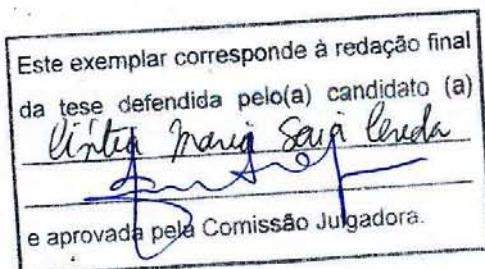


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CÍNTIA MARIA SAIA CEREDA

**“SISTEMA DE LIBERAÇÃO PROLONGADA COM O ANESTÉSICO
LOCAL PRILOCAÍNA EM LIPOSSOMAS: PREPARO,
CARACTERIZAÇÃO E TESTES BIOLÓGICOS”**



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

Co-Orientadora: Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C334s

Cereda, Cíntia Maria Saia

Sistema de liberação prolongada com o anestésico local prilocaína em lipossomas: preparo, caracterização e testes biológicos / Cíntia Maria Saia Cereda. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Eneida de Paula.

Co-orientadora: Daniele Ribeiro de Araújo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anestésicos locais. 2. Prilocaína. 3. Lipossomos.
I. Paula, Eneida. II. Araújo, Daniele Ribeiro de. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
IV. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: A new drug delivery system for the local anesthetic prilocaine in lipossomes: preparation, characterization and biological tests.

Palavras-chave em inglês: Local anesthetics; Prilocaine; Liposomes.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Eneida de Paula, José Ranali, Sílvia Stanisçuaski Guterres, Angélica de Fátima de Assunção Braga, Patrícia da Silva Melo.

Data da defesa: 28/02/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 28 de fevereiro de 2007

BANCA EXAMINADORA

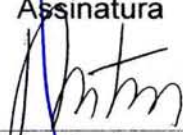
Profa. Dra. Eneida de Paula (Orientadora)


Assinatura

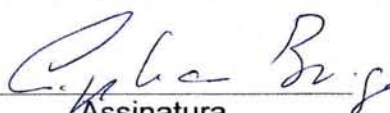
Prof. Dr. José Ranali


Assinatura

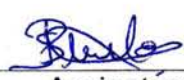
Profa. Dra. Sílvia Stanisquaski Guterres


Assinatura

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga


Assinatura

Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo


Assinatura

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Assinatura

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine

Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse

Assinatura



Mãe e filho - Pablo Picasso

*Para Ronaldo, Luís Henrique, Fábio e
Paulo... Amo vocês!!!*

*Agradeço a Deus...
Por tudo!!!!*

“...O amor vem de Deus. E todo aquele que ama, nasceu de Deus e conhece a Deus...”

1 João 4,7

“...Ainda que eu tivesse o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência... se não tivesse o amor, eu não seria nada...”

1 Coríntios 13,2

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eneida de Paula, por toda a orientação, amizade e por ter me dado a oportunidade de mostrar que seria possível retornar à vida acadêmica depois de tanto tempo...

Ao meu marido, Ronaldo, e aos meus filhos Luís Henrique, Fábio e Paulo, pelo amor, confiança, paciência, apoio, companheirismo, dedicação, enfim, por tudo o que construímos juntos...

Aos meus pais, Nilma e Dig, meus irmãos, cunhados, sobrinhos e agregados, Clau e Tchú, Glau e Giba, Mar e Sô, Zé e Cacá, Serguei e Olga, Gabi, Tuca, Rê, Gui, Thales, Quel, Ana, Pedro, Zé Ricardo, Bruno, Pal, Ângela, Venta, obrigada por estarem sempre perto e por acreditarem em mim sempre...

Aos meus sogros, Luiz (in memoriam) e Margarida, meus cunhados, Sil e Vagner, Eli e Zé Lú, e minhas sobrinhas, Estê e Lô, pela acolhida desde o começo...

À minha mãe Nilma, por estar sempre presente em qualquer momento, e sempre disponível a me ajudar com os filhotes...

À minha irmã Gláucia, por sempre conseguir as referências para mim... (foram tantas!)...

À Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo, minha amiga Dani Morango, pela amizade, orientação, conversas, risadas...

Aos professores, Denise Vaz Macedo, Bayardo Baptista Torres e Eneida de Paula, por me mostrarem o caminho para o ensino de bioquímica...

Aos Professores, Sarah Arana, Maria Cristina Volpato, Francisco Carlos Groppo, Fernanda Ramos Gadelha, Hiroshi Ayoama, Carmen Veríssima Ferreira, Dora Maria Grassi-Kassisse e Maria Sílvia Viccari Gatti, pelas dicas valiosas, sempre que necessário...

À “comunidade biomembranense”, Eneida, Dani, Nilce, Nonô, Cleyton, Bispo, Gí Tófoli, Fer, Gí Brunetto, Jú Minardi, André, Pô, Beth, Maribel, D. Cida, Márcio, Ana Cláudia, Roberta, Simone, Raquel, Dani Japipa, Josi, Carol, Léo, Sônia, Dú, Jú Matoso, Paulinho, por toda a convivência nesses anos... E também quanta risada! ☺ ☺ ☺ ☺ ☺

À turma da “Nata”, Cleyton, Nonô, Dani Morango, Japipa, Pô, Zequinha, André e Raquel, pelos almoços, chás da tarde, reuniões de final de ano... Que chique!!!

Ao pessoal do bandejão, Cleyton, Beth, Bispo e Paulinho... Risada mais do que comida!

😊😊😊😊😊

Ao meu amigo Cleyton, pela amizade e apoio, sempre!

Ao meu amigo corintiano, Bispo, por estar sempre pronto a ajudar, principalmente quando o problema era “computador”...

À turma da “salinha”, Gi Brunetto, Fer, Gi Tófoli e André... Sem comentários... Só risos, muitos!😊😊😊😊😊

Aos amigos do Labex (Fernando, Paulo, Rodrigo, Lucas, Fernanda, Lázaro, Renato, Danilo, Rubinho,...), do Laboratório de cultura de células (Patrícia, Daniel, Maristela, Neto,...), da Enzimologia (Roberta, Camila, Luli, Kati, Érica,...), enfim, de todo o Departamento de Bioquímica, pela ajuda, amizade e risadas nos congressos...

Aos “filhos” e “filhas” de congressos, Fernando, Gi, Fer, Paulo, Raquel, Simone, Josi, Ju, por me “adotarem” como mãe...

À Andréia e à Marina, sempre eficientes e dispostas a ajudar na hora difícil da “papelada”...

Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, da Universidade de Sorocaba (UNISO), pelo apoio técnico nas análises de Ressonância Magnética Nuclear...

Ao Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior, da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, pelo apoio técnico na confecção das lâminas histológicas...

À Maria de Fátima Momesso, do Setor de controle de qualidade da empresa Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos Ltda., pela realização dos testes de pirogênio...

À CAPES, pelo suporte financeiro...

A todos que, de alguma forma, participaram desta minha caminhada...

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O controle da dor é de extrema importância em odontologia, já que a maioria dos procedimentos odontológicos envolve estímulos dolorosos. Com a descoberta dos anestésicos locais, que se caracterizam pela capacidade de abolir a dor sem a perda da consciência, deu-se um grande passo para o avanço da odontologia. Um anestésico local ideal deve apresentar ação anestésica duradoura (suficiente para os procedimentos operatórios) e baixa toxicidade. Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com anestésicos locais objetivando prolongar a duração de seu efeito e diminuir sua toxicidade. Um caminho muito promissor foi aberto com o desenvolvimento de formulações anestésicas de liberação prolongada, utilizando carreadores como lipossomas, que mantêm o fármaco por mais tempo e em maior concentração no sítio de ação.

Este trabalho teve por finalidade preparar formulações de liberação prolongada do anestésico local prilocaína, muito usado em odontologia. Objetivou-se: (i) preparar prilocaína encapsulada em lipossomas; (ii) caracterizar físico-quimicamente essa formulação, (iii) avaliar a atividade terapêutica, com testes de nocicepção em animais e (iv) avaliar a formulação quanto à estabilidade e à toxicidade local.

Após a preparação, testes de caracterização físico-química demonstraram a interação da prilocaína com os lipossomas. Com a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica pôde-se observar um decréscimo de 11% no parâmetro de ordem da membrana lipossomal, em presença do anestésico local. Com a análise por espalhamento de luz quase-elástico (*light scattering*) observou-se que as vesículas lipossomais apresentaram diâmetro médio de 382nm (± 30), que não sofreu variação significativa ($p > 0,05$) após encapsulação da prilocaína.

Ensaio de liberação *in vitro* evidenciaram taxa de liberação mais lenta para a prilocaína lipossomal (equilíbrio em 90 min) que para prilocaína em solução (60 min). Análises por *light scattering* ($p > 0,05$), de peroxidação lipídica ($p > 0,05$) e ressonância magnética nuclear de prótons ($^1\text{H-NMR}$) mostraram que, após processo de esterilização em autoclave, a prilocaína lipossomal permaneceu estável por um período de 30 dias após a preparação. Esses experimentos não

mostraram diferenças na estabilidade físico-química da prilocaína ou da preparação lipossomal, estéreis ou não.

Testes de bloqueio do nervo infraorbital em ratos e de *tail-flick* em camundongos revelaram maior efeito analgésico para a prilocaína lipossomal em relação à prilocaína em solução ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). Já em comparação com a formulação comercial de prilocaína – que contém o vasoconstritor felipressina - não ocorreram diferenças significativas ($p > 0,05$) para o efeito da prilocaína lipossomal.

A avaliação da toxicidade local em ratos mostrou que a prilocaína lipossomal não provocou edema de pata, quando comparada com soluções controle: salina, tampão, prilocaína em solução e lipossoma ($p > 0,05$). Na avaliação histológica da mucosa oral dos ratos, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os animais tratados com prilocaína lipossomal e seus controles.

Com esses resultados, pôde-se concluir que a encapsulação de prilocaína em lipossomas aumentou a duração do bloqueio nervoso sensorial sem induzir o aumento na toxicidade local, podendo ser considerada mais uma opção no arsenal já disponível para a anestesia local em odontologia.

ABSTRACT

Pain control is an extremely important issue in dentistry since most of the dentistry procedures involve painful stimuli. The discovery of local anesthetics, which have the capability of abolishing the pain without losing the consciousness, meant a major step in dentistry advance. An ideal local anesthetic must present lasting anesthetic action (long enough for surgery procedures) and low toxicity. Many researches have been developed with local anesthetics aiming at the prolongation of their anesthetic effect duration and decrease of their toxicity. A very promising path was open with the development of long-acting local anesthetics formulations, using carriers as liposomes that are able to enhance the bioavailability, to reduce the systemic toxicity and to increase the local anesthetic half-life *in vivo*.

This present study comprised (i) the preparation of liposomal prilocaine (a local anesthetic widely used in dentistry) formulation, (ii) the physicochemical characterization of the formulation, (iii) the assessment of its anesthetic efficacy and (iv) the evaluation of its physicochemical stability, as well as of its toxic effects.

After preparation, the physicochemical characterization showed the prilocaine-liposome interaction. Electron spin resonance results showed a decrease in the order parameter of liposomal membrane, in presence of prilocaine. Laser light-scattering analysis revealed a vesicle population of liposomes with 382nm (± 30) diameter, without size changes after prilocaine incorporation.

In the *in vitro* drug release assay, the liposomal formulation led to a slower release rate of prilocaine compared to its plain formulation. Equilibrium was delayed from 60 min (prilocaine in solution) to 90 min with the drug delivery system.

Liposomal prilocaine was found to be stable up to 30 days after preparation, according to the analysis by laser light scattering ($p > 0.05$), thiobarbituric acid reactions ($p > 0.05$) and H^1 -nuclear magnetic resonance, once these assays did

not show differences on physicochemical stability of prilocaine in solution or prilocaine liposomal, sterilized or not.

Rat infraorbital nerve blockade and mice tail-flick tests revealed that a prolonged anesthetic effect was produced by liposomal prilocaine in comparison to prilocaine in solution ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectively). However, no statistical differences were found after comparison between liposomal prilocaine and vasoconstrictor-containing prilocaine ($p > 0,05$).

Local toxicity evaluation in rats showed that the liposomal prilocaine did not evoke rat paw edema when compared to the control groups: saline, Hepes buffer, prilocaine in solution and liposome ($p > 0.05$). There were no statistical differences ($p > 0.05$) between liposomal prilocaine and their controls, in histological evaluation of rat oral mucous.

In conclusion, the prilocaine encapsulation in liposomes enhanced the nerve sensorial blockade, without increasing local toxicity. Liposomal prilocaine can, therefore, be considered an option to local anesthesia in dentistry.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -TC.....	Alfa-tocoferol
AL.....	Anestésico local
ASC.....	Área sob a curva
CH.....	Colesterol
DCP.....	Dicetilfosfato
DMPC.....	Dimiristoil-fosfatidilcolina
DOPC.....	Dioleil-fosfatidilcolina
DSPC.....	Diesteroil-fosfatidilcolina
EA.....	Esteróilamina
EDTA.....	Ácido etilenodiamino-tetracético
EPC.....	Fosfatidilcolina de ovo
H&E.....	Coloração hematoxilina e eosina
HEPES.....	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
LDC.....	Lidocaína
LUV.....	Lipossoma unilamelar
MLV.....	Lipossoma multilamelar
MVC.....	Mepivacaína
PLC.....	Prilocaína
PLC _{LUV}	Prilocaína lipossomal
PLC _{FELIPRESSINA}	Prilocaína associada à felipressina
RMN.....	Ressonância Magnética Nuclear
RPE.....	Ressonância Paramagnética Eletrônica
5-SASL.....	Ácido doxil-esteárico
SPC.....	Fosfatidilcolina de soja
TBA.....	Ácido Tiobarbitúrico
TEP.....	Tetraetoxipropano
T _{rec}	Tempo de recuperação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	“El Sacamuelas” (Theodor Rombouts, 1627-8). Museu do Prado, Madri, Espanha.....	5
Figura 2	Condução do estímulo nervoso. Adaptada de Encyclopedia Britannica, 2002.....	8
Figura 3	Anestésicos locais da família das amidas (A) e dos ésteres (B) – Estruturas químicas.....	11
Figura 4	Vasoconstritores do tipo simpaticomimético.- Estrutura química.....	19
Figura 5	Composição do peptídeo vasoconstritor felipressina.....	20
Figura 6	Representação esquemática de lipossomas: unilamelar (A) e multilamelar (B) (Araujo et al., 2003).....	23
Figura 7	Estrutura química do marcador de spins 5-SASL (a) e espectro de RPE deste marcador em lipossomas (b), mostrando a determinação dos parâmetros $2A_{\parallel}$ e $2A_{\perp}$	36
Figura 8	Representação do sistema para avaliação de liberação in vitro descrito por Paavola et al, 1995.....	38
Figura 9	Raiz sensitiva do nervo trigêmio (Adaptado de Isen, 2006).....	42
Figura 10	(a) Local do forame infraorbital (adaptada de Fink et al, 1975); (b) Procedimento de anestesia do nervo infraorbital.....	44
Figura 11	Local da anestesia para o teste de <i>tail-flick</i> (Figura adaptada de Grant et al, 1994).....	45
Figura 12	Teste de edema de pata; (a) Delimitação da pata; (b) pletismômetro Ugo-Basile – 7140; (c) Injeção intraplantar; (d) Medidas de volume.....	48
Figura 13	(a) Detalhe do local do procedimento anestésico. (b) Procedimento anestésico, conforme descrição no texto.....	49
Figura 14	Corte longitudinal feito no primeiro molar esquerdo da maxila do rato (aumento 40x, microscopia ótica, H&E).....	50
Figura 15	Padronização da região do corte histológico que foi submetida ao procedimento de classificação de acordo com escore anteriormente descrito.....	52
Figura 16	Tamanho das vesículas lipossomais determinadas pela técnica de espalhamento de luz.....	54
Figura 17	Determinação da absortividade molar de prilocaína em 224nm.....	55
Figura 18	Variação do parâmetro de ordem de vesículas lipossomais unilamelares, causada pela prilocaína.....	58
Figura 19	Liberação cumulativa de PLC (%) a partir de sistema com lipossomas unilamelares, pH 7,4 e 25 °C. Dados representados como médias $\pm$ SD (n=4).....	59

Figura 20	Concentração de malondialdeído (MDA) (nM) em amostras da formulação de prilocaína lipossomal 3% estéril e não estéril (n= 6). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (ANOVA/ Tukey – Kramer).....	61
Figura 21	Espectro unidimensional obtido por Ressonância Magnética Nuclear (¹ H-RMN). Prilocaína em D ₂ O: antes (A) e após (B) procedimento de esterilização por autoclave. [Prilocaína] = 5mM, pH 5,5, 20°C, 500 MHz.	62
Figura 22	Gráficos, em função do tempo, da percentagem de animais (ratos) com analgesia avaliados pelo teste de bloqueio do nervo infraorbital (n =7-10 por grupo). (A) PLC em solução 1% vs. PLC lipossomal 1%; (B) PLC em solução 2% vs. PLC lipossomal 2%; (C) PLC em solução 3%, PLC lipossomal 3%, PLC comercial com vasoconstritor 3%.....	65
Figura 23	Tempo de recuperação da anestesia (min) no nervo infraorbital em função da concentração de PLC.....	66
Figura 24	Tempo de recuperação da analgesia (min) em função da concentração de PLC, na cauda de camundongos Swiss (teste de <i>tail-flick</i>).....	68
Figura 25	Gráficos, em função do tempo, da percentagem dos efeitos máximos possíveis, avaliados pelo teste de <i>tail-flick</i> (n = 7-8 por grupo). (A) PLC em solução 1% vs. PLC lipossomal 1%; (B) PLC em solução 2% vs. PLC lipossomal 2%; (C) PLC em solução 3%, PLC lipossomal 3%, PLC comercial com vasoconstritor 3%.....	70
Figura 26	Gráfico em função do tempo (min), do aumento de volume (mL) médio da pata de ratos Wistar ± erro padrão, após injeção dos compostos testados.....	72
Figura 27	Imagens de microscópio ótico (H&E, aumento 100x) do aspecto histológico da mucosa oral de ratos dos diferentes grupos testados, mostradas como exemplo para a determinação de escore qualitativo: A – Punção da agulha (4 dias) – escore 1 ; B – Solução lipossomal (24 horas) – escore 2; C – Prilocaína lipossomal (6 horas) – escore 3; D – Prilocaína em solução (6 horas) – escore 4; E – Prilocaína com felipressina (6 horas) – escore 5.....	73
Figura 28	Médias ± DP dos valores de escore de intensidade do infiltrado inflamatório, obtidos com os cinco tratamentos e seus respectivos controles, nos três tempos avaliados – 6 horas, 24 horas e 4 dias.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das fibras nervosas de acordo com tamanho e propriedades fisiológicas. (Adaptada de STRICHARTZ, 1987).....	8
Tabela 2	Propriedades físico-químicas e farmacológicas de anestésicos do tipo amida (adaptada de Covino,1986; Strichartz, 1987 e Malamed,2001).....	15
Tabela 3	Anestésicos locais em lipossomas.....	26
Tabela 4	Diâmetro médio das vesículas lipossomais (média $\pm$ DP), antes e após a encapsulação do anestésico (n=3).....	55
Tabela 5	Percentagem de encapsulação e coeficiente de partição dos anestésicos locais (AL) estudados em lipossomas compostos de fosfatidilcolina de ovo:colesterol e alfa-tocoferol (pH=7,4).....	57
Tabela 6	Estabilidade física – Tamanho das vesículas (nm) e proporção de distribuição (%) da prilocaína lipossomal, antes e após esterilização. Valores expressos em média $\pm$ DP (n = 6).....	63
Tabela 7	Efeito total do bloqueio sensorial (ASC) e tempo de recuperação para PLC comercial (com vasoconstritor), PLC em solução (3%, 2%, 1%) e PLC _{LUV} (3%, 2%, 1%). Dados expressos em mediana (mínimo – máximo) (n = 7 –10 /grupo).....	64
Tabela 8	Tempos de recuperação do bloqueio sensorial da prilocaína em solução (1%, 2% e 3%), da prilocaína lipossomal (1%, 2% e 3%) e da prilocaína comercial associada ao vasoconstritor felipressina (3%).....	67
Tabela 9	% Efeito Máximo (EMP) da prilocaína em solução (1%, 2% e 3%), da prilocaína lipossomal (1%,2% e 3%) e da prilocaína comercial associada ao vasoconstritor felipressina (3%).....	69
Tabela 10	Média $\pm$ erro padrão do aumento do volume (mL) da pata dos animais dos diferentes grupos nos três tempos testados.....	71
Tabela 11	Mediana (limites mínimo-máximo) dos escores de intensidade do infiltrado inflamatório obtidos após avaliação histológica dos grupos testados e dos respectivos controles com solução salina, 6 horas após o tratamento.....	75
Tabela 12	Mediana (limites mínimo-máximo) dos escores de intensidade do infiltrado inflamatório obtidos após avaliação histológica dos grupos testados e dos respectivos controles com solução salina, 24 horas após o tratamento.....	76
Tabela 13	Mediana (limites mínimo-máximo) dos escores de intensidade do infiltrado inflamatório obtidos após avaliação histológica dos grupos testados e dos respectivos controles com solução salina, 4 dias após o tratamento.....	76

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	3
1. DOR EM ODONTOLOGIA	3
2. ANESTÉSICOS LOCAIS – Definição e histórico	5
3. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS	7
4. ESTRUTURA E BIOTRANSFORMAÇÃO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS...	10
5. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E AÇÕES CLÍNICAS DOS ANESTÉSICOS LOCAIS.....	13
6. TOXICIDADE DOS ANESTÉSICOS LOCAIS.....	15
7. USO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS NA PRÁTICA ODONTOLÓGICA.....	16
7.1. Lidocaína.....	16
7.2. Mepivacaína.....	17
7.3. Bupivacaína	17
7.4. Prilocaína	17
7.5. Uso de vasoconstritores associados aos anestésicos locais	18
7.6. Cuidados especiais	20
8. LIPOSSOMAS.....	22
9. ANESTÉSICOS LOCAIS EM LIPOSSOMAS	24
II. OBJETIVOS GERAIS.....	31
III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
1. DROGAS, SAIS E SOLVENTES.....	32
2. EQUIPAMENTOS.....	32
3. ANIMAIS.....	33
4. PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL.....	33
5. CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL	34
5.1. Caracterização quanto ao tamanho	34
5.2. Caracterização quanto à eficiência de encapsulação e determinação do coeficiente de partição	34
5.3. Efeito do anestésico sobre a organização da bicamada (lipossoma).....	35
6. TESTE DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	37
7. ESTERILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO ANESTÉSICA LIPOSSOMAL	38

8. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA FORMULAÇÃO ANESTÉSICA LIPOSSOMAL (ANTES E APÓS ESTERILIZAÇÃO)	39
8.1. Estabilidade química do componente lipídico	39
8.2. Estabilidade química do anestésico	40
8.3. Estabilidade física das vesículas lipossomais	41
9. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANALGÉSICA EM MODELOS ANIMAIS	41
9.1. Bloqueio do nervo infraorbital	41
9.2. Teste de <i>tail-flick</i>	44
10. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE LOCAL EM MODELOS ANIMAIS	46
10.1. Teste de edema de pata	46
10.2. Avaliação histológica	48
11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
1. CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL	54
1.1. Caracterização quanto ao tamanho	54
1.2. Caracterização quanto à eficiência de encapsulação e determinação do coeficiente de partição	55
1.3. Caracterização quanto à organização da membrana lipossomal	57
2. TESTE DE LIBERAÇÃO IN VITRO	58
3-ESTERILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO ANESTÉSICA LIPOSSOMAL	59
4-AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA FORMULAÇÃO ANESTÉSICA LIPOSSOMAL (ANTES E APÓS ESTERILIZAÇÃO)	60
5. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANALGÉSICA EM MODELOS ANIMAIS	63
5.1. Bloqueio do nervo infraorbital	63
5.2. Teste de <i>tail-flick</i>	66
6-AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE LOCAL EM MODELOS ANIMAIS	70
6.1. Teste de edema de pata	70
6.2. Avaliação histológica	72
VI. CONCLUSÕES	78
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
VIII. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	91
IX. ANEXOS	94

I. INTRODUÇÃO

1. DOR EM ODONTOLOGIA

O combate à dor, sua eliminação ou a prevenção de sua ocorrência são temas predominantes na clínica odontológica, o que torna seu estudo de grande importância.

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável que surge em decorrência de lesão tecidual presente ou potencial (CAVALCANTI et al., 2004).

A dor pode ser de origem nociceptiva, quando é resultante da ativação mecânica, térmica ou química de receptores aferentes nociceptivos (o Sistema Nervoso Central recebe informação da agressão). Pode ser ainda de origem neuropática, quando iniciada ou causada por disfunção que compromete primariamente componentes do Sistema Nervoso, não estando obrigatoriamente ligada a uma lesão tecidual (RANG et al., 2004).

Pode-se também caracterizar a dor como aguda, aquela de causa conhecida e que desaparece com o processo de cura, ou como crônica, estabelecida por maior tempo sem ser acompanhada por manifestações de reatividade fisiológica (fuga ou luta, aumento de frequência respiratória e cardíaca) presentes na dor aguda, mas com diminuição de função (YAGIELA et al., 2000).

Antes de 1846, os procedimentos cirúrgicos eram raros e tinham caráter emergencial, devido à impossibilidade de alívio adequado da dor. Alguns métodos eram utilizados, sem grande sucesso, na tentativa de alívio da dor cirúrgica desde os tempos mais antigos (álcool, haxixe e derivados do ópio por via oral, torniquete ou uso de gelo), embora a simples contenção do paciente pela força fosse o que mais comumente se fazia para a obtenção de um campo cirúrgico relativamente calmo (TEIXEIRA, 2004) (*Figura 1*).

O desenvolvimento da Química e da Física a partir do final do século XVIII levou à descoberta de elementos e moléculas simples, inclusive diversos gases, que começaram a ser testados no combate a dor. Assim, em 1846, após vários anos de sucessos, fracassos e polêmicas, os dentistas Horace Wells e Thomas Green Morton demonstraram o uso do óxido nitroso e do éter como agentes anestésicos gerais em cirurgia (YAGIELA et al., 2000). Já no início do século XX, após discussões e controvérsias, o Colégio Norte-Americano de Cirurgiões nomeou um médico cirurgião de uma pequena cidade da Geórgia – EUA, Dr. Crawford Long, como sendo realmente a primeira pessoa, em 1842, a empregar éter para abolir a dor e a consciência de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, apesar de ter trazido a público a sua descoberta somente tempos após a demonstração de Morton (FRIEDMAN & FRIEDLAND, 2004).

Através dos tempos, a dor e o sofrimento sempre foram associados ao tratamento odontológico e o advento do uso de técnicas para anestesia geral trouxe um benefício inestimável à humanidade. Mas foi com o desenvolvimento da anestesia local que o panorama na odontologia sofreu mudança considerável, com a possibilidade de controle da dor transoperatória, sem a perda de consciência, e a conseqüente agilização dos procedimentos odontológicos (SIQUEIRA & TEIXEIRA, 2001).



Figura 1 - “El Sacamuelas” (Theodor Rombouts, 1627-8). Museu do Prado, Madri, Espanha.

2. ANESTÉSICOS LOCAIS – Definição e histórico

Os anestésicos locais são agentes que bloqueiam reversivelmente a condução nervosa quando aplicados a uma área restrita do corpo. Diferem dos anestésicos gerais, que são administrados por via inalatória ou endovenosa e que causam perda de consciência e inibição dos reflexos sensoriais e autônomos (KATZUNG, 1998).

No século XIX, o interesse pelas propriedades analgésicas da folha de coca (*Erythroxylon coca*) levou ao isolamento da cocaína por Niemann, em 1860, e ao seu estudo farmacológico por Von Anrep, a partir de 1879. Em 1884, Carl Köller introduziu o seu uso clínico-cirúrgico como anestésico local para o controle da dor em procedimentos oftalmológicos, familiarizando-se com os efeitos fisiológicos da droga, descritos posteriormente por Freud, ainda no final do século XIX (DE JONG, 1994; Cox et al., 2003).

No entanto, já em 1892, as reações adversas do uso da cocaína, como a toxicidade e a indução do paciente ao vício, tornaram-se evidentes e iniciou-se a pesquisa química à procura de anestésicos locais mais seguros, que não causassem dependência, culminando, em 1905, com a síntese da procaína, um

anestésico local derivado do ácido benzóico (Cox et al., 2003). A partir de então, a pesquisa voltada para a farmacologia dos anestésicos locais tomou um grande impulso e, como resultado, tem-se hoje um grande arsenal desses compostos para uso na prática clínica.

Várias propriedades consideradas ideais, do ponto de vista clínico, podem ser citadas para um anestésico local (BENNETT, 1989; PIPA-VALEJO & GARCIA-POLA-VALLEJO, 2004):

- ◆ Não irritar o tecido no qual é aplicado;
- ◆ Ser seletivo para tecido nervoso;
- ◆ Não determinar qualquer alteração permanente na estrutura do nervo;
- ◆ Ter toxicidade sistêmica pequena;
- ◆ Ser eficaz quando injetado no tecido ou aplicado localmente nas mucosas;
- ◆ Ter o menor intervalo de tempo possível, desde a aplicação até o início do efeito anestésico;
- ◆ Ter duração da ação suficientemente longa para permitir o término do procedimento, mas não tão longa que exija uma recuperação demorada;
- ◆ Ter potência suficiente para proporcionar uma anestesia completa, sem atingir concentrações tóxicas.
- ◆ Ser relativamente inócuo, no que diz respeito a reações alérgicas;
- ◆ Ser estável em solução e sofrer biotransformação rápida no organismo;
- ◆ Ser estéril ou esterilizável pelo calor, sem sofrer degradação.

Atualmente, as pesquisas de desenvolvimento de anestésicos locais se concentram em conseguir formas farmacêuticas que possuam o máximo de fatores desejáveis, principalmente no que diz respeito à diminuição da toxicidade e ao aumento da duração do efeito anestésico (MALAMED, 2001).

Uma alternativa à síntese química de novos fármacos é a veiculação ou preparo de formulações com anestésicos já existentes, encapsulados em veículos (sistemas carreadores) como lipossomas, que é o objeto deste trabalho.

3. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Para a compreensão do mecanismo de ação dos anestésicos locais é fundamental o entendimento da condução nervosa, que é a passagem auto-propagada de uma corrente elétrica ao longo das fibras nervosas (*Tabela 1*). Essas fibras podem ou não ser envoltas por várias camadas de mielina, que consiste na membrana plasmática da célula envoltória do axônio – célula de Schwann. A mielina aumenta muito a velocidade da condução nervosa, pois isola a membrana neuronal do meio condutor circulante e força o fluxo da corrente de ação através do axoplasma para os nós de Ranvier, que são interrupções periódicas da bainha de mielina (STRICHARTZ, 1987).

A função das fibras nervosas é transportar mensagens de uma região do corpo à outra, sob a forma de potenciais de ação elétricos (*Figura 2*), que são despolarizações transitórias da membrana nervosa, resultantes do breve aumento na permeabilidade dessa membrana aos íons sódio e potássio (MCLURE & RUBIN, 2005). Esses potenciais de ação elétricos (impulsos) são iniciados por estímulos químicos, térmicos, elétricos ou mecânicos e permanecem com amplitudes e formatos constantes, independentemente das alterações na qualidade ou na força do estímulo (DE JONG, 1994).

A partir desses estímulos, os sinais da dor são transmitidos para a medula espinhal e o cérebro pelas fibras aferentes do tipo A δ – mais rápidas, e responsáveis pela transmissão da dor aguda – e do tipo C, que conduzem a dor mais lentamente (dor crônica) (GUYTON & HALL, 1998).

Tabela 1 - Classificação das fibras nervosas de acordo com tamanho e propriedades fisiológicas. (Adaptada de STRICHARTZ, 1987).

Tipo de fibra	Presença de mielina	Diâmetro (μ)	Velocidade de Condução ($m.s^{-1}$)	Localização	Funções
A α	Sim	6-22	30-120	Aferentes de e eferentes para músculos e junções	Motora
A β	Sim	6-22	30-120	Aferentes de e eferentes para músculos e junções	Motora
A γ	Sim	3-6	15-35	Eferentes para feixes de músculos	Tônus muscular
A δ	Sim	1-6	5-25	Nervos sensoriais aferentes	Dor, temperatura e toque
B	Sim	<3	3-15	Pré-ganglionares simpáticas	Várias funções autonômicas
C	Não	0,4-1,2	0,1 -2,0	Nervos sensoriais aferentes	Dor, temperatura e toque

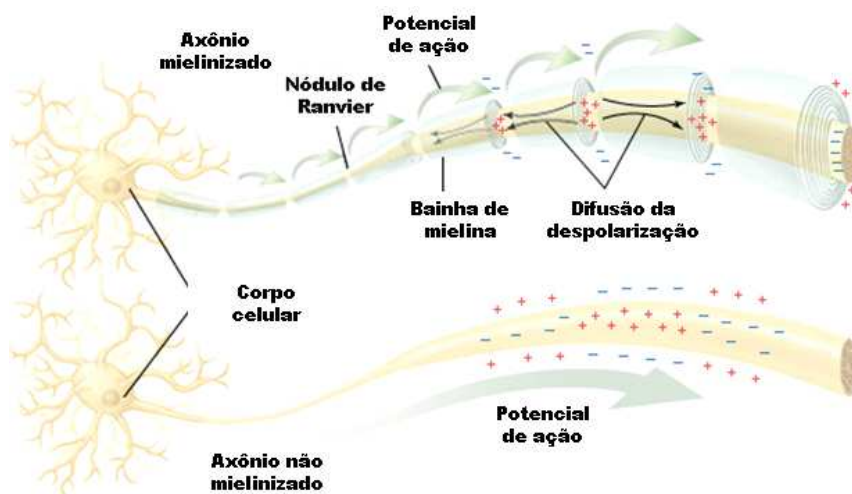


Figura 2 – Condução do estímulo nervoso. Adaptada de Encyclopedia Britannica, 2002.

Os anestésicos locais atuam na membrana dos neurônios, onde exercem suas ações farmacológicas pela interferência na transmissão do impulso nervoso,

por meio do bloqueio específico da entrada de íons sódio e da despolarização da membrana (STRICHARTZ, 1987; YAGIELA et al., 2000; MCLURE & RUBIN, 2005).

No decorrer dos anos, várias teorias foram propostas para tentar explicar o mecanismo de ação dos anestésicos locais, mas, com o avanço das pesquisas, algumas teorias tiveram sua credibilidade diminuída por não conseguirem elucidar completamente o mecanismo (DE JONG, 1994). As evidências acumuladas até o momento apontam como responsáveis pela não propagação do estímulo nervoso por ação dos anestésicos locais:

- **Interação com o canal de sódio voltagem-dependente:**

Há evidências da interação da forma protonada (FRAZIER et al., 1970; NARAHASHI et al., 1970) e da forma neutra dos anestésicos locais (RASGDALE et al., 1994, 1996; RASGDALE & AVOLI, 1998; LI et al., 1999) com sítios de interação específicos no canal de sódio voltagem-dependente da membrana celular (FRACETO et al., 2006). Os anestésicos locais interagem preferencialmente com o canal no estado fechado ou inativado, estabilizando-o nestas conformações. Assim, a interação com o anestésico local diminui ou abole a permeabilidade aos íons sódio, pelo bloqueio da despolarização da membrana e da condução do impulso nervoso ao Sistema Nervoso Central, não permitindo a percepção da dor.

- **Efeito indireto - interação com a fase lipídica membranar:**

Acredita-se também que, por serem moléculas anfifílicas, os anestésicos locais se inserem na bicamada lipídica membranar levando à formação de um “depósito” local, o que causaria modificação conformacional dos canais de sódio voltagem-dependente, com interrupção da excitação neural. Essa teoria é reforçada pela lei de Overton-Meyer, conhecida desde o final do século XIX, e que relaciona a potência anestésica à hidrofobicidade da molécula do anestésico local (Apud COVINO & VASSALO, 1985). De fato, a inserção dos anestésicos locais nas membranas causa alteração da fluidez membranar, o que já foi reportado por técnicas como Calorimetria Diferencial de Varredura, Ressonância Paramagnética Eletrônica, Ressonância Magnética Nuclear, fluorescência e outras (DE PAULA & SCHREIER, 1995, 1996, FRACETO et al., 2005). Outra evidência da interação com a

fase lipídica membranar é a grande quantidade de anestésico que deve ser empregada para se obter anestesia local, isto é, muito maior do que seria necessário para uma interação específica com os canais de sódio. Isso acontece devido à rápida difusão do anestésico local no meio circundante e à sua rápida captação pela circulação local. Assim, quanto maior a vascularização do local de anestesia, menor será a duração do efeito anestésico (DE JONG, 1994).

4. ESTRUTURA E BIOTRANSFORMAÇÃO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Para que uma molécula apresente efeito anestésico local, é essencial a presença de três regiões distintas em sua estrutura química (GUPTA, 1991):

- ♦ Um grupo aromático, que confere caráter lipofílico à molécula;
- ♦ Uma extremidade aminoterminal secundária ou terciária, que confere hidrossolubilidade à molécula: é a porção ionizável que sofre influência do pH do meio.
- ♦ Uma cadeia intermediária, que proporciona a separação espacial entre as extremidades lipofílica e hidrofílica.

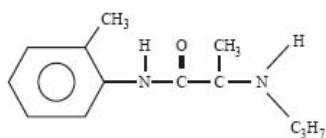
A maioria dos anestésicos locais de uso clínico pode ser classificada em dois grupos: ésteres e amidas (*Figura 3*).

Os ésteres apresentam cadeia intermediária que contém uma ligação éster e são derivados do ácido benzóico. Foram os primeiros anestésicos locais a serem sintetizados sendo, por muitos anos, as únicas opções para a anestesia local em odontologia. Ex: benzocaína, procaína, propoxicaína, tetracaína, clorprocaína.

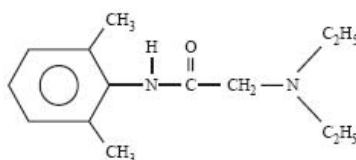
Os anestésicos locais do grupo amida apresentam a cadeia intermediária contendo uma ligação amida e não são derivados do ácido benzóico. Desde o seu surgimento, com a síntese da lidocaína na década de 40, tornaram-se o grupo mais popularmente usado até os dias de hoje, devido à sua menor toxicidade e à metabolização mais lenta, em comparação com o grupo dos ésteres. Ex:

lidocaína, prilocaína, bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína (YAGIELA et al., 2000; MALAMED, 2001; KOEHLER et al., 2005).

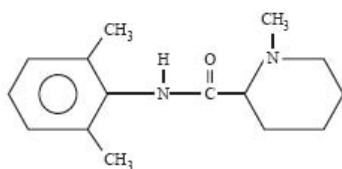
(A) AMIDAS



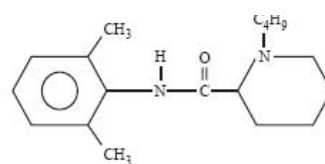
Prilocaína



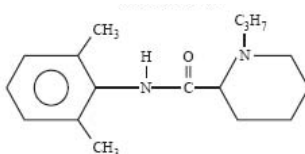
Lidocaína



Mepivacaína

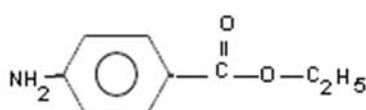


Bupivacaína

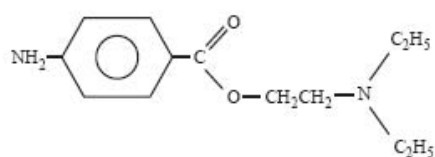


Ropivacaína

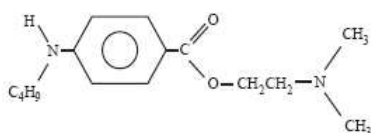
(B) ÉSTERES



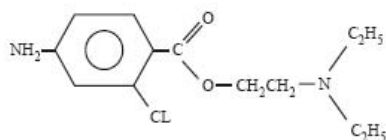
Benzocaína



Procaína



Tetracaína



Clorprocaína

Figura 3 - Anestésicos locais da família das amidas (A) e dos ésteres (B) – Estruturas químicas.

Essas duas classes de anestésicos locais apresentam uma importante diferença que é o meio pelo qual sofrem biotransformação. O conhecimento do metabolismo do anestésico local é importante, já que a toxicidade global de um fármaco depende do equilíbrio entre sua velocidade de absorção para a corrente sanguínea no local da administração e sua velocidade de retirada do sangue através de processos de captação e metabolismo no tecido.

Os anestésicos locais do grupo dos ésteres são hidrolisados no plasma sanguíneo, pela enzima pseudocolinesterase. A velocidade da hidrólise influencia a toxicidade potencial do anestésico. A clorprocaína é mais rapidamente hidrolisada, apresentando toxicidade menor que os demais análogos. Já a tetracaína se hidrolisa mais lentamente, sendo potencialmente mais tóxica. A procaína apresenta velocidade de hidrólise maior que a tetracaína e menor que a clorprocaína, sendo hidrolisada até o ácido para-aminobenzoico (PABA). As reações alérgicas que ocorrem em resposta aos anestésicos do tipo éster estão relacionadas com o PABA, que é o principal metabólito dessa classe de fármacos (MALAMED, 2001; PIPA-VALEJO & GARCIA-POLA-VALLEJO, 2004).

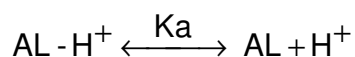
Os anestésicos locais do tipo amida apresentam o fígado como principal local de biotransformação, tendo, assim, a toxicidade diminuída em comparação com o grupo dos ésteres, que são hidrolisados pelas esterases plasmáticas. As velocidades de biotransformação da lidocaína, mepivacaína, etidocaína e bupivacaína são muito semelhantes. Já a prilocaína sofre biotransformação mais rapidamente que as outras amidas. A prilocaína é hidrolisada diretamente por amidases hepáticas até ortotoluidina e N-propilalanina. A eficiência da degradação da prilocaína pelo organismo é demonstrada pela fração muito pequena de prilocaína inalterada, encontrada na urina. A ortotoluidina pode induzir a oxidação da hemoglobina, produzindo metemoglobinemia se forem administradas altas doses de prilocaína (MALAMED, 2001).

5. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E AÇÕES CLÍNICAS DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Existem alguns fatores físicos e químicos que influenciam o efeito clínico de um anestésico local (COVINO, 1986; McLURE & RUBIN, 2005):

♦ Constante de dissociação (pKa) e pH

Os anestésicos locais (AL), por serem bases fracas, não se dissociam completamente em solução aquosa e, por isso, produzem espécies protonadas (ionizadas) e não protonadas (neutras) que co-existem em equilíbrio químico em pH 7,4. Esse equilíbrio pode ser determinado por uma constante de dissociação ou ionização (Ka).



Como a forma neutra é a forma capaz de sofrer maior difusão através da membrana do nervo, os anestésicos com pKa elevado (maior proporção da forma protonada em pH fisiológico) tendem a ter um início de ação mais lento do que os com pKa mais baixo (*Tabela 2*). A percentagem de anestésico em sua forma neutra depende do seu pKa e do pH tecidual (YAGIELA, 2000).

Sabendo-se que os anestésicos locais comerciais (em forma de cloridrato) apresentam, na sua maioria, um pKa que varia de 7 a 9, o controle do pH pode ser uma estratégia para atingir a diminuição do tempo de latência, o aumento da potência anestésica e da duração do efeito anestésico.

♦ Lipossolubilidade e hidrossolubilidade

A lipossolubilidade é essencial para a penetração do anestésico local na membrana nervosa, que é formada, em grande parte, por lipídios. Por sua vez, a hidrossolubilidade é essencial para o transporte da droga até as fibras nervosas. Por essas razões, a existência de um balanço entre essas duas características torna-se um fator de grande importância para a atividade anestésica (DE PAULA & SCHREIER, 1995, 1996).

Quanto maior a sua solubilidade em água, mais rápido o anestésico se distribuirá e alcançará a membrana e mais rapidamente será retirado do local de ação, o que diminui a duração do seu efeito. Quanto maior a lipossolubilidade do anestésico, maior serão sua facilidade de penetrar na membrana nervosa e a quantidade que ali se concentrará, o que refletirá biologicamente em maior potência anestésica (*Tabela 2*). A forma neutra dos anestésicos locais tem maior lipofilicidade (expressa, por exemplo, pelo coeficiente de partição membrana/água) que a forma protonada e isso explica a maior potência daquela espécie (STRICHARTZ, 1987, McLURE & RUBIN, 2005).

♦ Vasoatividade

A atividade vasodilatadora (vasoatividade) afeta a potência e a duração do efeito anestésico. Quanto maior a vasoatividade, mais rápidas serão a absorção do anestésico pela corrente circulatória e a sua retirada do local de ação, o que proporciona uma menor duração do efeito anestésico e também uma potência reduzida da droga (DE JONG, 1994; MALAMED, 2001).

♦ Ligação com proteínas

A Tabela 2 mostra que os anestésicos locais têm grande interação com proteínas plasmáticas, devido à sua hidrofobicidade (COVINO, 1986). Por isso, o grau de ligação do anestésico com proteínas está diretamente relacionado com a duração da atividade anestésica. Acredita-se que anestésicos mais lipofílicos (que possuem maior afinidade por proteínas plasmáticas) também apresentam uma interação maior aos sítios de ação na proteína-canal de sódio e, por isso, permanecem mais tempo no canal, o que resulta em uma duração maior da atividade anestésica (MALAMED, 2001; McLURE & RUBIN, 2005).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e farmacológicas de anestésicos do tipo amida (adaptada de Covino, 1986; Strichartz et al., 1990 e Malamed, 2001)

	Lidocaína	Prilocaína	Mepivacaína	Bupivacaína
Meia-vida (h)	1,6	1,6	1,9	3,5
Potência anestésica	moderada	moderada	moderada	alta
Peso molecular	234	220	246	288
pKa	7,9	7,9	7,6	8,1
Velocidade de início da ação	rápida	rápida	rápida	moderada
Hidrofobicidade^a	366	129	130	3420
Ligação a proteínas plasmáticas (%)	64	55	78	96

a - coeficiente de partição entre octanol/tampão (STRICHARTZ et al., 1990)

6. TOXICIDADE DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Como os anestésicos locais bloqueiam reversivelmente os potenciais de ação em todas as membranas excitáveis, o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Cardiovascular (SCV) são suscetíveis às suas ações, o que caracteriza a toxicidade sistêmica (GROBAN, 2003). Por atravessarem rapidamente a barreira hematoencefálica, a ação farmacológica dos anestésicos locais no SNC manifesta-se inicialmente por uma fase excitatória (calafrios, contrações, tremores e convulsões) e, à medida que a dose é aumentada, instala-se uma fase inibitória que se caracteriza pelo estado generalizado de depressão do SNC (KNUDSEN et al., 1997; COX et al., 2003; GROBAN, 2003). Já no sistema cardiovascular, os anestésicos locais exercem uma variedade de efeitos com a ação direta no miocárdio (modificando os eventos eletrofisiológicos por agirem de forma não específica em outros canais iônicos, que não o canal de sódio voltagem-dependente) e na vasculatura periférica, causando vasodilatação (STRICHARTZ, 1987; ELEDJAM et al., 1989; SISK, 1992; BUTTERWORTH et al., 1993; SZTARK, et al., 1994; COX et al., 2003).

Apesar da toxicidade sistêmica permanecer como um histórico foco de discussões sobre anestésicos locais, dados sugerem que outros riscos, como a neurotoxicidade ou injúria local associada à anestesia loco-regional, podem ser similares em frequência e significância (MULROY, 2002). Os mecanismos pelos quais os anestésicos locais produzem lesões no tecido neural ainda não são bem estabelecidos (GANEM et al., 2003). Porém, quando alterações clínicas se manifestam, as lesões são suficientemente graves para produzir a perda da condução de algumas populações de fibras nervosas (KALICHMAN, 1993).

7. USO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS NA PRÁTICA ODONTOLÓGICA

Atualmente, o cirurgião-dentista pode contar com uma diversidade de agentes anestésicos, que possibilitam o controle da dor durante e até mesmo após o procedimento operatório.

Dos anestésicos locais pertencentes ao grupo éster, o único utilizado na clínica odontológica hoje é a benzocaína, como anestésico tópico, na forma de pomadas ou géis (ANDRADE, 2001).

Os anestésicos do tipo amida são os preferidos, pois sua menor capacidade alergênica se apresenta como um grande diferencial e fator de sucesso em odontologia (YAGIELA et al., 2000; PIPA-VALEJO & GARCIA-POLA-VALLEJO, 2004). Desse grupo, as principais soluções disponíveis na forma de tubetes anestésicos para uso odontológico são: lidocaína, mepivacaína, bupivacaína e prilocaína, cujas características são apresentadas a seguir (COVINO, 1986; BENNETT, 1989; MALAMED, 2001; ANDRADE, 2001):

7.1. Lidocaína

Desde o início de sua comercialização até os dias de hoje, a lidocaína tornou-se um anestésico padrão ao qual todos os outros mais recentes são comparados. Pode ser utilizada na forma de anestésico tópico ou injetável (a concentração odontológica eficaz é de 2%); possui tempo de latência curto (2 a 3 min) e duração também curta (5 a 10 min em anestesia pulpar e 1 a 2 horas nos tecidos moles); apresenta ação vasodilatadora (SISK, 1992).

7.2. Mepivacaína

Somente disponível na forma injetável (as concentrações odontológicas eficazes são 2 e 3%), a mepivacaína apresenta tempo de latência rápido (1,5 a 2 min), efeito vasodilatador discreto, menor que o efeito apresentado pela lidocaína, e, por isso, o seu efeito anestésico é mais duradouro (na técnica infiltrativa, a anestesia pulpar tem duração de aproximadamente 20 minutos e na técnica de bloqueio de nervo, a anestesia pulpar tem duração de aproximadamente 40 minutos).

7.3. Bupivacaína

Esse anestésico, disponível somente na forma injetável (a concentração odontológica eficaz é 0,5%), apresenta tempo de latência moderado (4 a 6 min) e sua potência chega a ser cerca de 4 vezes maior que a da lidocaína. A bupivacaína, por ser um anestésico de longa duração, está sendo usada em odontologia para o controle da dor pós-operatória e para procedimentos operatórios que exigem uma anestesia pulpar com duração superior a 90 min.

7.4. Prilocaína

A prilocaína pode ser encontrada sob a forma básica, associada à lidocaína para uso tópico, ou sob a forma injetável (a concentração odontológica eficaz é 3%). Apresenta potência e tempo de latência semelhantes aos da lidocaína, mas por ter uma menor ação vasodilatadora – como a mepivacaína – seu efeito anestésico pode ser bem mais duradouro, dependendo da técnica utilizada (na técnica infiltrativa, a anestesia pulpar tem duração de 10 minutos e na técnica de bloqueio, de 60 minutos). A prilocaína é considerada menos tóxica que a lidocaína porque, além da ação vasodilatadora ser menor, sua biotransformação ocorre mais rapidamente no organismo. No entanto, um dos produtos da degradação da prilocaína é a ortotoluidina que, quando em altas doses, pode induzir a metemoglobinemia (STRICHARTZ,1987), principalmente em pacientes mais susceptíveis à diminuição da capacidade de transporte de oxigênio (VASTERS et al., 2006).

O interesse, em odontologia, na pesquisa do anestésico prilocaína tem sido crescente pelas características citadas. A prilocaína tem sido motivo de estudos como anestésico de uso tópico quando associada à lidocaína (JEFFCOAT et al., 2001; FRISKOPP et al., 2001; SPEIRS et al., 2001; MAGNUSSON et al., 2003; DONALDSON et al., 2003, VAN STEENBERGHE et al., 2004; LAGAN & COLLINS, 2006) e, na forma injetável, tem sido comparada a outros anestésicos, no que diz respeito às alterações de pressão e da frequência cardíaca (MEECHAN et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003); à ocorrência de dor durante administrações intra-orais, infiltração e bloqueio de nervo (KRAMP et al., 1999; WAHL et al., 2001; 2006); à duração do efeito anestésico (MCLEAN et al., 1993; VOLPATO et al., 2001; NIEMI et al., 2006; FREITAG et al., 2006) e, também, à possibilidade de indução de metemoglobinemia em humanos (WILBURN-GOO & LLOYD, 1999; VASTERS et al., 2006).

7.4.1. Metemoglobinemia: efeito adverso da prilocaína

Pode-se definir metemoglobinemia como uma condição patológica em que há a presença significativa de meta-hemoglobina no sangue, derivada da oxidação da oxi-hemoglobina. A meta-hemoglobina é a forma que contém o ferro do grupo heme no estado férrico (Fe^{3+}), que não se liga ao oxigênio. Essa alteração pode resultar da exposição a reagentes oxidantes (metemoglobinemia adquirida), como a ortotoluidina, ou de mutações (metemoglobinemia congênita). Na metemoglobinemia congênita, os principais sintomas são retardo mental, atraso e falha de crescimento, crises e outros problemas neurológicos, derivados do transporte de oxigênio deficiente. Já os pacientes com metemoglobinemia adquirida apresentam cefaléia, tontura, fadiga, dispnéia, taquicardia, náusea, vômito, sonolência, estupor, quadro clínico este que pode induzir ao coma e, raramente, à morte (MEDICAL ENCYCLOPEDIA, 2006).

7.5. Uso de vasoconstritores associados aos anestésicos locais

Como citado anteriormente, os anestésicos locais injetáveis apresentam atividade vasodilatadora que pode ser significativa ou discreta, dependendo do

anestésico. Quanto mais significativa for essa atividade, mais rápido o anestésico será retirado do local de ação, reduzindo o efeito anestésico e elevando o nível sanguíneo do composto, o que pode aumentar o risco de produzir toxicidade sistêmica (STRICHARTZ, 1987; COLLINS, 1993; YAGIELA et al., 2000).

Para reduzir esse efeito vasodilatador, com freqüência, vasoconstritores são adicionados aos anestésicos locais. Eles diminuem a taxa de absorção do anestésico, que fica mais tempo no local de aplicação, com aumento de duração do seu efeito e redução da probabilidade de ocorrência de toxicidade sistêmica (BROWN & RHODUS, 2005).

Os vasoconstritores são quimicamente idênticos ou muito semelhantes à adrenalina e à noradrenalina, que são mediadores do sistema nervoso simpático. São classificados como drogas simpaticomiméticas ou adrenérgicas, por mimetizar as respostas dos neurônios adrenérgicos à estimulação (YAGIELA et al., 2000; MALAMED, 2001; NEAL, 2003). Essas drogas podem ter ação indireta, ter ação mista ou agir diretamente nos receptores adrenérgicos (α_1 , α_2 , β_1 , β_2). Aquelas utilizadas em odontologia pertencem a este último grupo. Ex: adrenalina (epinefrina), noradrenalina (norepinefrina), levonordefrina (neocobefrina) e fenilefrina (*Figura 4*).

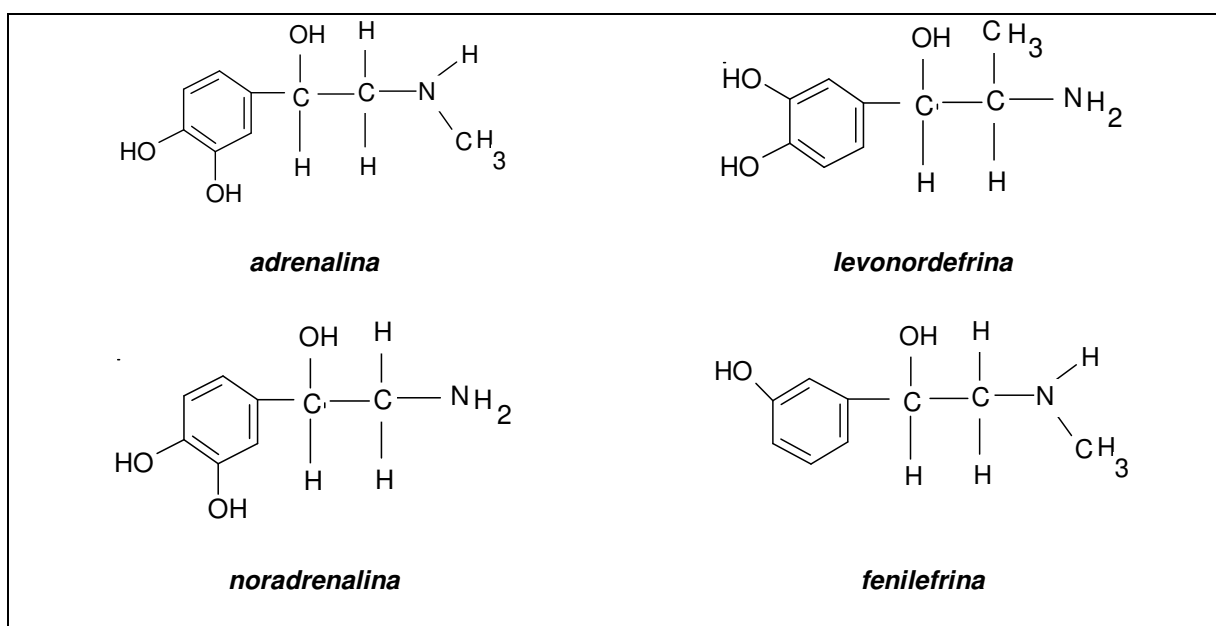


Figura 4 - Estrutura química dos vasoconstritores do tipo simpaticomimético.

No Brasil e em muitos países (que não incluem os Estados Unidos e o Canadá), o anestésico local prilocaína tem sido comercializado associado a um vasoconstritor que não pertence ao grupo das drogas simpaticomiméticas – a felipressina (*Figura 5*), que é um análogo sintético do polipeptídeo vasopressina (hormônio antidiurético).

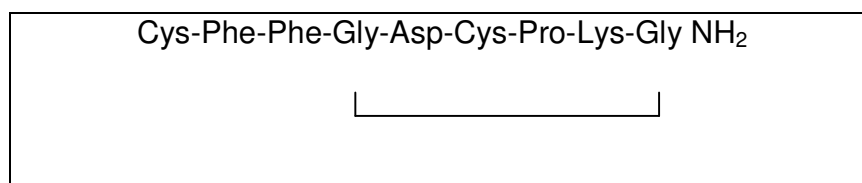


Figura 5 - Composição do peptídeo vasoconstritor felipressina.

7.6. Cuidados especiais

Existem situações em odontologia em que o profissional se vê diante de pacientes que apresentam maior sensibilidade aos efeitos tóxicos dos anestésicos locais (STRICHARTZ, 1987; HEAVNER, 2003; COX et al., 2003; AMADO-CUESTA et al., 2004):

- ◆ Na odontopediatria, quando o nível plasmático elevado do anestésico pode ser atingido mais facilmente na criança, em comparação com o adulto;
- ◆ No atendimento a pacientes idosos, pois, com o avanço da idade, ocorrem importantes alterações nos processos de distribuição, metabolização e excreção dos fármacos;
- ◆ No atendimento a gestantes, porque durante o período gestacional a mulher passa por uma série de mudanças físicas, fisiológicas e psicológicas, o que requer do profissional mais cuidados.

Na prática odontológica, o uso de vasoconstritores deve ser evitado em pacientes com as seguintes condições (PERUSSE et al., 1992a; b, GOULET, et al., 1992; PIPA-VALEJO & GARCIA-POLA-VALLEJO, 2004):

1-Hipertensão severa não tratada ou não controlada;

2-Doença cardiovascular grave:

- Menos de 6 meses após o infarto do miocárdio;
- Menos de 6 meses após acidente vascular cerebral (AVC)
- Cirurgia recente das artérias coronárias;
- *Angina pectoris* instável;
- Arritmias cardíacas refratárias, apesar de tratamento adequado;
- Insuficiência cardíaca congestiva não tratada ou não controlada;

3-*Diabetes mellitus* não controlado;

4-Hipertireoidismo;

5-Feocromocitoma;

6-Sensibilidade aos sulfitos (que são substâncias incorporadas às soluções anestésicas que contêm vasoconstritores, com o objetivo de impedir a sua oxidação e inativação);

7-Pacientes que fazem uso de antidepressivos tricíclicos, compostos fenotiazínicos ou beta-bloqueadores não seletivos;

8-Usuários de cocaína ou “crack”.

Nessas situações, o cirurgião-dentista deve recomendar ao paciente a realização do controle ou a compensação dos estados patológicos, antes do início do tratamento. Mas em caso de haver necessidade de intervir com urgência, o procedimento de menor risco é o uso de um anestésico sem vasoconstritor associado. Nesse caso, o profissional fica restrito ao uso de apenas alguns compostos e, dependendo do procedimento a ser realizado, o tempo de duração do efeito anestésico pode não ser suficiente, sendo necessário o aumento da

dose, com o risco da ocorrência de um efeito tóxico relacionado à própria solução anestésica.

Com vistas à diminuição da ocorrência de efeitos adversos dos anestésicos locais, justifica-se a busca por formas farmacêuticas que aliem aumento do efeito terapêutico com diminuição de toxicidade. Um caminho muito promissor foi aberto com o desenvolvimento de formulações anestésicas de liberação prolongada, capazes de manter o fármaco por mais tempo e em maior concentração no sítio de ação (KUZMA et al., 1997).

O grande empenho mundial no estudo de formulações com liberação prolongada de fármacos reflete-se na quantidade de sistemas em desenvolvimento por relevantes grupos acadêmicos e também no crescente interesse da indústria farmacêutica, que apontam para um papel essencial dessas formulações na terapêutica do futuro (GREGORIADIS, 1999; DAVIS & BREWSTER, 2004; TORCHILIN, 2005). A formulação lipossomal para liberação controlada de prilocaína, descrita neste trabalho, se enquadra nessa tendência.

8. LIPOSSOMAS

A descoberta dos lipossomas deu-se em 1963, com Alec Bangham, que demonstrou a formação de vesículas fechadas, obtidas pela agitação vigorosa de fosfolipídios na presença de água (SHARATA & KATZ, 1996).

Lipossomas têm sido usados desde então, no estudo físico-químico e biológico da membrana celular. Já a partir da década de 70, começou-se também a observar que lipossomas poderiam ser usados como carreadores de drogas e outros agentes ativos (BARENHOLZ, 2003; ROSE et al., 2005).

Os lipossomas consistem em uma ou mais bicamadas lipídicas dispostas em lamelas concêntricas que envolvem compartimentos aquosos, em que as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior da bicamada e as cabeças polares voltadas para o exterior. São classificados como unilamelares ou multilamelares, de acordo com o número de bicamadas lipídicas concêntricas que contêm (RANADE, 1989; TORCHILIN, 2005) (*Figura 6*).

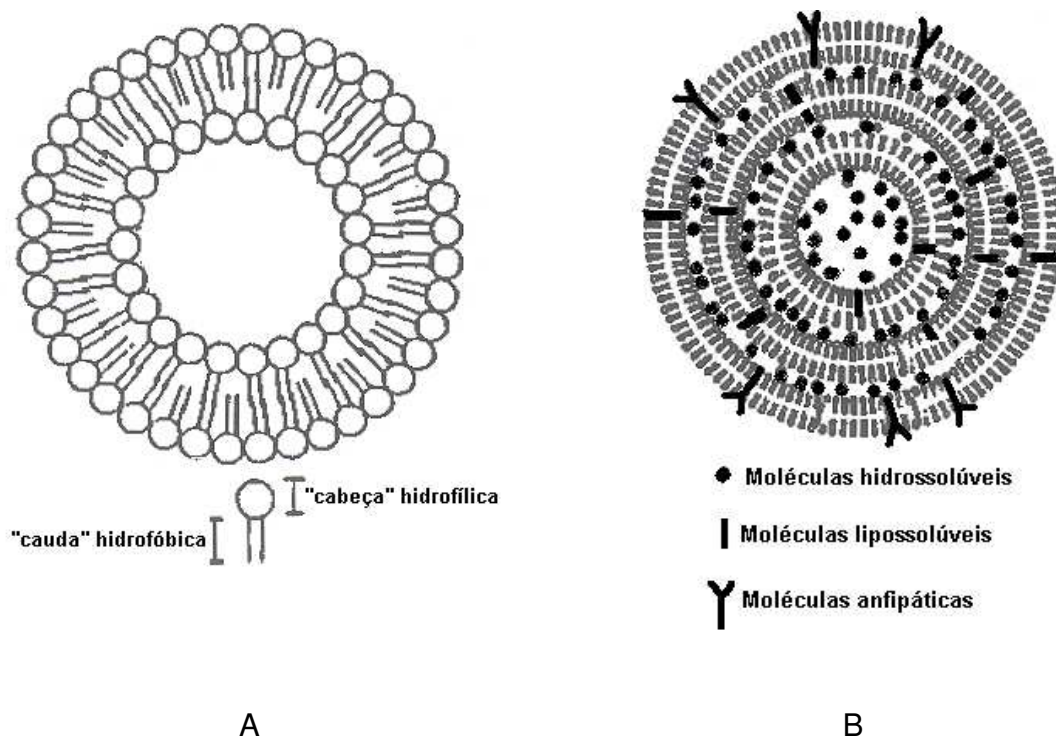


Figura 6 - Representação esquemática de lipossomas: unilamelar (A) e multilamelar (B) (Araujo et al., 2003).

As moléculas de fármacos podem ser encapsuladas no espaço aquoso interno do lipossoma ou intercalarem-se entre os lipídios da bicamada, a depender das características físico-químicas da droga ou da composição dos lipídios que constituem o lipossoma (Figura 6). A composição dos lipídios e o método de preparo do lipossoma determinam sua morfologia e tamanho, que por sua vez afetam diretamente sua absorção, distribuição e eliminação (KIRBY & GREGORIADIS, 1984; SHARATA & KATZ, 1996; ARAUJO et al., 2003; HUNG, 2006).

Lipossomas podem ser formados a partir de fosfolipídios puros, como a fosfatidilcolina, ou a partir de misturas de fosfolipídios com outros componentes membranares, como o colesterol e os esfingolipídios (NEW, 1997). A semelhança desses componentes com aqueles das membranas biológicas elimina o risco de reações antigênicas e de lesões histológicas associadas ao uso de lipossomas (MALINOVSKY et al., 1997; HUNG, 2006).

Aplicações clínicas dos lipossomas são bem conhecidas, sendo que várias drogas já foram testadas clinicamente com sucesso, como é o caso do agente anti-câncer doxorubicina, encapsulado em lipossomas associados a polietilenoglicol (ROSE, 2005). Outro exemplo é o lutotecan lipossomal, que se mostrou efetivo para pacientes com câncer de ovário (SEIDEN et al., 2004). O tratamento da leishmaniose visceral também apresentou avanços com o anti-fúngico Anfotericina B, em formulação lipossomal (MEYERHOFF, 1999; SUNDAR et al., 2003; KSHIRSAGAR et al., 2005). Uma outra aplicação dos lipossomas que tem mostrado resultados promissores é a encapsulação de anestésicos locais, descrita a seguir.

9. ANESTÉSICOS LOCAIS EM LIPOSSOMAS

Anestésicos locais têm sido encapsulados em lipossomas e testados em modelos animais e humanos, resultando em um prolongamento da duração da anestesia e redução da toxicidade para os sistemas cardiovascular e nervoso (*Tabela 3*).

Na *Tabela 3*, observa-se que a bupivacaína é o anestésico local mais estudado para encapsulação em lipossomas. Tal interesse deve-se ao fato de que é o anestésico mais utilizado na prática clínica, apresentando vantagens em relação aos outros representantes da classe quanto à potência e indução de bloqueio nervoso diferencial (separação efetiva entre bloqueio motor e bloqueio sensorial). No entanto, a hidrofobicidade da bupivacaína resulta em um risco potencial de cardio e neurotoxicidade, seja pela utilização de altas doses ou por injeções intravasculares inadvertidas, o que também justifica a diversidade de estudos envolvendo esse fármaco e sua encapsulação em lipossomas.

Outros anestésicos locais, como a lidocaína, também têm sido bastante estudados. A lidocaína apresenta-se como o segundo fármaco mais testado, pois, entre os anestésicos mais utilizados em odontologia, é o mais potente e também o que apresenta maior grau de toxicidade tanto local quanto sistêmica. Resultados promissores foram obtidos após a utilização de lidocaína, tetracaína e benzocaína

encapsuladas em lipossomas quando administradas por via tópica e comparados às respectivas formulações comerciais.

Além disso, a literatura também relata o estudo de outros anestésicos locais utilizados tanto em clínica médica quanto odontológica como mepivacaína, prilocaína e ropivacaína, um dos representantes mais recentes da classe. Mais uma vez, os resultados desses estudos comprovam um aumento na eficácia do anestésico local encapsulado em lipossomas em relação às formulações comercialmente disponíveis.

Tabela 3 – Anestésicos locais encapsulados em lipossomas

Referência	Anestésico	Lipossoma	pH	Via de administração	Sujeitos do estudo	teste	Resultado
GESZTES & MEZEI (1988)	Tetracaína (0,5%)	MLV	Não consta	Tópica	Humanos	<i>Pinprick</i>	Apresentou maior efeito quando comparada à formulação comercial de tetracaína 1%
MASHIMO et al. (1992)	Lidocaína (2%)	MLV (EPC + CH)	5,97	Epidural	Cães	Medida do potencial somatosensorial	Prolongamento do efeito anestésico com redução de taxa de liberação e aumento de disponibilidade local
BOOGAERTS et al. (1993 A)	Bupivacaína (0,25%)	MLV (EPC + CH)	8,1	Endovenosa	Coelhos	Análise eletrocardiográfica	Menor toxicidade em comparação com a solução de bupivacaína 0,5% com ou sem vasoconstritor
BOOGAERTS et al. (1993 B)	Bupivacaína (0,25%)	MLV (EPC + CH)	8,1	Bloqueio do plexo braquial	Coelhos	Medida de concentração plasmática	Liberação mais lenta do anestésico lipossomal em comparação com a solução de bupivacaína 0,5% com ou sem vasoconstritor
BOOGAERTS et al. (1994)	Bupivacaína (0,5%)	MLV (EPC + CH)	8,1	Epidural	Humanos	•Escala de dor e bloqueio motor •controle de pressão	Mostrou a eficácia da nova formulação para analgesia pós-cirúrgica em comparação com solução de bupivacaína 0,5% com adrenalina com aumento na duração da analgesia, sem causar efeitos adversos
FOLDIVARI (1994)	Tetracaína (2%)	MLV (fosfatidilcolina de soja + CH + ácido esteárico)	Não consta	Tópica	•Células humanas (<i>in vitro</i>) •Humanos	<i>Pinprick</i>	Os resultados <i>in vivo</i> (que apresentaram correlação <i>in vitro</i>) mostraram que a tetracaína lipossomal causou uma anestesia mais profunda e um tempo de latência mais curto em voluntários.

Tabela 3 – Continuação

Referência	Anestésico	Lipossoma	pH	Via de administração	Sujeito do estudo	teste	Resultado
LAFONT E LEGROS (1994)	Bupivacaína (0,25%)	MLV (EPC + CH)	Não consta	Bloqueio do plexo braquial	Humanos	<i>Pinprick</i>	Promoveu alívio da dor por 40 horas e, após este período, não houve necessidade de uso de analgésicos orais.
GRANT et al. (1994)	Bupivacaína (0,5%)	MLV (DMPC + CH)	Não consta	Infiltração na base da cauda	Camundongos	<i>Tail-flick</i>	Prolongamento da analgesia em comparação com bupivacaína em solução
BOOGAERTS et al. (1995)	Bupivacaína (0,25%)	MLV (EPC + CH)	8,1	Extradural	coelhos	Análise da biodistribuição (radioatividade)	A formulação lipossomal mostrou uma distribuição sistêmica mais lenta que a bupivacaína em solução
MOWAT et al. (1996)	Bupivacaína (0,75 e 2%)	LUV (DOPC + CH)	Gradiente de pH	Intradérmica (costas)	Cobaias	Modelo de reação alérgica cutânea	A preparação com gradiente de pH apresentou uma encapsulação eficiente da bupivacaína e aumentou a duração do bloqueio neural
LAFONT et al. (1996)	Bupivacaína (0,25%)	MLV (EPC + CH)	Não consta	Epidural	Humanos (com neoplasia pulmonar)	<i>Pinprick</i>	Formulação lipossomal se mostrou quase 3 vezes mais efetiva em comparação com a bupivacaína em solução associada a vasoconstritor
ZED et al. (1996)	Tetracaína (5%)	Não consta	Não consta	Tópica (oral)	Humanos	•Análise após anestesia infiltrativa oral •Escala visual analógica	Formulação lipossomal de uso tópico apresentou um efeito anestésico maior que a formulação de benzocaína 20%
SINGH & VYAS (1996)	Benzocaína (2%)	MLV (EPC + CH) (EPC +CH + EA) (EPC+CH+DCP)	7,4	Tópica	•Humanos •Pele humana (<i>in vitro</i>)	• <i>pinprick</i> •célula de difusão (Franz)	O estudo provou que sistema lipossomal pode ser usado com sucesso para prolongar a ação de anestésicos locais

Tabela 3 – Continuação

Referência	Anestésico	Lipossoma	pH	Via de administração	Sujeito do estudo	teste	Resultado
GRANT et al. (1997)	Bupivacaína (2%)	MLV (DSPC + CH)	5,3	Infiltração direta em feridas	ratos	Avaliação com Filamento de <i>Von Frey</i> em Modelo de ferida cirúrgica	Aumento da eficácia analgésica da formulação lipossomal
MALINOVISKY et al. (1997)	Bupivacaína (0,5%)	MLV (EPC + CH + α -TC)	8,1	Intracisternal	Coelhos	Avaliação de bloqueio motor e avaliação histológica por microscopia de luz	Formulação lipossomal prolongou a duração do bloqueio motor induzido pela bupivacaína, e não induziu neurotoxicidade
Yu et al. (1998)	Bupivacaína (0,5%)	MLV (EPC + CH + ácido fosfatídico)	6,35	Infiltração na base da cauda	Ratos	<i>Tail-flick</i>	Aumento da duração da anestesia da formulação lipossomal
FISCHER et al. (1998)	Tetracaína (5%)	Não consta	Não consta	Tópica	Humanos (pele intacta)	Estudo duplo-cego com o teste <i>pin-prick</i> e escala visual analógica	Aumento da capacidade de produzir anestesia tópica da tetracaína lipossomal em relação ao EMLA (lidocaína 2,5% e prilocaína 2,5%)
BUCALO et al. (1998)	Lidocaína (2,5% e 5%)	Não consta	Não consta	Tópica	Humanos	<i>pinprick</i>	Efeito mais duradouro da lidocaína lipossomal em comparação com a lidocaína não encapsulada
FRIEDMAN et al. (1999)	Lidocaína (4%)	“ELA-Max”	Não consta	Tópica (curativos oclusivos)	Humanos	Estímulo a laser	Estudo indicou que a encapsulação em lipossomas provê um aumento da eficácia na liberação do anestésico dentro da derme
MALINOVISKY et al. (1999)	Bupivacaína (0,75%; 0,375%; 0,25%; 0,125%; 0,065%)	MLV (EPC + CH + α -TC)	8,1	Epidural	Coelhos	Avaliação de bloqueio motor e medida da pressão arterial	Formulação lipossomal prolongou a duração do bloqueio motor induzido pela bupivacaína com mudanças hemodinâmicas lineares de acordo com as concentrações de anestésico injetadas.

Tabela 3 – Continuação

Referência	Anestésico	Lipossoma	pH	Via de administração	Sujeito do estudo	teste	Resultado
GRANT et al. (2001)	Bupivacaína (0,5%, 1%, 2%)	MLV (SPC + CH)	Não consta	Infiltração intradérmica	Humanos (antebraço)	<i>Pinprick</i>	Aumento de nocicepção das formulações lipossomais
GRANT et al. (2001)	Bupivacaína (0,5%)	Desidratação e re-hidratação de vesículas MLV (DMPC e DSPC)	4 e 5,5	subcutânea	Camundongos	Avaliação da analgesia por estímulo elétrico e vocalização	Formulação lipossomal prolongou a duração do bloqueio sensorial quando comparada à bupivacaína em solução
EICHENFIELD et al. (2002)	Lidocaína (4%)	“ELA-Max”	Não consta	Tópica	Crianças	Estudo duplo-cego com escala visual analógica	A lidocaína lipossomal 4% por 30 minutos, sem curativo oclusivo, apresentou a mesma segurança e eficácia no alívio à dor causada pela punção de agulhas que a mistura eutética de lidocaína e prilocaína (EMLA) em aplicação de 60 minutos com curativos oclusivos.
YU et al. (2002)	Bupivacaína (0,5%)	MLV (EPC + CH + ácido fosfatídico)	6,35	Infiltração na base da cauda	Ratos	<i>Tail-flick</i>	A preparação lipossomal mostrou um efeito anestésico maior, com um nível plasmático constante
FINKEL et al. (2002)	Lidocaína (4%)	“ELA-Max”	Não consta	Tópica	Humanos	Teste de limiar de tolerância à dor (estímulo elétrico)	Mostrou a eficácia da eletroestimulação transcutânea neuroseletiva para avaliar a latência da anestesia tópica
GRANT et al. (2004)	Bupivacaína (0,5%, 1%, 2%)	MLV (SPC+ CH)	Gradiente de pH	Infiltração na base das costas	Humanos	<i>Pinprick</i>	Ocorreu um prolongamento dose dependente da duração da analgesia da bupivacaína com a formulação lipossomal
ARAÚJO et al. (2004)	Mepivacaína (2%) Bupivacaína (0,5%)	Unilamelar (EPC + CH + α -TC)	7,4	Bloqueio de nervo ciático	Camundongos	Teste de pressão na pata (Analgesímetro)	A bupivacaína encapsulada em lipossoma apresentou uma menor eficiência anestésica, enquanto que a mepivacaína, neste mesmo sistema lipossomal, apresentou um significante aumento de duração no bloqueio sensorial.

Tabela 3 – Continuação							
Referência	Anestésico	Lipossoma	pH	Via de administração	Sujeito do estudo	teste	Resultado
CEREDA et al. (2004) *	Prilocaína (3%)	LUV (EPC + CH + α -TC)	7,4	Bloqueio do nervo infraorbital	Ratos	Teste do bloqueio do infraorbital	A prilocaína lipossomal apresentou um aumento significativo da duração do bloqueio sensorial quando comparada com a prilocaína em solução. Já quando comparada à prilocaína comercial com vasoconstritor, não ocorreu aumento significante.
TADDIO et al. (2005)	Lidocaína (4%)	“Maxilene”	Não consta	Tópica	Humanos (crianças)	Estudo duplo-cego – escala facial de dor	Observou-se uma redução da dor decorrente de procedimento de canulação intravenosa
ARAÚJO (2005)	Ropivacaína (0,5%)	LUV (EPC + CH + α -TC)	7,4	Bloqueio de nervo ciático e infraorbital	Camundongos e ratos	•Teste de pressão na pata (Analgesímetro); •Teste do bloqueio do infraorbital	Formulação lipossomal prolongou a duração e aumentou a intensidade da analgesia em relação aos fármacos livres
NESTOR (2006)	Lidocaína (4%)	“LMX4”	Não consta	Tópica (curativos oclusivos)	Humanos	Análise do soro sanguíneo por cromatografia gasosa	Os níveis sanguíneos da lidocaína foram observados após 1; 2; 6 e 24h da aplicação. Os autores concluíram que em pequenas quantidades a lidocaína aplicada com curativos oclusivos é segura, pois não houve sinais clínicos de intoxicação e baixos níveis sanguíneos de lidocaína foram encontrados
CEREDA et al. (2006) *	Prilocaína, lidocaína, mepivacaína (2%)	LUV (EPC + CH + α -TC)	7,4	Bloqueio de nervo infraorbital	Ratos	Teste do bloqueio do infraorbital	Estudo comparativo mostra que a encapsulação lipossomal aumentou a intensidade e duração da analgesia para os três anestésicos locais testados, com uma maior efetividade para a MVC em comparação com PLC e LDC.
MONTAN et al. (2007)	Ropivacaína (1%) (gel)	LUV (EPC + CH + α -TC)	7,4	Tópica (oral)	Humanos	• <i>pinprick</i> • <i>pulp-tester</i>	Ropivacaína lipossomal provocou uma redução à dor causada por inserção de agulha, e um aumento na duração da anestesia de tecido mole

* Trabalhos originados a partir desta Tese de doutorado

II. OBJETIVOS GERAIS

No laboratório de Biomembranas – IB, UNICAMP, estudos sobre a interação de anestésicos locais com lipossomas têm sido feitos (DE PAULA & SCHREIER 1995, 1996), nos quais se demonstrou a inserção diferencial dos anestésicos em diferentes profundidades da bicamada (PINTO et al., 2000, FRACETO et al., 2002, 2005, 2006), de acordo com o caráter hidrofóbico, o volume e a geometria da molécula. Mais recentemente, esse conhecimento da interação anestésico local/lipossomas tem sido aplicado para o desenvolvimento de formulações de uso clínico, com o estudo de anestésicos como a bupivacaína e mepivacaína (ARAÚJO et al., 2004), a ropivacaína (ARAÚJO, 2005) e a benzocaína e lidocaína (PINTO et al., 2004).

O objetivo deste projeto é avaliar a utilização da prilocaína encapsulada em lipossoma, como anestésico de escolha, e compará-la com formulações comerciais disponíveis, associadas ou não a vasoconstritores, em uso na prática odontológica. O uso da prilocaína se justifica por ser um anestésico alternativo com potência e tempo de latência semelhantes aos da lidocaína, mas com toxicidade menor, devido à sua rápida biotransformação no organismo (MCLURE & RUBIN, 2005).

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ♦ Preparar formulações do anestésico prilocaína encapsulado em lipossomas.
- ♦ Caracterizar as formulações preparadas, com o uso de técnicas físico-químicas, para avaliar a eficácia de encapsulação, o tamanho e o efeito sobre a organização da bicamada lipídica.
- ♦ Avaliar a atividade terapêutica da formulação em modelos animais (ratos e camundongos).
- ♦ Avaliar a formulação quanto à sua estabilidade antes e após esterilização.
- ♦ Avaliar a formulação quanto à ocorrência de toxicidade local.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. DROGAS, SAIS E SOLVENTES

- Anestésicos locais: Sal de cloridrato de prilocaína e solução de prilocaína comercial 3% com felipressina 0,03UI/mL (CITOCAÍNA[®], lote 04115560) obtidas por doação da Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda.
- Lipídios: fosfatidilcolina de ovo e colesterol (Sigma Chem. Co.)
- Soluções: tampão HEPES 20mM com NaCl 0,9% (Q-biogene)
- Outros: acetato de α -tocoferol, tetraetoxipropano, ácido tiobarbitúrico, glicina, butil-hidroxi-tolueno, dodecilsulfato de sódio, carragenina (Sigma Chem. Co.), ácido acético glacial, clorofórmio, cloreto férrico, dimetilsulfóxido, formaldeído, (Labsynth Ltda.), etanol, xilol, (Ecibra Reag. Anal.), tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália Ind. Quím. Farm.), parafina (Histosec-Merck), ácido doxil-esteárico (5- SASL – Sigma Chem. Co.), EDTA (Titriplex -Merck), soro fisiológico (Fresenius Kabi Brasil Ltda.).

2. EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro (Beckman[®] DU-70);
- Extrusor (Lipex Biomembranes Inc.);
- Light Scattering - Malvern[®] Autosizer 4700 (*Malvern Instruments*),
Faculdade de Engenharia Química –UNICAMP;
- Ultracentrífuga (Beckman[®] L8-80M);
- Espectrômetro Varian (9 GHz), *Instituto de Física – UNICAMP*;
- Espectrômetro Varian 500 (11,7 T), Laboratório Nacional de luz Sincrotron (LNLS);

- Micrótomo, Microscópio óptico e Fotomicroscópio (Zeiss);
- Aparelho para teste de *tail-flick* com lâmpada projetora de 150W (Onda Científica Ltda.);
- Pletismômetro - Ugo-Basile®, 7140.

3. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*) da linhagem Wistar (peso 250 - 350g), e camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss (peso 35 - 45g), machos, adultos, submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas com água e alimentação *ad libitum*, temperatura controlada a $22\pm3^{\circ}\text{C}$, alojados coletivamente (5 animais por gaiola) e aclimatados ao local da experimentação por, no mínimo, 7 dias. Antes da experimentação, os animais foram adquiridos do CEMIB/UNICAMP, os protocolos dos experimentos foram submetidos à Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP e aprovados sob os nºs 559-1; 654-1; 816-1; 871-1.

4. PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL

Os lipossomas multilamelares (MLV) foram preparados pela mistura de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol, na proporção de 4:3:0,07, obtidos de soluções estoque em clorofórmio. Com a evaporação do solvente sob fluxo de N_2 , seguido de vácuo (em temperatura ambiente) para a retirada do solvente residual, formou-se um filme lipídico seco, que contém os componentes lipossomais. Adicionou-se, então, solução tampão adequada (HEPES 20mM, NaCl 150mM com pH 7,4) e agitou-se em vórtex por 5 minutos. Assim, houve a formação de vesículas multilamelares concêntricas - separadas por cavidades aquosas - utilizadas para a obtenção de lipossomas unilamelares (LUV) de $0,4\mu\text{m}$ com a extrusão sob pressão de nitrogênio (LESERMAN & BARBET 1982; BOOGAERTS et al., 1993, 1994; MALINOVISKY et al., 1997).

A extrusão se deu em temperatura ambiente, passando-se por 12 vezes as amostras de vesículas multilamelares por membranas de policarbonato com poros

predeterminados (0,4 μ m). As repetidas passagens foram realizadas para que houvesse homogeneidade no tamanho das vesículas extrudadas. Os lipossomas obtidos ficaram em repouso por 2 horas para o intumescimento das vesículas.

A incorporação do anestésico local foi realizada após a preparação das vesículas, nas concentrações de 3% (comparável à dosagem clínica da prilocaína comercial disponível no mercado nacional), 2% e 1%.

5. CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL

5.1. Caracterização quanto ao tamanho

O diâmetro hidrodinâmico de partículas em difusão foi determinado por meio da técnica de espalhamento de luz quase elástico (*“Quasi Elastic Light Scattering”*), que consiste na observação das medidas de flutuação tempo-dependente da luz espalhada pelas partículas.

Foram realizadas medidas do raio hidrodinâmico das vesículas (SHAW, 1991) na presença e na ausência do anestésico local, para verificar o tamanho médio, a homogeneidade e a estabilidade das suspensões lipossomais, antes e após a encapsulação. As medidas foram realizadas em ângulo de 90°, em relação ao feixe de raio laser (He-Ne) incidente.

5.2. Caracterização quanto à eficiência de encapsulação e determinação do coeficiente de partição

Suspensões lipossomais (4mM) contendo o anestésico local prilocaína (2mM em tampão HEPES 20mM, NaCl 150mM e pH 7,4) foram submetidas a ultracentrifugação (120.000 x g) por duas horas em temperatura de 10°C. A concentração de prilocaína no sobrenadante foi analisada por espectrofotometria UV.

A percentagem do anestésico local (AL) não encapsulado em vesículas multilamelares (MLV) foi determinada com a utilização da seguinte equação (1):

$$\% \text{ não encapsulada} = \frac{\text{Absorbância sobrenadante} - \text{Absorbância MLV}}{\text{Absorbância inicial do AL}} \quad (\text{Equação 1})$$

A percentagem de encapsulação foi calculada subtraindo-se a percentagem do AL não encapsulado do total de anestésico (100 %) presente na solução inicial. Os resultados obtidos foram expressos também em termos do coeficiente de partição (P) de um soluto (s) entre duas fases não miscíveis, membrana (m) e aquosa (a) (Equação 2):

$$P = \frac{nm / vm}{na / va} \quad (\text{Equação 2})$$

Nesta equação, **n** é o número de moles do soluto (anestésico local) e **V** é o volume das fases. Como o número de moles do soluto em membrana (**nm**) adicionado ao número de moles do anestésico em água (**na**) corresponde ao número de moles total na solução inicial, pôde-se determinar o valor de **P** para a prilocaína entre lipossomas e água.

5.3. Efeito do anestésico sobre a organização da bicamada (lipossoma)

A organização da membrana lipossomal foi avaliada pela técnica espectroscópica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), que mede a absorção de energia (na região de microondas) que ocorre em moléculas ou íons paramagnéticos quando submetidos a um campo magnético.

Como a maioria dos sistemas biológicos, as membranas são sistemas diamagnéticos, ou seja, não apresentam elétrons desemparelhados. Assim, fez-se uso da técnica de marcadores de spin, que permite obter informações estruturais e dinâmicas da bicamada (HUBBELL & MC CONNEL, 1971, PERUSSI et al., 1985), usando-se sondas paramagnéticas intercaladas entre os lipídios de membrana (SCHREIER et al., 1978). Os marcadores de spin mais utilizados para estudo de

membranas são os que apresentam radical nitróxido associado a uma molécula hidrofóbica como, por exemplo, o ácido 5-doxil-esteárico (SASL, Figura 7).

As moléculas do marcador de spin se intercalam na membrana e tendem a se orientar. O marcador 5-SASL orienta-se com o eixo longo molecular paralelo ao eixo diretor da bicamada lipídica (como as cadeias acila dos fosfolipídios e esfingolipídios), o que permite a avaliação do parâmetro de ordem da bicamada, isto é, da orientação dos lipídios em relação ao plano da membrana.

A Figura 7 mostra o espectro de RPE do marcador 5-SASL incorporado em lipossomas. Estão assinaladas as medidas dos extremos interno e externo, usadas para determinação dos desdobramentos hiperfinos correspondentes ao marcador orientado com seu longo eixo molecular paralelo ($//$) e perpendicular ($\perp$), respectivamente, em relação ao campo magnético (HUBBELL & MCCONNELL, 1971).

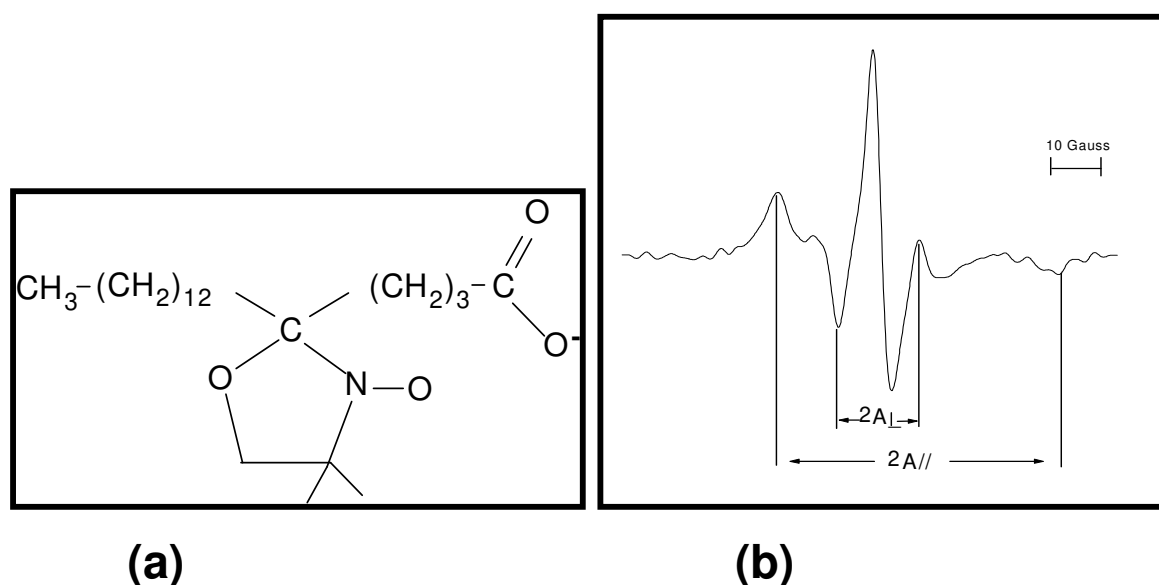


Figura 7- Estrutura química do marcador de spins 5-SASL (a) e espectro de RPE deste marcador em lipossomas (b), mostrando a determinação dos parâmetros $2A_{//}$ e $2A_{\perp}$

O parâmetro de ordem (S) da membrana lipossomal (4mM + 0,08mM do marcador 5-SASL) foi avaliado antes e após a encapsulação da prilocaína

(concentrações variáveis de 10 a 50mM). O espectro de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foi obtido com o espectrômetro Varian, operando em 9 GHz. Células chatas para soluções aquosas de 200µL foram usadas e o experimento foi conduzido em temperatura ambiente (22°C).

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{ZZ} - (A_{YY} + A_{XX})/2} \quad (\text{Equação 3})$$

Para o marcador 5-SASL, cujo longo eixo molecular é aproximadamente paralelo à normal da bicamada (SCHREIER et al., 1978), o parâmetro de ordem foi obtido experimentalmente, de acordo com a equação 3:

Na equação 3, $A_{//}$ e $A_{\perp}$ correspondem aos desdobramentos hiperfinos determinados no espectro (*Figura 7B*) e A_{ZZ} , A_{YY} e A_{XX} (32, 6 e 6 gauss, respectivamente) são valores determinados em baixíssimas temperaturas e que descrevem os desdobramentos hiperfinos do radical nitróxido totalmente imobilizado, isto é, perfeitamente orientado em relação ao campo magnético (SCHREIER et al., 1978). Desta forma, o parâmetro de ordem pode variar de 0 (zero), em sistemas isotrópicos, até 1 (um), para moléculas perfeitamente orientadas (SCHREIER et al., 1978).

6. TESTE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Utilizou-se um método para avaliação de liberação *in vitro* de fármacos livres ou encapsulados descrito por PAAVOLA et al. (1995) que consiste em um sistema de dois compartimentos: o doador (contendo 1 mL da amostra) e o receptor (com 100 mL de tampão HEPES 20 mM em NaCl 150 mM, pH 7,4 sob agitação leve) (*Figura 8*). Uma membrana de celulose (Spectrapore®, com poros para exclusão molecular de 12000 a 14000 Da.) separa esses dois compartimentos. Amostras foram retiradas do compartimento receptor (com subsequente reposição do volume retirado) nos seguintes tempos: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 e 300 minutos e analisadas por espectrofotometria

(Beckman® DU-70), no UV. Foram testados e comparados dois sistemas, um contendo a formulação lipossomal e o outro, prilocaína em solução.

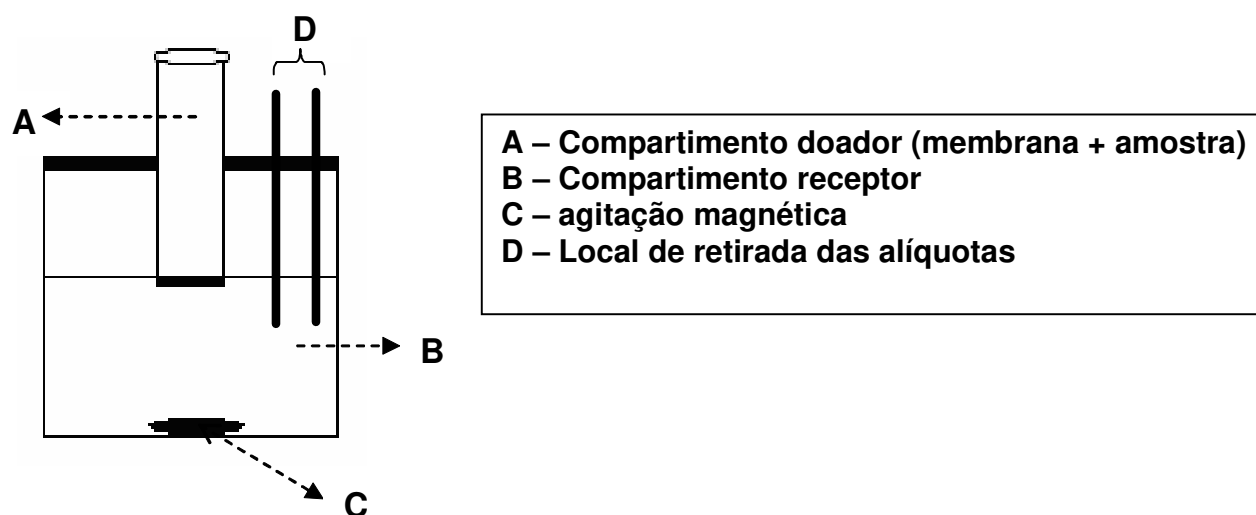


Figura 8 – Representação do sistema para avaliação de liberação *in vitro* descrito por Paavola et al., 1995.

7. ESTERILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO ANESTÉSICA LIPOSSOMAL

Em estudos prévios, realizados no Laboratório de Biomembranas do Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, avaliou-se a estabilidade da formulação lipossomal esterilizada por radiações ionizantes (ARAÚJO, 2005). A dose de radiação utilizada na literatura (BOOGAERTS et al., 1994) alterou a estabilidade do sistema lipossomal proposto, o que levou à procura de métodos alternativos.

Na procura por um método de esterilização eficiente e de fácil reprodução, optou-se pela esterilização por calor úmido (TORTORA et al., 2000).

As amostras da formulação de prilocaína lipossomal foram preparadas e acondicionadas em frascos-ampola. O preparo foi realizado com técnicas assépticas em ambiente limpo (fluxo laminar) com a utilização de material estéril.

Esses frascos foram levados para esterilização em autoclave em temperatura de 121°C e 1atm de pressão por um período de 15 minutos (TORTORA et al., 2000). Após esse procedimento, as amostras foram rapidamente resfriadas e armazenadas em geladeira (4°C).

Verificou-se a esterilidade das amostras em teste microbiológico realizado no Laboratório de Virologia (coordenado pela Prof^a Dr^a Maria Sílvia Viccari Gatti) do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia – UNICAMP. Esse teste microbiológico consistiu na incubação de amostras estéreis em meio de cultura BHI (*Brain-Heart Infusion*) por um período de 48 horas, e na observação da presença ou ausência de microorganismos viáveis – bactérias e fungos (TORTORA et al., 2000).

Outra avaliação que se fez necessária foi a verificação da presença ou não de endotoxinas produzidas pelo metabolismo de bactérias pirogênicas. O método utilizado para a determinação da presença dessas endotoxinas foi o teste do pirogênio *in vitro*, que consiste na utilização do lisado de Amebócitos de *Limulus polyphemus* (L.A.L.). Esse método é baseado na gelificação de certas proteínas do lisado de amebócitos na presença de endotoxinas. Amostras das formulações preparadas foram enviadas para o setor de controle de qualidade da empresa Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos Ltda, onde os testes foram realizados com o Kit “Endosafe® Limulus Amebocyte Lysate” (Alko do Brasil Indústria e Comercio Ltda).

8. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA FORMULAÇÃO ANESTÉSICA LIPOSSOMAL (ANTES E APÓS ESTERILIZAÇÃO)

8.1. Estabilidade química do componente lipídico

Os lipossomas foram avaliados quanto à estabilidade química de seus componentes estruturais, por meio da estimativa de oxidação de fosfolípidios. A oxidação de ácidos graxos dos fosfolípidios, na ausência de agentes oxidantes

específicos, pode ocorrer por mecanismos de formação de radicais livres. O passo inicial, a retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia lipídica, comumente se dá como resultado de exposição à radiação eletromagnética ou por contaminação de íons metálicos de transição (NEW,1990). Na avaliação da oxidação dos fosfolipídios pode-se considerar o desenvolvimento de conjugação de duplas ligações, a produção de aldeído com cisão de cadeia ou a formação de peróxidos (NEW, 1990).

Um método amplamente usado para avaliação de peroxidação lipídica consiste na detecção de endoperóxidos pela reação de produtos de sua quebra em altas temperaturas - os malondialdeídos - com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Essa reação gera um cromóforo vermelho com absorbância em 532 nm (OHKAWA et al., 1979; ASAKAWA & MATSUSHITA, 1980; NEW, 1990). Em tubos com amostras de solução lipossomal (0,1mL) foram adicionados 0,1mL de solução de cloreto férrico (0,27mg/mL), 0,1 mL de solução etanólica de hidroxitolueno butilado (0,22mg/mL), 1,5 mL de tampão glicina (0,2M / pH 3,6) e 1,5mL de reagente TBA (0,5mg/mL) em solução de dodecilsulfato de sódio (0,3 mg/mL). Foi feita uma curva de calibração com tetraetoxipropano (TEP,0,2mM) em concentrações que variaram de 1 a 6 nM com a adição das mesmas soluções citadas acima. Após a incubação em banho fervente por 15 minutos, os tubos foram resfriados rapidamente até a temperatura ambiente. Adicionou-se, então, 1mL de ácido acético glacial e 2mL de clorofórmio, com agitação e centrifugação (500xg, 20min, 4°C). Fez-se a leitura do sobrenadante em 532nm em espectrofotômetro Beckman® DU-70. Foi feita uma análise inicial (logo após o preparo) e análises em períodos de 30, 60, 90 e 120 dias após a preparação da formulação.

8.2. Estabilidade química do anestésico

A estabilidade da prilocaína foi avaliada por Ressonância Magnética Nuclear (^1H -RMN) antes e após esterilização. Amostras do anestésico foram solubilizadas em D_2O (5mM) e a remoção gasosa foi feita com fluxo de N_2 diretamente nos tubos de RMN (5mm). Espectros uni-dimensionais foram obtidos em um espectrômetro Varian INOVA 500, a 20°C. Foram utilizados nos

experimentos os seguintes valores de parâmetros: pulso de 90° de 10-12µs; intervalo entre seqüências de 6s; número de scans de 16 e janela de 12 ppm. O sinal da água residual (4,81 ppm) foi usado como referência.

8.3. Estabilidade física das vesículas lipossomais

A estabilidade física da prilocaína lipossomal foi avaliada pela observação de possíveis alterações no tamanho da vesícula antes e após o processo de esterilização, até que alterações significativas fossem observadas. O método utilizado para essa avaliação foi o de espalhamento de luz quase elástico (*“Quasi Elastic Light Scattering”*), já descrito na seção 5.1.

9. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANALGÉSICA EM MODELOS ANIMAIS

Testes para avaliação sensorial em ratos utilizaram a técnica de bloqueio do nervo infraorbital (FINK et al, 1975; READY & FINK 1980) e, em camundongos, a técnica de *tail-flick* (D'AMOUR & SMITH, 1941).

9.1. Bloqueio do nervo infraorbital

Os dentes, ossos e a maior parte dos tecidos moles da cavidade oral são inervados pelo nervo trigêmio, que é composto por uma raiz motora (pequena) e uma raiz sensitiva (tripartida). O nervo infraorbital faz parte da divisão maxilar da raiz sensitiva do nervo trigêmio e inerva pele da face, nariz, pálpebra inferior e lábio superior (MALAMED, 2001) (*Figura 9*).

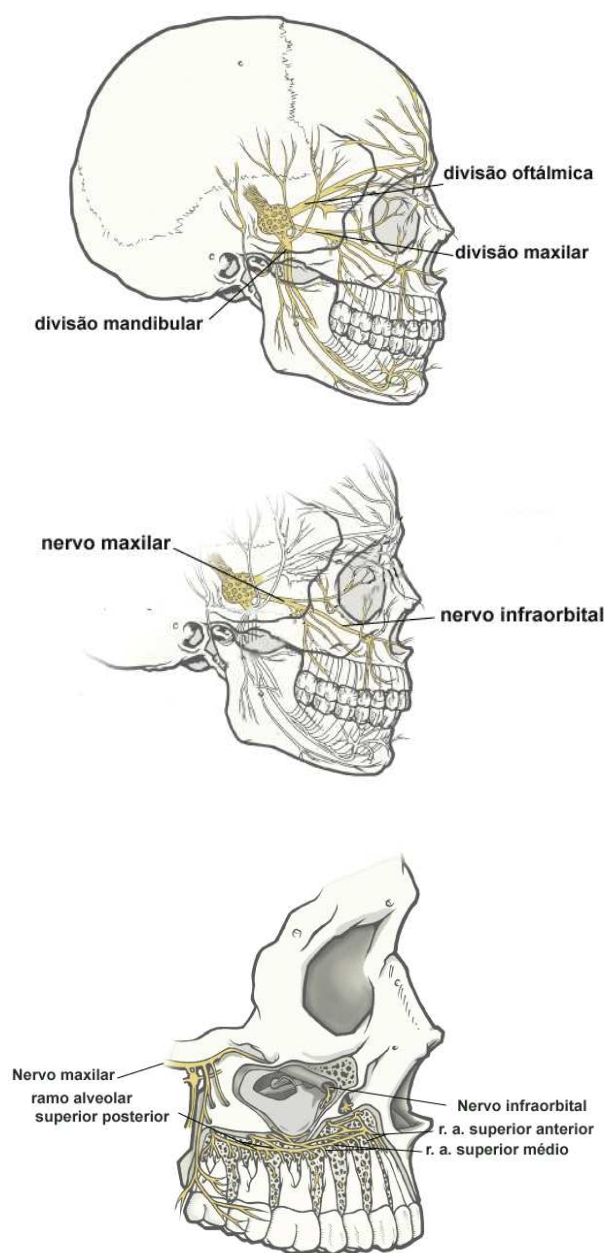


Figura 9 – Raiz sensitiva do nervo trigêmio (Adaptado de ISEN, 2006).

A avaliação do bloqueio do nervo infraorbital é importante devido à sua proximidade anatômica com regiões de interesse em odontologia. Utilizou-se o método do bloqueio do nervo infraorbital (FINK et al., 1975; READY & FINK 1980; HASSAN et al., 1985 a; b) para observação da resposta aversiva do animal ao

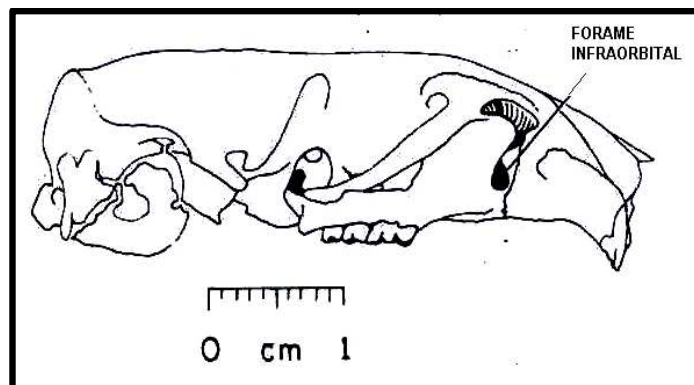
pinçamento do lábio superior, registrada de acordo com os escores: 0 (presença de resposta aversiva) e 1 (ausência de resposta aversiva). Esses valores foram expressos em percentagem de animais com anestesia (GRANT et al., 2004). Os animais utilizados nesse estudo (ratos) foram sedados com tiopental (25mg/kg) e o grau de sedação não interferiu na resposta aversiva. A divisão dos animais foi feita para os seguintes grupos:

- Solução aquosa de prilocaína (1%, 2%, 3%);
- Prilocaína lipossomal (1%, 2%, 3%);
- Prilocaína comercial associada ao vasoconstritor felipressina;
- Suspensão lipossomal.

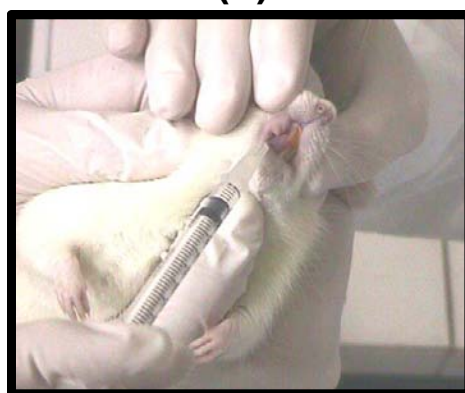
As soluções testadas foram injetadas (0,1mL) na região infraorbital (*Figura 10, a e b*) de um dos lados da face do animal e o outro lado, intacto, serviu como controle. Os animais foram testados em intervalos de cinco minutos até o aparecimento dos primeiros sinais de retorno da resposta aversiva ao pinçamento no lado injetado.

Cada solução foi testada em grupos com, no mínimo, sete animais e todos os experimentos foram realizados pelo mesmo observador.

A eficácia do bloqueio do nervo infraorbital foi mostrada pelo tempo de recuperação da função sensorial (T_{rec}) e pelo efeito total do anestésico local, que é estimado pela área sob a curva de tempo (ASC), expressa em escore por hora.



(a)



(b)

Figura 10– (a) Local do forame infraorbital (adaptada de Fink et al., 1975); (b) Procedimento de anestesia do nervo infraorbital.

9.2. Teste de *tail-flick*

O teste de *tail-flick*, descrito por D'Amour & Smith em 1941, mede a latência do movimento da cauda em resposta a um estímulo térmico focalizado. Embora esse teste tenha sido, desde então, muito usado para avaliar a atividade antinociceptiva de drogas administradas por diferentes vias, apenas a partir da década de 1990, passou-se a utilizá-lo para avaliar a duração de bloqueio sensorial de anestésicos locais administrados diretamente na base da cauda (GRANT et al., 1994; YU et al., 1998; 2002).

Camundongos Swiss foram divididos nos mesmos grupos descritos na avaliação do bloqueio do nervo infraorbital (seção 9.1). No dia anterior ao teste,

foram feitas medidas de linha basal de cada animal com a observação do tempo de reação (movimento da cauda) frente a um estímulo térmico (~55°C) gerado por uma lâmpada projetora de 150W do aparelho para teste de *tail-flick*. As soluções foram injetadas (0,1mL) na base da cauda do animal (*Figura 11*), sendo metade em cada lado.

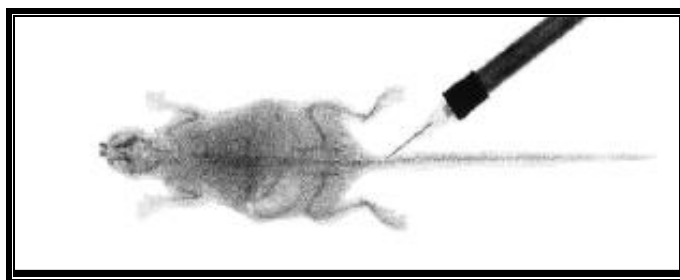


Figura 11 – Local da anestesia para o teste de *tail-flick* (*Figura adaptada de GRANT et al., 1994*).

A base da cauda foi colocada sob estímulo térmico por um tempo de latência de, no máximo, 15s (*cut off*), até a reação de movimentação da cauda. O animal foi submetido a esse procedimento a cada 10 minutos, até que o tempo de latência atingisse o valor da linha basal. Todos os experimentos foram realizados pelo mesmo observador. Os resultados obtidos mostraram a duração do efeito analgésico e foram expressos em percentagem de efeito máximo possível (%EMP), por meio da equação 4 (Yu et al., 2002):

$$\%EMP = \frac{\text{Tempo de Latência} - \text{Linha Basal}}{\text{"Cut - off" - Linha Basal}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

10. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE LOCAL EM MODELOS ANIMAIS

Após a avaliação do efeito anestésico da prilocaína lipossomal, fez-se necessária a avaliação de possível ocorrência de reação inflamatória. Para isso foram realizados testes de edema de pata e de avaliação histológica em ratos.

Inflamação pode ser definida como uma resposta local do tecido vascularizado agredido, caracterizada por alterações do sistema vascular e dos componentes líquidos e celulares, bem como por adaptações do tecido conjuntivo vizinho (COTRAN et al., 1999).

O processo inflamatório pode ser desencadeado por infecções microbianas, agentes físicos, substâncias químicas, reações imunológicas e tecido necrótico (RANG et al., 2004) e tem como objetivo destruir o agente agressor ou limitar a sua disseminação, com reparação e substituição dos tecidos lesados.

Podem ser descritos alguns fenômenos iniciais básicos considerados comuns a qualquer tipo de processo inflamatório, independentemente do agente causador da inflamação:

- Ocorrência de modificações dos tecidos agredidos com a liberação de mediadores químicos que desencadeiam a seqüência de eventos que caracterizam a resposta inflamatória;
- Alteração na permeabilidade dos capilares sanguíneos, o que permite a exsudação de líquidos, proteínas e células de defesa, para os tecidos;
- Acúmulo, nos focos inflamatórios, de leucócitos (neutrófilos e eosinófilos durante as primeiras 6-24 horas e linfócitos e macrófagos, a partir de 24-48 horas) advindos da circulação sanguínea.

10.1. Teste de edema de pata

O teste de edema de pata, adaptado de WINTER et al. (1962), é um modelo amplamente usado para avaliação de atividades anti e pró-inflamatórias

(DUHGAONKAR et al., 2006; FERNANDES et al., 2003; HAYASHI et al., 2001; CAMPOS & CALIXTO, 1995).

Como controle positivo, foi utilizada a carragenina, um mucopolissacarídeo derivado de um musgo marinho (*Chondrus*), que tem sido o agente de escolha para pesquisas de respostas inflamatórias, por estimular o processo inflamatório sem efeitos sistêmicos e permitir um alto grau de reprodutibilidade (WINTER et al., 1962).

Os animais foram distribuídos em sete grupos (n=6 por grupo):

- Grupos-teste - Prilocaína lipossomal (3%), prilocaína comercial (3%) com felipressina, solução aquosa de prilocaína (3%) e suspensão lipossomal;
- Grupos-controle (negativo) - solução salina e solução tampão HEPES 20mM, pH 7,4;
- Grupo-controle (positivo) – solução de carragenina a 1%.

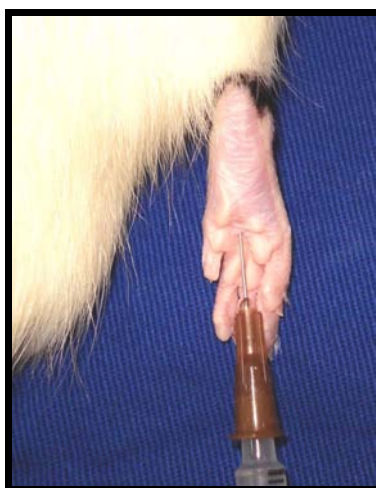
Fez-se a anestesia intraperitoneal dos animais com tiopental (40 mg/kg) e também a delimitação da pata a ser testada (*Figura 12.a*). Primeiramente, o volume basal da pata do animal foi obtido com o uso do pletismômetro (*Figura 12.b*). As soluções foram administradas por injeção intraplantar (0,1mL) na pata traseira do animal (*Figura 12.c*). As medidas de volume da pata foram feitas em 60, 120 e 180 minutos após a injeção (*Figura 12.d*) e foram expressas em mL (diferença entre o volume basal da pata e o volume da pata após a injeção).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 12: Teste de edema de pata; **(a)** Delimitação da pata; **(b)** pletismômetro Ugo-Basile – 7140; **(c)** Injeção intraplantar; **(d)** Medidas de volume.

10.2. Avaliação histológica

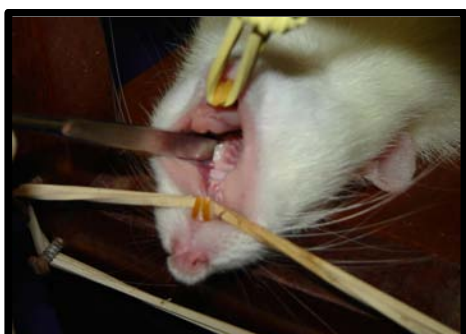
Para a realização de uma avaliação histológica da reação tecidual frente à anestesia intra-oral de prilocaína lipossomal, fez-se o estudo de cortes histológicos obtidos a partir de fragmentos do maxilar superior de ratos após injeção das

soluções teste e controle. Os animais foram divididos em cinco grandes grupos (n = 18 por grupo):

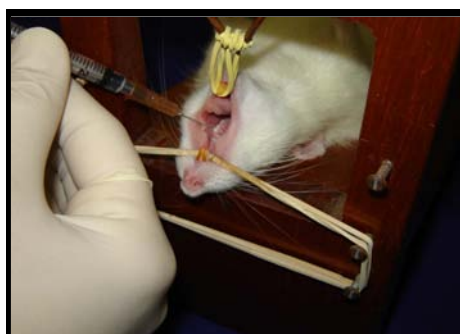
- Prilocaína lipossomal (3%) **(grupo 1)**;
- Prilocaína comercial (3%) com felipressina **(grupo 2)**;
- Solução aquosa de prilocaína (3%) **(grupo 3)**;
- Suspensão lipossomal **(grupo 4)**;
- Punção da agulha **(grupo 5)**.

Cada grupo foi subdividido em três (n = 6 cada), para avaliação após 6 horas, 24 horas e 4 dias após a injeção.

Após a indução prévia de anestesia geral por tiopental (40 mg/kg), cada animal recebeu 0,1mL das soluções testadas na região do fórnice do vestibulo do primeiro molar superior direito (Figuras 13.a e 13.b). Na região contralateral, todos os animais receberam 0,1mL da solução salina para controle.



(a)



(b)

Figura 13 – **(a)** Detalhe do local do procedimento anestésico. **(b)** Procedimento anestésico, conforme descrição no texto.

Após 6 horas da administração das soluções, 6 animais de cada grupo foram sacrificados e o fragmento da maxila com tecido mole aderido foi removido. Nos tempos seguintes (24 horas e 4 dias), o procedimento se repetiu para os animais restantes.

Para fixação, os fragmentos foram colocados em solução de Bowin alcoólico por 24 horas sendo, em seguida, colocados em solução de formol salina a 10% por 48 horas. Após lavagem em água destilada, as peças foram armazenadas em solução de EDTA até a ocorrência de desmineralização que permitisse o corte das peças. A partir desses fragmentos, as amostras foram incluídas em parafina e cortes histológicos foram obtidos com espessura de 6µm em cinco profundidades distintas, obtidas com intervalos de 40µm entre elas e corados com hematoxilina e eosina (HE).

Para que, no momento da análise das lâminas histológicas, se determinasse qual o lado do animal que estaria sendo analisado, um corte longitudinal foi feito com bisturi no primeiro molar do lado esquerdo (*Figura 14*):

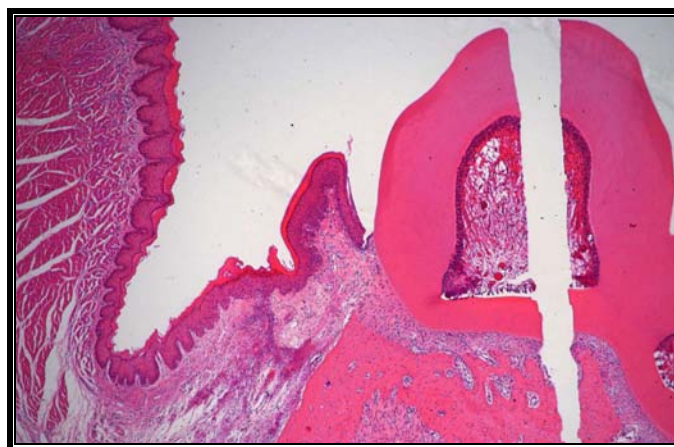


Figura 14 – Corte longitudinal feito no primeiro molar esquerdo da maxila do rato (aumento 40x, microscopia ótica, H&E).

Foram feitas análises qualitativas da resposta inflamatória no tecido com a observação da intensidade do infiltrado inflamatório por microscopia de luz (aumento 100x). As imagens foram codificadas por um segundo participante, para que o avaliador não tivesse conhecimento do grupo a ser analisado. Os resultados foram classificados de acordo com um escore qualitativo (SHIPPER, et al., 2005) que avaliou aspectos do processo inflamatório local em cada animal, tais como migração e concentração de células inflamatórias na região da injeção e possíveis áreas de necrose tecidual. O escore foi definido da seguinte maneira:

- Mínimo infiltrado inflamatório **(1)**;
- Infiltrado inflamatório leve **(2)**;
- Infiltrado inflamatório moderado **(3)**;
- Infiltrado inflamatório intenso **(4)**;
- Infiltrado inflamatório intenso com áreas de necrose **(5)**.

10.2.1. Padronização da região analisada

A região escolhida para análise é a região de tecido conjuntivo na porção interna do fundo do sulco vestibular (local da injeção das soluções) de cada corte histológico (*Figura 15*).

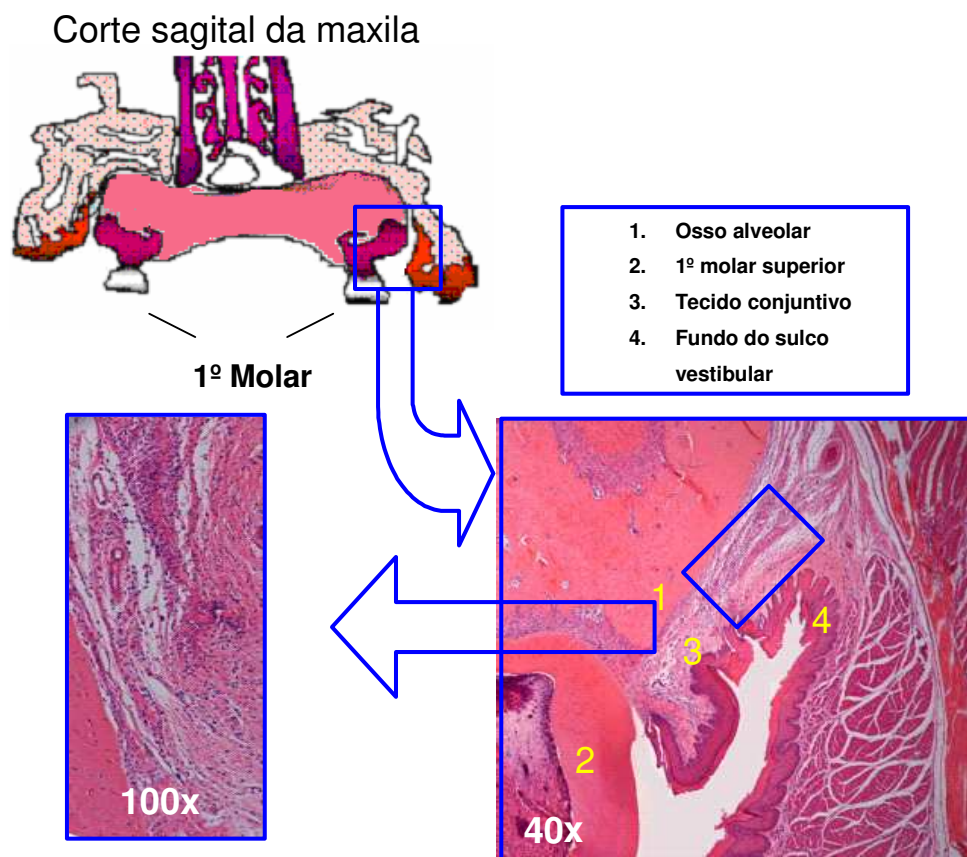


Figura 15 - Padronização da região do corte histológico que foi submetida ao procedimento de classificação de acordo com escore anteriormente descrito.

11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos testes de caracterização quanto ao tamanho da vesícula lipossomal e de liberação *in vitro*, a análise estatística foi realizada com o teste T de Student não-pareado.

Os valores obtidos nos testes de estabilidade (tamanho da vesícula lipossomal e peroxidação lipídica) foram comparados por análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) com teste posterior de Tukey-Kramer.

Os dados obtidos no teste do bloqueio do nervo infraorbital (ASC e tempo de recuperação) foram expressos em medianas (limites mínimo-máximo) e comparados, com o uso dos testes de Kruskal-Wallis (na comparação entre os grupos PLC 3%, PLC_{LUV}3% e PLC_{felipressina}) e Mann-Whitney (nas comparações individuais entre PLC/ PLC_{LUV}2% e PLC/ PLC_{LUV}1%).

Para a análise dos valores obtidos com o teste de *tail-flick*, utilizou-se o teste ANOVA (com teste posterior de Tukey-Kramer) na comparação entre os grupos PLC 3%, PLC_{LUV}3% e PLC_{felipressina}, e o teste T não pareado nas comparações individuais entre os grupos.

Na avaliação do edema de pata, os grupos foram comparados por análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) com teste posterior de Tukey-Kramer e, na avaliação histológica, a comparação se deu com o uso dos testes não paraméricos de Kruskal-Wallis (na comparação inter-grupos) e de Wilcoxon (na comparação intra-grupos).

As análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa Graph Pad - versão 3.0 (Graph Pad Software Inc.) e o grau de significância estatística foi definido como $p < 0,05$ (ZAR, 1996).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL

1.1. Caracterização quanto ao tamanho

O raio hidrodinâmico e a distribuição de tamanho das vesículas lipossomais extrudadas foram determinados pela técnica de espalhamento de luz (*Quasi Elastic Light Scattering*). As medidas foram realizadas a 25°C, com um ângulo de detecção de 90° em relação ao feixe de raio laser incidente, e a concentração das amostras foi de 1mM.

As medidas mostraram uma única população, de cerca de 400nm (*Figura 16 e Tabela 4*), compatível com o poro da membrana utilizada no processo de extrusão. A encapsulação da prilocaína mostrou não alterar de forma significativa ($p>0,05$) o diâmetro médio das vesículas, em comparação com as vesículas livres.

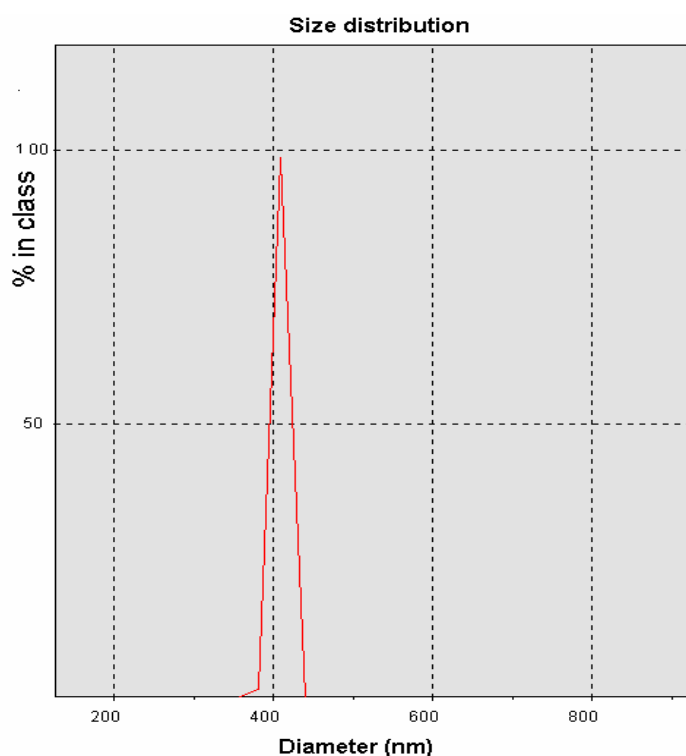


Figura 16: Tamanho das vesículas lipossomais determinadas pela técnica de espalhamento de luz.

Tabela 4: Diâmetro médio das vesículas lipossomais (média $\pm$ DP), antes e após a encapsulação do anestésico (n=3).

LIPOSSOMAS	DIÂMETRO MÉDIO (nm)	PROPORÇÃO (%)	POLIDISPERSÃO
LUV	381,97 $\pm$ 30,19	100%	0,19 $\pm$ 0,07
PLC _{LUV}	406,07 $\pm$ 8,83	100%	0,22 $\pm$ 0,05

NOTA: análise estatística – Teste T de Student não pareado. Não significativa p>0,05.

1.2. Caracterização quanto à eficiência de encapsulação e determinação do coeficiente de partição

Inicialmente foi feita a caracterização espectrofotométrica da prilocaína e o coeficiente de extinção molar (ϵ) de máxima absorção em 224nm foi de $50.10^2 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (pH 7,4) e de $49.10^2 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (pH 5,0) (figura 17).

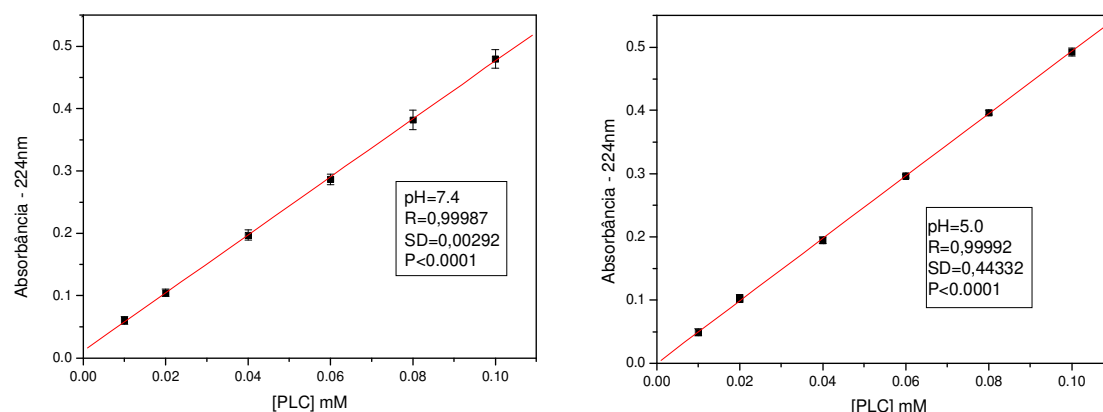


Figura 17. Determinação da absortividade molar de prilocaína em 224nm.

Para determinar a eficiência de encapsulação, suspensões lipossomais foram preparadas com concentração de 4mM e o anestésico local foi adicionado de maneira a apresentar uma concentração final de 2mM. Essas suspensões foram submetidas a ultracentrifugação (120.000xg, 2h, 10°C). Alíquotas do

sobrenadante foram analisadas por espectrofotometria UV (224nm). De acordo com a descrição em métodos, a percentagem determinada do anestésico local prilocaína encapsulado em vesículas multilamelares (4mM) foi de $12,1 \pm 1,11$ % (n=4). Com esse resultado pôde-se calcular o coeficiente de partição para a prilocaína entre lipossomas e água, que foi de 57 ± 6 . A opção por expressar a interação anestésico-lipossoma por meio do coeficiente de partição (além de pela percentagem de encapsulação) decorre do fato de que, para o cálculo deste clássico parâmetro de hidrofobicidade leva-se em consideração a concentração molar de lipídios no lipossoma. Assim, o valor de P é de uma constante molar que independe da concentração de lipídios usada no ensaio de separação de fases (ultracentrifugação) (LEE & SCHREIER, 1993).

O valor da percentagem de encapsulação e do coeficiente de partição da prilocaína, em comparação com outros anestésicos estudados, reflete as diferentes propriedades físico-químicas desses anestésicos (DE PAULA & SCHREIER, 1995; 1996). A prilocaína é bastante hidrofílica e apresenta menor partição em membrana e maior solubilidade aquosa que anestésicos como a mepivacaína, benzocaína, bupivacaína e outros.

Esses resultados mostram o caráter anfifílico da prilocaína – também apresentado por outros anestésicos locais – o que evidencia que este anestésico encontra-se distribuído parte na bicamada lipídica e parte na fase aquosa dos lipossomas. Para efeitos de comparação, a *Tabela 5* mostra a percentagem de encapsulação e o valor de coeficiente de partição de alguns anestésicos locais estudados no Laboratório de Biomembranas/IB/UNICAMP, o que evidencia o menor caráter lipofílico da prilocaína, em relação aos demais anestésicos locais comerciais.

Tabela 5- *Percentagem de encapsulação e coeficiente de partição dos anestésicos locais (AL) estudados em lipossomas compostos de fosfatidilcolina de ovo:colesterol e alfa-tocoferol (pH=7,4).*

AL	% DE ENCAPSULAÇÃO	COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (pH –7,4)
Prilocaína	12,1 ± 1,1 %	57 ± 6
Mepivacaína *	18,4 ± 3,9 %	93 ± 7
Lidocaína #	21,7 ± 2,6 %	114 ± 16 ##
Ropivacaína **	23,8 ± 3,52%	132 ± 25,8
Bupivacaína *	24,8 ± 4,2%	136 ± 23

* Araújo et al., 2004; ** Araújo, 2005; # Brunetto et al., 2004; ## Cereda et al., 2006

1.3 Caracterização quanto à organização da membrana lipossomal

A organização da membrana lipossomal foi avaliada pela técnica espectroscópica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), com uso do marcador de spin 5-docil estearato (5-SASL) incorporado à membrana lipossomal, na razão molar de 2mol%. As medidas foram conduzidas no espectrômetro Varian (na frequência de 9,4GHz, em faixa de 100Gauss, com tempo de aquisição de 4min e temperatura de 20°C), pertencente ao Laboratório de Propriedades Ópticas e Magnéticas de Sólidos do Instituto de Física – UNICAMP.

O parâmetro de ordem da membrana lipossomal foi avaliado antes e após a encapsulação da prilocaína, em concentrações crescentes. Para o 5-SASL, cujo eixo longo molecular está aproximadamente paralelo ao eixo da bicamada lipídica (SCHREIER et al., 1978), esse parâmetro foi obtido experimentalmente, de acordo com a equação 2, descrita na seção 5.3 (em materiais e métodos).

O resultado apresentado (*Figura 18*) evidenciou um decréscimo no parâmetro de ordem (de cerca de 11%) dos lipossomas unilamelares em presença de prilocaína, o que caracteriza a interação entre o anestésico e a membrana lipossomal. O efeito máximo no parâmetro de ordem da membrana lipossomal (4mM) foi alcançado com uma concentração de 40mM de prilocaína, que corresponde a 4,8mM de prilocaína encapsulada (de acordo com a percentagem de encapsulação determinada). Assim, a razão molar prilocaína-lipídio de 1,2: 1 foi alcançada na bicamada em concordância com resultados anteriores de RPE (LISSI et al., 1990; DE PAULA & SCHREIER, 1995).

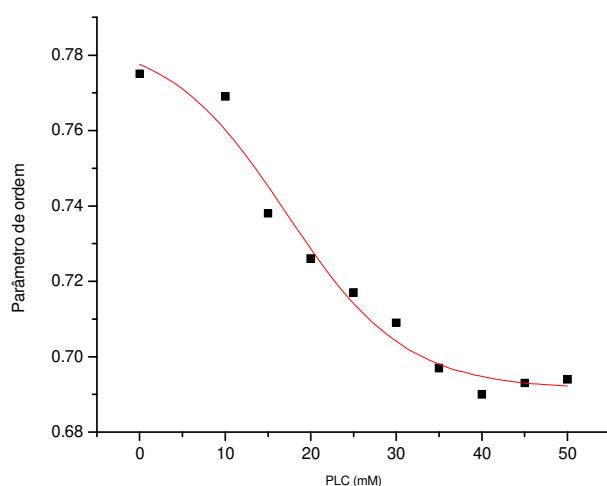


Figura 18 – Variação do parâmetro de ordem de vesículas lipossomais unilamelares, causada pela prilocaína.

2. TESTE DE LIBERAÇÃO IN VITRO

Para avaliação da liberação *in vitro*, o experimento foi realizado com o sistema lipossomal de prilocaína em comparação com o perfil de liberação do anestésico livre (*Figura 19*). A diminuição na taxa de liberação da prilocaína encapsulada em lipossoma em relação à forma livre indicou que o uso de carreador modificou a cinética de liberação do anestésico através de membranas de diálise.

A formulação lipossomal mostrou uma taxa de liberação mais lenta ($p < 0,05$ - *Teste T de Student não pareado*), que atingiu o equilíbrio em 90 minutos, quando comparada à prilocaína não encapsulada, cuja taxa de liberação alcançou o equilíbrio em 60 minutos (*Figura 19*).

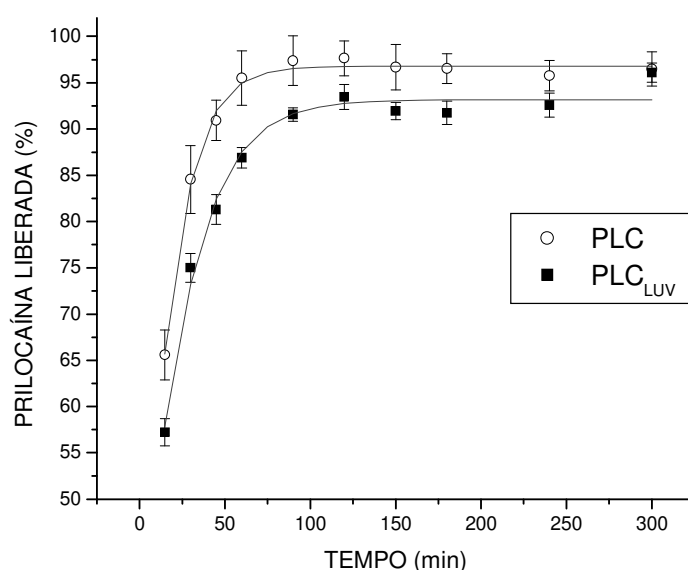


Figura 19 - Liberação cumulativa de PLC (%) a partir de sistema com lipossomas unilamelares, pH 7,4 e 25 °C. Dados representados como médias $\pm$ SD ($n=4$).

3. ESTERILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO ANESTÉSICA LIPOSSOMAL

As amostras da prilocaína lipossomal foram esterilizadas em autoclave em temperatura de 121°C e 1atm de pressão por um período de 15min, com subsequente resfriamento e submissão do material a testes para comprovação de esterilização.

Os testes microbiológicos em meio BHI, realizados no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia – UNICAMP, confirmaram a esterilização de todos os lotes de prilocaína lipossomal avaliados.

Os testes do pirogênio *in vitro*, realizados com kits Endosafe® Limulus Amebocyte Lysate, no setor de controle de qualidade da empresa Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos Ltda, comprovaram a ausência de endotoxinas nas amostras testadas.

4-AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA FORMULAÇÃO ANESTÉSICA LIPOSSOMAL (antes e após esterilização)

A estabilidade química do componente lipídico foi avaliada pelo método que consiste na detecção de endoperóxidos pela reação de produtos de sua quebra em altas temperaturas, os malondialdeídos (MDA), com ácido tiobarbitúrico (TBA). Essa reação gera um cromóforo vermelho com absorbância em 532nm (NEW, 1990; OHKAWA et al., 1979; ASAKAWA & MATSUSHITA, 1980).

Os resultados obtidos pela reação com o TBA mostraram que a estabilidade química dos lipídios foi mantida por até 60 dias sem diferenças significantes ($p>0,05$) entre as amostras estéreis e não estéreis (*Figura 20*).

Apesar da alteração mostrada a partir do terceiro mês, os valores de concentração de malondialdeído obtidos nesse mês e no subsequente ainda estão bem abaixo do valor limite considerado por Boogaerts e colaboradores (1994), que é de 2nM. Com isso, pode-se dizer que a formulação apresentou alteração de estabilidade lipídica dentro de níveis aceitáveis, de acordo com a literatura.

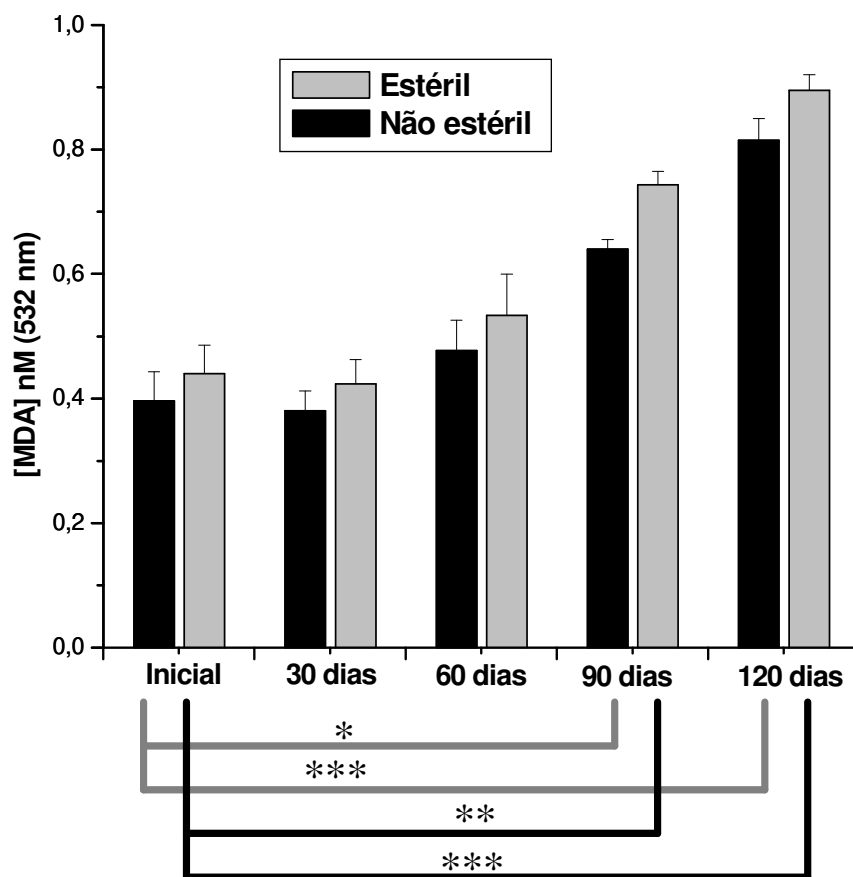


Figura 20 - Concentração de malondialdeído (MDA) (nM) em amostras da formulação de prilocaína lipossomal 3% estéril e não estéril (n= 6). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (ANOVA/ Tukey – Kramer).

A estabilidade da prilocaína foi avaliada por Ressonância Magnética Nuclear (^1H -RMN) antes e após esterilização, com a aquisição de um espectro uni-dimensional (*Figura 21*) em espectrômetro Varian. A atribuição dos picos e ausência de picos extras ou não atribuídos mostra que não houve decomposição química da prilocaína após processo de esterilização por calor úmido.

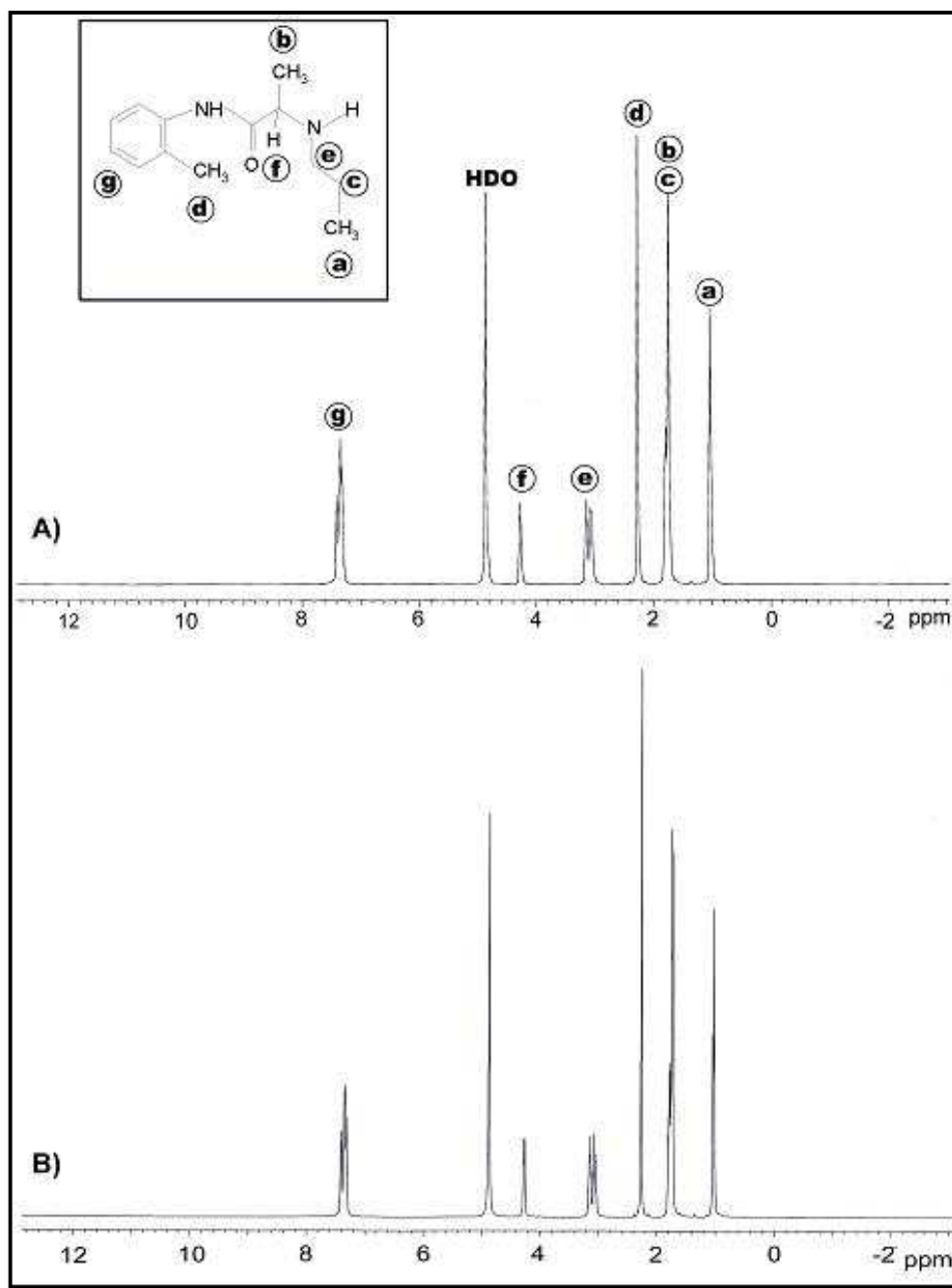


Figura 21 – Espectro unidimensional obtido por Ressonância Magnética Nuclear (^1H -RMN). Prilocaina em D_2O : antes (**A**) e após (**B**) procedimento de esterilização por autoclave. [Prilocaina] = 5mM, pH 5,5, 20°C , 500 MHz.

Quanto à estabilidade física, resultados obtidos por espalhamento de luz quase elástico (*Quasi Elastic Light Scattering*) mostraram que a prilocaína lipossomal (estéril ou não) não apresentou alteração significativa ($p>0,05$) no tamanho das vesículas por um período de até 30 dias (*Tabela 6*). Após esse período, a formulação apresentou um aumento significativo no tamanho das vesículas lipossomais tanto nas amostras estéreis (4,5 vezes, $p<0,001$), quanto nas amostras não submetidas ao processo de esterilização (2,4 vezes, $p<0,001$).

Tabela 6 – Estabilidade física – Tamanho das vesículas (nm) e proporção de distribuição (%) da prilocaína lipossomal, antes e após esterilização. Valores expressos em média $\pm$ DP ($n = 6$).

	Não estéril	Estéril
Inicial	341,71 $\pm$ 48 (100%) a***	342,8 $\pm$ 56 (100%) b***
30 dias	354,01 $\pm$ 61 (100%)	363,3 $\pm$ 57 (100%)
60 dias	812,9 $\pm$ 359 (94,1%)	1561,8 $\pm$ 954 (83,4%)

NOTA: Análise estatística: ANOVA/ Tukey – Kramer

a – amostras não estéreis (60 dias) vs amostras não estéreis (tempo inicial) - $p<0,001$ (***)

b – amostras estéreis (60 dias) vs amostras estéreis (tempo inicial) - $p<0,001$ (***)

5. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANALGÉSICA EM MODELOS ANIMAIS

5.1. Bloqueio do nervo infraorbital

A eficácia do bloqueio do nervo infraorbital em ratos foi avaliada pelo tempo de recuperação (T_{rec}) da função sensorial e pelo efeito total do anestésico local (*Tabela 7 e Figura 22*). Esse efeito foi estimado pela área sob a curva de tempo (ASC) expressa em escore por hora e calculada com o uso do programa Origin 6.0 (MicrocalTM Software, Inc, Northampton, MA, USA).

Tabela 7– Efeito total do bloqueio sensorial (ASC) e tempo de recuperação para PLC comercial (com vasoconstritor), PLC em solução (3%, 2%, 1%) e PLC_{LUV} (3%, 2%, 1%). Dados expressos em mediana (mínimo – máximo) (n = 7 –10 /grupo).

Grupos	ASC (escore/h)	T_{rec} (min)
LUV	0	0
PLC (3%)	57,5 (47,5 – 67,5) ^{a*** b**}	65,0 (55,0 – 75,0) ^{a*** b**}
PLC_{FELIPRESSINA} (3%)	87,5 (67,5 – 97,5)	95,0 (75,0 – 105,0)
PLC_{LUV} (3%)	87,5 (82,5 – 92,5) ^c	95,0 (90,0 – 100,0) ^c
PLC (2%)	42,5 (32,5 – 52,5) ^{d**}	50,0 (40,0 – 60,0) ^{d**}
PLC_{LUV} (2%)	57,5 (52,5 – 67,5) ^f	65,0 (60,0 – 75,0) ^f
PLC (1%)	32,5 (22,5 – 37,5) ^{e*}	40,0 (30,0 – 45,0) ^{e*}
PLC_{LUV} (1%)	37,5 (32,5 – 52,5) ^g	45,0 (40,0 – 60,0) ^g

NOTA: Diferenças estatísticas:

- **Teste de Kruskal-Wallis**

a – PLC 3% vs. PLC_{LUV} 3%- p<0,001 (***)

b – PLC 3% vs. PLC_{FELIPRESSINA} - p<0,01 (**)

c – PLC_{LUV} 3% vs. PLC_{FELIPRESSINA} - p> 0,05 (não-significante)

- **Teste de Mann-Whitney**

d – PLC 2% vs. PLC_{LUV} 2%- p<0,01 (**)

e – PLC 1% vs. PLC_{LUV} 1%- p<0,05 (*)

f – PLC 3% vs. PLC_{LUV} 2%- p> 0,05 (não-significante)

g – PLC 2% vs. PLC_{LUV} 1%- p> 0,05 (não-significante)

A Tabela 7 e a Figura 22 mostram que a duração do bloqueio do nervo após o tratamento com a prilocaína lipossomal (1%, 2%, 3%) foi significativamente mais longa que a duração do bloqueio produzido pela prilocaína em solução nas mesmas concentrações (p<0,05, p<0,01, p<0,001 , respectivamente). Este fato pode ser explicado pelo tempo mais longo de permanência da formulação lipossomal no local da injeção. Já a prilocaína lipossomal 3%, quando comparada à prilocaína com o vasoconstritor felipressina (disponível comercialmente), não apresentou alteração significativa (p>0,05) na duração do bloqueio. Com esse

resultado pôde-se observar uma equivalência de efeitos entre a prilocaína lipossomal e a prilocaína comercial quando usadas nas mesmas concentrações.

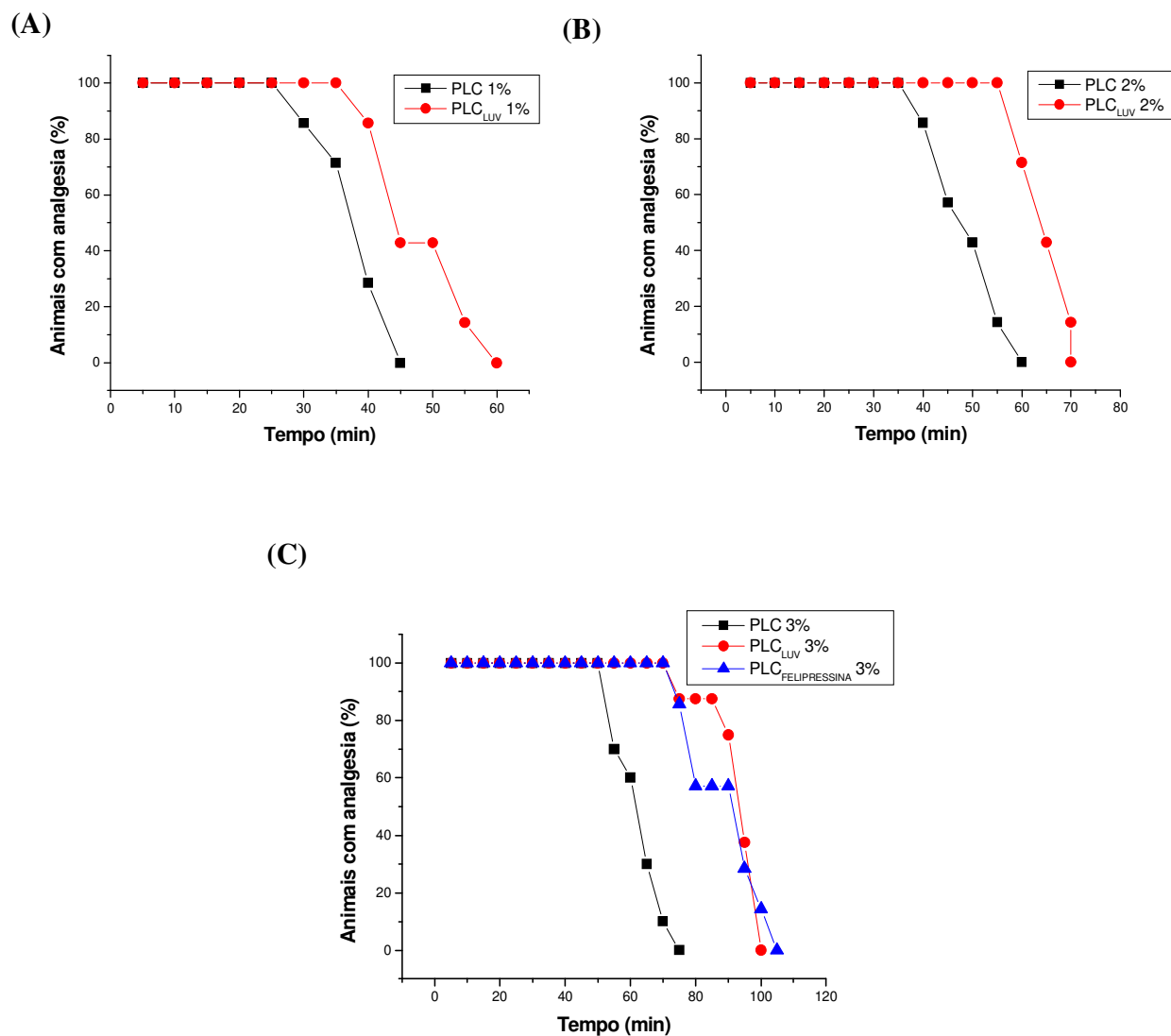


Figura 22 – Gráficos, em função do tempo, da porcentagem de animais (ratos) com analgesia avaliados pelo teste de bloqueio do nervo infraorbital ($n = 7-10$ por grupo). (A) PLC em solução 1% vs. PLC lipossomal 1%; (B) PLC em solução 2% vs. PLC lipossomal 2%; (C) PLC em solução 3%, PLC lipossomal 3%, PLC comercial com vasoconstritor 3%.

Em relação ao tempo de recuperação da anestesia, a *Figura 23* mostra o efeito concentração-dependente e a diferença entre a prilocaína em solução e a prilocaína lipossomal.

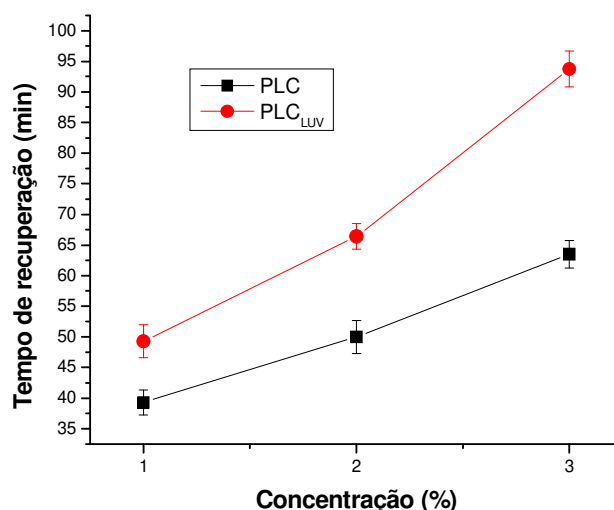


Figura 23: Tempo de recuperação da anestesia (min) no nervo infraorbital em função da concentração de PLC.

Uma outra observação a ser feita, com base na *Tabela 7*, é que os efeitos das formulações lipossomais de prilocaína 1% e 2% , quando comparadas às soluções de prilocaína 2% e 3% respectivamente, não apresentaram diferenças significantes. Com isso, pode-se inferir que, para a obtenção de efeitos semelhantes, há a necessidade de uma menor concentração de anestésico nas formulações lipossomais do que nas soluções aquosas.

5.2. Teste de *tail-flick*

O teste de *tail-flick* foi utilizado para avaliar a duração de bloqueio sensorial de anestésicos locais administrados por infiltração na base da cauda de camundongos Swiss. Esse teste requer uma função motora da cauda do animal suficiente para permitir sua movimentação frente a um estímulo doloroso. Portanto, foi feito uso da técnica de injeção do anestésico local na base da cauda, abaixo do local onde se inserem os músculos responsáveis pelo movimento

caudal, de acordo com Grant e colaboradores (1994). Essa técnica resulta em um bloqueio sensorial da cauda com a preservação da capacidade de movimento caudal do animal. Para se comprovar essa capacidade, durante o experimento, o movimento da cauda pôde ser facilmente observável na resposta ao toque no focinho do animal.

As durações do bloqueio sensorial (tempo de recuperação) das soluções testadas estão apresentadas na *Tabela 8* e na *Figura 24*, onde se pode observar que as formulações lipossomais - PLC_{LUV} 1%, PLC_{LUV} 2% e PLC_{LUV} 3% - provocaram um aumento no tempo de recuperação (54,6%, 25%, 22%, respectivamente) quando comparadas às mesmas concentrações do anestésico em solução. Os lipossomas sem o anestésico encapsulado, usados como controle, não induziram analgesia em todos os animais tratados (dados não mostrados).

Tabela 8 – Tempos de recuperação do bloqueio sensorial da prilocaína em solução (1%, 2% e 3%), da prilocaína lipossomal (1%, 2% e 3%) e da prilocaína comercial associada ao vasoconstritor felipressina (3%).

	$T_{rec} \text{ (min)}$	ΔT_{rec}
PLC 1%	31,4 ± 2,6	} 54,6%
PLC_{LUV} 1%	48,6 ± 2,6	
PLC 2%	51,4 ± 4,0	} 25 %
PLC_{LUV} 2%	64,3 ± 4,8	
PLC 3%	68,6 ± 5	} 22,1%
PLC_{LUV} 3%	83,7 ± 4,9	
PLC_{FELIPRESSINA} 3%	77,5 ± 6,1	

T_{rec} = Tempo de recuperação

$\Delta T_{rec} = [(Formulação \text{ lipossomal} - solução \text{ aquosa do AL}) / Solução \text{ aquosa do AL}] \times 100$

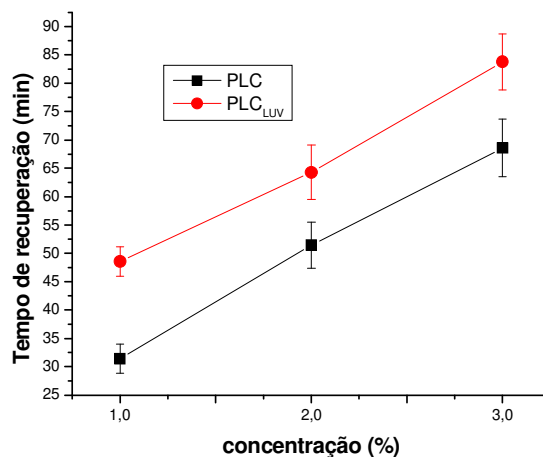


Figura 24- Tempo de recuperação da analgesia (min) em função da concentração de PLC, na cauda de camundongos Swiss (teste de tail-flick).

A comparação entre os efeitos máximos possíveis induzidos pelas soluções de prilocaína (PLC 1%, PLC 2%, PLC 3%) e pelas formulações lipossomais correspondentes (PLC_{LUV} 1%, PLC_{LUV} 2% e PLC_{LUV} 3%) é mostrada na *Tabela 9* e na *Figura 25*. É interessante observar que a prilocaína lipossomal 3%, nessa técnica em camundongos, também apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) do efeito quando comparada à prilocaína 3% em solução, da mesma maneira que ocorreu no experimento realizado em ratos (método do bloqueio do nervo infraorbital). Outra semelhança entre os resultados dos diferentes experimentos foi quanto à ausência de diferenças significantes ($p > 0,05$) entre os grupos: PLC_{LUV} 3% vs. PLC_{Felipressina} 3%; PLC 3% vs. PLC^{LUV} 2%; PLC 2% vs. PLC_{LUV} 1%.

Tabela 9 – % Efeito Máximo (**EMP**) da prilocaína em solução (1%, 2% e 3%), da prilocaína lipossomal (1%,2% e 3%) e da prilocaína comercial associada ao vasoconstritor felipressina (3%).

	PLC 1%	PLC_{LUV} 1%	PLC 2%	PLC_{LUV} 2%	PLC 3%	PLC_{LUV} 3%	PLC_{FELIPRESSINA} 3%
10 min	90,14	100 ^{g (ns)}	100	100 ^{f (ns)}	100	100 ^{a,c (ns)}	100
20 min	54,6 ^{e*}	93,5 ^{g (ns)}	93,4	88,8 ^{f (ns)}	91,2	100 ^{a,c (ns)}	100
30 min	14,7 ^{e**}	66,1 ^{g (ns)}	65	82,5 ^{f (ns)}	82,5 ^{a*,b*}	100 ^{c (ns)}	100
40 min	0 ^{e*}	27,8 ^{g (ns)}	51,5	64,5 ^{f (ns)}	57,2 ^{a**}	100 ^{c (ns)}	85,7
50 min	0	3,6 ^{g (ns)}	16,2	39,9 ^{f (ns)}	33 ^{a*}	84,7 ^{c (ns)}	52,1
60 min	0	0	0 ^{d**}	17,1 ^{f (ns)}	15,7 ^{a*}	66,2 ^{c (ns)}	33,5
70 min	0	0	0	4,2 ^{f (ns)}	7,8 ^{a*}	53,4	12,9 ^{c*}
80 min	0	0	0	0	0	28,6	7,3
90 min	0	0	0	0	0	6,5	6,5
100 min	0	0	0	0	0	0	0

NOTA: Diferenças estatísticas: $p < 0,001$ (***) $p < 0,01$ (**) $p < 0,05$ (*) $p > 0,05$ (ns) – diferença não significativa.

ANOVA

a – PLC 3% vs. PLC_{LUV} 3%

b – PLC 3% vs. PLC_{FELIPRESSINA}

c – PLC_{LUV} 3% vs. PLC_{FELIPRESSINA}

Teste T não pareado

d- PLC 2% vs. PLC_{LUV} 2%

e- PLC 1% vs. PLC_{LUV} 1%

f- PLC 3% vs. PLC_{LUV} 2%

g- PLC 2% vs. PLC_{LUV} 1%

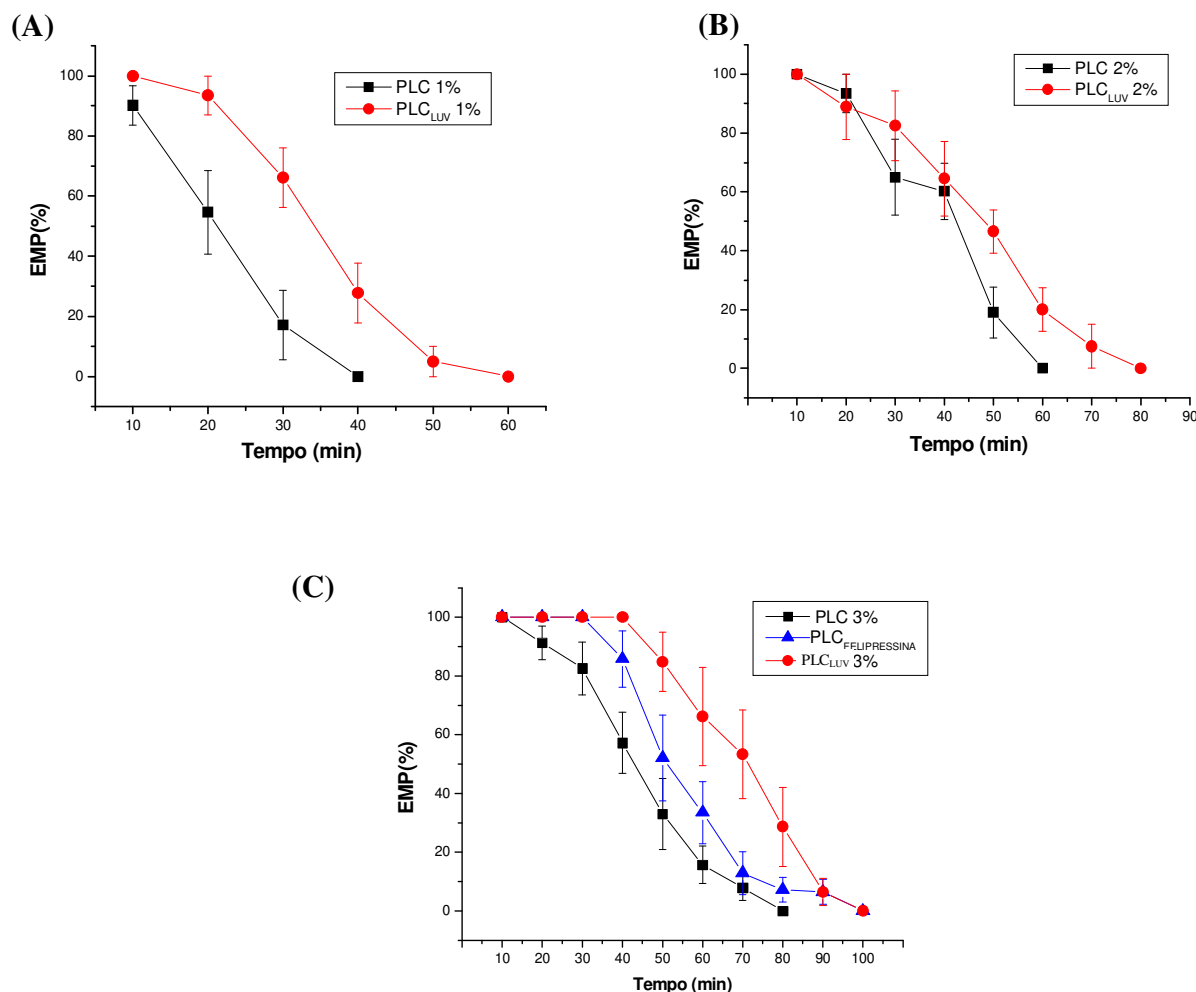


Figura 25: Gráficos, em função do tempo, da percentagem dos efeitos máximos possíveis, avaliados pelo teste de tail-flick ($n = 7-8$ por grupo). (A) PLC em solução 1% vs. PLC lipossomal 1%; (B) PLC em solução 2% vs. PLC lipossomal 2%; (C) PLC em solução 3%, PLC lipossomal 3%, PLC comercial com vasoconstritor 3%.

6-AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE LOCAL EM MODELOS ANIMAIS

6.1. Teste de edema de pata

Para uma primeira avaliação de toxicidade local das formulações testadas, foi utilizado o teste do edema de pata, que teve como controles negativos o tampão Hepes e a solução salina e, como controle positivo, a carragenina 1%. Com a injeção subcutânea de carragenina, os sinais cardinais da inflamação (edema, hiperalgesia e eritema) ocorrem imediatamente, como resultado da ação

imediate desse agente pró-inflamatório. A carragenina induz um edema de forma gradual, após a injeção intraplantar, que atinge um grau máximo em três horas (GOULART et al., 2005). Por isso, foram feitas medidas do volume da pata nos tempos de 60min, 120min e 180min.

Os resultados obtidos nesse teste mostraram que as formulações testadas (LUV, PLC_{LUV}3%, PLC 3%) não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas entre si e também em comparação com os controles negativos ($p>0,05$). Já o grupo testado com a carragenina mostrou uma diferença significativa ($p<0,001$) do aumento do volume da pata em relação a todos os outros grupos (*Figura 26 e Tabela 10*). Assim, pode-se dizer que a prilocaína lipossomal não provocou aparecimento de edema, que é um dos sinais característicos do processo inflamatório, do mesmo modo que a prilocaína em solução e que o veículo lipossomal.

Tabela 10– Média $\pm$ erro padrão do aumento do volume (mL) da pata dos animais dos diferentes grupos nos três tempos testados.

	60 min	120 min	180 min
Salina	0,07 $\pm$ 0,06 <i>a</i> ***	0 <i>a</i> ***	0 <i>a</i> ***
HEPES	0,04 $\pm$ 0,02 <i>a</i> ***	0,01 $\pm$ 0,01 <i>a</i> ***	0 <i>a</i> ***
LUV	0,05 $\pm$ 0,02 <i>a</i> ***	0,06 $\pm$ 0,02 <i>a</i> ***	0,02 $\pm$ 0,02 <i>a</i> ***
PLC 3%	0,06 $\pm$ 0,03 <i>a</i> ***	0,06 $\pm$ 0,02 <i>a</i> ***	0,07 $\pm$ 0,02 <i>a</i> ***
PLC_{LUV} 3%	0,09 $\pm$ 0,02 <i>a</i> ***	0,05 $\pm$ 0,02 <i>a</i> ***	0,01 $\pm$ 0,01 <i>a</i> ***
PLC_{FELIPRESSINA} 3%	0,06 $\pm$ 0,02 <i>a</i> ***	0,06 $\pm$ 0,03 <i>a</i> ***	0,04 $\pm$ 0,02 <i>a</i> ***
Carragenina 1%	0,59 $\pm$ 0,08	0,57 $\pm$ 0,09	0,50 $\pm$ 0,1

NOTA: Diferenças estatísticas: $p<0,001$ (***) **ANOVA. a** - Carragenina vs todos os outros grupos testados (salina, HEPES, LUV PLC, PLC_{LUV} e PLC_{FELIPRESSINA})

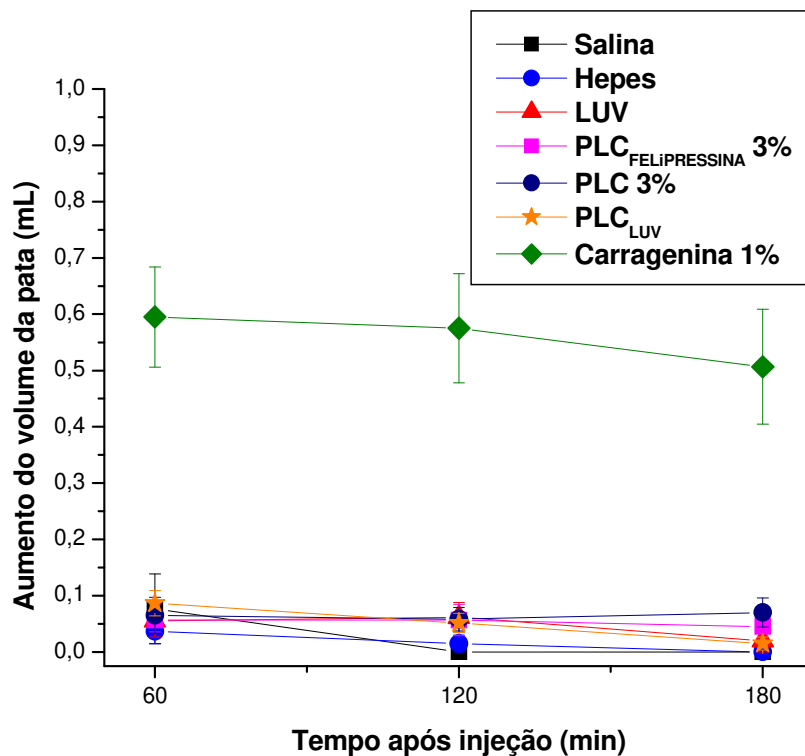
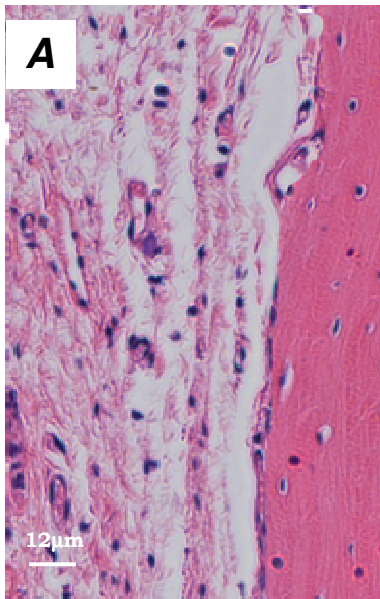


Figura 26: Gráfico em função do tempo (min), do aumento de volume (mL) médio da pata de ratos Wistar $\pm$ erro padrão, após injeção dos compostos testados.

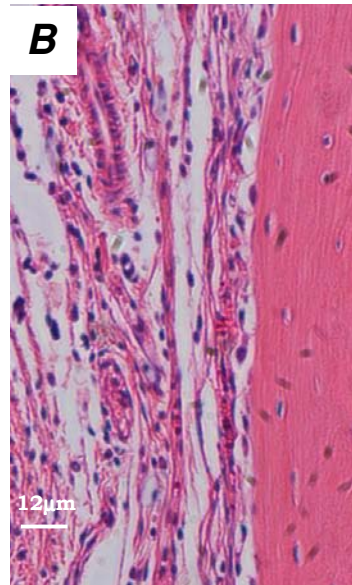
6.2. Avaliação histológica

A análise histológica da mucosa oral após injeção das formulações testadas foi feita com o objetivo de verificar a presença ou não de infiltrado inflamatório, ou seja, de células características da inflamação. Fez-se uma análise qualitativa do processo inflamatório, tendo como base a observação de um escore qualitativo já descrito na seção 10.2 (em Materiais e Métodos).

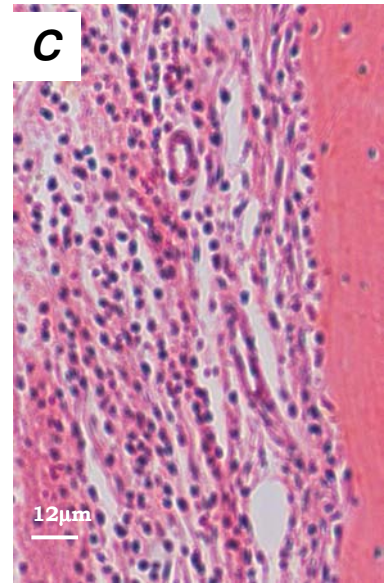
A Figura 27 mostra o aspecto histológico das formulações testadas, como exemplo para os valores de escore utilizados.



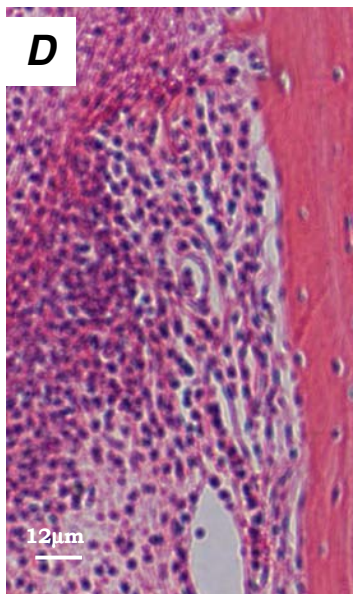
1 mínimo infiltrado
inflamatório



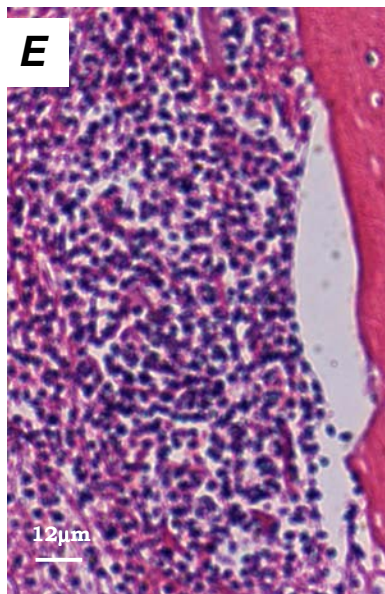
2 infiltrado inflamatório
leve



3 infiltrado inflamatório
moderado



4 infiltrado inflamatório
intenso



5 infiltrado inflamatório
intenso + necrose

Figura 27: Imagens de microscópio ótico (H&E, aumento 100x) do aspecto histológico da mucosa oral de ratos dos diferentes grupos testados, mostradas como exemplo para a determinação de escore qualitativo: **A** – Punção da agulha (4 dias) – **escore 1** ; **B** – Solução lipossomal (24 horas) – **escore 2**; **C** – Prilocaína lipossomal (6 horas) – **escore 3**; **D** – Prilocaína em solução (6 horas) – **escore 4**; **E** – Prilocaína com felipressina (6 horas) – **escore 5**.

Os valores de escore de intensidade do infiltrado inflamatório obtidos com a avaliação histológica de todos os grupos testados, no tempo de 6 horas, estão mostrados na *Tabela 11*. Em uma análise comparativa entre os diferentes grupos, pôde-se observar que os valores de escores obtidos após a administração de prilocaína lipossomal foram significativamente menores que os valores obtidos após a injeção de prilocaína com felipressina ($p<0,01$). Já em comparação com os outros grupos (PLC, LUV e punção da agulha), os valores de escore obtidos pelo grupo tratado com prilocaína lipossomal não mostraram diferenças significativas ($p>0,05$). Os grupos que receberam tratamento com prilocaína com felipressina e prilocaína em solução apresentaram valores de escores significativamente maiores que o grupo tratado apenas com a punção da agulha ($p<0,001$ e $p<0,05$ respectivamente). Além disso, ainda após 6 horas de tratamento, na comparação entre os lados de um mesmo animal (análise intra-grupos) – o lado direito que recebeu a solução teste e o lado contralateral que recebeu a solução salina – observou-se que apenas as administrações de prilocaína com felipressina e de prilocaína em solução mostraram um aumento de valores de escore em relação a seus respectivos controles (*Tabela 11*); já a punção da agulha revelou valores de escore menores que o seu controle ($p<0,05$).

Na *Tabela 12*, os valores de escore apresentados após 24 horas de tratamento com prilocaína com felipressina se mostraram significativamente ($p<0,001$) maiores que os valores apresentados pelo grupo que recebeu apenas a punção da agulha. Em relação aos outros grupos, não ocorreram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os valores obtidos. Na análise intra-grupos, os valores de escores obtidos por todos os grupos e seus respectivos controles não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$).

Após 4 dias de tratamento, os valores de escores obtidos pelos grupos não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) entre si, com exceção do grupo tratado com prilocaína com felipressina, que mostrou diferenças estatísticas ($p<0,01$) em

relação ao grupo que recebeu a punção da agulha. Já na análise intra-grupos, o tratamento com prilocaína com felipressina e prilocaína em solução apresentaram valores de escore maiores que os seus respectivos controles ($p < 0,05$), enquanto que a punção da agulha mostrou valores de escore significativamente ($p < 0,05$) menores que os valores apresentados pela solução salina administrada contralateralmente (*Tabela 13*).

Tabela 11– Mediana (limites mínimo-máximo) dos escores de intensidade do infiltrado inflamatório obtidos após avaliação histológica dos grupos testados e dos respectivos controles com solução salina, 6 horas após o tratamento.

	<i>Teste</i>	<i>Solução salina</i>
PLC_{LUV}	2,0 (2,0-2,2) <i>a</i> **	2,4 (2,2-3,6)
PLC_{Felipressina}	3,8 (3,2-4,4)	2,1 (2,0-2,8) <i>d</i> *
PLC	2,6 (2,2-4,0)	2,0 (2,0-2,4) <i>e</i> *
LUV	2,3 (2,0-2,8)	2,4 (2,0-3,4)
Punção (agulha)	2,0 (1,6-2,0) <i>b</i> ***, <i>c</i> *	2,0 (2,0-2,6)

NOTA: Análise estatística: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*), $p > 0,05$ (não significativa)

Inter-grupos (Kruskal-Wallis)

a - PLC_{Felipressina} vs PLC_{Luv}

b- PLC_{Felipressina} vs Punção (agulha)

c- PLC vs Punção (agulha)

Intra-grupos (Wilcoxon pareado)

d- PLC_{Felipressina} vs controle (solução salina)

e- PLC vs controle (solução salina)

f- PLC_{LUV} vs controle (solução salina)

g- LUV vs controle (solução salina)

h- Punção (agulha) vs controle (solução salina)

Tabela 12-Mediana (limites mínimo-máximo) dos escores de intensidade do infiltrado inflamatório obtidos após avaliação histológica dos grupos testados e dos respectivos controles com solução salina, 24 horas após o tratamento.

	<i>Teste</i>	<i>Solução salina</i>
PLC_{LUV}	2,0 (2,0-2,6)	2,3 (2,0-2,4)
PLC_{Felipressina}	2,8 (2,4-3,0)	2,0 (2,0-2,8) <i>d</i> *
PLC	2,1 (2,0-3,0)	2,0 (2,0-2,2)
LUV	2,1 (2,0-2,4)	2,0 (2,0-2,8)
Punção (agulha)	1,5 (1,0-2,0) <i>b</i> ***	2,0 (2,0-2,6)

NOTA: Análise estatística: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*), $p > 0,05$ (não significativa)

Inter-grupos (Kruskal-Wallis)

a - PLC_{Felipressina} vs PLC_{LUV}

b- PLC_{Felipressina} vs Punção (agulha)

c- PLC vs Punção (agulha)

Intra-grupos (Wilcoxon pareado)

d- PLC_{Felipressina} vs controle (solução salina)

e- PLC vs controle (solução salina)

f- PLC_{LUV} vs controle (solução salina)

g- LUV vs controle (solução salina)

h- Punção (agulha) vs controle (solução salina)

Tabela 13– Mediana (limites mínimo-máximo) dos escores de intensidade do infiltrado inflamatório obtidos após avaliação histológica dos grupos testados e dos respectivos controles com solução salina, 4 dias após o tratamento.

	<i>Teste</i>	<i>Solução salina</i>
PLC_{Luv}	1,6 (1,2-1,8)	1,7 (1,4-1,8)
PLC_{Felipressina}	2,3 (1,8-3,0)	1,6 (1,4-2,0) <i>d</i> *
PLC	1,8 (1,6-2,2)	1,6 (1,2-1,8) <i>e</i> *
LUV	1,9 (1,6-2,4)	1,9 (1,4-2,2)
Punção (agulha)	1,2 (1,0-1,4) <i>b</i> **, <i>h</i> *	1,6 (1,4-2,0)

NOTA: Análise estatística: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*), $p > 0,05$ (não significativa)

Inter-grupos (Kruskal-Wallis)

a- PLC_{Felipressina} vs PLC_{LUV}

b- PLC_{Felipressina} vs Punção (agulha)

c- PLC vs Punção (agulha)

Intra-grupos (Wilcoxon pareado)

d- PLC_{Felipressina} vs controle (solução salina)

e- PLC vs controle (solução salina)

f- PLC_{LUV} vs controle (solução salina)

g- LUV vs controle (solução salina)

h- Punção (agulha) vs controle (solução salina)

A prilocaína associada à felipressina apresenta pH = 5,0, valor este que é menor que os das outras soluções testadas. Tal fato pode explicar a presença de um quadro inflamatório de maior intensidade nos três tempos analisados para essa formulação, já que se sabe que o pH do meio exerce influência no desenvolvimento de um processo inflamatório (MURAKAMI et al., 1994; MEECHAN, 1999). Tanto a prilocaína encapsulada em lipossoma quanto a solução lipossomal mostraram que, com valores de pH próximos ao fisiológico, induzem um quadro inflamatório semelhante ao quadro apresentado pela simples punção da agulha, ou seja, estas soluções não são responsáveis pelo quadro inflamatório apresentado.

A *Figura 28* mostra as médias ($\pm$ desvio-padrão) dos valores de escore obtidos com os cinco tratamentos e seus controles nos três tempos testados.

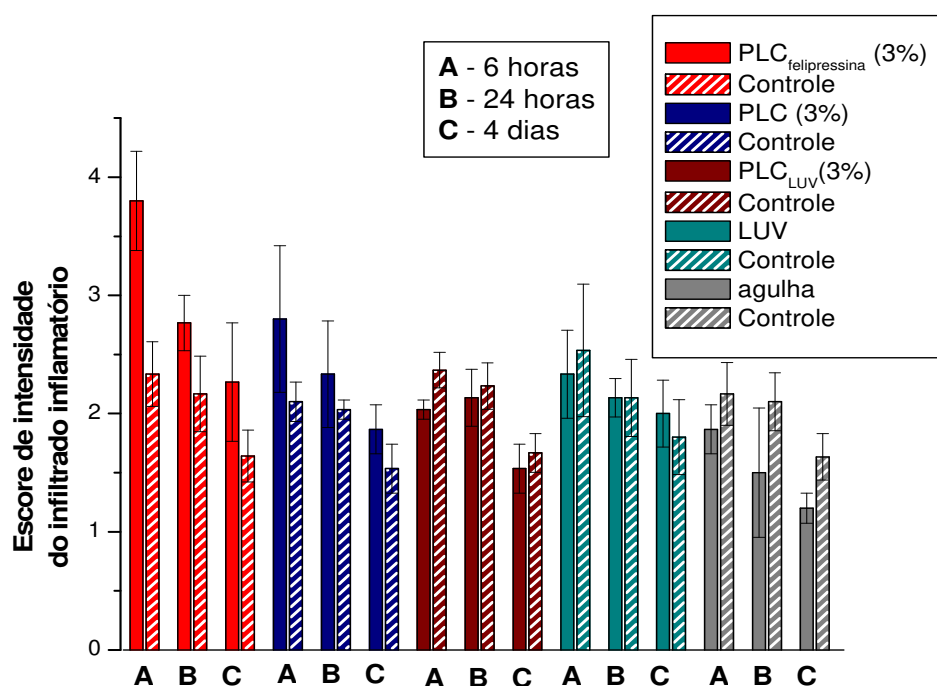


Figura 28: Médias $\pm$ DP dos valores de escore de intensidade do infiltrado inflamatório, obtidos com os cinco tratamentos e seus respectivos controles, nos três tempos avaliados – 6 horas, 24 horas e 4 dias ($n=6$ /grupo).

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o sistema de liberação prolongada da prilocaína em lipossomas pode ser considerado uma opção de utilização desse anestésico, especialmente em odontologia, pois:

- Experimentos de ressonância paramagnética eletrônica evidenciaram uma alteração no parâmetro de ordem da membrana lipossomal, o que caracteriza a interação anestésico-lipossoma (inserção da prilocaína na bicamada lipídica);
- Por meio de ensaios *in vitro*, observou-se que a formulação lipossomal mostrou uma taxa de liberação mais lenta, quando comparada à prilocaína não encapsulada;
- Os testes de estabilidade físico-química não mostraram alterações na formulação lipossomal após esterilização em autoclave, quando comparada à prilocaína lipossomal não-estéril. Contudo, mesmo não tendo apresentado alterações nos testes de estabilidade química por um período de 60 dias, em análises de *light scattering*, a prilocaína lipossomal apresentou alterações significativas no tamanho da vesícula após 30 dias da preparação (antes e após esterilização), o que inviabiliza o uso desta formulação por períodos maiores;
- Nos testes de toxicidade local, pôde-se observar que a formulação lipossomal não causou edema, em comparação aos controles;
- Nesses mesmos testes, na avaliação histológica, observou-se ainda uma reação inflamatória significativamente menor da formulação lipossomal quando comparada à da formulação comercial associada à felipressina;
- A prilocaína lipossomal, nos ensaios *in vivo*, aumentou o tempo de duração do bloqueio nervoso sensorial quando comparada à prilocaína em solução. Já em relação à prilocaína comercial

associada ao vasoconstritor felipressina, não ocorreram diferenças significativas nos tempos de duração de bloqueio, o que indica que o anestésico encapsulado em lipossoma tem efeito equivalente à associação anestésico-vasoconstritores. Ainda em relação aos estudos *in vivo*, observou-se que os efeitos das formulações lipossomais de prilocaína 1% e 2%, quando comparadas às soluções de prilocaína 2% e 3% respectivamente, não apresentaram diferenças significantes. Com isso, pôde-se inferir que, para a obtenção de efeitos semelhantes, há a necessidade de uma menor concentração de anestésico nas formulações lipossomais do que nas soluções aquosas.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADO-CUESTA, S.; VALMASEDA-CASTELLON, E.; BERINI-AYTÉS, L.; GAY-ESCODA, C. (2004). Complications of ambulatory oral surgery in patients over 65 years of age. **Med. Oral**, v. 9, p. 253-262.

ANDRADE, E.D. (2001) **Terapêutica medicamentosa em odontologia**. São Paulo: Artes médicas.

ARAÚJO, D.R.; PINTO, L.M.A.; BRAGA, A.F.A.; DE PAULA, E. (2003). Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. **Rev. Bras. Anesthesiol.** v. 53, p. 663-671.

ARAÚJO, D.R.; CEREDA, C.M.S.; BRUNETTO, G.B.; PINTO, L.M.A.; SANTANA, M.H.A.; DE PAULA, E. (2004). Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. **Can. J. Anesth.**, v. 51, p. 566-572.

ARAÚJO, D.R. (2005). **Desenvolvimento e avaliação farmacológica de formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-amidas cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína**. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, Universidade de Campinas.

ARAÚJO, L.D.; SINGI, G.; GAZOLA, R. (2002). Verification of protector effect of the norepinephrine and felypressin upon the cardiovascular system under action of the lidocaine hydrochloride and prilocaine hydrochloride in anesthetized rats. **Pharmacol. Research**, v. 46, n. 2, p. 107-111.

ASAKAWA, T.; MATSUSHITA, S. (1980). Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. **Lipids**, v. 15, n. 3, p. 137-140.

BARENHOLZ, Y. (2003). Relevancy of drug loading to liposomal formulation therapeutic efficacy. **J. Liposome Research**, v. 13, n. 1, p. 1-8.

BENNETT, R.C. (1989). **Monheim: Anestesiologia local e controle da dor na prática dentária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

BOOGAERTS, J.G.; LAFONT, N.D.; LUO, H.; LEGROS, F.J. (1993b). Plasma concentrations of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome-associated and plain solutions to rabbits. **Can. J. Anaesth.**, v. 40, p. 1201-1204.

BOOGAERTS, J.G.; DECLERCQ, A.; LAFONT, N.; BENAMEUR, H.; AKODAD, E.M.; DUPONT, J-M. LEGROS, F.J. (1993a). Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. **Anesth. Analg.**, v. 76, p. 553-555.

BOOGAERTS, J.G.; LAFONT, N.D.; CARLINO, S.; NOEL, E.; RAYNAL, P.; GOFFINET, G.; LEGROS, F.J. (1995). Biodistribution of liposome-associated bupivacaine after extradural administration to rabbits. **Br. J. Anesth.**, v. 75, p. 319-325.

BOOGAERTS, J.G.; LAFONT, N.D.; DECLERCQ, A.G.; HONGWEN, C.L.; GRAVET, E.T.; BIANCHI, J.A.; LEGROS F.J. (1994). Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. **J. Clin. Anesth.**, v. 6, p. 315-320.

BROWN, R.S.; RHODUS, N.I. (2005). Epinephrine and local anesthesia revisited. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Oral Endod.**, v. 100, n. 4, p. 401-408.

BRUNETTO, G. B.; CEREDA, C. M. S.; ARAÚJO, D. R.; PAULA, E. (2004). Liposomal lidocaine formulation: development and biological tests in rats. **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ**, Caxambú - MG.

BUCALO, B. D.; MIRIKITANI, E.J.; MOY, R. L. (1998). Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine and EMLA using 30-minute application time. **Dermatol. Surg.**, v. 24, p. 537-541.

BUTTERWORTH, J. F.; BROWNLOW, C.; LEITH, J.P.; PRIELIPP, R.C.; COLE, L.R. (1993). Bupivacaine inhibits Cyclic-3, 5 – Adenosine Monophosphate Production. **Anesthesiology**, v. 79, p. 88-95.

CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. (1995). Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 1005-1013.

CAVALCANTI, I.L. GOZZANI, J.L.; SAMPAIO FILHO, A.A.; ALVES NETO, O.; GARCIA, J.B.S. (2004). **Dor pós-operatória**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de anestesiologia/SBA.

CEREDA, C.M.S.; ARAÚJO, D.R.; BRUNETTO, G.B.; DE PAULA, E. (2004). Liposomal prilocaine: preparation, characterization and in vivo evaluation. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v. 7, n. 2, p. 235-240.

CEREDA, C.M.S.; ARAUJO, D.R.A.; BRUNETTO, G.B.; DE PAULA, E. (2006). Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. **Can. J. Anaesth.**, v. 53, p. 1092-1097.

COLLINS, V.J. (1993) **Principles of Anesthesiology general and regional**. 3.ed. Malvern: Lea & Febiger.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (1999). **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 6.ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company.

COVINO, B.G.; VASSALO, H.G. (1985). **Anestésicos locais**: mecanismos de ação e uso clínico. Rio de Janeiro: Colina.

COVINO, B.G. (1986). Pharmacology of local anaesthetic agents. **Br. J. Anesth.**, v. 58, p. 701-716.

COX, B.; DURIEX, M.E.; MARCUS, M.A.E. (2003). Toxicity of local anesthetics. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 17, n.1, p.111-136.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.I. (1941). A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v. 72, p. 74-79.

DAVIS M.E.; BREWSTER M.E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Rev. Drug-Discovery**, v. 3, p. 1023-1035.

DE JONG, R.H. (1994) **Local Anesthetics**. Saint Louis: Mosby-Year Book.

DE PAULA, E.; SCHREIER, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficient to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1240, p. 25-33.

DE PAULA, E.; SCHREIER, S. (1996). Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. **Braz. J. Med. Res.**, v. 29, p. 877-894.

DONALDSON, D.; GELSKEY, S.C.; LANDRY, R.G.; MATTHEUS, D.C.; SANDHU, H. S. (2003) A placebo-controlled multi-centred evaluation of na anaesthetic Gel (Oraqix®) for periodontal therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, p. 171-175.

DUHGAONKAR, S.P.; TANDAN, S.K.; BHAT, A.S.; JADHAV, S.H.; KUMAR, D. (2006). Synergistic anti-inflammatory interaction between meloxicam and aminoguanidine hydrochloride in carrageenan-induced acute inflammation in rats. **Life Sci.**, v. 78, n. 10, p. 1044-1048.

EICHENFIELD, L.F.; FUNK, A.; FALLON-FRIEDLANDER, S.; CUNNINGHAM, B.B. (2002). A clinical study to evaluate the efficacy of ELA-Max (4% – liposomal lidocaine) as compared with eutectic mixture of local anesthetics cream for pain reduction of venipuncture in children. **Pediatrics**, v. 109, n. 6, p.1093-1099.

ELEDJAM, J.J. et al. (1989). In vitro study on mechanisms of bupivacaine-induced depression of myocardial contractility. **Anesth. Analg.**, v. 69, p. 732-735.

ENCYCLOPEDIA BRYTANNICA. Disponível em: <<http://www.britannica.com>>. Acesso em: 06 jan. 2007.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G. F.; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, J.G.V.C.; PESQUERO, J.L.; AVELLAR, M.C.; TEIXEIRA, M.M.; CALIXTO, J.B. (2003). Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of Kinin B1 receptors in the rat paw. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, p. 973-981.

FINK, B.R.; AASHEIM, G.; KISH, S.J.; CROLEY, T.S. (1975). Neurokinetics of lidocaine in infraorbital nerve of the rat in vivo. **Anesthesiology**, v. 42, p. 731-736.

FINKEL, J.C.; YANG, C.I.; YARVITZ, J.L.; PATEL, K.M. (2002). Neuroselective sensory electrodiagnostic evaluation of 4% liposomal topical lidocaine. **Anesth. Analg.**, v. 94, p. 1259-1262.

FISHER, R.; HUNG, O.; MEZEI, M.; STEWART, R. (1998). Topical anaesthesia of intact skin: liposome-encapsulated tetracaine vs EMLA. **Br. J. Anaesth.**, v. 81, n. 6, p. 972-973.

FOLDVARI M. (1994). In vitro cutaneous and percutaneous delivery and in vivo efficacy of tetracaine from liposomal and conventional vehicles. **Pharm. Res.**, v. 11, n. 11, p. 1593-1598.

FRACETO, L.F.; PINTO, L.M.A.; FRANZONI, L.; BRAGA, A.A.C.; SPISNI, A.; SCHREIER, S., DE PAULA, E. (2002). Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. **Biophys. Chem.**, v. 99, p. 229-243.

FRACETO, L.F.; SPISNI, A.; SCHREIER, S., DE PAULA, E. (2005). Differential effects of uncharged aminoamide local anesthetics on phospholipid bilayers, as monitored by ¹H-NMR measurements. **Biophys. Chem.**, v. 115, p. 11-18.

FRACETO, L.F.; OYAMA JR., S.; NAKAIE, C.R.; SPISNI, A.; SCHREIER, S., DE PAULA, E.; PERTINHEZ, T.A. (2006). Interaction of local anesthetics with a peptide encompassing the IV/S4-S5 linker of the NA⁺ channel. **Biophys. Chem.**, v. 123, p. 29-39.

FRAZIER, D.T.; NARAHASHI, T.; YAMADA, M. (1970). The site of action and active form of local anesthetics. III. Experimental with quaternary compounds. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v. 171, p. 45-51.

FREITAG, M.; ZBIERANEK, K.; GOTTSCHALK, A.; BUBENHEIM, M.; WINTER, R.; TUSZYNSKI, S.; STANDL, T.G. (2006). Comparative study of different concentrations of prilocaine and ropivacaine for intraoperative axillary brachial plexus block. **Eur. J. Anaesthesiol.**, v. 23, n. 6, p. 481-486.

FRIEDMAN, P.M. (1999). Comparative study of the efficacy of four topical anesthetics. **Dermatol. Surg.**, v. 25, n. 12, p. 950-954.

FRIEDMAN, M.; FRIEDLAND, W.G. (2004). **As dez maiores descobertas da medicina**. São Paulo: Companhia das Letras.

FRISKOPP, J.; NILSSON, M.; ISACSSON, G. (2001). The anesthetic onset and duration a new lidocaine/prilocaine gel intra-pocket anesthetic (Oraqix) for periodontal scaling/root planing. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 5, p. 453-458.

GANEM, E.M.; VIANNA, P.T.G.; MARQUES, M.; CASTIGLIA, Y.M.M.; VANE, L.A. (2003). Effects of spinal administration of large volumes of 2% lidocaine and 1% ropivacaine on spinal cord and meninges: experimental study in dogs. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 53, p. 351-360.

GESZTES, A.; MEZEI, M. (1988). Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine. **Anesth. Analg.**, v. 67, p. 1079-1081.

GOULART, A.C.; CORREIA, F.A.; SOUSA, S.C.; LUZ, J.G. (2005). Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. **Braz. J. Research**, v. 19, n. 2, p. 99-105.

GOULET, J.P.; PERUSSE, R.; TURCOTTE, J.Y. (1992) Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: Part III. Pharmacologic interactions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 74, n. 5, p. 692-697.

GRANT, G.J.; VERMEULEN, K.; LANGERMAN, L.; ZAKOWSKI, M.; TURNDORF, H. (1994). Prolonged analgesia with liposomal bupivacaine in a mouse model. **Reg. Anesth.**, v. 19, n. 4, p. 264-269.

GRANT, G.J.; LAX, J.; SUSSER, L.; ZAKOWSKI, M.; WEISSMAN, T.E.; TUNDORF, H. (1997). Wound infiltration with liposomal bupivacaine prolongs analgesia in rats. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, v. 41, p. 204-207.

GRANT, G.J.; DAVIDSON, E.M.; BARENHOLZ, Y. (2001). Liposomal bupivacaine produces prolonged analgesia in humans. **Anesthesiol.**, v. 95, A926.

GRANT G.J.; BARENHOLZ Y.; PISKOUN B.; BANSINATH M.; TURNDORF H.; BOLOTIN E.M. (2001). DRV liposomal bupivacaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation in mice. **Pharm. Res.**, v. 18, p. 336-343.

GRANT, G.J. ; BARENHOLZ Y.; BOLOTIN E.M.; BANSINATH M.; TURNDORF H.; PISKOUN B.; DAVIDSON, E.M. (2004). A Novel Liposomal Bupivacaine Formulation to produce Ultralong-Acting Analgesia. **Anesthesiology**, v. 101, p. 133-137.

GREGORIADIS, G. (1999) Commentary: Liposomes: the future ahead. **J. Liposome Research**, v. 9, n. 2, p. xvii-xviii.

GROBAN L. (2003). Central nervous system and cardiac effects from long-acting amide local anesthetic toxicity in the intact animal model. **Reg. Anesth. Pain Med.**, v. 28, n. 1, p. 3-11.

GUPTA, S. P. (1991). Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. **Chem. Rev.**, v. 91, p. 1109-1119.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. (1998). **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

HASSAN, H. G.; RENCK, H.; LINDBERG, B.; ÅKERMANN, B.; HELLQUISTE, R. (1985a). Effects of adjuvants to local anesthetics on the duration. I. Studies of dextrans of widely varying molecular weight and adrenaline in rat infraorbital nerve block. **Acta Anaesth. Scand.**, v. 29, p. 375-379.

HASSAN, H.G.; RENCK, H.; LINDBERG, B.; LINDQUISTE, B.; ÅKERMANN, B. (1985b). Effects of adjuvants to local anesthetics on the duration. II. Studies of some substituted dextrans and other macromolecules in rat infraorbital nerve block. **Acta Anaesth. Scand.**, v. 29, p. 380-383.

HAYASHI, I.; ISHIHARA, K.; KUMAGAI, Y.; MAJIMA, M. (2001). Proinflammatory characteristics of a nonpeptide bradykinin mimic, FR190997, in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, p. 1296-1306.

HEAVNER, J.E. (2003). Toxicity of anaesthetics. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 17, p. 1-3.

HUBBELL, W.L.; MCCONNELL, H.M. (1971). Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 93, p. 314-320.

HUNG, O. (2006). Drug transformation: advances in drug delivery systems. **Can. J. Anesth.**, v. 53, n. 11, p. 1074-1077.

ISEN, D.A. **Local anaesthetic technique**. Disponível em: <<http://www.septodont.ca>>. Acesso em: 19 set. 2006.

JEFFCOAT, M.K.; GEURS, N.C.; MAGNUSSEN, I.; MACNEILL, S.R.; MICKELS, N.; ROBERTS, F.; ROBINSON, P.; SALAMATI, A.; YUKNA, R. (2001). Intrapocket anesthesia for scaling and root planing: results of a double-blind multicenter trial using lidocaine prilocaine dental gel. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 7, p. 895-900.

KALICHMAN, M. W. (1993). Physiologic mechanisms by which local anesthetics may cause injury to nerve and spinal cord. **Reg. Anesth.**, v. 18, p. 448-452.

KATZUNG, B. G. (1998). **Farmacologia básica e clínica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

KIRBY, C.; GREGORIADIS G. (1984). Dehydration - Rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. **Biotechnology**, v. 2, p. 979-984.

KNUDSEN, J.; SUURKÜLA, M. B.; BOLMBERG, S.; SJÖVALL, J.; EDVARDSSON, N. (1997). Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. **Br. J. Anaesth.**, v. 78, p. 507-514

KOEHLER, A.; OERTEL, R.; KIRCH, W. (2005) Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacaine, prilocaine and ropivacaine in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1088, p. 126–130.

KRAMP, L.F; ELEAZER, P.D.; SCHEETZ J.P. (1999). Evaluation of prilocaine for the reduction of pain associated with transmucosal anesthetic administration. **Anesth. Prog. Spring**, v. 46, n. 2, p. 52-5.

KSHIRSAGAR, N.A.; PANDYA, S.K.; KIRODIAN, B.G.; SANATH S. (2005). Liposomal drug delivery system from laboratory to clinic. **J. Postgrad. Med.**, v. 51, p. 5-15.

KUZMA, P.J.; KLINE, M.D.; CALKINS, M.D.; STAATS, P.S. (1997). Progress In the development of ultra-long-acting local anesthetics. **Reg. Anesth.**, v.22, p. 543-551.

LAFONT, N.D.; LEGROS, F.J. (1994). Use of liposome associated bupivacaine for the management of a chronic pain syndrome. **Anesth. Analg.**, v. 79, p. 818.

LAFONT, N.D.; LEGROS, F.J.; BOOGAERTS, J.G. (1996). Use of liposome-associated bupivacaine in a cancer pain syndrome. **Anaesthesia**, v. 51, p. 578-579.

LANGAN, S.M.; COLLINS P. (2006). Randomized, double-blind, placebo-controlled prospective study of the efficacy of topical anaesthesia with a eutetic mixture of lignocaine 2.5% and prilocaine 2.5% for topical 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratoses. **Br. J. Dermatol.**, v. 154, n. 1, p. 146-149.

LEE, A.G.; SCHREIER, S. (1993). Binding of charged molecules to lipid bilayers. In: GREGORIADIS, G. (ed.). **Liposome technology**: Entrapment of drugs and other materials. Boca Raton: C.R.C. Vol. 2.

LESERMAN, L. D.; BARBET, J. (1982). **Methodologie des liposomes/ Liposome methodology**. Paris: Inserm.

LI, H-L.; GALUE, A.; MEADOWS, L.; RAGSDALE, D. S. (1999). A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. **Mol. Pharmacol.**, v. 55, p.134-141.

LISSI, E.; BIANCONI, M.L.; AMARAL, A.T.; DE PAULA, E.; BLANCH, L.E.B.; SCHEREIER, S. (1990). Methods for determination of partition coefficients based on the effect of solutes upon membrane structure. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1021, p. 46-50.

MAGNUSSON, I.; GEURS, N.C.; HARRIS, P.A.; HEFTI, A.F.; MARIOTTI, A.J.; MAURIELLO, S.M.; SOLER, L; OFFENBACHER, S. (2003). Intrapocket anesthesia for scaling and root planing in pain-sensitive patients. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 5, p. 597-602.

MALAMED, S. F. (2001). **Manual de anestesia local**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

MALINOVSKY, J.M.; BENHAMOU, D.; ALAFANDY, M.; MUSSINI, J.M.; COUSSAERT, C.; COUARRAZE, G.; PINAUD, M.; LEGROS, F.J. (1997). Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. **Anesth. Analg.**, v. 85, p. 1331-1336.

MALINOVSKY, J.M.; LE CORRE, P.; MEUNIER, J.F.; CHEVANNE, F.; PINAUD, M.; LEVERGE, R.; LEGROS, F.J. (1999). A dose-response study of epidural liposomal bupivacaine in rabbits. **J. Control. Release**, v. 60, p. 111-119.

MASHIMO T.; USHIDA I.; PACK M.; SHIBATA, A.; NISHIMURA, S.; INAGAKI, Y.; YOSHIYA, Y. (1992). Prolongation of canine epidural anesthesia by liposome encapsulation of lidocaine. **Anesth. Analg.**, v. 74, p. 827-834.

MCLEAN, C.; READER, A.L.; BECK, M.; MEYERS, W.J. (1993). An evaluation of 4% prilocaine and 3% mepivacaine compared with 2% lidocaine (1:100,000 epinephrine) for inferior alveolar nerve block. **J. Endod.**, v. 19, p. 146-503.

MCLURE, H.A.; RUBIN, A.P. (2005). Review of local anaesthetic agents. **Minerva Anesthesiol.**, v. 71, p. 59-74.

MEDYCAL ENCYCLOPEDIA. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus>>. Acesso em: 23 ago. 2006.

MEECHAN, J.G. (1999). Bespoke Analgesia for the young, the old and the unfit. In: THE LONDON INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LOCAL ANALGESIA IN DENTISTRY, 1999, London. **Proceedings...** London: Royal College of Surgeons of England. p.14-16.

MEECHAN, J.G.; COLE, B.; WELBURY, R.R. (2001). The influence of two different dental local anaesthetic solutions on the haemodynamic responses of children undergoing restorative dentistry: a randomised, single-blind, split-mouth study. **Br. Dent. J.**, v. 190, n. 9, p. 502-4

MEYERHOFF A., (1999). U.S. Food and Drug administration approval of AmBisome (liposomal Amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, p. 42-48, p. 49-51.

MONTAN, M.F.; SILVA, A.L.R.; COGO, K.; BERGAMASCHI, C.; VOLPATO, M.C.; RANALI, J.; DE PAULA, E.; GROPPPO, F.C. (2007). Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia in human oral mucosa. **Anesth. Analg.** (no prelo).

MOWAT, J.J.; MOK, M.J.; MACLEOD, B.A.; MADDEN, T.D. (1996) Liposomal bupivacaine. **Anesthesiology**, v. 85, p. 635-643.

MULROY, M.F. (2002). Systemic toxicity and cardiotoxicity from local anesthetics: Incidence and preventive measures. **Reg. Anesth. Pain Med.**, v. 27, p. 556-561.

MURAKAMI, C.S.; ODLAND, P.B.; ROSS B.K. (1994). Buffered local anesthetics and epinephrine degradation. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, v. 20, n. 3, p. 192-195.

NARAHASHI, T.; FRAZIER, D. T.; YAMADA, M. (1970). The site of action and active form of local anesthetics. I. Theory and pH experiments with tertiary compounds. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v. 171, p. 33-44.

NEAL, J.M. (2003) Effects of Epinephrine in Local Anesthetics on the Central and Peripheral Nervous Systems: Neurotoxicity and Neural Blood Flow. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 28, n. 2, p. 124-134.

NESTOR, M.S. (2006). Safety of occluded 4% liposomal lidocaine cream. **J. Drugs Dermatol.**, v. 5, n. 7, p. 618-620.

NEW, R.R.C. (1990). Liposomes: **a practical approach**. Oxford: IRL.

NIEMI, T.T.; NEUVONEN, P.J.; ROSENBERG, P.H. (2006). Comparison of ropivacaine 2mg ml(-1) and prilocaine 5 mg ml(-1) for i.v. regional anaesthesia in outpatient surgery. **Br. J. Anaesth.**, v. 96, n. 5, p. 640-644.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. (1979). Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351-358.

OLIVEIRA, N.S.; GAZOLA, R.; PATEZ, P.S.; SINGI, G. (2003). Effects of prilocaine and of the association of prilocaine with different vasoconstrictors on the isolated hearts of rats. **Pharmacol. Res.**, v. 48, n. 4, p. 325-328.

PAAVOLA, A.; YLIRUUSI, J.; KAJIMOTO, Y.; KALSO, E.; WAHLSTRÖM, T.; ROSENBERG, P. (1995). Controlled Release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 1997-2002.

PERUSSE, R.; GOULET, J.P.; TURCOTTE, J.Y. (1992a). Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: Part I. Cardiovascular diseases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 74, n. 5, p. 679-86.

PERUSSE, R.; GOULET, J.P.; TURCOTTE, J.Y. (1992b) Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: Part II. Hyperthyroidism, diabetes, sulfite sensitivity, cortico-dependent asthma, and pheochromocytoma. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol.**, v. 74, n. 5, p. 687-691.

PERUSSI, J. R.; RUGGIERO, A. C.; TABAK, M. (1985). O método de marcadores de spin aplicado a Bioquímica. **Química nova**, out., p. 313-324.

PINTO, L.M.A.; PEREIRA, R.; DE PAULA, E.; DE NUCCI, G.; SANTANA, M.H.A; DONATO, J.L. (2004). Influence of Liposomal-Local Anesthetics on Platelet Aggregation in vitro. **J. Liposome Res.**, v. 14, p. 51-59.

PINTO, L.M.A.; YOKAICHIYA, D.K.; FRACETO, L.F.; DE PAULA, E. (2000). Interaction of benzocaine with model membranes. **Biophys. Chem.**, v. 87, p. 213-223.

PIPA-VALEJO, A.; GARCIA-POLA-VALLEJO, M.J. (2004). Local Anesthetics in Dentistry. **Méd. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 9, p. 438-443.

RAGSDALE, D.S.; AVOLI, M. (1998). Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. **Brain Res. Rev.**, v. 26, p.16-28.

RAGSDALE, D.S.; MCPHEE, J.C.; SCHEUER, R., CATTERALL, W.A. (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 9270-9275.

RAGSDALE, D.S.; MCPHEE, J.C.; SCHEUER, R.; CATTERALL, W.A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. **Science**, v. 265, p. 1724-1728.

RANADE, V.V. (1989). Drug delivery systems. 1. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 29, p. 685-694.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. (2004). **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

READY, L.B.; FINK, B.R. (1980). Experimental evaluation of local anaesthetic solutions using rat infraorbital nerve block. **Can. Anaesth. Soc. J.**, v. 27, n. 1, p. 58-61.

ROSE P.G. (2005). Pegylated liposomal doxorubicin: optimizing the dosing schedule in ovarian cancer. **Oncologist**, v. 10, p. 205-214.

ROSE J.S.; NEAL J.M.; KOPACZ D.J. (2005). Extended-duration analgesia: update on microspheres and liposomes. **Reg. Anesth. Pain Med.**, v. 30, n. 3, p. 275-285.

SCHREIER, S.; POLNASZEK, C.F.; SMITH, I.C.P. (1978). **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 515, p. 375-436.

SEIDEN, M.V.; GORDON, A.N.; BODURKA, D.C. et al. (2004). A phase II study of liposomal lurtotecan (OSI-211) in patients with topotecan resistant ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 93, p. 229-232.

SHARATA, H.H.; KATZ, K.H. (1996). Liposomes. **Int. J. Dermatol.**, v. 35, p. 761-769.

SHAW, D.J. (1991). **Introduction to colloid & surface chemistry**. 4.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann.

SHIPPER G.; TEIXEIRA F.B.; ARNOLD R.R.; TROPE M. (2005). Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or resilon. **J. Endod.**, v. 31, n. 2, p. 91-96.

SINGH, R.; VYAS, S.P. (1996). Topical liposomal system for localized and controlled drug delivery. **J. Dermatol. Sci.**, v. 13, n. 2, p.107-111.

SIQUEIRA, J.T.; TEIXEIRA, M.J. (2001). **Dor orofacial** - Diagnóstico, terapêutica e qualidade de vida. Curitiba: Ed. Maio.

SISK, A. L. (1992). Vasoconstrictores in local anesthesia for dentistry. **Anesth. Prog.**, v. 39, p. 187-193.

SPEIRS, A.F.; TAYLOR, K.H.; JOANES, D.N.; GIRDLER, N.M. (2001). A randomised, double-blind, placebo-controlled, comparative study of topical skin analgesics and anxiety and discomfort associated with venous cannulation. **Br. Dent. J.**, v. 190, n. 8, p. 444-449.

STRICHARTZ, G.R. (ed.) (1987). **Local Anesthetics**. Berlin: Springer-Verlag. (Handbook of experimental pharmacology, 81).

STRICHARTZ, G.R.; SANCHEZ, V.; ARTHUR, G.R.; CHAFETZ, R.; MARTIN, D. (1990). Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured Octanol:Buffer partition Coefficients and pKa Values of Clinically Used Drugs. **Anesth. Analg.**, v. 71, p. 158-170.

SZTARK, F.; TUEUX, O.; ERNY, P.; DABADIE, P.; MAZAT, J.P. (1994). Effects of bupivacaine on cellular oxygen consumption and Adenine Nucleotide Metabolism. **Anesth. Analg.**, v. 78, p. 335-339.

SUNDAR, S. et al. (2003). Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. 800-804.

TADDIO, A.; SOIN, H.K.; SCHUH, S.; KOREN, G.; SCOLNIK, D. (2005). Liposomal lidocaine to improve procedural success rates and reduce procedural pain among children: a randomized controlled trial. **CMAJ**, v. 172, n. 13, p. 1691-1695.

TEIXEIRA, M.J. (2004). **Dor**: contexto interdisciplinar. Curitiba: Ed. Maio.

TORCHILIN, V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Rev. Drug-Discovery**, v. 4, p. 145-160.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. (2000). **Microbiologia**. 6.ed. São Paulo: Artes Médicas Sul.

VAN STEENBERGHE, D.; BERCY, P.; BOEVER, J.D.; ADRIAENS, P.; GEERS, L.; HENDRICKX, E.; ADRIAENSSEN, C.; ROMPEN, E.; MALMENÄS, M.; RAMSBERG, J. (2004). Patient evaluation of a novel non-injectable anesthetic gel: A multicenter cross-over study comparing the gel to infiltration anesthesia during scaling and root planing. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 11, p. 1471-1478.

VASTERS, F.G.; EBERHART, L.H.J.; KOCH, T.; KRANKE, P.; WULF, H.; MORIN, A.M. (2006). Risk factor for prilocaine-induced methaemoglobinaemia following peripheral regional anaesthesia. **Eur. J. Anaesthesiol.**, p. 1-6.

VOLPATO, M.C.; RAMACCIATO, J.C.; GROPPA, F.C.; RANALI, J. (2001). Avaliação clínica de três soluções anestésicas locais comerciais de prilocaína a 3% com felipressina. **Revista da APCD**, v. 55, n. 6, p. 405-408.

WAHL, M.J.; SCHMITT, M.M.; OVERTON, D.A. (2006). Injection pain of prilocaína plain, mepivacaína plain, articaine with epinephrine, and lidocaína with epinephrine. **Gen. Dent.**, v. 54, n. 3, p.168-171.

WAHL, M. J.; OVERTON, D.; HOWELL, J.; SIEGEL, E.; SCHMITT, M. M.; MULDOON M. (2001). Pain on injection of prilocaine plain vs. lidocaine with epinephrine. A prospective double-blind study. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 132, n. 10, p. 1396-401.

WILBURN-GOO, D.; LLOYD, L.M.(1999). When patients become cyanotic: acquired methemoglobinemia. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 130, n. 6, p. 826-31.

WINTER, C.A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G.W. (1962). Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Proceedings of Society for Biology and Medicine**, v. 3, p. 544-546.

YAGIELA, J.A.; NEIDLE, E.A.; DOWD, F.J. (2000). **Farmacologia e terapêutica para dentistas**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

YU H.Y.; SUN, P.; HOU, W.Y. (1998). Prolonged local anesthetic effect of bupivacaine liposomes in rats. **Int. J. Pharm.**, v.176, p.133-136.

YU H.Y.; LI S.D.; SUN, P. (2002). Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 54, p. 1221-1227.

ZAR, J. H. (1996). **Biostatistical Analysis**. 3.ed. New Jersey: Prentice Hall.

ZED, C.M.; EPSTEIN, J.; DONALDSON, D. (1996). Topical liposome encapsulated tetracaine versus benzocaine: a clinical investigation. **Journal of Dental Research**, v. 75, p. 247.

VIII. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Artigos científicos: publicados e submetidos

- **Cereda, C. M. S.**, Araujo, D. R., Brunetto, G. B., de Paula E. LIPOSOMAL PRILOCAINE: PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND IN VIVO EVALUATION. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, p. 235-240, 2004.
- **Cereda, C. M. S.**, Araujo, D. R. A., Brunetto, G. B., de Paula, E. LIPOSOMAL FORMULATIONS OF PRILOCAINE, LIDOCAINE AND MEPIVACAINE PROLONG ANALGESIC DURATION. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v.53, p.1092 – 1097, 2006.
- Araújo, D. R., **Cereda, C. M. S.**, Brunetto, G. B., Pinto, L. M. A., Santana, M. H. A., de Paula, E. ENCAPSULATION OF MEPIVACAINE PROLONGS THE ANALGESIA PROVIDED BY SCIATIC NERVE BLOCKADE IN MICE. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 51, p. 566-572, 2004.
- Araujo, D. R., **Cereda, C. M.**, Brunetto, G. B., Braga, A. F. A., de Paula, E. LOCAL ANESTHETIC ACTIVITY OF A LIPOSOMAL SYSTEM FOR ROPIVACAINE – SCIATIC AND INFRAORBITAL NERVE BLOCKADE STUDIES IN MICE AND RATS. Submetido à publicação no **Regional Anesthesia and Pain Medicine** (2006).

Resumos publicados em revistas indexadas

- **Cereda, C. M. S.**; Araújo, D. R.; Paula, E. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW LIPOSOMAL PRILOCAINE FORMULATION. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 299, 2003.
- **Cereda, C. M. S.**; Tofoli, G. R.; Paschoal, M. A.; Fraceto, L. F.; Araujo, D. R.; Paula, E. Liposomal prilocaine formulation: sterility, stability and local toxicity evaluation . **J Pharm Pharmaceut Sci., CSPS 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences proceedings**, 9(2), 2006.

Processo de patente & Transferência de tecnologia

- **Anestésicos locais encapsulados em lipossomas para formulações de liberação controlada (patente de processo requerida)**, protocolado no INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI), em 15.12.03, sob nº 6.257.

Participação em eventos

- **CSPS 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences**, Ottawa – Ontário , Canadá, 2006.
- **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ**, Águas de Lindóia – SP, 2006.
- **4º Seminário de Encerramento das Atividades da Segunda Fase da Rede de Nanobiotecnologia**, Campinas – SP, 2005.
- **The Network of Nanobiotechnology - Third meeting**. São Pedro - SP, 2005.
- **XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq**. Águas de Lindóia – SP, 2005.
- **Workshop: Educação em Bioquímica**. SBBq , Caxambu – MG, 2004.
- **XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE**. Águas de Lindóia – SP, 2004.
- **XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq**. Caxambu – MG, 2004.
- **4th Congress of Pharmaceutical Sciences**. Ribeirão Preto – SP, 2003.

Publicações em Anais de Eventos

- **Cereda, C. M. S.**, Tófoli, G.R., Araujo, D.R., Paula, E. LOCAL TOXICITY EVALUATION OF LIPOSOMAL LOCAL ANESTHETIC FORMULATIONS: PRILOCAINE AND MEPIVACAINE. **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ**, Águas de Lindóia – SP, 2006.
- Araujo, D. R.; **Cereda, C. M. S.**; Tófoli, G. R.; Fraceto, L. F.; Ranali, J.; Braga, A. F. A.; Paula, E. PHARMACOLOGICAL AND HISTOLOGICAL EVALUTION OF HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN-BUPIVACAINE INCLUSION COMPLEX. **Particles 2006: Medical/Biochemical Diagnostic, Pharmaceutical, and Drug Delivery Applications of Particle Technology**, Orlando-Florida, EUA, 2006.
- Almeida, A.C.P., Carvalho, F.D.G., **Cereda, C. M. S.**, Paula, E. IN VIVO EVALUATION OF A NOVEL LIPOSOMAL LIDOCAINE FORMULATION. **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ**, Águas de Lindóia – SP, 2006.
- Carvalho, F.D.G., Almeida, A.C.P., **Cereda, C.M.S.**, Paula, E. ROPIVACAINE HYDROXYPROPYL-CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEX: ANALGESIC PROPERTIES AS EVALUATED TROUGH THE INFRAORBITAL NERVE BLOCKADE TEST, IN RATS **XXXV Reunião Anual**

da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ, Águas de Lindóia – SP, 2006.

- **Cereda, C. M. S.; Araújo, D. R.; Brunetto, G. B.; Paula, E. ADVANTAGES OF LIPOSOME ENCAPSULATION OF PRILOCAINE, LIDOCAINE AND MEPIVACAINE. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ, Águas de Lindóia - SP. 2005.**
- **Cereda, C. M. S.; Araújo, D. R.; Brunetto, G. B.; Paula, E. LIPOSOMES AS DRUG CARRIERS FOR PRILOCAINE, LIDOCAINE AND MEPIVACAINE. 4º Seminário de Encerramento das atividades da segunda fase da Rede de Nanobiotecnologia, Campinas - SP. Livro de Resumos. 2005.**
- **Cereda, C. M. S.; Araújo, D. R.; Paula, E. ADVANTAGES OF LIPOSOMAL PRILOCAINE FORMULATION: DEVELOPMENT AND IN VIVO EVALUATION. The Network of Nanobiotecnology – Third meeting, São Pedro - SP. Notebook of summaries - THE NETWORK OF NANOBIOTECHNOLOGY - Third Meeting. 2005.**
- **Cereda, C. M. S.; Araújo, D. R.; Paula, E. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA IN VIVO DE UM SISTEMA LIPOSSOMAL PARA O ANESTÉSICO LOCAL PRILOCAÍNA. XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, Águas de Lindóia -SP. 2004.**
- **Araújo, D. R.; Cereda, C. M. S.; Hoffman, M. E.; Paula, E. MEPIVACAÍNA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS: AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL E EFEITOS CITOTÓXICOS. XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, Águas de Lindóia. 2004.**
- **Brunetto, G. B.; Cereda, C. M. S.; Araújo, D. R.; Paula, E. LIPOSOMAL LIDOCAINE FORMULATION: DEVELOPMENT AND BIOLOGICAL TESTS IN RATS. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ, Caxambú - MG. 2004.**
- **Cereda, C. M. S.; Araújo, D. R.; Brunetto, G. B.; Paula, E. LIPOSOMAL PRILOCAINE: IN VITRO RELEASE TESTS AND IN VIVO EVALUATION OF THE ANESTHETIC EFFECT. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ, Caxambú - MG. 2004.**
- **Alves, A. A.; Araújo, D. R.; Cereda, C. M. S.; Domingues, C. C.; Gandra, P. G.; Hohl, R.; Lazarim, F. L.; Preté, P. S. C.; Silva, F. O. C.; Souza, A. C. S.; Stancanelli, M.; Tessuti, L. S.; Macedo, D. V.; Paula, E. USING SUCROSE FOR THE GLUCOSE TOLERANCE TEST DETERMINATION IN BIOCHEMISTRY CLASSES. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ, Caxambú - MG. 2004.**

IX. ANEXOS



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEIA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEIA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 559-1, sobre "Formulações de liberação controlada do anestésico local prilocaína: preparação, caracterização e testes biológicos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula/Cíntia Saia Cereda está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEIA)-IB-UNICAMP em reunião de 06 de Junho de 2003.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 559-1, entitled "Controlled release formulations of the prilocaïne local anesthetic: preparation, characterization and biological tests", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on June 6, 2003.

Campinas, 06 de Junho de 2003.

Prof. Dra. Liana Verinaud
Presidente
CEEIA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
Caixa Postal 6109
CEP -13083-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

Fátima Alonso
Secretária Executiva
CEEIA/IB/UNICAMP

TELEFONE: (19) 3788-6359
FAX 55 19 32893124



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **654-1**, sobre "**FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DO ANÉSTICO LOCAL PRILOCAÍNA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E TESTES BIOLÓGICOS**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Eneida de Paula/Cíntia Maria Saia Cereda** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 11 de Março de 2004.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **654-1**, entitled "**CONTROLLED RELEASE OF THE LOCAL ANESTHETIC PRILOCAINE FORMULATIONS: PREPARATION, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL TESTS**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 11, 2004.

Campinas, 11 de Março de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 816-1, sobre "FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DO ANESTÉSICO LOCAL PRILOCAÍNA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E TESTES BIOLÓGICOS" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula/Cintia Maria Saia Cereda está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de maio de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 816-1, entitled "CONTROLLED RELEASE OF THE LOCAL ANESTHETIC PRILOCAINE FORMULATIONS: PREPARATION, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL TESTS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on May 4, 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Campinas, 04 de maio de 2005.
Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

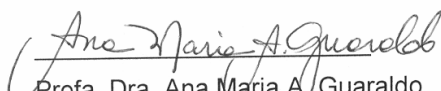
CERTIFICADO

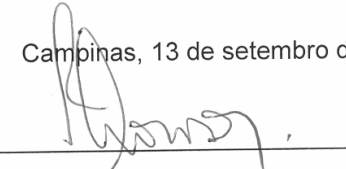
Certificamos que o Protocolo nº **871-1**, sobre "**FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ANESTÉSICOS LOCAIS: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, TESTES DE ATIVIDADE ANESTÉSICA E ESTUDO HISTOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA TOXIDADE LOCAL**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Eneida de Paula / Cíntia Maria Saia Cereda / Giovana Randomille Tófoli** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 13 de setembro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **871-1**, entitled "**CONTROLLED RELEASE FORMULATIONS OF LOCAL ANESTHETICS: PREPARATION, CHARACTERIZATION, LOCAL ANESTHETIC ACTIVITY TESTS, AND LOCAL TOXICITY EVALUATION BY HISTOLOGICAL STUDY**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 13, 2005.

Campinas, 13 de setembro de 2005.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP


Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP