescimento pessoal e profissional.

A minha joia, o ser único em minha vida, minha irmã Mariane, que de alguma maneira foi o grande propulsor em minha vida. Me ensinando a viver desde o primeiro minuto e norteando meus ideais.

Aos meus familiares: tios Jussara, Gera, Val, Leandro, Gilberto, Ana e, em especial, Irene; primos Maurício, Augusto, Fabinho e Fernando, que sempre me apoiaram e contribuíram na minha formação, e propiciaram belos momentos juntos.

Em especial aos meus avós Meiri e Marcos, por sempre confiarem e alimentarem o meu desejo pelo conhecimento, sem nunca perder o bom humor e alegria.

A minha namorada Larissa Motta, pelo apoio, incentivo, carinho, amor e confiança. Um alento a todas as minhas preocupações.

À professora Maria Cristina Volpato, minha orientadora, pelo profissionalismo e dedicação com que guiou esse projeto, características essas que desejo levar pelo resto da vida. Serei sempre grato pela compreensão, atenção, exigência e excelência na orientação. Sempre um exemplo profissional a ser seguido.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, sempre solícito em nos ajudar com atenção, debate científico e, sempre instigando o senso crítico.

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia, e Terapêutica, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade e Prof. Dr. José Ranali, pelos ensinamentos e conversas sobre os mais diversos assuntos.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa do Reitor

Prof. Dr. José Tadeu Jorge, à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), por meio do Diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, à coordenação dos cursos de pós-graduação da FOP/UNICAMP, na figura da Prof^a Dr^a Renata C. M. R. Garcia.

Em especial à Prof^a Dr^a Cinthia P. M. Tabchoury, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP, por sua solicitude, prontidão e dedicação com os alunos, sempre buscando a excelência do PPG-O.

Aos professores das bancas de qualificação primeira e segunda fases: Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco, Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, Prof. Dr. Bruno Bueno-Silva, Prof^a. Dr^a. Carina Denny e Prof^a. Dr^a. Cintia Maria Saia Cereda, por suas sensatas avaliações e contribuições que buscaram sempre a melhoria dessa dissertação.

Aos colaboradores do meu projeto: Prof^a. Dr^a. Eneida de Paula, Camila Morais Gonçalves da Silva e Márcio Paschoal, pela ajuda, disponibilidade e gentileza de suas consultorias.

Aos técnicos do laboratório de farmacologia Eliane Melo (Ely) e José Carlos Gregório (Zé) pela bela amizade, conversas entusiasmadas, solicitude e orientações.

À Maria Elisa dos Santos, pela alegria e carinho no exercício de suas funções, sempre solicita para atender, com gentileza e dedicação a todos.

Aos meus amigos de mestrado, doutorado e demais professores da farmacologia: Ana Paula Bentes, Bruno Bueno, Bruna Benso, Carina Denny, Irlan Almeida (Iran), Karina Cogo, Luciano Serpe, Marcelo Franchin, Marcos Cunha, Laila Facin, Jonny Burga, Lívia Galvão, Luciana Berto, Paula Sampaio, Sérgio Rochelle, Talita Graziano e Verônica Freitas, pelo companheirismo e a certeza de levar essas amizades pelo resto da vida.

Em especial aos meus amigos mais do que especiais, Camila Batista da Silva (Camilinha), Cleiton Pita dos Santos (Celso) e Luiz Eduardo Nunes Ferreira, com quem sempre pude contar em todos os momentos e contribuíram enormemente com o desenvolvimento desse projeto, sem nunca perder o bom

humor.

Aos meus amigos da terrinha, Thiago, Luis Gustavo, Israel, Higor e Marcão, por compartilharem das minhas insanidades.

À terrinha, Itararé - SP, onde cresci e aprendi a ser feliz.

A todos os funcionários da FOP/UNICAMP que de alguma forma trabalharam para que eu pudesse ter êxito nos meus ideais. Agradecimento particular ao Sr. Isaías, Marcão e Carlão (setor de transporte), pelas idas e vindas ao IB, em Campinas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos em nível de mestrado (nº 2011/15768-6), do auxílio Projeto Temático intitulado “Novas formulações farmacêuticas de anestésicos locais de ação prolongada: do desenvolvimento ao teste clínico odontológico” (nº 2006/00121-9) e Auxílio à Pesquisa intitulado “Efeitos modulatórios de anestésicos locais associados a carreadores sobre a produção de mediadores inflamatórios e viabilidade celular em células epiteliais orais e fibroblastos gengivais humanos” (2012/05705-0), os quais possibilitaram a realização desse trabalho e contribuíram para minha formação.

À DFL Indústria e Comércio SA, pela cessão do sal de cloridrato de articaína, contribuindo assim para a realização do estudo.

Enfim, estou grato a todos que de alguma maneira, contribuíram para a conclusão desse trabalho.

1 INTRODUÇÃO

O controle da dor trans e pós-operatória é fundamental em várias áreas da medicina e da odontologia. Em função de seus mecanismos de ação, local e sistêmico, os anestésicos locais são fármacos chave para esse controle, motivo pelo qual tem sido alvo constante de pesquisas para o desenvolvimento de novas formulações (Strichartz, 2008).

Desenvolvida em 1969, a articaína é o único anestésico do tipo amida que contém um anel tiofeno e um grupo éster (Malamed, 2005), o que parece ser a causa da melhor difusibilidade, rápido início de ação e elevadas taxas de sucesso (Paxton & Thome, 2010; Malamed, 2005). Esses atributos geraram boa reputação e grande aceitação desse anestésico entre clínicos (Paxton & Thome, 2010).

A presença do radical éster permite ação das esterases plasmáticas e, em decorrência, menor meia-vida plasmática, fato esse que contribui para a menor toxicidade sistêmica da articaína (Oertel *et al.*, 1997; Malamed *et al.*, 2001; Snoeck, 2012). Entretanto, tem sido relatada ocorrência de toxicidade local associada ao uso desse anestésico, a parestesia, evento esse provavelmente relacionado à alta concentração em que a articaína é usada na clínica, 4% (Gaffen & Haas, 2009; Garisto *et al.*, 2010). Pesquisas em culturas também evidenciam que a articaína exerce efeito citotóxico em diferentes linhagens celulares (Werdehausen *et al.*, 2009; Keck *et al.*, 2010; Werdehausen *et al.*, 2012).

Visando diminuir a toxicidade local e sistêmica, vários estudos têm buscado associar anestésicos locais a sistemas de liberação controlada (Boogaerts *et al.*, 1993a e 1993b; Grant & Bansinath, 2001; de Paula *et al.*, 2010; Cereda *et al.*, 2012), destacando-se os lipossomas (Grant & Bansinath, 2001; Cereda *et al.*, 2006; Epstein-Barash *et al.*, 2009; de Paula *et al.*, 2010).

Lipossomas são moléculas anfipáticas, compostas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídios, ao redor de um centro aquoso, podendo, desta forma,

encapsular drogas hidrofílicas, anfífilas e hidrofóbicas. Os anestésicos locais, sendo fármacos anfipáticos se distribuem tanto na porção hidrofóbica quanto na hidrofílica (Grant & Bansinath, 2001; Fritze *et al.*, 2006; Epstein-Barash *et al.*, 2009; de Paula *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado a capacidade de diversos tipos de lipossomas em aumentar a eficiência e diminuir a toxicidade de anestésicos locais (de Araújo *et al.*, 2003; Grant *et al.*, 2004; Cereda *et al.*, 2004; de Araújo *et al.*, 2004; Rose *et al.*, 2005; Cereda *et al.*, 2006; de Araújo *et al.*, 2008; de Paula *et al.*, 2010; Davidson *et al.*, 2010; Tofoli *et al.*, 2011).

Entretanto, os próprios carreadores podem apresentar certo grau de toxicidade intrínseca. Assim, Epstein-Barash *et al.* (2009) relataram presença de miotoxicidade quando da exposição a lipossomas com 6 mg/mL de lipídeos e neurotoxicidade com concentração a partir de 9 mg/mL.

Os lipossomas podem variar quanto ao tamanho, número de camadas, organização das vesículas, composição lipídica e carga de superfície, podendo ainda ser neutros ou apresentar gradiente de pH em relação ao meio externo de (Paula *et al.*, 2010).

Especificamente para a articaína, foi observado que a mesma apresenta baixa encapsulação em lipossomas neutros (de Souza, 2010) e, desta forma, essa formulação não proporciona aumento significativo de eficiência em relação à articaína associada a vasoconstritor, especialmente em modelos de maior desafio, como em tecidos submetidos à hipernocicepção (Batista da Silva, 2012).

Por outro lado, o uso de lipossomas com gradiente de pH transmembranar tem proporcionado excelentes resultados em termos de encapsulação (Mowat *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 2004).

Com base nesses resultados, no presente trabalho foi avaliada uma preparação de articaína encapsulada em lipossomas com gradiente de pH transmembranar, por meio da caracterização inicial da formulação e estudo de sua toxicidade, em relação à viabilidade celular e liberação da citocina pró-inflamatória

IL-6, em cultura de queratinócitos humanos (HaCaT).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANESTÉSICOS LOCAIS

Sendo a cirurgia um evento muito doloroso por natureza, sempre se buscou agentes que inibissem a percepção de dor, seja por meio da perda da consciência ou pelo do bloqueio da condução nervosa a partir do local da cirurgia (Weiniger *et al.*, 2012).

Nesse sentido, os anestésicos locais se tornaram componentes-chave para o controle da dor tanto no período transoperatório, quanto no pós-operatório, sendo importante para o conforto, satisfação e mobilização rápida do paciente, contribuindo ainda para menor tempo de internação e custos mais baixos na área da saúde. Assim, os anestésicos locais constituem atualmente o grupo de drogas mais comumente usadas na prática diária da odontologia e em muitas áreas da medicina (Malamed, 2005; Golembiewski, 2013).

O bloqueio da condução nervosa se dá por meio da inibição do influxo de íons sódio no neurônio, diminuindo assim a taxa de despolarização da membrana, culminando na ausência de potencial de ação. Os anestésicos locais ligam-se ao segmento S6 dos domínios III e IV, localizados na porção voltada para o axoplasma, dos canais de sódio voltagem-dependentes (Yarov-Yarovoy *et al.*, 2001). Essa interação é feita por anestésicos na forma protonada, devendo os mesmos primeiramente atravessar a membrana na forma neutra (Strichartz & Ritchie, 1987, *apud* Pinto, 2002).

Além deste local, há ainda um sítio no interior do canal de sódio, ao qual anestésicos essencialmente hidrofóbicos, como a benzocaína, podem ligar-se. Nesse caso, o anestésico local atinge o canal de sódio por difusão através da bicamada lipídica (Ragsdale *et al.*, 1994). Deve-se ainda destacar a importância da interação entre os anestésicos locais e os lipídeos da membrana, alterando a fluidez dos mesmos, podendo modificar a conformação do canal de sódio (de Paula & Shreier, 1996).

Os anestésicos locais são moléculas anfipáticas, apresentando na

porção lipofílica um anel aromático derivado do ácido benzoico, da anilina ou do tiofeno; a porção hidrofílica é formada por um radical amino derivado do álcool etílico ou do ácido acético. De acordo com a natureza da cadeia intermediária, que une as porções lipofílica e hidrofílica, os anestésicos podem ser classificados em dois grupos, as amidas [-NH-CO-] e os ésteres [-O-CO-]. Anestésicos sem a porção hidrofílica, como é o caso da benzocaína, são usados apenas para anestesia tópica (Malamed, 2005).

O tipo de cadeia intermediária da molécula de anestésico local é de extrema importância para a biotransformação da droga, sendo os de tipo éster hidrolizados no plasma, pela ação das esterases plasmáticas, em ácido para-aminobenzóico. As amidas, por outro lado, são metabolizadas essencialmente no fígado. A biotransformação da droga é importante, pois influencia diretamente na toxicidade da mesma (Malamed, 2005; Weiniger *et al.*, 2012; Golembiewski, 2013).

A toxicidade sistêmica é associada com o aumento dos níveis sanguíneos dos anestésicos locais e afeta os sistemas nervoso central e cardiovascular, podendo levar a convulsões, coma, parada respiratória e morte (Malamed, 2005). Os altos níveis sanguíneos de anestésicos locais podem ser atingidos devido a injeção intravascular acidental ou administração de altas doses no tecido local (Malamed, 2005).

Além da toxicidade sistêmica, também pode ocorrer dano no local de injeção, tanto ao tecido nervoso do local, quanto de outros tecidos, como a musculatura esquelética, por exemplo (Foster & Carlson, 1980).

A primeira referência do efeito anestésico de um composto foi do jesuíta Barnabé Cobo, em 1653, em que dizia ser possível aliviar a dor de dente mascando-se folhas de coca. Posteriormente, em 1860, Albert Niemann, no Laboratório de Friedrich Wöhler, conseguiu isolar o princípio ativo, que denominou de cocaína. Em 11 de setembro de 1884, Carl Koller realizou a primeira cirurgia com anestesia local, em um paciente com glaucoma. Porém, os efeitos indesejáveis da cocaína (toxicidade e vício) tornaram-se conhecidos e iniciou-se

uma busca por novas drogas anestésicas para substituí-la (Calatayud & González, 2003).

Em 1905, foi desenvolvida a novocaína, posteriormente rebatizada de procaína, um éster com fraco efeito anestésico e alto potencial alergênico. Em 1946 desenvolveu-se a primeira amida, a lidocaína, droga essa com efeito anestésico mais potente e atividade alergênica escassa, o que levou a tornar-se padrão ouro de comparação para os novos anestésicos (Calatayud & González, 2003).

A partir da lidocaína, novos anestésicos do tipo amida começaram a ser desenvolvidos. Em 1957 surgiram a mepivacaína e bupivacaína, em 1960 a prilocaína, e em 1969 a articaína (Calatayud & González, 2003; Malamed, 2005; Paxton & Thome, 2010). Esta última, por suas características singulares, tem sido alvo de pesquisas, tanto em odontologia, quanto em medicina (Malamed *et al.*, 2001; Batista da Silva *et al.*, 2010; Paxton & Thome, 2010; Leith *et al.*, 2012; Snoeck, 2012; Tortamano *et al.*, 2013; Amjad-Iranagh *et al.*, 2013; Förster *et al.*, 2013).

2.2 ARTICAÍNA

Nomeada originalmente como carticaína, a articaína (4-metil-3-[2-(propilamino)-propionamido]-2-tiofeno-carboxílico, cloridrato do éster metílico), foi sintetizada por Rusching e colaboradores na Alemanha e passou a ser disponibilizada para uso odontológico nesse país a partir de 1976. Desde então tem se tornado um anestésico local extremamente popular nos países em que é comercializada (Canadá, em 1983, Reino Unido, em 1998, Brasil em 1998, EUA, em 2000, e Austrália, em 2005) (Malamed, 2005).

A aceitação crescente da articaína como anestésico local em odontologia deve-se a sua potência relativamente alta, 1,5 vezes maior que a lidocaína, alta lipossolubilidade e taxa de ligação proteica (95%), o que lhe permite maior afinidade ao sítio de ligação nos canais de sódio (Malamed, 2005; Snoeck, 2012). A articaína apresenta coeficiente de partição em octanol (uma das medidas

para avaliação da lipossolubilidade) de 257, enquanto que para a lidocaína esse coeficiente é de 43 (Columb & Ramsaran, 2010).

Quando comparada com a lidocaína, dependendo da técnica anestésica utilizada, a articaína mostra menor tempo de latência (Robertson *et al.*, 2007; Tortamano *et al.*, 2013), duração anestésica mais longa (Batista da Silva *et al.*, 2010; Tortamano *et al.*, 2013) e maior taxa de sucesso (Robertson *et al.*, 2007; Ashraf *et al.*, 2013).

Essas características favoráveis são provavelmente decorrentes de sua estrutura química peculiar em relação aos demais anestésicos locais, apresentando um anel tiofeno e um radical éster, como pode ser visto na Figura 1. A presença do anel tiofeno possibilitaria maior solubilidade lipídica, facilitando assim sua difusão através dos tecidos, em comparação à lidocaína (Robertson *et al.*, 2007). Entretanto, o anel tiofeno é menos hidrofóbico do que o anel benzeno e, de acordo com Skjevik *et al.* (2011), a maior difusão, principalmente através do osso, ocorreria pela formação de ligação intramolecular de hidrogênio, especialmente entre a forma ionizada da articaína (Mojumdar *et al.*, 2010) com os fosfolípidos da membrana, “destruindo” as pontes de hidrogênio entre a água e a membrana.

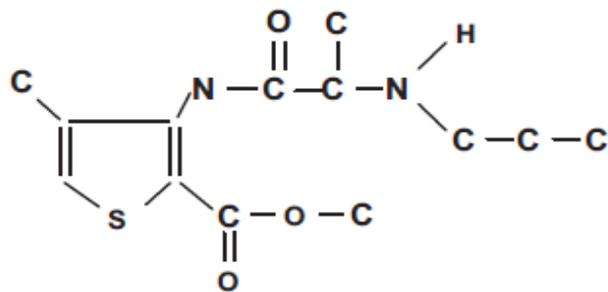


Figura 1. Estrutura química da articaína.

Fonte: Paxton & Thome, 2010

A presença do radical éster, ligado ao anel tiofeno, por sua vez, confere menor meia-vida plasmática à articaína em relação aos demais anestésicos do grupo amida, variando de 20 minutos (Oertel *et al.*, 1997) a 60 minutos (Vree *et al.*, 1997). Após injeção intra-oral de articaína na dose máxima recomendada para uso odontológico (500 mg), observou-se meia-vida em torno de 44 minutos (Hersh *et al.*, 2006). O menor tempo de meia-vida é consequência da ação das esterases plasmáticas sobre o radical éster, convertendo a articaína em ácido articaínico. Essa biotransformação também ocorre no fígado. O ácido articaínico pode ser eliminado nesta forma por via renal, ou ainda sofrer conjugação com ácido glicurônico e ser eliminado pelos rins (Malamed *et al.*, 2001; Snoeck, 2012). Essa biotransformação mais rápida contribui para a menor toxicidade sistêmica.

2.3 TOXICIDADE DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Entretanto, apesar da menor possibilidade de toxicidade sistêmica, tem sido relatado como efeito tóxico local, a ocorrência de parestesia associada ao uso da articaína. Provavelmente esse efeito seja decorrente da alta concentração na qual esse anestésico é utilizado clinicamente, 4% (Gaffen & Haas, 2009; Garisto *et al.*, 2010). De fato, Hillerup *et al.* (2011) observaram alterações neurotóxicas dose-dependente após a injeção de articaína nas concentrações de 2% e 4% no interior do nervo ciático de ratos.

Paralelamente aos achados clínicos, pesquisas têm demonstrado que a articaína, bem como os demais anestésicos locais, exerce efeitos citotóxicos em diferentes culturas celulares, tais como neuroblastoma humano (SK-N-SH) (Werdehausen *et al.*, 2009), pré-adipócitos (Keck *et al.*, 2010) e linfomas de células T (Jurkat) (Werdehausen *et al.*, 2012). Nessas pesquisas fica evidenciado que o grau de toxicidade dos anestésicos locais pode variar de acordo com tipo celular avaliado.

Werdehausen *et al.*, em 2009, avaliaram a toxicidade de oito anestésicos locais (tetracaína, procaína, bupivacaína, ropivacaína, prilocaína, lidocaína, mepivacaína e articaína) em células de neuroblastoma humano da

linhagem SK-N-SH. Após a incubação das células por 24 horas com várias concentrações de cada anestésico local, as mesmas foram avaliadas por citometria de fluxo, com marcação por Anexina V e 7-AAD, para observação de ocorrência de apoptose e necrose. Os autores concluíram que todos os anestésicos avaliados apresentam neurotoxicidade em concentrações observadas clinicamente após anestesia espinhal e intratecal. Concluiu-se também que a neurotoxicidade é um fenômeno mais ligado às propriedades físico-químicas das drogas do que com a sua estrutura molecular, estando diretamente relacionada à lipossolubilidade. A procaína e a articaína foram os anestésicos que apresentaram menor neurotoxicidade.

Mais recentemente, esses autores (Werdehausen *et al.*, 2012) avaliaram, com a mesma metodologia do estudo anterior, a toxicidade desses anestésicos locais sobre células T de linfoma humano (Jurkat). Observaram correlação moderada e significativa entre a dose letal em 50% das células (IC₅₀), o coeficiente de partição octanol/tampão e as potências clínicas dos anestésicos estudados. Embora a ordem de toxicidade tenha diferido do estudo anterior para alguns dos anestésicos, a articaína foi o que apresentou a menor toxicidade em ambos os estudos.

Por outro lado, Keck *et al.* (2010), ao avaliar a ação de anestésicos locais em pré-adipócitos, obtiveram resultados distintos dos relatados por Werdehausen *et al.* (2009 e 2012). Nesse estudo culturas de pré-adipócitos foram expostas aos anestésicos bupivacaína, mepivacaína, ropivacaína, lidocaína e articaína (esta última associada à epinefrina) por 30 minutos e então avaliadas quanto à viabilidade (por imunofluorescência, pelo método de exclusão do iodeto de propídio) e à capacidade de diferenciação (por expressão do marcador de adiponectina). Com exceção da bupivacaína, todos os anestésicos estudados diminuíram a viabilidade dos adipócitos, sendo que a articaína e a lidocaína apresentaram maior grau de toxicidade.

A possibilidade de a ação tóxica dos anestésicos locais ocorrer por estímulo inflamatório, levou a pesquisas nessa área, especialmente sobre os

mediadores inflamatórios, como as citocinas (Sinclair *et al.*, 1993; Su *et al.*, 2010; Yardeni *et al.*, 2009; Schmittner *et al.*, 2010; Ferreira, 2014).

As citocinas são moléculas produzidas por vários grupos celulares e têm importância crucial nos processos de imunidade e inflamação, com papel ativo na imunidade inata, na apresentação de antígenos, na diferenciação da medula óssea, no recrutamento celular e na ativação e expressão de moléculas de adesão (Borish & Steinke, 2003).

Segundo a classificação de Borish & Steinke (2003), as citocinas podem ser agrupadas segundo suas vias de ativação: na imunidade alérgica (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25 e interferon- γ), na citotoxicidade (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, TNF- α , TNF- β e interferons), na imunidade celular (IL-2, IL-16, IL-17, IL-21 e interferon- γ), na imunidade humoral (IL-7 e IL-11), na apresentação de antígeno (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 e TNF) e na atividade anti-inflamatória (IL-1ra, TGF- β e IL-10). Dentre as citocinas pró-inflamatórias, podem ser destacadas TNF- α , IL-1 α e IL-6.

O TNF- α é uma proteína produzida por fagócitos mononucleares, neutrófilos, linfócitos ativados, células endoteliais, células NK e mastócitos. Age estimulando a resposta imune antitumoral e inflamatória, facilitando a saída de neutrófilos para o local da injúria, bem como sua ativação, mediando a aderência, quimiotaxia e degranulação (Borish & Steinke, 2003).

A IL-1 α é uma citocina pleiotrópica produzida em resposta à lesão celular. Age sobre leucócitos polimorfonucleares estimulando a fagocitose, quimiotaxia e degranulação (Hollmann & Durieux, 2000). Também induz apoptose celular e está envolvida em respostas imunes, inflamatórias e na hematopoiese. É produzida por uma variedade de células, dentre as quais se destacam os fagócitos mononucleares e os neutrófilos (Borish & Steinke, 2003).

A IL-6 é uma importante citocina pró-inflamatória produzida por células locais na inflamação aguda e crônica, e que atua na maturação de linfócitos B. De acordo com Borish & Steinke (2003), é o indutor mais importante da produção de proteínas da fase aguda pelos hepatócitos. Como a IL-1 α , age como pirógeno

induzindo a febre, e está associada com doenças inflamatórias. Da mesma forma que o TNF- α e a IL-1 α , a IL-6 é produzida primariamente por fagócitos mononucleares, mas pode ser sintetizada por vários tipos celulares como neutrófilos, linfócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, entre outras. (Borish & Steinke, 2003).

Tem sido demonstrado que alguns anestésicos locais apresentam atividade anti-inflamatória, com ação direta sobre a função dos leucócitos polimorfonucleares e dos macrófagos, bem como inibindo a liberação de mediadores inflamatórios (Hollmann & Durieux, 2000).

Sinclair *et al.* (1993) observaram que tanto a lidocaína, quanto a bupivacaína reduzem a liberação de IL-1 α em células sanguíneas mononucleares humanas previamente estimuladas por lipopolissacarídeos. A redução observada foi dose-dependente e diferente para cada um dos anestésicos (lidocaína em concentração de 0,005% a 1% e bupivacaína de 0,00125% a 0,25%).

Mais recentemente, Su *et al.* (2010) relataram que a lidocaína inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) em cultura de células da micróglia. Além disso, a lidocaína, mas não a tetracaína, é capaz de atenuar a injúria celular induzida em células endoteliais e da musculatura lisa vascular previamente submetidas por 72 h a TNF- α , interferon γ e IL-1 β . Esta modulação parece ser mediada por canais de potássio mitocondriais sensíveis a ATP (de Klaver *et al.*, 2003).

Também foi demonstrado que a lidocaína diminui a liberação de IL-6 em cultura de células tronco de tecido adiposo e é capaz de afetar a viabilidade celular, mesmo após exposição por 1 ou 2 h a concentrações usadas clinicamente (Girard *et al.*, 2013). A administração endovenosa de lidocaína a pacientes que iriam se submeter a histerectomia transabdominal também demonstrou redução de produção de IL-6 ex-vivo (Yardeni *et al.*, 2009).

Contrariamente a esses estudos, a administração de prilocaína em doses acima de 600 mg (máxima recomendada por sessão) promove aumento da liberação de IL-6, decorrente da metemoglobinemia causada pelo seu metabólito,

a ortotoluidina (Schmittner *et al.*, 2010).

Da mesma forma, foi relatado que a bupivacaína pode estimular o processo inflamatório. Gordon *et al.* (2008) avaliaram dor, produção de PGE₂ e expressão do gene para COX₂ em indivíduos submetidos à exodontia de terceiro molar inferior incluso, os quais receberam bupivacaína ou lidocaína (associadas a placebo ou rofecoxibe). Demonstraram que a administração de bupivacaína associada a placebo promoveu maior grau de dor, maior produção de PGE₂ e maior expressão do gene para COX₂, respectivamente nos períodos de 24, 4 e 48 horas após a exodontia.

Não há, até o momento, estudos que avaliem a ação da articaína sobre a liberação de interleucinas inflamatórias.

2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS – FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS

Recentemente, o foco do controle da dor pós-operatória passou a se concentrar em uma nova área de interesse, os sistemas de liberação de fármacos. Com esses sistemas é possível manipular algumas das propriedades farmacêuticas e farmacológicas das drogas, e assim aproveitar as moléculas já existentes, considerando que a síntese de novos compostos viáveis é um processo mais longo e dispendioso.

Uma vez que a toxicidade apresenta relação direta com a concentração, o uso de sistemas de liberação poderia diminuir a concentração da droga no local injetado e, conseqüentemente, a toxicidade local e sistêmica. Especificamente para os anestésicos locais, a manutenção de níveis constantes mais baixos permitiria ainda o aumento do tempo de anestesia pela manutenção da concentração (Cereda *et al.*, 2006; Epstein-Barash *et al.*, 2009;).

Dentre os critérios essenciais desejáveis para os sistemas de liberação de fármacos estão a ausência de toxicidade intrínseca e tamanho suficiente para resistir à redistribuição rápida que os fármacos podem sofrer, promovendo assim liberação lenta e sustentada do mesmo. Tomando como base essas

características, o uso de suspensões lipossomais tornou-se uma boa alternativa para entregar fármacos, pois são vesículas lipídicas biocompatíveis com a membrana celular, com baixa toxicidade intrínseca e capazes de armazenar drogas hidrófilas, anfifílicas e hidrofóbicas (Grant & Bansinath, 2001; Epstein-Barash *et al.*, 2009; de Paula *et al.*, 2010).

Descritos pela primeira vez na década de 1960, por Alec Bagham (Grant, 2002), os lipossomas são formados quando filmes secos de lipídios são ressuspendidos em um excesso aquoso. Lipídeos compostos por uma porção polar (comumente designada por “cabeça”) ligada a duas porções apolares (designadas por “caudas”), quando suspensos em meio aquoso, tendem a se orientar espontaneamente em bicamadas estruturalmente muito similares às membranas celulares, ficando as “caudas” de hidrocarbonetos orientadas uma para outra, e a “cabeça” polar em contato com o meio aquoso interno e externo à bicamada. A arquitetura do lipossoma é determinada pela interação entre os lipídios e o meio aquoso, que ocorre durante a preparação, e dessa maneira diversos tipos de lipossomas podem ser sintetizados, variando quanto ao número de bicamadas lipídicas, tamanho, carga de superfície, composição lipídica, organização das vesículas e gradiente de pH transmembranar (Grant & Bansinath, 2001; Fritze *et al.*, 2006).

Quanto ao número de bicamadas lipídicas, os lipossomas podem apresentar uma única camada (unilamelares), várias camadas (multilamelares), ou ainda apresentar várias vesículas lipídicas dentro de uma vesícula maior (multivesiculares). O tamanho dos lipossomas pode variar de nanômetros (20nm para vesículas unilamelares pequenas) a micrômetros (vesículas unilamelares gigantes, vesículas multilamelares e lipossomas multivesiculares) (Grant, 2002; de Paula *et al.*, 2012).

Os lipossomas podem ser obtidos por vários processos, como evaporação de fase reversa, congelamento e descongelamento, desidratação-reidratação, extrusão, fusão ou sonicação (Lichtenberg & Barenholz, 1988; Grant, 2002; Santos & Castanho, 2002).

Avaliações estruturais das membranas lipídicas são de suma importância para entender as relações entre função, estrutura e dinâmicas das vesículas (Nakano, 2009). Dentre os testes mais usados, podem ser citados o espalhamento da luz dinâmica, por meio do qual se pode avaliar o índice de polidispersão, tamanho e Potencial Zeta (Ulrich, 2002).

A técnica parte do princípio de que quando um raio de luz é direcionado a uma suspensão coloidal ou dispersão, parte dessa luz pode ser absorvida, parte é dispersa e a restante é transmitida através da amostra. Resultado de um campo elétrico associado à luz incidente, a luz dispersa induz oscilações periódicas na nuvem eletrônica dos átomos do material analisado, que são detectadas pelo aparelho ao longo de um intervalo de tempo. A dinâmica das oscilações permite calcular o raio hidrodinâmico e a distribuição das partículas (Shaw, 1991).

Potencial Zeta é um termo utilizado para designar o potencial eletrocinético de sistemas coloidais, que reflete o potencial de cargas na superfície das partículas, o qual sofre influências pelas mudanças na interface com o meio dispersante, devido à dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou à adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão (Ulrich, 2002; Zetasizer Manual, 2004).

Busca-se sempre elevar as forças repulsivas entre as partículas para obterem-se suspensões estáveis, uma vez que as forças de repulsão mútuas entre partículas adjacentes impedem a sua união. O modelo utilizado para explicar como atuam as forças elétricas na superfície das partículas é o Modelo da Camada Dupla. Por este modelo pressupõe-se que se a partícula for negativa, ao redor dela coexistirão contra-íons, íons de carga oposta, no caso, positiva. Inicialmente, ocorre uma atração eletrostática fazendo com que alguns íons positivos formem uma rígida camada ao redor da partícula, conhecida como camada de Stern. Todavia, outros contra-íons são atraídos para a camada de Stern, gerando um equilíbrio dinâmico e dando origem a uma segunda camada conhecida como difusa. Um ponto particular é o potencial na junção entre as duas camadas (de Stern e difusa), conhecido como potencial Zeta. Trata-se de uma

maneira efetiva de controlar o comportamento das partículas, pois indica a interação entre o potencial de superfície e as forças de repulsão entre as partículas (Zetasizer Manual, 2004). Os fosfolipídios presentes nos lipossomas são capazes de influenciar o potencial Zeta, fornecendo um potencial negativo à interface (Schaffazick *et al.*, 2005).

Além das avaliações estruturais, é importante ainda, na avaliação pré-clínica da toxicidade das formulações lipossomais, o estudo da interferência das mesmas em culturas de tipos celulares que entrarão em contato com a formulação, como queratinócitos, condrócitos e fibroblastos, além de neurônios (Ferreira, 2014).

Suspensões lipossomais têm sido estudadas como alternativa para melhorar a cinética de diversos fármacos, entre os quais os anestésicos locais, por seu caráter anfifílico. De fato, foram demonstrados aumento na duração da anestesia e redução na toxicidade para a lidocaína, mepivacaína, prilocaína, bupivacaína e ropivacaína, quando associados a lipossomas, em comparação aos respectivos sais na forma livre (Boogaerts *et al.*, 1993a e 1993b; Grant *et al.*, 1997; Bucalo *et al.*, 1998; de Araújo *et al.*, 2003; Cereda *et al.*, 2004; de Araújo *et al.*, 2004; Grant *et al.*, 2004; Rose *et al.*, 2005; Cereda *et al.*, 2006; de Araújo *et al.*, 2008; Berto, 2010; de Paula *et al.*, 2010; Davidson *et al.*, 2010; Tofoli *et al.*, 2011). Além da forma injetável, recentemente também tem aumentado o interesse na encapsulação de anestésicos locais em lipossomas, para uso tópico, tanto em odontologia, quanto em medicina de forma geral (Mura *et al.*, 2007 e 2008; Franz-Montan *et al.*, 2007, 2010a, 2010b e 2012; Maestrelli *et al.*, 2009 e 2010; Paphangkorakit *et al.*, 2012; Brenner *et al.*, 2013; Carboni *et al.*, 2013).

O aumento da eficiência anestésica e a redução na toxicidade dos anestésicos locais encapsulados em lipossomas têm sido observados apesar da taxa de encapsulação não ser elevada quando do uso de lipossoma sem gradiente de pH transmembranar. As taxas de encapsulação, considerando lipossomas com concentração lipídica 4 mM variam de 12% para a prilocaína, 18% para a mepivacaína e 19% para a lidocaína, a 24% e 24,8% respectivamente para a

ropivacaína e bupivacaína (Cereda *et al.*, 2004; de Araújo *et al.*, 2008).

Vários fármacos anfipáticos, como anestésicos locais e antineoplásicos, apresentam tendência de se acumular em organelas com gradiente de concentração iônica, como as mitocôndrias (Moriyama, 1996). Essa característica tem sido utilizada para desenvolvimento de lipossomas com gradiente de pH transmembranar, com o interior ácido em relação ao meio externo, a fim de aumentar a capacidade de encapsulação desses fármacos (Fritze *et al.*, 2006).

Alguns antineoplásicos como a doxorrubicina e estaurosporina (Fritze *et al.*, 2006; Mukthavaram *et al.*, 2013) e o anestésico local bupivacaína (Mowat *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 2004), encapsulados em lipossomas com gradiente de pH transmembranar, já foram caracterizados e avaliados com relação à citotoxicidade.

Assim, para a doxorubicina, o uso de lipossomas com gradiente de pH transmembranar, com sulfato de amônio como meio interno, resultou em eficiência de 95% de encapsulação, levando os autores à conclusão de que os lipossomas com gradiente de pH transmembranar oferecem novas perspectivas visando a melhoria do tratamento tumoral (Fritze *et al.*, 2006). Para a estaurosporina a eficiência de encapsulação foi de 70% e testes em animais mostraram aumento da eficiência e redução da toxicidade da droga encapsulada em comparação com a droga livre (Mukthavaram *et al.*, 2013). Neste último trabalho os autores demonstraram que os melhores coeficientes de encapsulação foram obtidos com uso de sulfato de amônia e fosfato de amônia (respectivamente 65% e 70%) como tampão interno, em comparação ao sulfato e fosfato de sódio.

Para a bupivacaína, Mowat *et al.* (1996) observaram aumento da encapsulação de bupivacaína para até 64% a 82% com uso de lipossomas unilamelares com gradiente de pH transmembranar, enquanto lipossomas neutros (sem gradiente de pH) tiveram encapsulação muito baixa. Nesse estudo o gradiente de pH transmembranar foi obtido com o uso de tampão citrato com pH 4,0. No estudo “in vivo” esses lipossomas promoveram aumento na duração da anestesia da pele de cobaias em relação ao observado com uso de bupivacaína livre e bupivacaína associada a lipossomas sem gradiente de pH transmembranar.

A eficiência da encapsulação de bupivacaína em lipossomas com gradiente de pH também foi avaliada em humanos. Grant *et al.*, em 2004, caracterizaram e avaliaram a eficiência da encapsulação da bupivacaína em lipossomas multivesiculares com gradiente de pH transmembranar, obtido com uso de sulfato de amônia, relatando encapsulação superior a 90%. Os resultados da injeção subcutânea no dorso de voluntários mostraram que a bupivacaína livre 0,5% proporcionou tempo médio de anestesia de 1 h, enquanto que a bupivacaína encapsulada nas concentrações de 0,5% a 2,0% levaram ao aumento do tempo de anestesia, respectivamente para 19 e 48 horas.

Embora sistemas carreadores possam promover melhora sensível na cinética de fármacos, o próprio sistema carreador pode apresentar toxicidade intrínseca. Alguns trabalhos têm relatado a presença de infiltrado inflamatório local, após a injeção de formulações lipossomais, em cortes histológicos. De Araújo *et al.* (2008) relataram a presença de células inflamatórias após a injeção de lipossoma sem anestésico (em um espécime), lipossoma associado a ropivacaína 0,5% e ropivacaína 0,5%.

Epstein-Barash *et al.* (2009) observaram miotoxicidade em células C2C12 expostas a lipossomas (sem fármacos) com concentração de lipídeos a partir da 6 mg/mL, atingindo 50% de morte celular na concentração de 9 mg/mL, após injeção de bupivacaína lipossomal. A partir dessa última concentração também foi observada neurotoxicidade em células C12 (linhagem celular de feocromocitoma).

Em estudos anteriores foi demonstrado que a articaína apresenta baixa taxa de encapsulação em lipossomas neutros, beirando o erro experimental (de Souza, 2010), resultando em pequeno ganho em termos de sucesso e duração da anestesia, especialmente em modelos com maior desafio, como o bloqueio do nervo alveolar inferior e em tecidos submetidos à hipernocicepção (Batista da Silva, 2012).

Assim como observado para a bupivacaína, é possível que a encapsulação de articaína em lipossomas com gradiente de pH transmembranar

possa resultar em aumento da encapsulação e, conseqüentemente, em diminuição da toxicidade e maior sucesso de anestesia. A possibilidade de aumento da eficiência de encapsulação e diminuição da toxicidade levou ao desenvolvimento do presente estudo.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo principal preparar e fazer a caracterização inicial, bem como avaliar a toxicidade “in vitro” de uma formulação de articaína encapsulada em lipossomas com gradiente de pH transmembranar.

Objetivos específicos:

- Preparar formulação de articaína encapsulada em lipossomas com gradiente de pH transmembranar.
- Avaliar eficiência de encapsulação, tamanho, polidispersão e potencial Zeta.
- Avaliar viabilidade celular e produção de IL-6 em queratinócitos humanos – HaCaT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram utilizadas soluções de cloridrato de articaína, preparadas a partir do sal de cloridrato de articaína (Sanofi Aventis Deutschland, cedido por DFL Ind. Com. SA, Rio de Janeiro, Brasil), solução de cloreto de sódio 0,9% (Equiplax Ind. Farm., Brasil), formulações lipossomais unilamelares de articaína e formulação lipossomal sem adição de anestésico local. As formulações lipossomais foram preparadas a partir de acetato de α -tocoferol, fosfatidilcolina de ovo e colesterol (Sigma-Aldrich Co. LLC.), tampões HEPES 20 mM com NaCl 0,9% (Q-biogene, Inc.), acetato de sódio 50 mM (Labsinth Prod. Lab. LTDA, Brasil), ácido acético glacial (Sigma Chem. Co.) e sulfato de amônio (Ecibra, Cetus Ind. e Com. Prod. Químicos LTDA, Brasil). Para a cultura das células, avaliação de citocinas e viabilidade celular foram utilizados Meio Eagle de Dulbecco modificado - DMEM (GIBCO[®], United Kingdom), soro fetal bovino (GIBCO[®], Life Technologies Corp.), penicilina (Sigma-Aldrich Co. LLC.), estreptomicina (Sigma-Aldrich Co. LLC.), placas de Petri para cultura de tecido de 61 cm² (TPP Techno Plastic Products AG), EDTA (GIBCO[®], Life Technologies Corp.), tripsina (GIBCO[®], Life Technologies Corp.), MTT (MTT Assays, Life Technologies Corp.), anticorpo de captura para IL-6 (PeproTech Brasil FUNPEC-RP), Tween 20 em PBS (Sigma-Aldrich Co. LLC.), BSA em PBS (Sigma-Aldrich Co. LLC.), soluções-padrão (PeproTech Brasil FUNPEC-RP), anticorpo de detecção anti-IL6 (PeproTech Brasil FUNPEC-RP), conjugado de avidina (PeproTech Inc.), solução de substrato ABTS (Sigma-Aldrich Co. LLC.) para ELISA (Sigma-Aldrich Co. LLC.) e lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS de *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich Lote # 122M4001V).

4.2 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES LIPOSSOMAIS

As formulações lipossomais utilizadas consistiram de lipossomas com gradiente de pH transmembranar (meio interno pH=5,5 e meio externo pH=7,4), o

que possibilitou a estabilização da articaína dentro dos lipossomas.

As suspensões lipossomais foram preparadas no laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, com orientação da Profa. Dra. Eneida de Paula, de acordo com a descrição a seguir.

Vesículas unilamelares foram preparadas pelo método de hidratação de filme seco (Boogaerts *et al.*, 1993 a,b; Pinto, 2002). O filme seco foi obtido a partir de soluções de fosfatilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol em clorofórmio (na proporção molar de 4:3:0,07). De cada solução, uma de cada vez, foi retirada uma alíquota, na proporção mencionada, sendo colocada em um tubo e submetida à evaporação sob fluxo de N_2 , à temperatura ambiente. Esse processo foi repetido para cada uma das três substâncias (fosfatilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol em clorofórmio), formando no tubo um filme seco, que foi mantido em vácuo por 2h. Após a secagem, adicionou-se tampão acetato (50 mM de acetato de sódio com 0,78 mM de ácido acético glacial em 100 ml, pH 5,5) com sulfato de amônia 50 mM, sendo a dispersão agitada por 5 minutos em vórtex. Em seguida, os lipossomas foram mantidos em repouso por 2 h, para o intumescimento das vesículas, passando a suspensão a apresentar vesículas multilamelares concêntricas com cavidades aquosas.

A seguir, passaram-se os lipossomas multilamelares por um extrusor (Extrusor Lipex Biomembranes Inc., modelo EmulsiFlex-C5). Esse processo foi realizado sob pressão de nitrogênio, à temperatura ambiente, sendo a amostra de lipossomas injetada através de um disco de drenagem e duas membranas de policarbonato (Poretics) com poros de 0,4 μ m, por 12 vezes. Os lipossomas foram mantidos em repouso por 2 h, para o intumescimento das vesículas. A concentração lipídica dos lipossomas foi de 4 mM. Logo após, realizou-se a lavagem dos lipossomas com tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 com NaCl 154 mM na proporção de 2:1 (6 ml de tampão e 3 ml de lipossoma) em Ultracentrífuga (Beckman Coulter, modelo Optima L-90) à 46400 rpm (133466 x g) por 2 horas, com temperatura de 4°C, rotor TI-90, repetindo-se o processo duas vezes. Esta lavagem permitiu manter a diferença de gradiente de pH entre o veículo (tampão

HEPES) e a região interna do lipossoma (tampão acetato com sulfato de amônia), o que auxiliou no aumento da porcentagem de encapsulação da articaína. Essa preparação foi utilizada como controle. Após a preparação das vesículas, incorporou-se o sal de cloridrato de articaína nas diversas concentrações utilizadas (Adaptado de Mowat *et al.*, 1996 e; Grant *et al.*, 2004)

As formulações lipossomais foram preparadas em câmara de fluxo laminar (com materiais e soluções autoclavados a 1 atm e 121°C, por 20 min) e após o preparo foram esterilizadas em autoclave (121°C, 1 atm durante 15 minutos) (Cereda *et al.*, 2008). Todas as suspensões lipossomais utilizadas eram estéreis.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO

A Figura 2 mostra os testes realizados para a caracterização da suspensão lipossomal de articaína.

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada no Laboratório de Biomembranas e as avaliações de tamanho, integridade e morfologia das vesículas foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica, ambos pertencentes ao Instituto de Biologia da UNICAMP. A avaliação da distribuição de tamanho das partículas e o potencial zeta foram avaliados na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. Todos os testes conduzidos com auxílio da doutoranda Camila Morais Gonçalves da Silva, sob orientação da Profa. Dra. Eneida de Paula.

À exceção da determinação da eficiência de encapsulação, todos os testes de caracterização foram realizados com formulações contendo articaína nas concentrações de 2%, 3% e 4%, uma vez que para os valores mínimo e máximo de concentração há estudos de eficiência com o anestésico não encapsulado comprovando o sucesso de anestesia clínica (Potocnik *et al.* 2006; Hintze & Paessler, 2006).

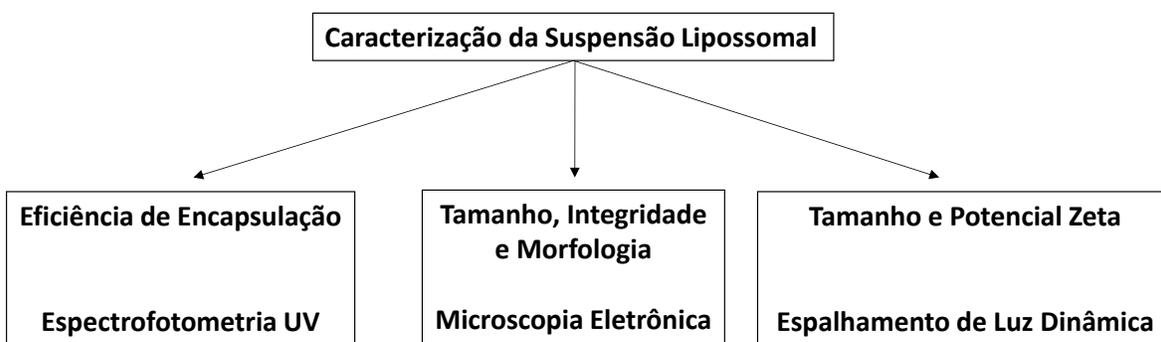


Figura 2 - Fluxograma dos testes utilizados para a caracterização da suspensão de articaína em lipossomas com gradiente de pH transmembranar.

4.3.1 Determinação da eficiência da encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada com formulação contendo 4 mM de lipídeo e 2 mM de articaína.

As suspensões lipossomais, com e sem articaína foram submetidas a um processo de ultracentrifugação (Beckman Coulter, modelo Optima L-90), (120.000 x g) por duas horas em temperatura de 4°C. A concentração de articaína no sobrenadante foi analisada por espectrofotometria UV e subtraída da concentração inicial (total) de anestésico, permitindo assim a determinação da concentração encapsulada nos lipossomas (de Araújo, 2005).

Os valores de encapsulação de articaína (E%) foram obtidos de acordo com as expressões mostradas na Figura 3.

$$(NE\%) = \frac{(A - L)}{ATC}$$

$$E\% = 100\% - (NE\%)$$

Figura 3 - Equações para determinação da porcentagem de encapsulação da articaína. **A**: valor de absorbância da amostra; **L**: valor de absorbância da suspensão lipossomal; **ATC**: valor de absorbância da articaína.

4.3.2 Distribuição de tamanho: espalhamento quase-elástico de luz/polidispersão

A avaliação da distribuição de tamanho dos lipossomas foi realizada por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmica, com uso do aparelho Zeta-Sizer® (Malvern Instruments). Com essa técnica consegue-se obter, de forma rápida e sem interferência no sistema avaliado, a estimativa do tamanho e homogeneidade das partículas lipossomais, com uma análise representativa das amostras, já que o número de partículas é relativamente grande.

Foram realizadas medidas contínuas do raio hidrodinâmico das vesículas na presença e na ausência do anestésico local, com o objetivo de verificar o tamanho médio e a homogeneidade das suspensões antes e após a encapsulação. As medidas foram realizadas em duplicata à 25°C com um ângulo de detecção de 90° e a concentração das preparações utilizadas foi de 4 mM de lipossomas (de Araújo, 2005).

4.3.3 Determinação do potencial Zeta das vesículas

O potencial Zeta foi determinado com o mesmo equipamento utilizado para a avaliação do tamanho das partículas (Zeta-Sizer® - Malvern Instruments), combinando o espalhamento dinâmico de luz com microeletroforese, sendo a variação na frequência da luz espalhada proporcional à mobilidade eletroforética (Zetasizer Manual, 2004).

As medidas foram realizadas em duplicata, em alíquotas diluídas cerca de 5 vezes (concentração lipídica de 4 mM), na temperatura de 25°C, a um ângulo de 90°.

4.3.4 Avaliação do tamanho, integridade e morfologia das vesículas

A análise de integridade, morfologia e tamanho das amostras de lipossomas foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão, de acordo com o seguinte procedimento: uma gota da formulação contendo os lipossomas, na concentração lipídica de 4 mM, foi adicionada à grade de cobre (200 mesh).

Após 10 segundos, o excesso da amostra foi retirado com papel filtro, e, em seguida, uma gota de solução aquosa de acetato de uranila a 2% (m/v) foi adicionada sobre a mesma, no intuito de melhorar o contraste das imagens. Após 8 segundos, o excesso foi novamente retirado com papel filtro e, na sequência, uma gota de água MilliQ foi adicionada à grade, por 5 segundos, seguindo o mesmo procedimento, com o intuito de eliminar o excesso de amostra e corante. Em seguida, a grade permaneceu em repouso em temperatura ambiente, até secagem. As leituras foram realizadas no mesmo dia, sob feixe de elétrons de 80 kV no microscópio eletrônico de transmissão (Cereda *et al.*, 2013).

4.4 CULTURA CELULAR

Foram utilizados queratinócitos humanos imortalizados espontaneamente da linhagem HaCaT mantidos em Meio Eagle de Dulbecco modificado - DMEM (GIBCO[®], United Kingdom) acrescido de 10% de soro fetal bovino (GIBCO[®]), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Cultivaram-se as células em placas de Petri para cultura de tecido de 61 cm² (TPP[®]) em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C. A cultura foi duplicada duas vezes por semana; após remover-se o meio, as células foram lavadas com PBS 1x, pH 7,4, e tratadas com tripsina (GIBCO[®]) acrescida de EDTA 0,5 mM (GIBCO[®]), por 7 minutos, para a liberação das células (Doyle & Griffiths, 1999).

4.5 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

A Figura 4 mostra o fluxograma da metodologia de avaliação da toxicidade da formulação lipossomal em estudo em queratinócitos humanos da linhagem HaCaT.

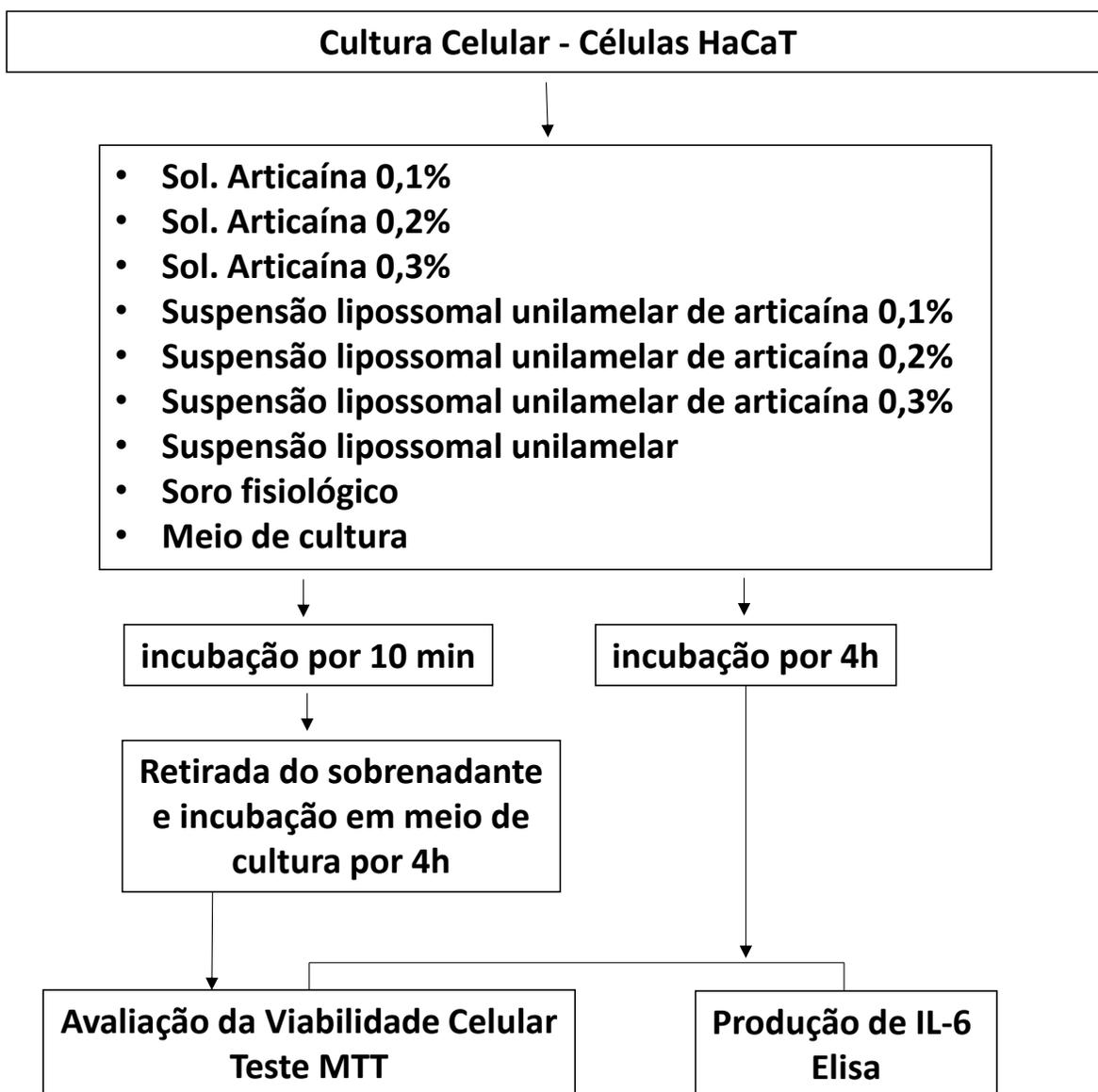


Figura 4 - Fluxograma da metodologia utilizada para avaliação da toxicidade da suspensão de articaína em lipossomas com gradiente de pH transmembranar, sobre células HaCaT.

As concentrações de articaína para avaliação da viabilidade celular e produção de IL-6 foram estabelecidas a partir dos resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa, nos quais foram calculadas IC_{50} de 0,34% e 0,12% após exposição de células HaCaT à articaína, respectivamente por 1 hora e 24 horas

(dados não publicados).

Assim, as células HaCaT foram expostas às formulações de articaína e aos controles, constituindo os seguintes grupos:

- solução de articaína de 0,1%,
- solução de articaína 0,2%,
- solução de articaína 0,3%,
- suspensão lipossomal unilamelar de articaína de 0,1% (concentração lipídica de 0,66 mM),
- suspensão lipossomal unilamelar de articaína 0,2% (concentração lipídica de 1,34 mM),
- suspensão lipossomal unilamelar de articaína 0,3% (concentração lipídica de 2 mM),
- suspensão lipossomal unilamelar (concentração lipídica de 2 mM),
- soro fisiológico (associado ao meio de cultura nas mesmas proporções utilizadas nas formulações lipossomais),
- grupo sem tratamento (apenas células em meio de cultura).

As placas foram incubadas a 37°C com as formulações por 10 min e 4 horas. O tempo de 10 minutos foi baseado no estudo de Perez-Castro *et al.*, (2009) que utilizaram esse tempo como “indicador primário de toxicidade” do anestésico local. O tempo de 4 horas foi escolhido por corresponder à duração da anestesia em tecidos moles (Tófoli *et al.*, 2003), e portanto ao tempo no qual as células permaneceriam em contato com o anestésico local “in vivo”.

Após a incubação de 10 min, retirou-se o sobrenadante e foi colocado, novamente, o meio de cultura e os testes foram realizados após 4 h (Figura 4).

A viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria a partir da redução do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-brometo de 2,5-difeniltetrazólio] (descrita no item 4.5.1) e a quantificação da citocina pró-inflamatória IL-6 foi realizada por meio do imunoenensaio de ELISA de captura (descrito no item 4.5.2). Os experimentos foram conduzidos em triplicatas em três tempos diferentes.

4.5.1 Avaliação da viabilidade celular

Após a realização da cultura celular, conforme descrito nos itens 4.4 e 4.5, as células foram tripsinizadas e plaqueadas com DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células por poço, incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C , por um período de 24 a 48 horas ou até atingir a semi-confluência. Foram adicionadas as formulações teste e controle aos poços, nas concentrações descritas, sendo então as placas incubadas por 10 min e 4 h em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C .

Após o tempo de incubação das placas com as formulações, desprezou-se o conteúdo dos poços, sendo os mesmos submetidos à lavagem com 100 μL de PBS 1X, sendo então adicionados a cada poço 200 μL de MTT dissolvido em DMEM (livre de soro fetal bovino), na concentração de 0,3 mg de MTT para 1 mL de DMEM. As placas foram então incubadas por 3 horas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C . Em seguida, as placas foram novamente lavadas com 100 μL de PBS 1X; os conteúdos dos poços foram ressuspensos com 200 μL de etanol absoluto, envolvidos em papel alumínio e lidos em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm.

Este teste de viabilidade celular baseia-se na ação das desidrogenases mitocondriais das células viáveis sobre o MTT, reduzindo-o a um derivado do formazana que é insolúvel em água e apresenta coloração violeta. Assim, quanto mais intensa a coloração, maior a proporção de células viáveis (Tao *et. al.*, 2013).

4.5.2 Liberação de Interleucina 6 (IL-6)

Previamente à realização do teste com as amostras, foi realizada curva padrão com o controle positivo, lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, em placas de 24 poços, nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 12, 24 e 48 horas, para confirmação da produção de IL-6 pelas células HaCaT.

Para avaliação da interleucina 6, as células HaCaT, cultivadas em placas de Petri, foram tripsinizadas (como descrito nos itens 4.4 e 4.5) e

plaqueadas com DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células por poço, incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C , por um período de 24 à 48 horas ou até atingir a semi-confluência. Após essa etapa, foram realizados os tratamentos e coletados os sobrenadantes para avaliação de IL-6.

Foram utilizadas placas de 96 poços, sendo colocados em cada poço 100 μL de anticorpo de captura para IL-6, de acordo com as instruções do fabricante (Peprotech Inc.). As placas foram mantidas em temperatura ambiente overnight. No dia seguinte, as mesmas foram lavadas com 0,05% Tween 20 em PBS (Sigma) três vezes com tampão de lavagem apropriado e então foram adicionados 300 μL de tampão de bloqueio 1% BSA em PBS (BSA Sigma), a cada poço. Em seguida, as placas foram incubadas com este tampão por 1 hora à temperatura ambiente para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos, sendo então novamente lavadas. Após esse procedimento, foram acrescentados 100 μL das amostras ou das soluções-padrão (Peprotech Inc.), as quais foram diluídas em concentrações decrescentes de acordo com a instrução do fabricante.

Em seguida incubaram-se as placas à temperatura ambiente por 2 horas e, a seguir, as mesmas foram lavadas conforme descrito anteriormente. Foram então adicionados a cada poço 100 μL de anticorpo de detecção anti-IL6 (Peprotech Inc.).

Foi então realizada nova incubação das placas por 2 horas à temperatura ambiente, seguido de lavagem. Após esse procedimento, adicionaram-se a cada poço 100 μL de uma solução de conjugado de avidina, com subsequente incubação por 30 minutos.

Após nova lavagem, foram adicionados 100 μL de solução de substrato (ABTS Sigma) para ELISA, sendo as placas mantidas em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor. Após esse procedimento, a reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm com correção de 650 nm.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados os softwares Bioestat 5.0 para Windows® (Instituto Mamirauá, Belém, PA) e GraphPad® 6.0. Os resultados foram submetidos a análise de variância e posteriormente aos testes de Kruskal-Wallis e de Dunn (viabilidade celular) e de Kruskal-Wallis e de Student-Newman-Keuls (liberação de IL-6). Foi considerado como significativo o nível de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS

5.1.1 Determinação da eficiência de encapsulação

Após análise por espectrofotometria, a eficiência de encapsulação da articaína em lipossomas foi de 18,95% ($\pm 4,50\%$).

5.1.2 Distribuição de tamanho: espalhamento quase-elástico de luz/polidispersão; Potencial Zeta

O tamanho médio das vesículas lipossomais livres de articaína foi de 719,7 nm (± 35 nm) e os das vesículas com articaína 2%, 3% e 4% foram, respectivamente, 622 nm ($\pm 71,5$ nm), 707,05 nm ($\pm 92,1$ nm) e 795,75 nm ($\pm 111,95$ nm), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Tamanho, polidispersão (PDI) e Potencial Zeta das suspensões lipossomais livres e com articaína nas concentrações de 2%, 3% e 4% (concentração lipídica 4 mM; lipossomas com gradiente de pH transmembranar).

	Livre	2%	3%	4%
Tamanho (nm)	719,7 \pm 35	622 \pm 71,5	707,05 \pm 92,1	795,75 \pm 111,95
PDI	0,2 \pm 0	0,593 \pm 0,066	0,557 \pm 0,035	0,6565 \pm 0,1015
Potencial Zeta (mV)	-16,15 \pm 2,15	-18,15 \pm 0,35	-21,2 \pm 0,9	-10,53 \pm 0,87

Nota: valores apresentados como média \pm desvio padrão.

Abreviações: nm: nanômetro; PDI: polidispersão; mV: milivolts.

Os valores de polidispersão (PDI) mostram variação do tamanho das vesículas na solução coloidal, sendo que as carregadas com articaína se mostraram mais heterogêneas (Tabela 1).

O índice de polidispersão da suspensão lipossomal livre foi de 0,2, indicando que, nesse grupo, os lipossomas tinham uma estreita faixa de variação de tamanho. Nos grupos lipossomais com articaína houve um aumento na

polidispersão, mostrando que a presença da articaína criou lipossomas de tamanhos diferentes dos presentes originalmente na suspensão, com maior heterogeneidade no diâmetro das vesículas lipossomais. Os valores médios de polidispersão das suspensões lipossomais com articaína a 2%, 3% e 4% foram, respectivamente, de 0,593 ($\pm 0,066$), 0,557 ($\pm 0,035$) e 0,6565 ($\pm 0,1015$).

A suspensão lipossomal livre apresentou potencial Zeta médio de -16,15 mV ($\pm 2,15$), enquanto que as formulações encapsuladas com articaína tiveram valores que variaram de -10,53 a -21,2 mV, o que pode ser observado na Tabela 1.

5.1.3 Avaliação do tamanho, integridade e morfologia das vesículas

A avaliação ao microscópio eletrônico mostrou vesículas arredondadas íntegras, com uma única bicamada lipídica e sem variações estruturais aparentes. tanto para as vesículas sem anestésico local, quanto para aquelas contendo articaína.

Na figura 5 (A) é possível observar uma vesícula lipossomal sem articaína, e em 5 (B) uma vesícula com articaína a 4%. Após encapsulação da articaína, as vesículas permaneceram íntegras, mostrando um maior intumescimento (Figura 5 B).

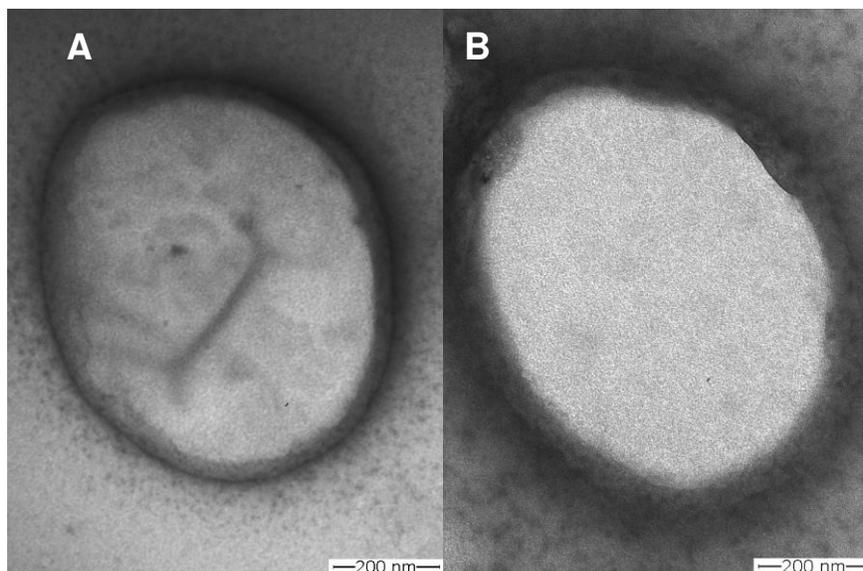


Figura 5 - Imagens das suspensões lipossomais unilamelares obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (100.000X). (A) Lipossoma unilamelar sem anestésico. (B) Lipossoma unilamelar com articaína 4%.

5.2 ENSAIOS “IN VITRO”

5.2.1 Viabilidade Celular

Os resultados da avaliação da viabilidade celular, por redução do corante MTT, após exposição de culturas de células (queratinócitos humanos imortalizados – HaCaT) às formulações testadas são mostrados na Figura 6 e descritos a seguir.

Nas células incubadas por 10 minutos, e avaliadas após 4 horas, não houve diminuição ($p > 0,05$) na viabilidade celular nos grupos controles (meio, NaCl 100 μ L, NaCl 67 μ L e NaCl 33 μ L) e nem nos grupos tratados com articaína (0,1%, 0,2% e 0,3%). Porém, nos grupos tratados com formulações lipossomal livre e com articaína encapsulada (concentrações de 0,1%, 0,2% e 0,3%) observou-se uma queda acentuada na viabilidade, ficando entre 50 e 60%, havendo diferença significativa quando comparados com os seus respectivos controles ($p < 0,01$). Os

grupos das formulações lipossomais não diferiram entre si ($p>0,05$).

No tempo de 4 horas houve diminuição na viabilidade em todos os tratamentos ($p<0,01$), à exceção dos grupos controle e articaína 0,1% ($p>0,05$). Nos grupos articaína 0,2% e 0,3%, observaram-se quedas acentuadas na viabilidade ($p<0,01$), quando comparadas ao controle, sendo concentração dependente. No entanto, na comparação entre os grupos com articaína livre, foi observada diferença apenas entre as concentrações de articaína 0,1% e 0,3% ($p=0,004$). Os grupos lipossomais, apesar de mostrarem toxicidade concentração dependente, não apresentaram diferenças significantes entre si ($p>0,05$); entretanto, observou-se uma queda significativa na viabilidade quando comparado com os controles ($p<0,01$).

Quando comparados os tratamentos articaína e articaína encapsulada em lipossomas, observou-se diferença no tempo de 10 minutos, no qual o tratamento com formulações lipossomais de articaína 0,1%, 0,2% e 0,3%, mostrou maior toxicidade para as células HaCaT do que o tratamento com articaína não encapsulada nas respectivas concentrações de 0,1% ($p=0,02$), 0,2% ($p=0,0002$) e 0,3% ($p=0,002$).

A toxicidade da articaína também mostrou ser um evento tempo dependente. Foi observada diminuição da viabilidade celular após exposição por 4 h em relação à exposição por 10 min para os grupos articaína livre 0,2% e 0,3% ($p=0,0015$). Nos tratamentos com lipossomas encapsulados com articaína foi observado aumento da toxicidade (diminuição da viabilidade) nas três concentrações testadas ($p<0,01$). Como pode ser observado na Figura 6, no tempo de 4 h houve queda mais acentuada na viabilidade nos grupos tratados com articaína não encapsulada em relação ao controle com meio de cultura do que naqueles submetidos às formulações de articaína encapsulada em lipossomas.

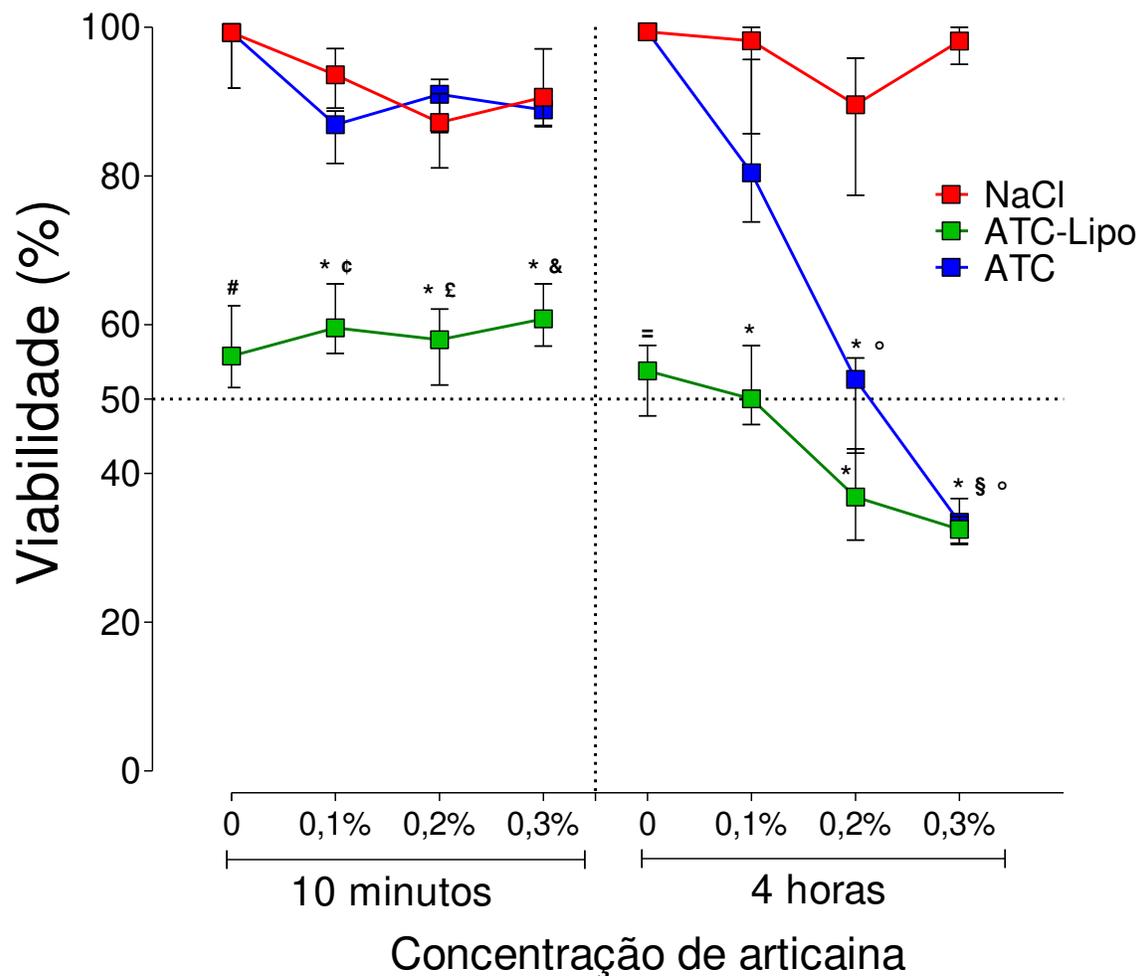


Figura 6 – Viabilidade (%) de células HaCaT expostas por 10 minutos e 4 horas a formulações de artocaina livre (ATC) e associada a lipossomas (ATC-Lipo). A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico do MTT. Os dados representam mediana e valores máximos e mínimos, e estão expressos como porcentagem em relação ao controle. (Comparações: em relação ao respectivo controle * $p < 0,01$; entre formulações com e sem lipossoma no mesmo tempo de exposição: sem artocaina: # $p < 0,0001$; com artocaina 0,1%: ¢ $p = 0,02$; com artocaina 0,2%: £ $p = 0,0002$ e com artocaina 0,3%: & $p = 0,002$; entre formulações de artocaina 0,2% e 0,3% no tempo de 4 h: § $p = 0,004$; entre 10 min e 4 h para a mesma formulação: ° $p = 0,0015$; $n = 9$; Kruskal-Wallis, Dunn).

5.2.2 Liberação de Interleucina 6 (IL-6)

A Figura 7 mostra a liberação de IL-6 por células HaCaT estimuladas por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* ao longo do tempo. Observa-se, nos tempos avaliados, que a produção de IL-6 é máxima em 4 horas, decrescendo ao longo do tempo. No tempo de 48 horas a liberação de IL-6 ainda se apresentava acima do limite de detecção do método.

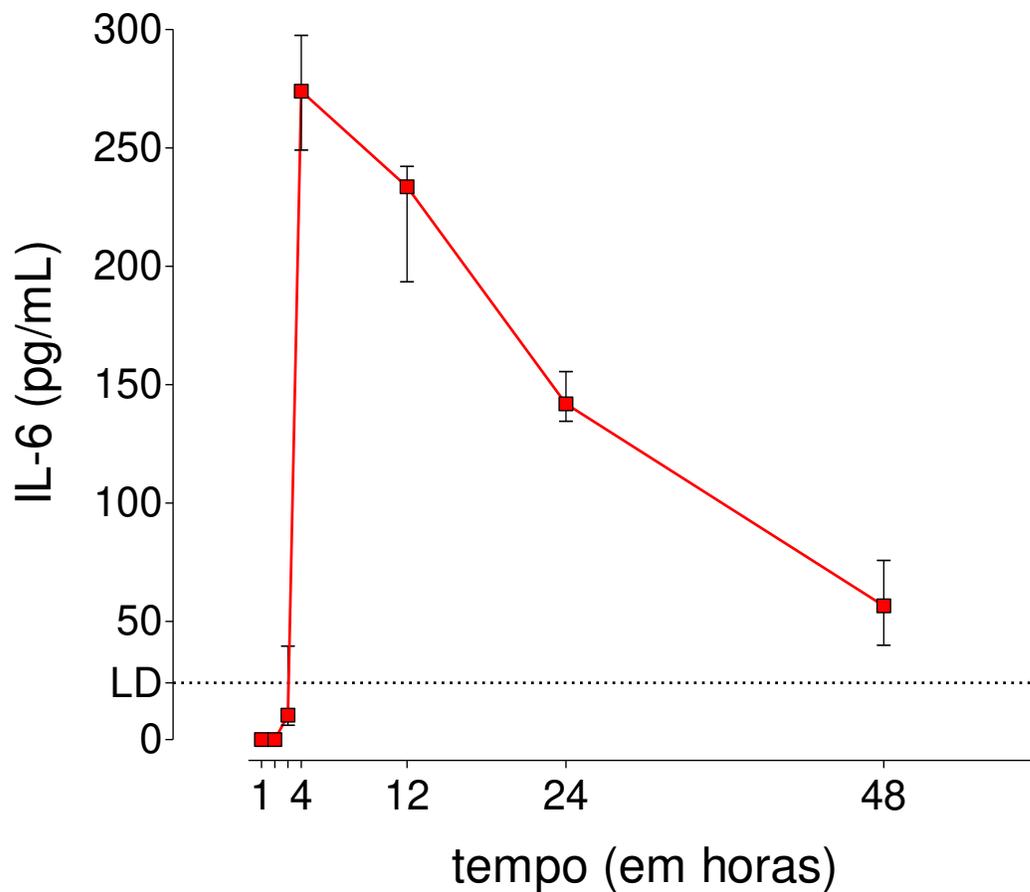


Figura 7. Liberação de IL-6 por células HaCaT expostas a LPS de *E. coli* 1 µg/ml. (n=9).

Na figura 8 são mostrados os resultados de liberação de IL-6 pelas células HaCaT após 4 horas de exposição às formulações, bem como a faixa de liberação de IL-6 após exposição das células ao controle positivo (LPS de *E. coli*). A articaína, em todas as concentrações testadas, (ATC-0,1%, ATC-0,2% e ATC-0,3%), aumentou a liberação de IL-6 em relação ao controle (meio de cultura - ATC-0) ($p < 0,0001$). Para cada concentração testada, a articaína promoveu aumento da liberação de IL-6 em relação à formulação lipossomal respectiva (0,1%: $p = 0,0051$; 0,2%: $p < 0,0001$ e 0,3%: $p = 0,0019$). As formulações lipossomais não diferiram do controle ($p > 0,05$).

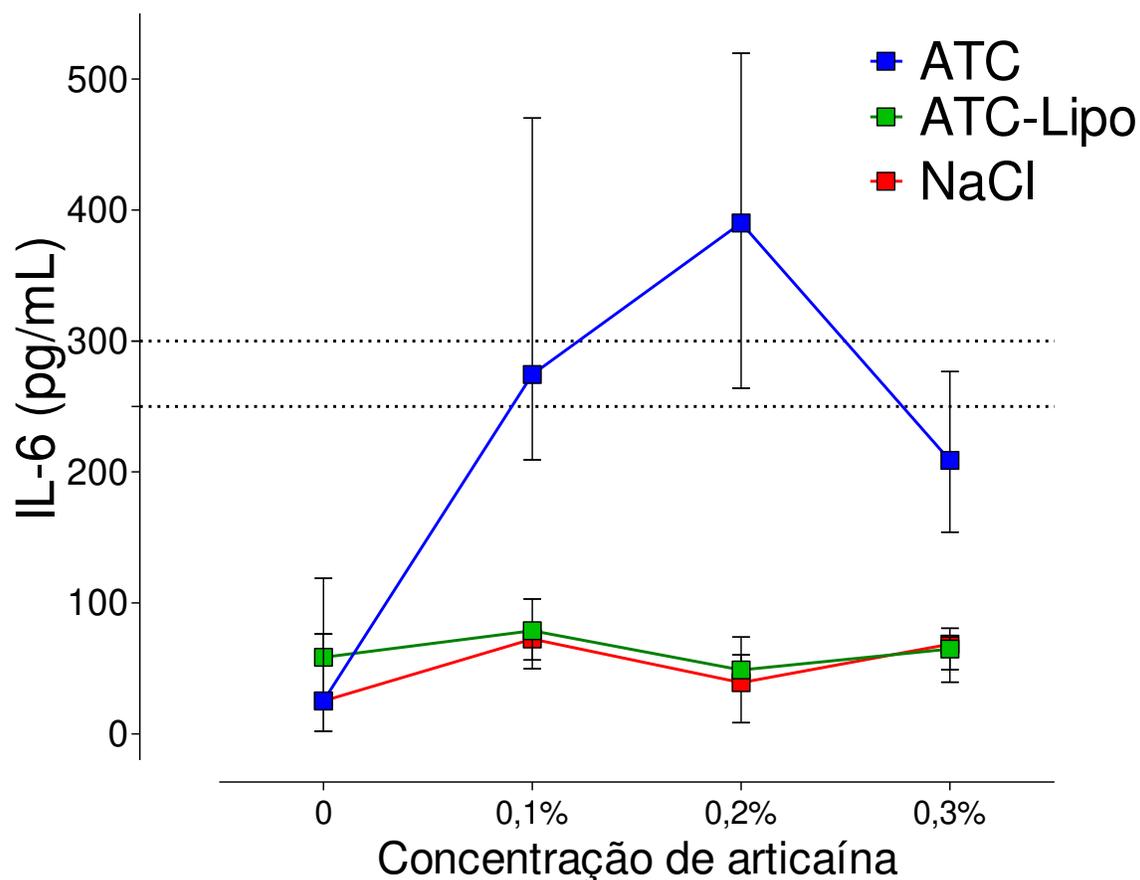


Figura 8. Liberação de IL-6 por células HaCaT expostas por 4 horas aos tratamentos com articaína (ATC), articaína encapsulada em lipossomas (ATC-Lipo) e controle com soro fisiológico (NaCl). Linhas tracejadas indicam a faixa de liberação (mínima e máxima) de IL-6 após exposição das células ao LPS de *E. coli* (controle positivo). (n=9; Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls; Comparações: entre articaína e articaína encapsulada em lipossomas: 0,1%, $p=0,0051$; 0,2%, $p<0,0001$ e 0,3%: $p=0,0019$; entre o controle e ATC-0,1%, ATC-0,2% e ATC-0,3%: $p<0,0001$).

6 DISCUSSÃO

A encapsulação da articaína em lipossomas ainda é pouco estudada (de Souza, 2010; Batista da Silva, 2012). Por seu elevado coeficiente de partição em octanol (257), em relação ao apresentado pela lidocaína (43) e à prilocaína (25) (Columb & Ramsaran, 2010), seria razoável supor que a mesma apresentasse encapsulação maior que esses sais. Entretanto, de Souza (2010) relatou não ser possível determinar o coeficiente de encapsulação da articaína em lipossomas sem gradiente de pH transmembranar, no pH fisiológico, pois o valor obtido situava-se próximo do erro experimental do método utilizado. No mesmo trabalho foi demonstrado que, mesmo com pequena taxa de encapsulação, a associação a lipossomas diminuía a toxicidade em cultura de fibroblastos 3T3 e aumentava a duração do bloqueio sensorial em teste de tail-flick em ratos, em comparação à articaína livre.

A partir desses resultados, no presente estudo propôs-se trabalhar com lipossomas com gradiente de pH transmembranar, visando o aumento da encapsulação da articaína. Para isso, utilizou-se como tampão interno o tampão acetato com sulfato de amônia, com correção para pH 5,5. Externamente à vesícula, manteve-se o tampão HEPES com pH 7,4. Obteve-se uma eficiência de encapsulação de 18,95%, o que constitui uma notável melhora, quando comparado à baixa encapsulação, com impossibilidade de determinação, ocorrida com lipossomas sem gradiente de pH transmembranar (de Souza, 2010).

Utilizando lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de ovo e colesterol com concentração lipídica 5 mM e tendo sulfato de amônia como tampão interno da vesícula, Fritze *et al.* (2006) conseguiram chegar a uma eficiência de encapsulação de 95% para o antineoplásico doxorubicina. Fritze *et al.*, justificaram que a encapsulação da doxorubicina deve-se a dois fatores sinérgicos, a saber, a protonação do fármaco no interior do lipossoma e a precipitação do mesmo no interior hidrofílico da vesícula, quando a solubilidade da droga é ultrapassada.

A mesma justificativa pode ser aplicada para a articaína, pois, como o pKa da molécula é 7,8, em pH=10 tem-se 100% das moléculas na forma neutra; em pH=5,0, ao contrário, 100% das moléculas estão protonadas e em pH=7,4 ambas as espécies estão presentes, tanto as positivas como as neutras, na proporção de 70% e 30%, respectivamente (de Souza, 2010). Dessa maneira, em pH 7,4, as moléculas no estado neutro atravessam a membrana lipossomal, em direção ao interior ácido da vesícula, onde, com pH=5,5, aproximadamente 100% do fármaco estará ionizado. Dessa maneira, conforme relatado por Fritze *et al.* (2006), um “pool de prótons” no interior do lipossoma é necessário como uma força motriz do carregamento da droga.

A utilização de lipossoma com gradiente de pH transmembranar permitiu o aumento da encapsulação da bupivacaína para 43% a 75% com uso de citrato (Mowat *et al.*, 1996) e para 90% com uso de sulfato de amônia como tampão interno (Grant *et al.*, 2004), enquanto que a utilização de lipossoma sem gradiente de pH transmembranar permitiu encapsulação de apenas 25% (De Araújo, 2005). Esses resultados mostram que a acidificação do meio interno do lipossoma aumenta a eficiência da encapsulação.

Comparado ao aumento na encapsulação observado para a bupivacaína quando da utilização de lipossoma com gradiente de pH transmembranar, o aumento obtido para a articaína no presente estudo foi discreto. Essas diferenças encontradas podem ser explicadas com base na lipossolubilidade desses anestésicos (de Paula & Schreier, 1995; 1996). A bupivacaína apresenta maior coeficiente de partição em octanol (346) em comparação à articaína (257) (Columb & Ramsaran, 2010), apresentando assim maior capacidade de penetração nas membranas lipossomais, facilitando a encapsulação do fármaco. Em acréscimo, pelo pKa dessas drogas, respectivamente 8,2 e 7,8 para bupivacaína e articaína (Columb & Ramsaran, 2010), no pH mais ácido do interior dos lipossomas com gradiente de pH transmembranar a porcentagem de moléculas ionizadas da bupivacaína é maior do que o da articaína, permitindo assim maior taxa de encapsulação da primeira.

Com relação à caracterização inicial da formulação, além da eficiência de encapsulação foram ainda avaliados o tamanho das partículas, o índice de polidispersão e o potencial Zeta. Quanto ao tamanho das vesículas, os resultados mostraram que, apesar da membrana de extrusão ser de 400 nm, houve um aumento no tamanho das vesículas, sendo que para o lipossoma livre o tamanho foi de 719,7 nm (± 35 nm), e os encapsulados com articaína a 2%, 3% e 4%, foram respectivamente, 622 nm ($\pm 71,5$ nm), 707,05 nm ($\pm 92,1$ nm) e 795,75 nm ($\pm 111,95$ nm). Entretanto, o aumento do tamanho ocorreu em todas as formulações.

Outros autores também obtiveram diferença entre o tamanho do poro da extrusora e o tamanho das vesículas. Fritze *et al.* (2006) extrudaram a formulação em filtros com poro de 80 nm, e obtiveram aumento do tamanho dos lipossomas para 128 nm. Mowat *et al.* (1996), ao contrário, observaram tamanho menor nas vesículas (365 ± 183 nm) em relação ao tamanho do poro da extrusora (600 nm), em lipossomas unilamelares a base de 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC).

O índice de polidispersão, por sua vez, caracteriza a homogeneidade ou heterogeneidade da formulação e pode apresentar valores na faixa de 0 a 1. Quanto mais próximo do valor zero, mais homogênea é a dispersão, pois apresenta menor variação no tamanho das vesículas lipossomais (Barth & Flippen, 1995).

A formulação lipossomal sem articaína mostrou-se bem homogênea, pois apresentou um índice de polidispersão de 0,2. Já os lipossomas encapsulados com articaína 2%, 3% e 4%, mostraram-se mais heterogêneos que os lipossomas sem anestésico.

Esse resultado mostra que havia uma maior diversidade de tamanho de partículas na suspensão, podendo inclusive levar à suspeição de fusão de vesículas, devido a uma instabilidade na membrana lipossomal promovida pela articaína. Esse tipo de efeito foi demonstrado por Cullis & Verkleij (1979) para a dibucaína.

A dibucaína é um anestésico do grupo amida que tende a assumir posição mais superficial na membrana e age competindo com os íons cálcio pela ligação aos fosfolípídeos que compõem a membrana. Íons cálcio, por sua dupla valência positiva conseguem ligar-se a grupos fosfato de dois fosfolípídeos e, assim, podem diminuir a estabilidade da membrana. A dibucaína tende a promover desestabilização da membrana pelo mesmo mecanismo (Cullis & Verkleij, 1979).

Assim como a dibucaína e a lidocaína, a articaína também se posiciona mais superficialmente na membrana, enquanto anestésicos como a bupivacaína e a etidocaína o fazem em regiões mais profundas da bicamada lipídica (Fernandes Fraceto *et al.*, 2005; Mojundar *et al.*, 2010; Skjevik *et al.*, 2011). Nessa posição mais superficial a articaína poderia apresentar uma ação semelhante à da dibucaína, o que poderia justificar o aumento de polidispersão observado quando da encapsulação desse anestésico. Entretanto, essa possibilidade é pouco provável pelos valores de potencial Zeta obtidos.

O potencial Zeta define o potencial de carga na superfície das partículas, que pode ser positivo ou negativo. Quanto mais próximo de zero, indica menor quantidade de carga na superfície e, portanto, menor repulsão entre as partículas da suspensão. Da mesma forma, quanto maior o valor, em módulo, maior é a tendência à repulsão entre as partículas (Kontogiannopoulos *et al.*, 2014). Considerando-se os valores de potencial Zeta obtidos, observa-se que as vesículas mantinham um potencial de repulsão, resultando assim em maior estabilidade dos lipossomas.

Embora seja relatado que valores de potencial Zeta inferiores a 30 devem ser considerados como tendência maior à instabilidade, ou seja, de aglutinação das partículas rígidas, como as poliméricas (Mohanraj & Chen, 2006), não há comprovação de que este seja o valor limite para outras suspensões (Mishra *et al.*, 2009). De fato, vários estudos de caracterização de suspensões lipossomais consideram o sistema como estável, mesmo com valores de potencial Zeta inferiores a 30 (de Souza, 2010; Cereda *et al.*, 2013; Kontogiannopoulos *et al.*, 2014).

A incorporação de articaína às vesículas lipossomais não resultou em alteração no formato, integridade e número de bicamadas lipídicas, como pôde ser observado na microscopia eletrônica de transmissão, confirmando os resultados de tamanho das vesículas obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmica.

Com relação à avaliação da toxicidade da formulação desenvolvida optou-se pela utilização de células epiteliais humanas imortalizadas (HaCaT), uma vez que se constitui em um modelo bem definido e amplamente aceito para observação de resposta celular frente a diversos agentes (Boukamp *et al.*, 1988; Ravid *et al.*, 2002), além do fato de, juntamente com os fibroblastos, constituírem um tipo celular exposto a anestésicos locais quando os mesmos são utilizados para infiltração e em aplicação tópica (Ferreira, 2014; Sánchez, 2014). Da mesma forma, o ensaio de redução do MTT para avaliação da viabilidade celular tem sido empregado em diferentes tipos celulares para avaliação da ação de fármacos e outros agressores (Maurice *et al.*, 2010; da Silva, 2011; Park *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2013).

Como pode ser visto na figura 6, a exposição por 10 minutos à articaína nas concentrações de 0,1%, 0,2% e 0,3% não promoveu alteração significativa na viabilidade celular. Entretanto, o tempo parece ser um fator importante, uma vez que a exposição por 4 horas promoveu aumento da toxicidade, especialmente para as maiores concentrações (0,2% e 0,3%). O aumento da toxicidade em decorrência do tempo de exposição à articaína também foi observado por Sanchez (2014) que estudou a viabilidade de células HaCaT por até 6 horas de exposição.

No tempo de 10 minutos, tanto para a formulação lipossomal, quanto para a articaína não encapsulada, o aumento da concentração de articaína não afetou a viabilidade, tanto em comparação ao controle (meio de cultura), quanto à exposição ao soro fisiológico, nas diversas proporções de associação ao meio de cultura.

O aumento no tempo de exposição para 4 horas resultou em diminuição drástica na viabilidade das soluções de articaína livre nas concentrações maiores.

A concentração de 0,1% não promoveu alteração significativa da viabilidade em relação ao controle. Esses resultados corroboram os encontrados por Sanchez (2014) em estudo realizado com o mesmo tipo celular exposto à articaína na mesma concentração, pelo mesmo tempo. Também estão de acordo com o observado por Werdehausen *et al.*, (2012), os quais mostraram redução de 50% na viabilidade celular em células de linfoma-T (Jurkat) com articaína em concentração de aproximadamente 0,17%.

A formulação lipossomal, por sua vez, apresentou toxicidade muito maior com viabilidade variando entre 56% e 60%, enquanto a articaína livre nas diversas concentrações promoveu viabilidade acima de 80% após 10 minutos de exposição. O aumento no tempo de exposição resultou em diminuição na viabilidade das formulações lipossomais a partir da concentração de 0,2% de articaína.

Embora a maioria dos estudos publicados mostrem ausência de toxicidade de lipossomas sem a adição de drogas, alguns sistemas podem não ser adequados, como o observado no presente estudo. A toxicidade poderia ocorrer pela concentração de lipídeos da membrana, pela composição da membrana lipossomal, e, ainda, pelo sistema utilizado para promover o gradiente de pH.

Epstein-Barash *et al.* (2009) observaram que lipossomas com concentração lipídica variando de 0,3 a 0,6 mg/mL não interferiam na viabilidade celular. Acima dessa faixa, entretanto, havia redução de 50% da viabilidade celular com a concentração lipídica de 9 mg/mL. No presente estudo a concentração de lipídeos foi de 1,2 mg/mL (2 mM ou 0,12%) e portanto inferior à concentração relatada como tóxica por esses autores.

Especificamente com relação a células HaCaT, Bonnekoh *et al.* (1991) relataram aumento da fluidez da membrana celular após exposição por 1h a lipossomas com concentração lipídica de 0,1% a 1% e diminuição da síntese de proteínas e de DNA após exposição por 24 h a lipossomas com concentração lipídica de, respectivamente 0,08% e 0,06%. A redução da síntese de DNA e de proteínas promoveu redução da proliferação dessas células, embora a viabilidade

celular não tenha sido alterada. Deve-se ressaltar que neste estudo os lipossomas continham fosfatidilcolina de soja; Bertschi (1982), citado por Bonnekoh *et al.* (1991), relataram alterações tóxicas em células epidérmicas de cobaias após exposição por 72 h a lipossomas com concentração lipídica de 0,1% preparados com lecitina de ovo. Assim, não apenas a concentração de lipídeos, mas também a sua composição pode influenciar de forma incisiva a viabilidade celular.

A composição dos lipossomas utilizados no presente trabalho (fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol) foi utilizada em diversos estudos em combinação com diferentes sais anestésicos, sem evidência de toxicidade (Cereda *et al.*, 2008; de Araujo *et al.*, 2008; Tofoli *et al.*, 2010). Nesses estudos, entretanto, não foi utilizado o sistema de gradiente de pH. Assim, é possível que o tampão interno composto de sulfato de amônia possa ter causado diminuição da viabilidade nas células HaCaT.

Grant *et al.* (2004) utilizaram o mesmo tipo de tampão interno para encapsular bupivacaína em lipossomas multivesiculares e aparentemente não observaram toxicidade. Nesse estudo, realizado em humanos, foi injetado na região lombar 0,5 mL de preparações lipossomais com gradiente de pH transmembranar contendo bupivacaína nas concentrações 0,5%, 1% e 2%. Embora os voluntários não tenham relatado efeitos adversos durante o estudo, em alguns indivíduos foi observado aumento de volume após injeção, o qual permaneceu por vários dias, sendo perceptível visualmente no primeiro dia e por palpação nas avaliações subsequentes. Essa condição regrediu ao longo do tempo, e 28 dias após a injeção não havia aumento de volume ou sensibilidade alterada na região. Nesse estudo, Grant e colaboradores utilizaram lipossoma multivesicular, composto por fosfatidilcolina de soja, colesterol e tert-butanol. O sistema utilizado aumentou a duração da anestesia e permitiu uso de maior concentração de bupivacaína. Entretanto, o aumento de volume no local da injeção poderia ser decorrente da maior permanência dos lipossomas no local injetado, ou ainda de uma reação tecidual aos mesmos, uma vez que o efeito anestésico máximo foi inferior a 66 horas.

Outro fator importante é a existência de diferença de resposta a agentes agressores entre tipos celulares distintos. Ferreira (2014) observou diminuição da viabilidade de células HaCaT em relação ao controle, após exposição por 6 horas à ropivacaína na concentração de 100 μM e por 24 horas nas concentrações de 1, 10 e 100 μM . Fibroblastos gengivais humanos, entretanto, não foram afetados pela ropivacaína nessas concentrações e tempos.

Assim, embora Grant *et al.* (2004) não tenham observado toxicidade com uso de lipossomas com tampão interno de sulfato de amônia, é possível que as células HaCaT apresentem sensibilidade maior ao mesmo.

Considerando a liberação de IL-6, foi observado que a articaína aumenta a liberação dessa citocina.

Aumento da liberação de IL-6 também foi demonstrado por Schmittner *et al.* (2010), em consequência à metemoglobinemia causada pela administração de dose máxima ou acima da máxima total recomendada de prilocaina (600 mg) em pacientes.

Para a lidocaína, ao contrário, há relatos de diminuição da liberação de IL-6 por células expostas a esse anestésico local (Yardeni *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2010; Girard *et al.*, 2013). Entretanto, Ferreira (2014) não observou alteração na liberação de IL-6 após exposição de células HaCaT por 6 h à lidocaína nas concentrações de 1, 10 e 100 μM . A exposição à ropivacaína nas mesmas concentrações resultou em aumento da liberação de IL-6 em todas as concentrações e a bupivacaína causou diminuição dessa liberação apenas com a exposição à maior concentração. Dessa forma, a ação sobre a produção de IL-6 parece depender do tipo celular, do anestésico e de sua concentração.

As formulações lipossomais não induziram aumento da liberação de IL-6 pelas células HaCaT no presente estudo. Assim, provavelmente a diminuição da viabilidade celular pelos lipossomas com gradiente de pH não esteja relacionada com a estimulação da liberação dessa citocina. É possível ainda que a ausência de alteração na produção de IL-6 com uso dessas formulações seja decorrente do número de células viáveis disponíveis, uma vez que a viabilidade das formulações

lipossomais ficou entre 56% e 60%, enquanto que para as formulações de articaína livre a viabilidade estava em 80%. Desta forma, com menor número de células viáveis, haveria também menor produção de IL-6 após exposição das células HaCaT às formulações lipossomais.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a articaína apresenta comportamento diferente dos demais anestésicos quanto à eficiência de encapsulação, pois embora apresente lipossolubilidade muito maior que a lidocaína, esta não se traduz em maior capacidade de encapsulação, conforme já discutido nesse trabalho. Mesmo a encapsulação em lipossomas com gradiente de pH transmembranar resultou em aumento discreto na encapsulação. Desta forma, há necessidade de outros estudos para melhor entendimento da interação da articaína com membranas de bicamadas lipídicas para, assim, obter uma formulação lipossomal compatível com as necessidades de encapsulação, toxicidade e eficiência anestésica.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a utilização de lipossomas com gradiente de pH transmembranar, com tampão interno de sulfato de amônia, aumentou a encapsulação de articaína, entretanto, apresentou toxicidade intrínseca no modelo avaliado

REFERÊNCIAS

1. Amjad-Iranagh S1, Yousefpour A, Haghghi P, Modarress H. Effects of protein binding on a lipid bilayer containing local anesthetic articaine, and the potential of mean force calculation: a molecular dynamics simulation approach. *J Mol Model*. 2013;19(9):3831-42.
2. Ashraf H, Kazem M, Dianat O, Noghrehkar F. Efficacy of articaine versus lidocaine in block and infiltration anesthesia administered in teeth with irreversible pulpitis: a prospective, randomized, double-blind study. *J Endod*. 2013;39(1):6-10.
3. Barth HO, Flippen RB. Particle size analysis. *Anal. Chem*. 1995; 67: 257–272.
4. Batista da Silva C. Eficácia anestésica das preparações lipossomais uni e multilamelar de articaína, em bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior e em infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, em ratos [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2012 [Acesso 2014 Mar 18]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000853819&opt=4>.
5. Batista da Silva C, Berto LA, Volpato MC, Ramacciato JC, Motta RH, Ranali J, Groppo FC. Anesthetic efficacy of articaine and lidocaine for incisive/mental nerve block. *J Endod*. 2010;36(3):438-41.
6. Berto LA. Eficácia anestésica da formulação Lipossomal de articaína em ratos. Berto [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010 [Acesso 2014 Mar 18]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000478868&fd=y>.
7. Bertschi W. Herstellung von liposomen aus synthetischen Lipiden und Einschluss verschiedener Modellsubstanzen: Toxizitätsprüfungen im Hinblick auf eine mögliche topische Applikation. PhD Thesis. Naturwissenschaftliche Fakultät ETH. Zurich. 1982. Apud Bonnekoh B1, Rödning J, Krueger GR, Ghyczy M, Mahrle G. Increase of lipid fluidity and suppression of proliferation

- resulting from liposome uptake by human keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol.* 1991;124(4):333-40.
8. Boogaerts J, Declercq A, Lafont N, Benameur H, Akodad EM, Dupont JC, Legros FJ. Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. *Anesth Analg.* 1993a;76(3):553-5.
 9. Boogaerts JG, Lafont ND, Luo H, Legros FJ. Plasma concentrations of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome-associated and plain solutions to rabbits. *Can J Anaesth.* 1993b;40(12):1201-4.
 10. Bonnekoh B1, Röding J, Krueger GR, Ghyczy M, Mahrle G. Increase of lipid fluidity and suppression of proliferation resulting from liposome uptake by human keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol.* 1991;124(4):333-40.
 11. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111(2 Suppl): S460-75.
 12. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal of Cell Biology.* 1988; 106: 761-771.
 13. Brenner SM, Rupp V, Boucher J, Weaver K, Dusza SW, Bokovoy J. A randomized, controlled trial to evaluate topical anesthetic for 15 minutes before venipuncture in pediatrics. *Am J Emerg Med.* 2013;31(1):20-5.
 14. Bucalo BD, Mirikitani EJ, Moy RJ. Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine, and EMLA using 30-minute application time. *Dermatol Surg.* 1998; 24(5): 537-541.
 15. Calatayud J1, González A. History of the development and evolution of local anesthesia since the coca leaf. *Anesthesiology* 2003;98(6):1503-8.
 16. Carbone A, Marciani D, Piemonte P, Frascione P. Topical anesthetics for cosmetic dermatologic procedures. *G Ital Dermatol Venereol.* 2013;148(5):465-9.
 17. Cereda CM, Brunetto GB, de Araujo DR, de Paula E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. *Can J*

- Anaesth. 2006;53(11):1092-7.
18. Cereda CM, de Araújo DR, Brunetto GB, de Paula E. Liposomal prilocaine: preparation, characterization and in vivo evaluation. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2004;7(2):235–40.
 19. Cereda CM, Franz-Montan M, da Silva CM, Casadei BR, Domingues CC, Tofoli GR, de Araujo DR, de Paula E. Transdermal delivery of butamben using elastic and conventional liposomes. *J Liposome Res.* 2013;23(3):228-34.
 20. Cereda CM, Tófoli GR, de Brito Junior RB, de Jesus MB, Fraceto LF, Groppo FC, de Araujo DR, de Paula E. Stability and local toxicity evaluation of a liposomal prilocaine formulation. *J Liposome Res.* 2008;18(4):329-39.
 21. Cereda CM, Tofoli GR, Maturana LG, Pierucci A, Nunes LA, Franz-Montan M, de Oliveira AL, Arana S, de Araujo DR, de Paula E. Local neurotoxicity and myotoxicity evaluation of cyclodextrin complexes of bupivacaine and ropivacaine. *Anesth Analg.* 2012;115(5):1234-41.
 22. Columb MO, Ramsaran R. Local anaesthetic agents. *Anaesth Int Care Med* 2010;11(3):113-7.
 23. Cullis PR, Verkleij AJ. Modulation of membrane-structure by Ca²⁺ and dibucaine as detected by P-31 NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 1979; 552: 546-551.
 24. Davidson EM, Barenholz Y, Cohen R, Haroutiunian S, Kagan L, Ginosar Y. High dose bupivacaine remotely loaded into multivesicular liposomes demonstrates slow drug realease without systemic toxic plasma concentrations after subcutaneous administration in humans. *Anesth Analg.* 2010;110(4):1018-23.
 25. Da Silva RA. Vias de sobrevivência e morte em queratinócitos submetidos ao estresse oxidativo e choque hiperosmótico [tese]. Campinas: UNICAMP/IB; 2011 [Acesso 2014 Mar 18]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000803657&opt=4>.
 26. de Araújo DR. Desenvolvimento e avaliação farmacologica de formulações

- de liberação controlada com anestésicos locais amino-amidas cíclicas : bupivacaina, mepivacaina e ropivacaina [tese]. Campinas: UNICAMP/IB; 2005 [Acesso 2014 Mar 18]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000366724&opt=4>.
27. de Araújo DR, Cereda CM, Brunetto GB, Pinto LM, Santana MH, de Paula E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. *Can J Anesth*. 2004;51(6):566-72.
 28. de Araújo DR, Cereda CM, Brunetto GB, Vomero VU, Pierucci A, Neto HS, Oliveira ALR, Fraceto LF, Braga AFA, de Paula E. Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. *J Pharm Pharmacol*. 2008; 60(11): 1449-57.
 29. de Araújo DR, Pinto LMA, Braga AFA, de Paula E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: Aplicações Terapêuticas, *Rev. Bras. Anesthesiol*. 2003; 53(5): 653-61.
 30. de Klaver MJ, Buckingham MG, Rich GF. Lidocaine attenuates cytokine-induced cell injury in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Anesth Analg*. 2003;97(2):465-70.
 31. de Paula E, Cereda CM, Tofoli GR, Franz-Montan M, Fraceto LF, de Araújo DR. Drug delivery systems for local anesthetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2010;4(1):23-34.
 32. de Paula E, Schreier S. Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1240(1):25-33.
 33. de Paula E, Schreier S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(7):877-94.
 34. de Souza TF. Sistema lipossomal para liberação sustentada de articaína [trabalho de conclusão de curso - bacharelado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Curso de Farmácia; 2010.

35. Doyle A, Griffiths JB. Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. Chichester: Wiley, 2009.
36. Epstein-Barash H, Shichor I, Kwonb AH, Hallc S, Lawlord MW, Langer B, Kohanea D. Prolonged duration local anesthesia with minimal toxicity. PNAS 2009; 106:7125-7130.
37. Ferreira LEN. Efeitos dos anestésicos locais associados a carreadores na modulação de mediadores inflamatórios, viabilidade celular e apoptose [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2014.
38. Förster JG, Rosenberg PH, Harilainen A, Sandelin J, Pitkänen MT. Chloroprocaine 40 mg produces shorter spinal block than articaine 40 mg in day-case knee arthroscopy patients. Acta Anaesthesiol Scand. 2013;57(7):911-9.
39. Foster AH, Carlson BM. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. Anesth Analg 1980;59(10):727-36.
40. Franz-Montan M, de Paula E, Groppo FC, Silva AL, Ranali J, Volpato MC. Liposomal delivery system for topical anaesthesia of the palatal mucosa. Br J Oral Maxillofac Surg. 2012;50(1):60-4.
41. Franz-Montan M, de Paula E, Groppo FC, Silva AL, Ranali J, Volpato MC. Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;110(6):800-4.
42. Franz-Montan M, Silva AL, Cogo K, Bergamaschi Cde C, Volpato MC, Ranali J, de Paula E, Groppo FC. Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. Anesth Analg. 2007;104(6):1528-31.
43. Franz-Montan M, Silva AL, Fraceto LF, Volpato MC, Paula Ed, Ranali J, Groppo FC. Liposomal encapsulation improves the duration of soft tissue anesthesia but does not induce pulpal anesthesia. J Clin Anesth. 2010;22(5):313-7.
44. Fritze A, Hens F, Kimpfler A, Schubert R, Peschka-Süss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate

- gradient. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(10):1633-40.
45. Gaffen AS, Haas DA. Retrospective review of voluntary reports of nonsurgical paresthesia in dentistry. *J Can Dent Assoc*. 2009;75(8):579.
 46. Garisto GA, Gaffen AS, Lawrence HP, Tenenbaum HC, Haas DA. Occurrence of paresthesia after dental local anesthetic administration in the United States. *J Am Dent Assoc* 2010;141;836-844.
 47. Girard AC¹, Atlan M, Bencharif K, Gunasekaran MK, Delarue P, Hulard O, Lefebvre-d'Hellencourt C, Roche R, Hoareau L, Festy F. New insights into lidocaine and adrenaline effects on human adipose stem cells. *Aesthetic Plast Surg*. 2013;37(1):144-52.
 48. Golembiewski J. Local anesthetics. *J Perianesth Nurs*. 2013;28(6):409-12.
 49. Gordon SM, Chuang BP, Wang XM, Hamza MA, Rowan JS, Brahim JS et al. The differential effects of bupivacaine and lidocaine on prostaglandin E2 release, cyclooxygenase gene expression and pain in a clinical pain model. *Anesth Analg*. 2008;106(1):321-7.
 50. Grant AS. The holy grail: long-acting local anesthetics and liposomes. *Best Pract Res Clin Anesthesiol* 2002; 16:345-352.
 51. Grant GJ, Bansinath M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med* 2001; 26:61-63.
 52. Grant GJ, Barenholz Y, Bolotin E, Bansinath M, Turndorf H, Piskoun B, Davidson EM. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiology* 2004; 100:133-137.
 53. Grant GJ, Lax J, Susser L, Zakowski M, Weissman TE, Turndorf H. Wound infiltration with liposomal bupivacaine prolongs analgesia in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997; 41(2):204-7.
 54. Hersh EV, Giannakopoulos H, Levin LM, Secreto S, Moore PA, Peterson C, Hutcheson M, Bouhajib M, Mosenkis A, Townsend RR. The pharmacokinetics and cardiovascular effects of high-dose articaine with 1:100,000 and 1:200,000 epinephrine. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(11):1562-71.
 55. Hillerup S, Jensen RH, Ersbøll BK. Trigeminal nerve injury associated with

- injection of local anesthetics: needle lesion or neurotoxicity? *J Am Dent Assoc.* 2011; 142(5):531-9.
56. Hintze A, Paessler L. Comparative investigations on the efficacy of articaine 4% (epinephrine 1:200,000) and articaine 2% (epinephrine 1:200,000) in local infiltration anaesthesia in dentistry--a randomised double-blind study. *Clin Oral Investig.* 2006;10(2):145-50.
 57. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology.* 2000; 93(3): 858-75.
 58. Keck M, Zeyda M, Gollinger K, Burjak S, Kamolz LP, Frey M et al. Local anesthetics have a major impact on viability of preadipocytes and their differentiation into adipocytes. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 126(5): 1500-5.
 59. Kontogiannopoulos KN, Tsermentseli SK, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Sterically stabilized liposomes as a potent carrier for shikonin. *J Liposome Res.* 2014 Mar 6. PMID: 24597496 [divulgado antes da publicação].
 60. Lichtenberg D, Barenholz Y. Liposomes: preparation, characterization, and preservation. *Methods Biochem Anal.* 1988;33:337-462.
 61. Maestrelli F, Capasso G, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Ghelardini C, Mura P. Effect of preparation technique on the properties and in vivo efficacy of benzocaine-loaded ethosomes. *J Liposome Res.* 2009;19(4):253-60.
 62. Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Ghelardini C, Mura P. New "drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes" formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics. *Int J Pharm.* 2010;395(1-2):222-31.
 63. Malamed SF. *Manual de anestesia local.* 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.
 64. Malamed SF, Gagnon S, Leblanc D. Articaine hydrochloride: a study of the safety of a new amide local anesthetic. *J Am Dent Assoc* 2001;132:177–85.
 65. Maurice JM, Gan Y, Ma FX, Chang YC, Hibner M, Huang Y. Bupivacaine

- causes cytotoxicity in mouse C2C12 myoblast cells: involvement of ERK and Akt signaling pathways. *Acta Pharmacol Sin.* 2010; 31(4): 493-500.
66. Mishra PR1, Al Shaal L, Müller RH, Keck CM. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *Int J Pharm.* 2009;371(1-2):182-9.
 67. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles—a review. *Trop J Pharm Res.* 2006;5:561–73.
 68. Mojumdar EH, Lyubartsev AP. Molecular dynamics simulations of local anesthetic articaine in a lipid bilayer. *Biophys Chem.* 2010;153(1):27-35.
 69. Moriyama Y. Membrane energization by proton pumps is important for compartmentalization of drugs and toxins: a new type of active transport. *J Exp Biol.* 1996;199(Pt 7):1447-54.
 70. Mowat JJ, Mok MJ, MacLeod BA, Madden TD. Liposomal bupivacaine. Extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient. *Anesthesiology.* 1996;85(3):635-43.
 71. Mukthavaram R, Jiang P, Saklecha R, Simberg D, Bharati IS, Nomura N, Chao Y, Pastorino S, Pingle SC, Fogal V, Wrasidlo W, Makale M, Kesari S. High-efficiency liposomal encapsulation of a tyrosine kinase inhibitor leads to improved in vivo toxicity and tumor response profile. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:3991-4006.
 72. Mura P, Capasso G, Maestrelli F, Furlanetto S. Optimization of formulation variables of benzocaine liposomes using experimental design. *J Liposome Res.* 2008;18(2):113-25.
 73. Mura P, Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;67(1):86-95.
 74. Oertel R, Rahn R, Kirch W . Clinical pharmacokinetics of articaine. *Clin Pharmacokinet.* 1997;33(6):417-25.
 75. Park GJ, Kim YS, Kang KL, Bae SJ, Baek HS, Auh QS, Chun YH, Park BH, Kim EC. Effects of sirtuin 1 activation on nicotine and lipopolysaccharide-

- induced cytotoxicity and inflammatory cytokine production in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2013;48(4):483-92.
76. Paphangkorakit J, Sangsirinakagul C, Priprem A. Relief of palatal injection pain by liposome-encapsulated 2% lignocaine prepared by ultrasonic dental scaler. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2012;50(8):784-7.
 77. Paxton K, Thome DE. Efficacy of articaine formulations: quantitative reviews. *Dent Clin North Am.* 2010;54(4):643-53.
 78. Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, Rosenberg A, Recio-Pinto E, Zhang J, Blanck TJ, Xu F. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. *Anesth Analg.* 2009;108(3):997-1007.
 79. Pinto, LM. Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys Chem* 2002; 6(99):229-43.
 80. Pinto LM, Yokaichiya DK, Fraceto LF, de Paula E. Interaction of benzocaine with model membranes. *Biophys Chem.* 2000 Oct 30;87(2-3):213-23.
 81. Potocnik I, Tomsic M, Sketelj J, Bajrovic FF 2006. Articaine is more effective than lidocaine or mepivacaine in rat sensory nerve conduction block in vitro.. *J Dent Res.* 2006;85(2):162-6.
 82. Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science.* 1994;265(5179):1724-8.
 83. Ravid A, Rubinstein E, Gamady A, Rotem C, Liberman UA, Koren R. Vitamin D inhibits the activation of stress-activated protein kinases by physiological and environmental stresses in keratinocytes. *Journal of Endocrinology.* 2002; 173: 525-532.
 84. Robertson D, Nusstein J, Reader A, Beck M, McCartney M. The anesthetic efficacy of articaine in buccal infiltration of mandibular posterior teeth. *J Am Dent Assoc.* 2007; 138(8):1104-12.
 85. Rose JS, Neal JM, Kopacz DJ. Extended-duration analgesia: Update on microspheres and liposomes. *Reg Anesth Pain Med.* 2005;30(3): 275-285.
 86. Sánchez JB. Efeitos da articaína associada a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina

- ou epinefrina sobre a viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCaT) [dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2014.
87. Santos NC, Castanho MARB. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Quim. Nova* 2002;25(6B):1181-1185.
 88. Shaw DJ. *Introduction to colloid & surface chemistry*. 4.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann. 1991.
 89. Schaffazick SR1, Pohlmann AR, de Cordova CA, Creczynski-Pasa TB, Guterres SS. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *Int J Pharm*. 2005;289(1-2):209-13.
 90. Schmittner MD1, Faulhaber J, Kemler B, Koenen W, Thumfart JO, Weiss C, Neumaier M, Beck GC. Influence of high dose tumescent local anaesthesia with prilocaine on systemic interleukin (IL)-6, IL-8 and tumour necrosis factor- α . *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(12):1400-5.
 91. Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, Cassuto J, Thomsen P. Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB₄ release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1993; 37(2): 159–65.
 92. Skjevik AA, Haug BE, Lygre H, Teigen K. Intramolecular hydrogen bonding in articaine can be related to superior bone tissue penetration: a molecular dynamics study. *Biophys Chem*. 2011;154(1):18-25.
 93. Snoeck M. Articaine: a review of its use for local and regional anesthesia. *Local and Regional Anesthesia*. 2012; 5: 23–33.
 94. Strichartz GR. Novel ideas of local anaesthetic actions on various ion channels to ameliorate postoperative pain. *Br J Anaesth*. 2008; 101(1):45–7.
 95. Strichartz GR, Ritchie JM. Local Anesthetics. *Handbook of Experimental Pharmacology* 1987, Springer-Verlag, Berlin. In: Pinto, LM. Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys Chem* 2002; 6(99):229-43.
 96. Su D, Gu Y, Wang Z, Wang X. Lidocaine attenuates proinflammatory cytokine

- production induced by extracellular adenosine triphosphate in cultured rat microglia. *Anesth Analg*. 2010;111(3):768-74.
97. Tao LY, Li JY, Zhang JY. Brazilein, a compound isolated from *Caesalpinia sappan* Linn., induced growth inhibition in breast cancer cells via involvement of GSK-3 β / β -Catenin/cyclin D1 pathway. *Chem Biol Interact*. 2013;206(1):1-5.
 98. Tofoli GR, Cereda CM, de Araujo DR, de Paula E, Brito RB Jr, Pedrazzoli J Jr, Meurer E, Barros FA, Groppo FC, Volpato MC, Ranali J. Pharmacokinetic and local toxicity studies of liposome-encapsulated and plain mepivacaine solutions in rats. *Drug Deliv*. 2010;17(2):68-76.
 99. Tofoli GR, Cereda CM, Groppo FC, Volpato MC, Franz-Montan M, Ranali J, de Araújo DR, de Paula E. Efficacy of liposome-encapsulated mepivacaine for infiltrative anesthesia in volunteers. *J Liposome Res*. 2011;21(1):88-94.
 100. Tófoli GR, Ramacciato JC, de Oliveira PC, Volpato MC, Groppo FC, Ranali J. Comparison of effectiveness of 4% articaine associated with 1: 100,000 or 1: 200,000 epinephrine in inferior alveolar nerve block. *Anesth Prog*. 2003;50(4):164-8.
 101. Tortamano IP, Siviero M, Lee S, Sampaio RM, Simone JL, Rocha RG. Onset and duration period of pulpal anesthesia of articaine and lidocaine in inferior alveolar nerve block. *Braz Dent J*. 2013;24(4):371-4.
 102. Yardeni IZ1, Beilin B, Mayburd E, Levinson Y, Bessler H. The effect of perioperative intravenous lidocaine on postoperative pain and immune function. *Anesth Analg*. 2009 Nov;109(5):1464-9.
 103. Yarov-Yarovoy V, Brown J, Sharp EM, Clare JJ, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of voltage-dependent gating and binding of pore-blocking drugs in transmembrane segment III S6 of the Na(+) channel alpha subunit. *J Biol Chem*. 2001;276(1):20-7.
 104. Vree TB, Gielen MJ. Clinical pharmacology and the use of articaine for local and regional anaesthesia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2005;19(2):293-308.
 105. Weiniger CF, Golovanevski L, Domb AJ, Ickowicz D. Extended release

- formulations for local anaesthetic agents. *Anaesthesia*. 2012;67(8):906-16.
106. Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, Hermanns H, Essmann F, Hollmann MW et al. Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line. *Br J Anaesth*. 2009; 103(5): 711-8.
107. Werdehausen R, Braun S, Fazeli S, Hermanns H, Hollmann MW, Bauer I, Stevens MF. Lipophilicity but not stereospecificity is a major determinant of local anaesthetic-induced cytotoxicity in human T-lymphoma cells. *Eur J Anaesthesiol*. 2012;29(1):35-41.
108. Zetasizer Nano Series. User manual. England: Malvern Instruments. 2004. [Acesso 2014 Mar 18]. Disponível em: [Acesso 2014 Mar 18]. Disponível em: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf.