

ANA LAÍS NASCIMENTO VIEIRA

**COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ANESTÉSICO LOCAL ROPIVACAÍNA EM
CICLODEXTRINA, ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS**

CAMPINAS

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA LAÍS NASCIMENTO VIEIRA

**COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ANESTÉSICO LOCAL ROPIVACAÍNA
EM CICLODEXTRINA,
ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ANA LAÍS NASCIMENTO VIEIRA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, área de Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. ENEIDA DE PAULA

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

V673c	<p>Vieira, Ana Laís Nascimento, 1981- Complexo de inclusão do anestésico local ropivacaína com ciclodextrina, encapsulado em lipossomas / Ana Laís Nascimento Vieira. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Eneida de Paula. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Anestésicos locais. 2. Ropivacaína. 3. Sistema ternário. 4. Lipossomos. 5. Ciclodextrinas. I. Paula, Eneida de, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Cyclodextrin inclusion complex of ropivacaine encapsulated in liposomes

Palavras-chave em Inglês:

Local anesthetics

Ropivacaine

Double-loading

Liposomes

Cyclodextrins

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Eneida de Paula [Orientador]

Silvia Stanisçuaski Guterres

Leonardo Fernandes Fraceto

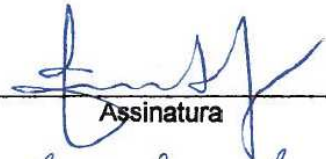
Data da defesa: 24-07-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 24 de julho de 2012

BANCA EXAMINADORA

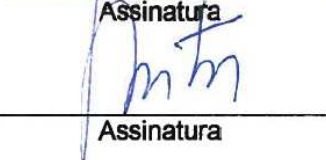
Prof.^a Dr.^a Eneida de Paula
(Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto


Assinatura

Prof.^a Dr.^a Silvia Stanisçuaski Guterres


Assinatura

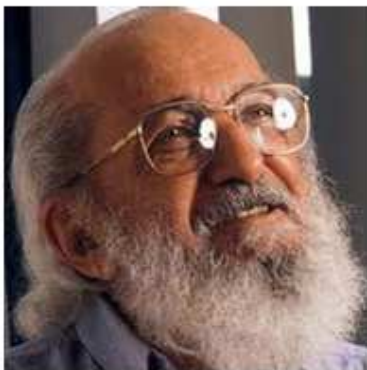
Prof. Dr. Cleyton Crepaldi Domingues

Assinatura

Prof.^a Dr.^a Milene Heloísa Martins

Assinatura

"Na Vida, não vale tanto o que temos,
Nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos,
Com aquilo que possuímos.
E acima de tudo, importa
O que fazemos de nós"



"Educação não transforma o mundo.
Educação muda pessoas.
Pessoas transformam o mundo."
(Paulo Freire)

À minha família, em especial, meus pais, José Lauro e Claudete, meus irmãos, Saulo e Laura, por acreditarem no meu sonho e serem a base da minha vida;

Ao Vô Pedro (*in memoriam*) que sempre apoiou os estudos;

Ao Du, pela confiança, carinho e apoio.

Agradeço primeiro a Deus, sem Ele eu nada seria;

Aos meus pais, José Lauro e Claudete, aos quais tenho a maior admiração do mundo. Eu amo muito vocês e sou grata por todo o amor que me dedicaram a vida toda. Obrigada por tudo o que eu sou e por me apoiarem e confiarem em mim SEMPRE!

Aos meus irmãos Saulo e Laura, aos meus cunhados Alexandre e à Valéria, pelo carinho, confiança e apoio!!

Ao meu esposo e amigo Du, pela paciência, companheirismo e por me dar força quando às vezes eu achava que não ia dar conta!!

Ao Vovô Pedro (*in memorian*) pelo incentivo de SEMPRE!

À Vó Ana (*in memorian*), que mesmo não tendo convivido com ela, me trazia paz nos momentos de ansiedade, sempre que eu tocava ou ouvia “Ave Maria”;

Aos meus tios, primos, avós e agregados por acreditarem em mim sempre.

À UNICAMP pelas oportunidades e experiências;

À UNIFAL onde me formei em Farmácia e me incentivou aos estudos e à pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e CAPES pelo apoio financeiro;

À Cristália Indústria Química e Farmacêutica, pelo fornecimento dos anestésicos locais para a realização deste trabalho;

À *Medley S/A Indústria Farmacêutica*, onde aprendi muito do que sou profissionalmente hoje e me possibilitou a continuidade aos estudos;

À *Althia S/A Indústria Farmacêutica*, onde trabalho atualmente pelo apoio no mestrado a aos meus superiores pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar para dar andamento ao projeto;

À *Profa. Dra. Eneida de Paula*, pela oportunidade, orientação, discussões, atenção. Obrigada por ajudar a concretizar meu sonho;

Ao *Prof. Dr. Nelson Duran e sua equipe*, por ceder o Laboratório de Nanotecnologia para utilização do *Light Scattering* para medidas de tamanho de partículas e potencial zeta;

Ao *Dr. Luís Fernando Cabeça*, que muito me ajudou com os estudos de RMN, MUITO OBRIGADA;

Ao *Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto* (Unesp/Sorocaba), *Prof. Dr. Marcelo Lancellotti* (Bioquímica/Unicamp), *Profa. Dr^a. Lucimara Gaziola de La Torre* (Engenharia de Materiais e Bioprocessos, FEQ/Unicamp), à *Dr^a. Milene Heloísa Martins* (Instituto de Química / Unicamp) e à *Prof^a. Dr^a. Silvia Stanisçuaski Guterres* (UFRGS) pelas importantes contribuições feitas na qualificação e defesa e que permitiram melhorar a qualidade da minha dissertação;

Ao *Dr. Francisco Carlos Groppo* (FOP/Unicamp) e *Dra. Maria Cristina Volpato* (FOP/Unicamp), pelas importantes discussões e orientações no Workshop temático;

À *Dra Daniele Ribeiro Araújo* (UFABC), por sempre tirar minhas dúvidas e me ajudar na realização deste trabalho;

À *Dra. Michelle Franz-Montan*, muito obrigada por me ajudar com os estudos de liberação;

À *Maribel*, sem ela eu não teria conduzido tão bem os estudos de citotoxicidade – cultura de células;

Ao *Márcio*, sempre muito organizado ajudando a todos no laboratório de Biomembranas, principalmente no preparo de formulações lipossomais, muito obrigada;

À *amiga Cíntia Cereda*, sempre ouvindo e aguentando pacientemente a minha lógica sistemática, de querer encontrar uma razão para todos os experimentos, milhões de questionamentos e aflições. Obrigada pela ajuda de sempre, pelo sorriso, exemplo e alegria!!

Vivi Guilherme, ainda bem que existe você para fazer os estudos com os camundongos!! Tudo pela ciência!! Coitadinhos!!! Sobrou pra eles!!!

À *Vivi Vieira*, essa que Deus colocou no mundo para nos alegrar e no meu caso, para ouvir minhas lamentações!! Mesmo que ela não queira, vai ser minha amiga pra SEMPRE!!!

Vivi Queiroz – detalhista, organizada e muito inteligente – “quando eu crescer quero ser como você”

Sheila - tantos sábados prolongados, lá estávamos nós, no pouco tempo que tínhamos para nos entregar à pesquisa!! Obrigada pela companhia!!

Allan, esse me ensinou muito sobre as medidas de tamanho de partículas e potencial zeta! Obrigada!

Cleyton, com sua graça deixava meus dias mais leves!! Obrigada por toda ajuda em meus momentos de desespero!!

Camila, super dedicada e que faz com amor o seu trabalho pela ciência!! Obrigada pelas imagens em microscopia eletrônica;

Mário, igualzinho a mim, ansioso pra fazer tudo acontecer e ver o resultado CERTO no final... agora rumo ao doutorado... JUNTOS!!!

Aos amigos e colegas do Biomembranas: Eneida, Cíntia, Dani, Giovana Tófoli, Raquel, Bruna, Sheila, Vivi Tseng, Vivi Vieira, Vivi Queiroz, Vivi Guilherme, Mário, Camila, Natálie, Grilo, Allan, Márcio, Maribel... agradeço a todos pela amizade, risadas, troca de experiências, aprendizado... foram muitos momentos inesquecíveis!!!

À todos, que de uma forma ou de outra, fizeram parte desta minha trajetória...

MUITO OBRIGADA!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ÍNDICE DE TABELAS.....	5
RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Dor.....	10
1.2 Anestésicos locais	10
1.3 Ropivacaína.....	12
1.4 Ciclodextrinas	14
1.5 Lipossomas.....	17
1.6 Sistema binário: RVC em HP-βCD.....	20
1.7 Sistema binário: RVC em lipossomas	21
1.8 Sistema de duplo carregamento: anestésico em ciclodextrinas em lipossomas....	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Justificativa.....	25
2.2 Objetivos Gerais.....	25
2.3 Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Fármacos, sais e solventes.....	28
3.2 Equipamentos.....	28
3.3 Quantificação da ropivacaína	29
3.3.1 Validação da metodologia analítica.....	29
3.3.1.1 Seletividade/Especificidade e Pureza de Pico	29
3.3.1.2 Linearidade.....	30
3.3.1.3 Exatidão	31
3.3.1.4 Precisão	31

3.3.1.5 Robustez.....	32
3.3.1.6 Estabilidade das soluções contendo RVC (padrão e amostra).....	33
3.4 Preparo das formulações.....	33
3.4.1 Complexos de inclusão de RVC em HP- β ciclodextrina (1:1).....	33
3.4.2 Lipossomas.....	33
3.5 Caracterização das formulações.....	34
3.5.1 Medida da concentração total de fosfolipídios.....	34
3.5.2 Distribuição de tamanho e Potencial Zeta – lipossomas	35
3.5.3 Eficiência de encapsulação e coeficiente de partição da RVC em lipossomas	36
3.5.4 Avaliação da associação da RVC com ciclodextrina e lipossomas, por RMN..	38
3.5.5 Morfologia das formulações: Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	40
3.6 Medidas da estabilidade físico-química dos componentes estruturais em lipossomas	40
.....	40
3.6.1 Estimativa da oxidação de fosfolipídios.....	40
3.6.2 Medidas de tamanho e potencial Zeta.....	43
3.7 Teste de liberação <i>in vitro</i>	43
3.8 Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i>	44
3.8.1 Cultivo e tratamento das células.....	44
3.9 Ensaio <i>in vivo</i> : avaliação farmacológica	46
3.9.1 Avaliação do bloqueio motor do nervo ciático	47
3.9.2 Avaliação do bloqueio sensorial do nervo ciático	47
3.10 Análise Estatística	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Quantificação da ropivacaína por absorção no UV com CLAE	50
4.1.1 Validação da metodologia analítica.....	50
4.1.1.1 Seletividade.....	51
4.1.1.2 Linearidade.....	53
4.1.1.3 Exatidão	54
4.1.1.4 Precisão	54

4.1.1.5 Robustez.....	54
4.1.1.6 Estabilidade do método de quantificação de ropivacaína	56
4.2 Caracterização da nova formulação de RVC para liberação sustentada.....	57
4.2.1 Distribuição de tamanho e potencial Zeta dos lipossomas	57
4.2.2 Eficiência de encapsulação e coeficiente de partição da RVC nos lipossomas.....	61
4.2.3 Avaliação da interação de RVC com ciclodextrina e com lipossomas, analisada por RMN.....	63
4.2.4 Morfologia das formulações: análise por microscopia eletrônica de transmissão.....	65
4.3 Estabilidade físico-química dos lipossomas na formulação	68
4.3.1 Medidas de peroxidação lipídica.....	68
4.3.2 Medidas de tamanho e potencial Zeta.....	70
4.4 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	72
4.5 Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i>	75
4.6 Ensaios <i>in vivo</i> : Avaliação farmacológica.....	77
4.6.1 Avaliação do bloqueio motor do nervo ciático	77
4.6.2 Avaliação do bloqueio sensorial do nervo ciático	78
5. CONCLUSÕES	83
6. PERSPECTIVAS.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
8. ANEXO	97

LISTA DE ABREVIações

AL: anestésico (s) local (is)

A ou Abs: absorbância

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

α -toc: alfa tocoferol

CHOL: colesterol

EPC: Fosfatidilcolina de ovo

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

RVC: ropivacaína

BVC: Bupivacaína

RVC:HP- β CD : complexo de inclusão de ropivacaína com hidroxipropil β -ciclodextrina

CD: ciclodextrina (s)

HP- β CD: hidroxipropil β -ciclodextrina (s)

LUV: lipossomas unilamelares de EPC

MLV: lipossomas multilamelares de EPC

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio

LUV:RVC: ropivacaína lipossomal de EPC

LUV:RVC:HP- β CD: complexo inclusão de ropivacaína com hidroxipropil β -ciclodextrina encapsulado em lipossomas de EPC (sistema de duplo carregamento ou ternário)

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TEP: Tetraetoxipropano

CEMIB: Centro de Bioterismo da UNICAMP

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

ASC: Área sob a curva

T_{máx}: Tempo para o efeito máximo

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de alguns ALs do tipo amino-amida de uso clínico (adaptado de (Strichartz & RITCHIE, 1987)).....	12
Figura 2 – Representação esquemática de α -CD (a), β -CD (b) e γ -CD (c) – (adaptado de (Davis & Brewster, 2004)).....	15
Figura 3 – Estrutura geral das principais ciclodextrinas modificadas, derivadas da β -CD – (adaptado de (Rajewski & Stella, 1996)).....	16
Figura 4 - Representação esquemática da organização de um lipossoma unilamelar (A) e multilamelar (B), remetendo as possíveis formas de inserção de compostos hidro, lipo e anfifílicos (de Araújo et al., 2003).....	17
Figura 5 - Representação esquemática das alterações químicas em fosfolipídios com consequente alteração na permeabilidade dos lipossomas – (adaptado de (Torchilin, 2005)).....	42
Figura 6 – Curva de calibração de TEP utilizada para o cálculo de peroxidação lipídica das formulações avaliadas.....	43
Figura 7 - Representação do sistema usado nos ensaios para determinação da cinética de liberação de fármacos. A= Compartimento doador (amostra), B= compartimento receptor , C= barra magnética para agitação, D= local de retirada das alíquotas e reposição de meio, E = membrana.....	44
Figura 8 – Estrutura química do MTT.....	45
Figura 9 – Cromatograma representativo de uma injeção de solução padrão de ropivacaína (coluna Purospher Star RP 18e, Fase Móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH 8,0 numa razão de 60:40 (v/v) e comprimento de onda de 240 nm, no equipamento Merck Hitach®, conforme detalhado em “Materiais e métodos” – item 3.3).....	50
Figura 10 – Cromatograma referente a uma injeção de solução placebo (A), padrão de ropivacaína (B) e amostra (C) (coluna Purospher Star RP 18e, Fase Móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH	

8,0 numa razão de 60:40 (v/v) e comprimento de onda de 240 nm, no equipamento Merck Hitach®, conforme detalhado em “Materiais e métodos” – item 3.3)	51
Figura 11 – Recuperação da solução amostra frente à solução padrão (n=3).....	52
Figura 12 – Pureza cromatográfica referente à solução padrão de ropivacaína (coluna Purospher Star RP 18e, Fase Móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH 8,0 numa razão de 60:40 (v/v) e comprimento de onda de 240 nm, no equipamento Merck Hitach®, conforme detalhado em “Materiais e métodos” – item 3.3)	52
Figura 13 – Pureza cromatográfica referente à solução amostra (coluna Purospher Star RP 18e, Fase Móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH 8,0 numa razão de 60:40 (v/v) e comprimento de onda de 240 nm, no equipamento Merck Hitach®, conforme detalhado em “Materiais e métodos” – item 3.3)	53
Figura 14 – Curva de calibração para ropivacaína (r = 0,99996), medida por absorção em UV em 240nm, por CLAE, conforme descrito no item 3.3.1.2 de “Materiais e Métodos”.....	53
Figura 15 – Avaliação de Robustez do método analítico: (A) alteração de temperatura; (B) alteração de fluxo de fase móvel e (C) alteração de proporção da fase móvel (n=3).....	55
Figura 16 – Estabilidade – porcentagem de recuperação da solução padrão de ropivacaína, medida por até 48 h após preparo (n=3).....	56
Figura 17 – Estabilidade – porcentagem de recuperação da solução amostra de ropivacaína, acompanhada por até 48h após preparo (n=3).....	56
Figura 18 – Distribuição de tamanho por intensidade de luz espalhada da vesícula lipossomal de EPC:α-tocoferol (1:0,01 mol %) após encapsulação do complexo de inclusão RVC:HP-βCD.....	58
Figura 19 – Medida do potencial zeta da vesícula lipossomal de EPC:α-tocoferol (1:0,01 mol %) após encapsulação do complexo de inclusão RVC:HP-βCD.....	60
Figura 20 – Imagem de MET para: suspensão lipossomal de EPC sem AL - Aumento de 60000x (A); lipossoma de EPC sem AL - Aumento de 100000x (B); suspensão lipossomal de EPC contendo	

ropivacaína - Aumento de 60000x (C); lipossoma de EPC contendo RVC – Aumento de 100000x (D); suspensão lipossomal de EPC contendo o complexo de inclusão RVC:HP-βCD - Aumento de 60000x (E) e lipossoma de EPC contendo o complexo RVC:HP-βCD - Aumento de 100000x (F) - todas as formulações foram preparadas contendo 8mM do AL e dos carreadores..... 66

Figura 21 – Esquema da possível formação do sistema de duplo carregamento proposto (LUV:RVC:HP-βCD)..... 67

Figura 22 – Concentração de endoperóxidos medida pelo teste de TBA na formulação LUV: RVC ao longo de 60 dias de armazenamento a 4, 25 e 37°C..... 69

Figura 23 – Concentração de endoperóxidos medida pelo teste de TBA na formulação LUV:RVC:HP-βCD ao longo de 60 dias de armazenamento a 4, 25 e 37°C..... 69

Figura 24 – Liberação cumulativa para as formulações RVC livre; RVC:HP-βCD ; LUV:RVC e LUV:RVC:HP-βCD a partir de sistemas em pH 7,0 e 37 °C; [RVC]=8 mM, [EPC]=8 mM e [HP-βCD]=8 mM. Dados representados como médias±PD (n=3)..... 73

Figura 25 – Ensaio de viabilidade celular em fibroblastos 3T3 em cultura, após tratamento com RVC livre, ou carregada: na forma de complexo de inclusão com HP-βCD, encapsulada em lipossomas de EPC ou no sistema de duplo carregamento LUV:RVC:HP-βCD..... 76

Figura 26 – Efeito anestésico x tempo no ensaio PWTP para os grupos tratados com RVC; RVC:HP-βCD; LUV:RVC e LUV:RVC:HP-βCD) – todas as formulações contendo RVC na concentração final de 0,125%..... 79

Figura 27 – Efeito anestésico x tempo no ensaio PWTP para os grupos tratados com RVC; RVC:HP-βCD; LUV:RVC e LUV:RVC:HP-βCD – todas as formulações contendo RVC na concentração final de 0,25%..... 80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas e farmacocinéticas da ropivacaína.....	14
Tabela 2: Formulações lipossomais aprovadas para uso clínico.....	19
Tabela 3 – Parâmetros de adequabilidade obtidos na corrida cromatográfica de ropivacaína usando uma coluna Purospher Star RP 18e.....	50
Tabela 4 – Recuperação média para o teste de exatidão de quantificação da RVC por CLAE.....	54
Tabela 5 – Coeficiente de variação para o parâmetro Precisão, no teste de quantificação da RVC por CLAE.....	54
Tabela 6: Diâmetro médio das vesículas lipossomais de EPC: α -tocoferol (1:0,01 mol %) extrudadas (média \pm DP), contendo ou não RVC encapsulada (n=3). T = 25°C	59
Tabela 7: Medidas de potencial zeta das vesículas lipossomais de EPC: α -tocoferol (1:0,01 mol %) extrudadas (média \pm DP), contendo ou não RVC encapsulada (n=3).....	61
Tabela 8- Eficiência de encapsulação e partição de RVC (livre e na forma de complexo de inclusão) em MLV (n = 3).....	62
Tabela 9 – Coeficientes de Difusão (D) da RVC, HP- β CD e lipossomas de EPC e constantes de associação (Ka) da RVC nos sistemas binários: RVC:HP- β CD , LUV:RVC e sistema de duplo carramento (ternário) LUV: RVC:HP- β CD medidos em experimentos de DOSY-RMN.....	64
Tabela 10- Diâmetro médio das partículas lipossomais (EPC: α -tocoferol 1:0,01 mol %) sem e com RVC (livre ou na forma de complexo de inclusão com ciclodextrinas) medido por 60 dias após preparo, armazenadas a 4 °C e medidas por espalhamento dinâmico de luz (n = 3).....	10
Tabela 11- Potencial zeta das partículas lipossomais (EPC: α -tocoferol 1:0,01 mol %) sem e com RVC (livre ou na forma de complexo de inclusão com ciclodextrina) medido por até 60 dias de armazenamento a 4°C (n = 3).....	72

Tabela 12 - Latência, T_{máx}, tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (ASC) induzido pelas formulações de RVC livre e lipossomal (contendo RVC livre ou na forma de complexo de inclusão com HPβ-CD) durante o bloqueio do nervo ciático em camundongos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 7/grupo)..... 78

RESUMO

Os anestésicos locais (AL) são fármacos utilizados para o tratamento, alívio ou eliminação da dor crônica ou aguda. Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de prolongar sua duração de ação e reduzir sua toxicidade sistêmica, através do uso de diferentes carreadores, como lipossomas e ciclodextrinas. Essas novas formulações possibilitam a liberação sustentada do ativo no local de ação, prolongando o efeito anestésico, além de evitar picos de concentração plasmática, reduzindo sua toxicidade. A ropivacaína (RVC) é um AL de longa duração de ação, que é sintetizado na forma do estereoisômero S, de menor toxicidade para o sistema nervoso central e cardíaco. Estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram a complexação da RVC em hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β CD) (de Araujo et al., 2008b). Neste trabalho objetivamos: i) desenvolver uma formulação contendo complexo de inclusão de RVC em HP- β CD na razão molar de 1:1 e posteriormente, encapsulado em lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (EPC) contendo 1 mol% de α -tocoferol, ii) caracterizar esta nova formulação anestésica, comparando-a com as preparações comerciais deste fármaco, quanto à estabilidade e liberação sustentada do anestésico. Os lipossomas unilamelares grandes (LUV) compostos por fosfatidilcolina de ovo e α -tocoferol (1,0:0,01 – razão molar) foram preparados por extrusão, em pH 7,0. A formulação lipossomal foi caracterizada quanto à eficiência de encapsulação com a obtenção de valores de porcentagem de encapsulação da RVC de $33,0 \pm 2,4$ % e coeficiente de partição de 102,1. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear com variação de campo magnético (*diffusion ordered spectroscopy*, DOSY) demonstraram a interação molecular da RVC tanto com a ciclodextrina (constante de associação, K_a RVC:HP- β CD = 128 M^{-1}) quanto com os lipossomas (K_a LUV:RVC = 22 M^{-1}). No sistema de duplo carregamento (LUV:RVC:HP- β CD) a constante de associação foi maior que nos sistemas binários RVC:HP- β CD e LUV:RVC (2,6 e 1,7 vezes, respectivamente) indicando que este novo sistema de liberação sustentada é capaz de aumentar ainda mais a quantidade de ropivacaína carregada. O tamanho dos lipossomas ($220,2 \pm 20,3$ nm) e o potencial zeta ($-31,7 \pm 1,4$ Mv) não se alteraram com a adição do anestésico. As formulações foram acompanhadas por 60 dias, em termos de peroxidação lipídica e tamanho das vesículas: os níveis de peroxidação mostraram-se baixos (menor que 1% do total de lipídios da formulação) e as vesículas tiveram um comportamento estável em relação ao tamanho por até 30 dias de armazenamento a 4°C. Ensaio de liberação *in vitro*, demonstraram menor velocidade de liberação da RVC quando na forma de complexo de inclusão em ciclodextrinas e encapsulada nos lipossomas, em relação à RVC livre. Testes de toxicidade *in vitro*, em culturas de células de fibroblastos 3T3 revelaram que a RVC livre induz morte celular de maneira concentração dependente; efeito este que foi parcialmente revertido com incubação das células com o sistema de duplo carregamento LUV:RVC:HP- β CD, indicando menor potencial tóxico para a formulação proposta. Ensaio de bloqueio sensorial *in vivo* (teste de pressão na pata, em camundongo) mostraram uma ação analgésica prolongada da RVC encapsulada no sistema de duplo carregamento (até 300 min para 0,25% LUV:RVC:HP- β CD), quando comparado ao fármaco livre (180 min) e sistema binário LUV:RVC (240 min). Em geral, o efeito da analgesia para o sistema de duplo carregamento proposto foi cerca de 1,6 vezes maior em relação ao fármaco livre e 1,3 vezes maior em relação ao sistema lipossomal binário. Os resultados obtidos contribuem com a investigação, pesquisa e caracterização de formas farmacêuticas de liberação sustentada e demonstram regulação da cinética de liberação da RVC quando do uso conjugado desses dois carreadores (lipossoma de EPC e HP- β CD) em sistema de liberação sustentada de anestésico local, abrindo perspectivas para justificar o uso clínico.

ABSTRACT

Local anesthetics (LA) are medicines used for the treatment, alleviation or elimination of acute or chronic pain. Many studies have been carried out aiming to prolong LA duration of action and to reduce their systemic toxicity by the use of carrier systems such as liposomes and cyclodextrins. Such formulations allow the sustained release of the LA at the site of action, prolonging the anesthetic effect and avoiding peak plasma concentrations, thus reducing LA toxicity. Ropivacaine (RVC) is a long acting LA, synthesized in the S enantiomer form which is less toxic to the Central nervous and Cardiac systems. Previous work from our lab has shown the complexation of RVC in hydroxipropyl-beta-cyclodextrin (HP- β CD) (de Araujo et al., 2008b). The present work aimed: i) the development of a formulation containing RVC in HP- β CD inclusion complex in a 1:1 mole % ratio and subsequently encapsulated into egg phosphatidylcholine plus 1 mol% α -tocopherol liposomes; ii) the characterization of that formulation, comparing it with commercial preparations of RVC, regarding the stability and sustained release of the anesthetic. Large unilamellar liposomes (LUV) composed of egg phosphatidylcholine and α -tocopherol (1,0:0,01 mol %) were prepared by extrusion, at pH 7.0. The liposomal formulation was characterized with respect to encapsulation efficiency ($33.0 \pm 2.4\%$) corresponding to partition coefficient of 102.1. Nuclear magnetic resonance (*diffusion ordered spectroscopy*, DOSY) experiments clearly demonstrated the molecular interaction between RVC and the HP- β CD (association constant, K_a RVC:HP- β CD = 128 M^{-1}) and liposomes (K_a LUV:RVC = 22 M^{-1}). In the ternary system LUV:RVC:HP- β CD a stronger association was detected ($K_a = 2.6$ and $1.7 \times$ higher than in the binary RVC:HP- β CD e LUV:RVC systems, respectively), pointing out the increased RVC loading capacity of the new drug-delivery system. The size of the vesicles ($220.2 \pm 20.3 \text{ nm}$), and zeta potential of the liposomes ($-31.7 \pm 1.4 \text{ Mv}$) were not changed by the incorporation of the anesthetic. The formulations were followed by 60 days in terms of lipid peroxidation and size of vesicles: peroxidation were shown to be low (less than 1% of total lipids in the formulation) and the vesicles remained stable in relation to their size up to 30 days of storage at 4°C . Release kinetics experiments revealed a decrease in the release of RVC when in the inclusion complex with HP- β CD and when encapsulated into the liposomes, relatively to free RVC, Cytotoxicity assays *in vitro*, over cultures of 3T3 fibroblast cells showed that RVC was able to induce cell death in a concentration dependent manner and that this effect was partially reverted if cells were incubated with double-loading LUV:RVC:HP- β CD system. *In vivo* sensory block experiments (paw withdraw threshold to pressure in rats) showed a prolonged anesthetic effect for RVC in the ternary system (300 min) in comparison to free RVC (180min) and binary system LUV:RVC (240min). In general, pain relief effect of the double-loading system was longed about 1.6 times than that of free RVC and 1.3 times when compared to the liposomal binary system. The results obtained were important in the research, study and characterization of controlled release dosage forms and show changes on the release kinetics of RVC following the combined use of two carriers (EPC liposomes and HP- β CD) in a delivery system among its future use in clinical practice.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor

O estudo da dor é, possivelmente, uma das maiores e mais importantes áreas da medicina, sendo que a dor pode ter como causas, desordens orgânicas ou até psicológicas (Carpenter & Dickenson, 2002). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), esta é uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou relacionada à lesão real ou potencial dos tecidos (SBED, 2012).

Apesar de incômoda, a dor desempenha uma função biológica essencial, pois é a resposta do organismo a um trauma real ou potencial. Porém, em algumas situações, o sofrimento doloroso perde sua função biológica e começa a representar uma consequência insuportável de desordens refratárias aos tratamentos (Stevens, 1992). A dor pode ser classificada em função da duração da lesão tecidual, em aguda ou de curta duração - que persiste apenas enquanto durar o dano - e crônica ou lenta - relacionada à lesões mais profundas (Siddall & Cousins, 1995).

Anestésicos locais são os agentes mais utilizados para controle da dor em procedimentos invasivos, porém os avanços nas pesquisas, básica e clínica têm expandido as opções na farmacoterapia da dor. Para pacientes com câncer ou dor neuropática, por exemplo, a farmacoterapia é a principal, senão a única saída para mantê-la sob controle. Além disso, a busca por novos agentes terapêuticos é uma abordagem interessante, além daquela de desenvolver outras formas farmacêuticas para compostos com atividade antinociceptiva já consagrada. Sistemas de liberação sustentada de fármacos podem melhorar a resposta terapêutica proporcionando níveis sanguíneos mais consistentes em relação aos medicamentos de liberação imediata ou de uso parenteral (Stevenson et al., 2012).

Pesquisas envolvendo liberação sustentada de anestésicos locais vêm mostrando o avanço na terapia da dor, bem como as vantagens (por exemplo, redução da toxicidade) do uso desses novos sistemas (Kuzma et al., 1997; Torchilin, 2005; de Paula et al., 2010; Wiles & Nathanson, 2010).

1.2 Anestésicos locais

O primeiro anestésico local descrito foi a cocaína, extraída das folhas de *Erythroxylon coca* em 1860 por Nieman, na Alemanha, que verificou que a mesma causava entorpecimento da língua (Catterall & Mackie, 1996). Em 1884 Koller a utilizou pela primeira vez para anestesia tópica do olho, familiarizando-se com os efeitos fisiológicos da cocaína, descritos posteriormente por Freud, ainda no final do século XIX (De Jong, 1994; Cox et al., 2003).

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, foi então, que em 1905, Einhorn e Braun sintetizaram a procaína, derivada do ácido para-aminobenzóico, mais hidrossolúvel e menos tóxica que a benzocaína, compatível com o uso sistêmico. (De Jong, 1994; Cox et al., 2003).

Em 1943, Löfgren sintetizou a lidocaína, derivada do ácido dietil-aminoacético, iniciando-se a era dos anestésicos locais tipo amida, que embora menos potentes que os amino-ésteres (Covino & Vassalo, 1985) são praticamente isentos das reações alérgicas tão comuns àqueles compostos (Collins, 1993). 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.

Os anestésicos locais (AL) são uma classe de fármacos capazes de induzir alívio da dor em virtude da sua capacidade de se ligar ao canal de sódio de membranas excitáveis, bloqueando assim, o influxo de íons sódio e a propagação do impulso nervoso (Covino & Vassalo, 1985); (Collins, 1993; HARVEY et al., 1998; MALAMED, 2001; Mura et al., 2007).

O bloqueio da condução nervosa é reversível, sendo que essa propriedade é uma consequência da inibição do processo de excitação-condução em nervos periféricos, após aplicação local e em concentrações adequadas. Um AL exerce sua ação reversível em qualquer tecido nervoso, podendo bloquear a passagem de impulsos tanto em fibras sensoriais quanto motoras, aliviando ou evitando a dor, o que contribui para a grande utilização desses fármacos na prática médica (Covino, 1986).

As características desejáveis para uma molécula anestésica são: a longa duração de ação, diminuição da toxicidade local e/ou sistêmica e aumento da seletividade para o bloqueio motor (de Araújo et al., 2003). Os anestésicos locais apresentam grande aplicação clínica em Medicina e Odontologia, sendo utilizados em bloqueios regionais, na indução de analgesia operatória e/ou pós-operatória, no tratamento da dor aguda e crônica e, até para tratar arritmias ventriculares (Carpenter & Dickenson, 2002).

Alguns anestésicos locais como lidocaína, bupivacaína, levobupivacaína e ropivacaína, foram introduzidos na terapia da dor aguda e crônica na tentativa de melhorar a ação dos fármacos já utilizados (Whiteside & Wildsmith, 2001). Uma alternativa, que vem promovendo os efeitos desejáveis é a liberação sustentada desses fármacos através da encapsulação em

lipossomas e/ou outros veículos (Kuzma et al., 1997);(de Araújo et al., 2003); (de Paula et al., 2010) como por exemplo, as ciclodextrinas.

Os ALs mais comumente usados em clínica são pertencentes à família das amino-amidas: bupivacaína, ropivacaína, lidocaína, mepivacaína e prilocaína (Koehler et al., 2005). A

Figura 1 (Strichartz & RITCHIE, 1987) ilustra alguns destes compostos.

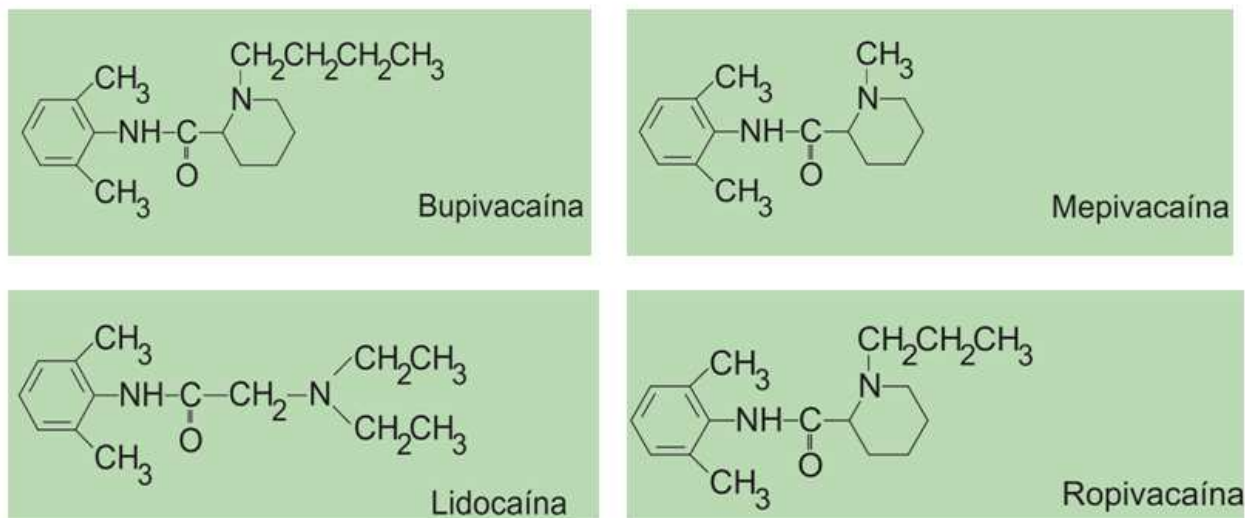


Figura 1 – Estrutura química de alguns ALs do tipo amino-amida de uso clínico (adaptado de (Strichartz & RITCHIE, 1987)).

1.3 Ropivacaína

A ropivacaína (RVC) é um anestésico local do tipo amino-amida com estrutura química relacionada à da mepivacaína e bupivacaína (compostos amino-amidas cíclicos – **Figura 1**). Apresenta como característica, uma larga duração de ação, com menor toxicidade cardiovascular e sobre o sistema nervoso central (SNC) que a bupivacaína (Zuo et al., 2004), este ultimo sendo o AL de escolha no Brasil e no mundo para procedimentos cirúrgicos de longa duração. Além disso, estudos realizados com animais e humanos, sugerem que a RVC produz menor bloqueio motor em relação à bupivacaína (BVC), dada sua maior seletividade sobre as fibras nervosas sensitivas (Cánovas Martínez et al., 2004), uma vez que é sintetizada e comercializada na forma do isômero S (McClure, 1996).

Pesquisas mostraram que a dose cumulativa de ropivacaína capaz de produzir parada cardíaca em ratos é de 108 ± 27 mg/kg, enquanto para levobupivacaína esta dose é de 57 ± 8 mg/kg e para a bupivacaína racêmica é de 39 ± 9 mg/kg. Além disso, após injeções

intravasculares de ropivacaína em voluntários saudáveis não foram relatados acidentes vasculares cerebrais ou alterações na duração dos intervalos e da frequência cardíaca (Leone et al., 2008).

Estudos indicam ainda que a RVC apresenta menor capacidade arritmogênica que a bupivacaína (potencial cardiotoxíco 1:2, RVC:BVC) (Aguilar et al., 1999; Dony et al., 2000; Wang et al., 2001). Comparando-se os efeitos neuro e cardiotoxícos, as convulsões induzidas por RVC tendem a se manifestar mais lentamente que aquelas por BVC, e são anteriores às arritmias cardiovasculares; fato este não observado após o tratamento com BVC, onde a toxicidade cardiovascular manifesta-se antes de qualquer sinal de neurotoxicidade (Dony et al., 2000; Heavner, 2002). Estudos realizados em suínos mostraram que a ropivacaína causou menos repercussões hemodinâmicas do que a bupivacaína quando doses equivalentes foram injetadas por via venosa (Melo et al., 2009).

Com relação às propriedades físico-químicas, a ropivacaína tem pKa de 8,1, sua ligação às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 94%, e apresenta menor solubilidade lipídica que a bupivacaína (Cederholm, 1997). Estas e outras características físico-químicas e farmacocinéticas da ropivacaína podem ser visualizadas na **Tabela 1**. A RVC é biotransformada no fígado por diferentes isoenzimas do citocromo P-450, originando como metabólitos, encontrados em análises de urina humana: 3-hidroxi-ropivacaína, 4-hidroxi-ropivacaína, e 2-hidroximetilropivacaína, entre outros (Reif et al., 1998).

Estudos apontam a RVC como uma alternativa ao uso de BVC, justamente por induzir menor toxicidade sistêmica e promover maior grau de dissociação entre o bloqueio motor e sensorial, sendo útil na administração epidural, infiltração e alívio da dor pós-operatória (Whiteside & Wildsmith, 2001).

No presente estudo, ropivacaína foi escolhida devido as suas características, isto é, anestésico local de longa duração, disponível na forma do isômero-S puro, que apresenta menor toxicidade para o sistema nervoso central e sistema cardíaco (Kennedy et al., 2001) que o “anestésico de escolha”, bupivacaína. A RVC é o monoidrato do sal clorídrico de 1-propil-2,6-pipecoloxilidida e é sintetizada na forma enantiomérica S (100%), diferentemente dos outros anestésicos amino-amidas cíclicos, como bupivacaína e mepivacaína (**Figura 1**), que são comercializados como misturas racêmicas (McClure, 1996).

Tabela 1 – Características físico-químicas e farmacocinéticas da ropivacaína.

pKa (em solução de KCl 0,1M) ^a	8,07
Log P (n-octanol/ água) ^b	2,9
Volume de distribuição (L) ^c	59
Tempo de meia vida (min) ^c	111
<i>Clearance</i> (L/min) ^c	0,72
Ligação com as proteínas plasmáticas (%) ^{a,c}	94
Massa Molar da Base (g/mol) ^c	274,4
Massa Molar do cloridrato de RVC (g/mol) ^a	328,9
Solubilidade do cloridrato em água, a 25°C (mg/mL) ^a	53,8
Fórmula molecular do cloridrato de RVC ^a	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O•HCl•H ₂ O

De acordo com: (a) <http://www.rxlist.com/naropin-drug.htm>, consultado em 06 de abril de 2012; (b) <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>, consultado em 15 de abril de 2012; (c) (Leone et al., 2008).

1.4 Ciclodextrinas

Ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos de seis ou mais unidades de glicopiranosas unidas por ligações α-1,4 e correspondem a um dos carreadores de fármacos mais utilizados. CDs são capazes de formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas orgânicas, chamadas moléculas hóspedes (Loftsson & Duchêne, 2007).

As ciclodextrinas são produzidas a partir da degradação do amido pelas enzimas ciclodextrinas glicosiltransferases, presentes em diferentes microorganismos e plantas (Loftsson & Masson, 2001). As três ciclodextrinas naturais são a alfa (α-ciclodextrina), beta (β-ciclodextrina) e gama (γ-ciclodextrina) compostas de seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopiranosas, respectivamente (**Figura 2**). Esses agentes têm em sua estrutura grupos hidroxil primários e secundários, orientados para o exterior do anel macrocíclico, o que lhes confere um exterior hidrofílico, enquanto sua cavidade interna é relativamente hidrofóbica, que lhes permite a complexação com moléculas que apresentam dimensões e caráter hidrofóbico compatíveis com esta cavidade. A complexação altera propriedades físico-químicas, como a solubilidade em água, a estabilidade química e a biodisponibilidade dos compostos na forma de complexo de inclusão (McCormack & Gregoriadis, 1998; Pinto et al., 2005).

Em solução aquosa as CDs são capazes de solubilizar em água compostos lipofílicos através da inserção da parte lipofílica dos mesmos na sua cavidade central (porção apolar da CD), formando complexos de inclusão mais hidrofílicos que a molécula hóspede livre (Messner et al., 2010).

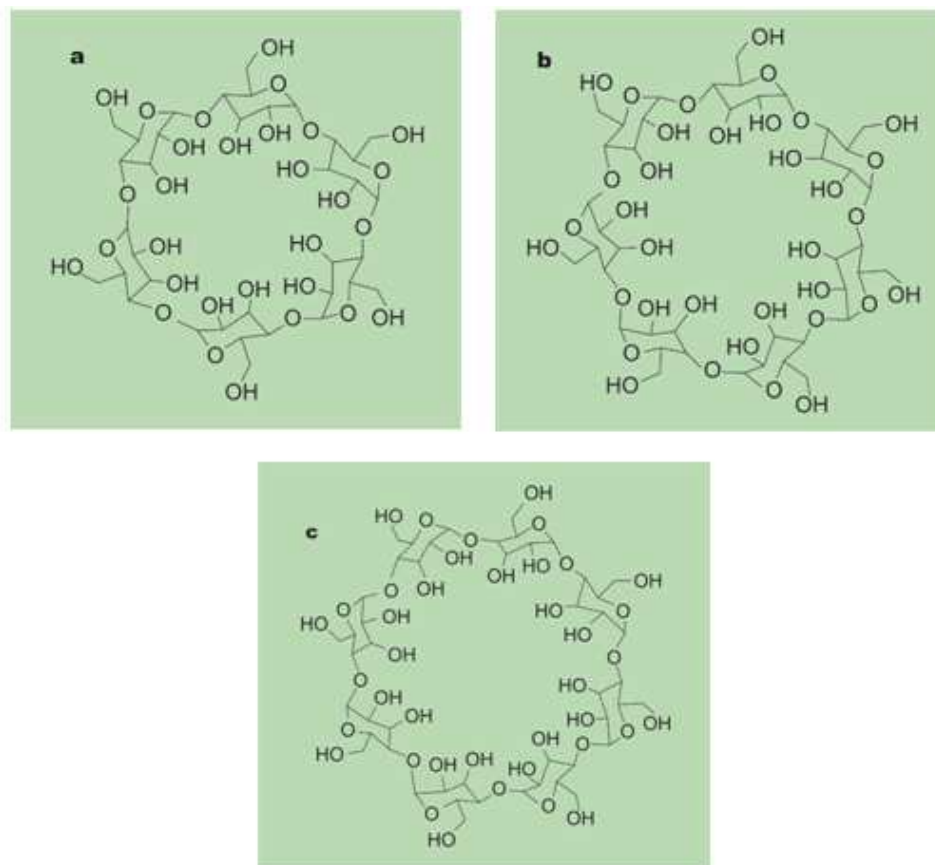


Figura 2 – Representação esquemática de α -CD (a), β -CD (b) e γ -CD (c) – (adaptado de (Davis & Brewster, 2004).

Entretanto, as ciclodextrinas naturais, em particular a β -ciclodextrina, têm solubilidade aquosa limitada (16,4 mM ou 18,6 mg/mL) e a formação de complexos com compostos lipofílicos geralmente resulta em precipitação dos complexos sólidos, se o limite de solubilidade for atingido. Assim, numerosas modificações na estrutura química das β -ciclodextrinas já foram feitas (**Figura 3**), originando derivados mais solúveis como 2,6-dimetil- β -ciclodextrina (DM- β -ciclodextrina), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -ciclodextrina) e ciclodextrinas sulfatadas como sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β -ciclodextrina) (Rajewski & Stella, 1996).

Esses derivados alquilados como a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD), têm atraído crescente interesse devido à melhora na sua capacidade complexante, melhor solubilidade aquosa e menor toxicidade (Dollo et al., 1998; Moraes et al., 2007).

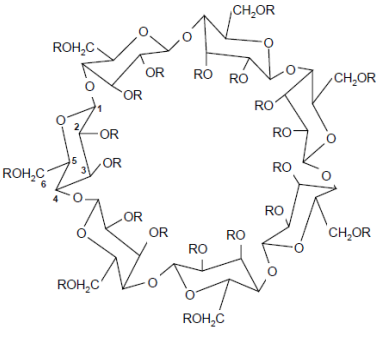
	<p>Nome / Sigla</p> <p>β-ciclodextrina (β-CD)</p> <p>Dimetil β-ciclodextrina (DMβ-CD)</p> <p>Hidroxipropil β-ciclodextrina (HPβ-CD)</p> <p>Sulfobutileter β-ciclodextrina (SBβ-CD)</p> <p>6-O-Glicosil-β-ciclodextrina (G₁β-CD)</p> <p>6-O-Carboximetil-O-etil-β-ciclodextrina (CMEβ-CD)</p>	<p>Grupo R *</p> <p>H</p> <p>CH₃ ou H</p> <p>CH₂CHOHCH₃ ou H</p> <p>(CH₂)₄SO₃Na ou H</p> <p>C₆H₁₂O₆ ou H</p> <p>CH₂COONa ou H</p>
---	--	--

Figura 3 – Estrutura geral das principais ciclodextrinas modificadas, derivadas da β -CD – (adaptado de (Rajewski & Stella, 1996).

* O grau de substituição pode ser variável.

Além da estabilização, a modificação da farmacocinética e das propriedades biofarmacêuticas dos compostos carregados são efeitos significativos da complexação com ciclodextrinas. Esses efeitos são observados especialmente na solubilidade aquosa e na cinética de liberação da molécula hóspede sob a forma de um complexo de inclusão molecular. Como consequência disso, a administração de fármacos na forma de complexo de inclusão com β -ciclodextrina altera a intensidade e a duração de seus efeitos, através da baixa absorção sistêmica dos fármacos aplicados localmente (de Araújo et al., 2003). Essas propriedades tornam o uso da complexação em ciclodextrinas, bastante promissor. Existem hoje, uma série de produtos na forma de complexo de inclusão com diferentes tipos de ciclodextrinas, tais como: albendazol, cloranfenicol, fluoxetina, indometacina, cetoprofeno, miconazol, nifedipino, piroxicam, tacrolimus, dentre outras que sugerem a alteração da farmacocinética de liberação do fármaco (Loftsson & Brewster, 2011).

Em estudos anteriores, o laboratório de Biomembranas avaliou formulações de anestésicos locais na forma de complexos de inclusão com ciclodextrinas obtendo bons resultados em termos de analgesia (Pinto et al., 2005; Fraceto et al., 2007; Moraes et al., 2007). No laboratório também foi realizado um estudo bem caracterizado de complexo de inclusão de RVC com HP- β CD (de Araujo et al., 2008b), em que a constante de associação entre RVC e HP- β CD foi de $9,5M^{-1}$, determinou-se a estequiometria de formação do complexo (1:1), com aumento da solubilidade do AL após obtenção do complexo de inclusão. O mesmo estudo revelou diminuição na taxa de liberação da RVC *in vitro*, redução dos efeitos hemolíticos do AL na forma de complexo de inclusão e maior efeito de bloqueio sensorial em animais. Esses resultados identificaram o complexo de inclusão de RVC com HP- β CD como eficaz para melhorar os efeitos farmacológicos da RVC (de Araujo et al., 2008b).

1.5 Lipossomas

Os lipossomas, descritos em 1963 por A. Bagham consistem de vesículas microscópicas de tamanhos variados (em escalas de nm a μm) que contem uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por compartimentos aquosos, em que as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior e as cabeças polares para o exterior da bicamada (**Figura 4**), mantendo contato com a fase aquosa (Ranade, 1989).

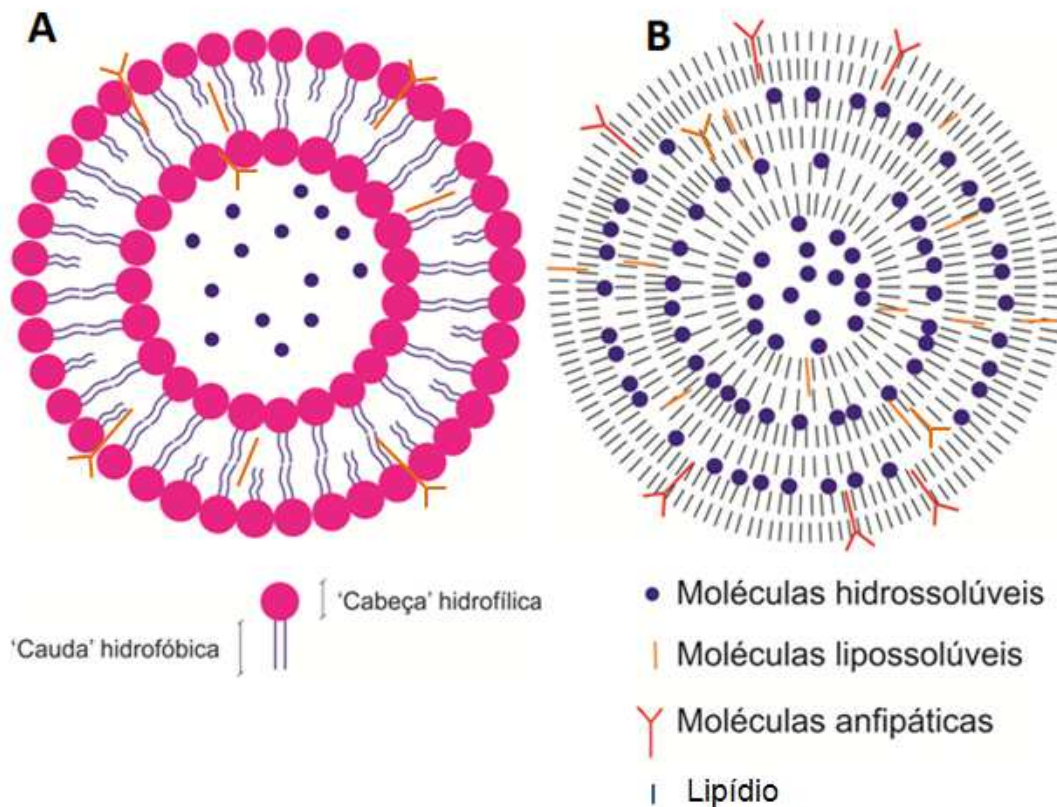


Figura 4 - Representação esquemática da organização de um lipossoma unilamelar (A) e multilamelar (B), remetendo as possíveis formas de inserção de compostos hidro, lipo e anfílicos (de Araújo et al., 2003).

Os lipossomas são classificados em relação ao tamanho e de acordo com o número de camadas lipídicas concêntricas que contêm, dentre os quais, podemos citar (EIDELMAN et al., 2005; Torchilin, 2005):

- Vesículas multilamelares grandes (MLV): consistem de várias bicamadas concêntricas e têm tamanho de 500 a 5000 nm;

- Vesículas unilamelares pequenas (SUV): formadas por uma simples bicamada e com tamanho em torno de 100 nm;
- Vesículas unilamelares grandes (LUV): têm unilameladas e variação no tamanho de 200 a 800 nm.

No presente trabalho, foram preparadas vesículas lipossomais multilamelares grandes (MLV) e unilamelares grandes (LUV) contendo fosfatidilcolina de ovo e α -tocoferol, cujo preparo está descrito em “Materiais e Métodos” - **item 3.4.2**.

As moléculas de fármacos podem ser encapsuladas no espaço aquoso interno do lipossoma ou ainda podem se intercalar entre os lipídios que compõem a bicamada, dependendo de suas características físico-químicas ou da composição dos lipídios que constituem o lipossoma (**Figura 4**).

A função dos lipossomas como veículos é liberar os fármacos nele encapsulados em alvos específicos, evitando a toxicidade sistêmica das substâncias que ficam disponíveis no local de ação (Grant & Bansinath, 2001). Tem sido relatado que os lipossomas podem regular os níveis sistêmicos de fármacos e serem endereçados para tecidos alvo (Malinovsky et al., 1997a). Além disso, lipossomas têm sido utilizados em imunoenaios (Rongen et al., 1997) e como sistemas de liberação sustentada para vários fármacos incluindo antivirais (Law et al., 2000), antifúngicos (Kotwani et al., 2002), medicamentos antineoplásicos (Stuart et al., 2000) e outros.

O comportamento lipossomal *in vivo* e as características de liberação do fármaco encapsulado são determinadas pelo tamanho, estrutura e composição dos lipossomas (Malinovsky et al., 1999). Por exemplo, após injeção subcutânea, lipossomas menores do que 120nm de diâmetro facilmente ganham acesso aos capilares e são rapidamente retirados do local de injeção; por outro lado, lipossomas relativamente grandes tendem a permanecer no local de ação por mais tempo (Grant & Bansinath, 2001).

O laboratório de Biomembranas tem desenvolvido formulações lipossomais, formadas vesículas unilamelares grandes contendo fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol, encapsulando anestésicos locais, com bons resultados em termos de prolongamento da anestesia, em animais: Lidocaína (Cereda et al., 2006), Mepivacaína (de Araujo et al., 2004; Cereda et al., 2006), Ropivacaína (de Araujo et al., 2008a), Prilocaína (Cereda et al., 2004) e humanos: (Mepivacaína (Tofoli et al., 2011; Tofoli et al., 2012), Ropivacaína (Franz-Montan et al., 2010a), Prilocaína (Wiziack Zago et al., 2011), entre outros.

A **Tabela 2** reúne, a título de exemplo, uma relação de formulações lipossomais que já foram aprovadas para uso clínico.

Tabela 2: Formulações lipossomais aprovadas para uso clínico.

Fármaco em lipossomas	Produto	Indicações
Daunorubicina	DaunoXome	Sarcoma de Kaposi
Doxorubicina	Mycet	Terapia combinada de câncer de mama recorrente
Doxorubicina em lipossomas peguillados	Doxil/Caelyx	Sarcoma de Kaposi refratário; câncer ovariano; câncer de mama recorrente
Anfotericina B	AmBisome	Infecções fúngicas
Citarabina	Depocyt	Meningite linfomatosa
Vincristina	Oncotop	Linfoma não-Hodgkins
Lurtotecan	NX211	Câncer ovariano
Nistatina	Nyotran	Agente antifúngico tópico
Ácido retinóico todo-trans	Altragen	Leucemia promielocítica aguda; linfoma não-Hodgkins; carcinoma renal; sarcoma Kaposi
Citarabina / Daunorubicina	CPX - 351	Leucemia
Compostos de Platina	Aroplatin	Tumores sólidos
Cisplatina	-	Células germinativas de câncer, pequenas células de carcinoma pulmonar
Fotossensibilizadores	-	Terapia fotodinâmica para câncer de pele
Codificação de DNA de plasmídeo e HLA-B7 microglobulina β 2	Allovectin-7	Melanoma metastático
Complexo Lidocaína/lipossoma	Maxilene ELA-Max	Anestesia tópica
Bupivacaína	Exparel	Analgesia pós cirúrgica
Bupivacaína	Bupisome	Analgésico local

Fonte: (EIDELMAN et al., 2005; Torchilin, 2005, 2012; Gorfine et al., 2011; Cohen et al., 2012)

Estudos anteriores do laboratório avaliaram a atividade farmacológica, a citotoxicidade e a toxicidade local de uma formulação lipossomal (vesículas unilamelares grandes, preparadas por extrusão e compostas de EPC:colesterol: α -tocoferol na razão molar 4:3:0,07, em pH 7,4) de ropivacaína (0,125 a 0,5%) comparando-a com solução da RVC livre, de iguais concentrações (de Araujo et al., 2008a). Naquele estudo, ensaios de liberação *in vitro* revelaram diminuição da taxa de liberação *in vitro* da RVC, dos lipossomas. Além disso, a RVC encapsulada em lipossomas apresentou citotoxicidade reduzida quando comparada com a RVC livre, bem como melhorou a intensidade do efeito analgésico em relação à RVC livre, em testes de bloqueio do nervo ciático e nervo infraorbital, em animais.

Em análises histológicas, não foram detectadas alterações teciduais na área de injeção nos nervos, ciático e infraorbital e poucas células inflamatórias foram observadas em apenas um dos animais tratados com RVC livre ou lipossomal a 0,5%. Em humanos, demonstrou-se que RVC encapsulada naquele tipo de lipossomas, na forma de gel contendo 1% do ativo induziu anestesia mais longa quando comparada com a RVC em solução 1%, mostrando que esse tipo de formulação pode ser eficaz e viável, promovendo liberação sustentada do fármaco (Franz-Montan et al., 2007).

De maneira geral, pode-se dizer que o uso de anestésicos locais encapsulados em lipossomas unilamelares grandes (contendo fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol) tem como vantagens a liberação lenta do fármaco, prolongando a duração da anestesia e a redução da toxicidade para os sistemas cardiovascular e nervoso central (Langerman et al., 1992; Mowat et al., 1996). Grandes avanços têm sido alcançados em pesquisas envolvendo lipossomas e anestésicos locais, que demonstram suas vantagens em relação ao uso do fármaco livre (de Paula et al., 2010; Weiniger et al., 2010; Franz-Montan et al., 2011; Mercado & Weinberg, 2011; Richard et al., 2011).

1.6 Sistema binário: RVC em HP- β CD

Estudo anterior do laboratório de Biomembranas demonstrou a formação e caracterização de um complexo de inclusão entre RVC e HP- β CD na estequiometria de 1:1 (AL:CD) razão molar (de Araújo et al, 2008b) e tempo de equilíbrio de complexação de 6h. Naquele trabalho, medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) forneceram evidências da formação do complexo de inclusão, pelo deslocamento de moléculas de água da cavidade central da ciclodextrina, quando na presença de RVC.

De forma semelhante, medidas de Difração de Raios X e MET forneceram outras evidências da complexação, pela perda da estrutura cristalina dos componentes puros (AL, CD). Além disso, medidas de $^1\text{H-RMN}$ confirmaram definitivamente a formação do complexo, pela proximidade espacial entre hidrogênios do anel piperidínico da RVC e hidrogênios (H3, H5), do interior da cavidade da HP- β CD. Como resultado da complexação houve um aumento linear na solubilidade da RVC, em função das concentrações crescentes de HP- β CD utilizadas (pH 7,4), e a constante de associação RVC:HP- β CD (K_a) foi determinada em $9,5 \text{ M}^{-1}$ (de Araujo et al., 2008b).

Como resultado da complexação, a cinética de liberação *in vitro* da RVC foi mais lenta que a do anestésico livre, o efeito hemolítico do AL foi reduzido e estudos *in vivo*, de bloqueio do nervo ciático de ratos mostraram que o complexo formado foi capaz de reduzir o período de latência, sem aumentar a duração do bloqueio motor, e de prolongar a duração e a intensidade do bloqueio sensorial (de Araujo et al., 2008b).

1.7 Sistema binário: RVC em lipossomas

Em estudos anteriores do laboratório de Biomembranas, utilizando RVC em lipossomas de EPC:colesterol o tamanho médio das vesículas foi de $356 \pm 83 \text{ nm}$, correspondendo em proporção a 85% das vesículas, sem alterações após encapsulação do anestésico (de Araujo et al., 2008a).

O coeficiente de partição dessa formulação lipossomal foi de 132 ± 26 e estudos de liberação *in vitro*, mostraram uma redução na taxa de liberação do fármaco quando comparada à formulação contendo RVC livre (de Araujo et al., 2008a). Além disso, a avaliação farmacológica da formulação indicou aumento da duração e intensidade do efeito analgésico em relação à RVC livre (de Araujo et al., 2008a). Esses resultados sugerem o sistema binário, composto por RVC em lipossomas de EPC:colesterol, como uma formulação de AL de liberação sustentada.

1.8 Sistema de duplo carregamento: anestésico em ciclodextrinas em lipossomas

Como discutido anteriormente, o uso de formulações de liberação sustentada têm sido proposto para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de anestésicos poucos solúveis, incluindo-se sistemas baseados em ciclodextrinas (Dollo et al., 1998) e formulações lipossomais (Grant & Bansinath, 2001). De fato, entre as formas farmacêuticas comerciais disponíveis e patentes depositadas para carregamento de AL, há uma grande fração de formulações envolvendo esses dois carreadores (de Paula et al., 2010).

Uma abordagem inovadora, proposta por (Loukas, 1998), levando em conta os avanços na tecnologia de produção de complexos de inclusão molecular com ciclodextrinas e de vesículas lipossomais como carreadores de fármacos, é o uso combinado desses dois carreadores no preparo de sistemas de carregamento ternários, isto é: fármaco sob a forma de complexo de inclusão com ciclodextrina encapsulado em lipossomas (Loukas, 1998).

Fatouros e colaboradores mostraram que o principal requisito para eficácia do sistema de duplo carregamento: fármaco (prednisolona) em ciclodextrinas em lipossomas é a habilidade do fármaco em complexar-se, em altas quantidades, com as moléculas de ciclodextrinas (Fatouros et al., 2001).

Piel e col. (2006) prepararam sistemas de duplo carregamento, de betametasona em vários derivados de ciclodextrinas (dentre eles, HP- β CD) em lipossomas de fosfatidilcolina de soja e colesterol e mostraram preocupação com a possível desestabilização dos lipossomas, pelo sequestro de lipídios daqueles, uma vez que as ciclodextrinas, e em particular seus derivados metilados, são capazes de remover componentes lipídicos das membranas, especialmente o colesterol (Piel et al., 2006). No entanto, ensaios de liberação *in vitro* mostraram liberação mais prolongada para o sistema de duplo carregamento (betametasona-ciclodextrina-lipossomas) que a betametasona encapsulada em lipossomas, comprovando que os lipossomas mantiveram sua propriedade de “reservatório”, mesmo quando encapsularam complexos com ciclodextrinas.

Maestrelli e colaboradores, estudando um sistema de duplo carregamento para ketoprofeno (em ciclodextrina e lipossomas) relataram que a presença de complexos de ciclodextrinas afetou as dimensões de lipossomas, mas não sua estrutura lamelar. O complexo ketoprofeno- HP- β CD em virtude da sua alta estabilidade, permitiu altas porcentagens de encapsulação e proporcionou maior estabilidade ao sistema (Maestrelli et al., 2005).

Recente estudo de Bragagni e colaboradores mostrou que suspensões lipossomais do anestésico prilocaína a 1% apresentaram maior eficácia em termos de ocorrência e duração de

ação anestésica, comparada a preparações não lipossomais de prilocaína, na mesma concentração. Além disso, a encapsulação do anestésico em lipossomas na forma de complexo de inclusão com ciclodextrina (HP- β CD) mostrou ser capaz para aumentar a duração de ação anestésica e reduzir o tempo de latência, em relação à prilocaína lipossomal. Estes resultados mostraram que o sistema fármaco em ciclodextrinas em lipossomas aumentou a eficácia terapêutica de prilocaína, evitando o uso de vasoconstritores para prolongar o efeito anestésico Prilocaína em odontologia (Bragagni et al., 2010).

Tendo em vista o exposto e na tentativa de se obter formulações lipossomais química e fisicamente estáveis, capazes de modificar a cinética de liberação da RVC e que apresentem menor toxicidade sistêmica, o presente estudo propõe o desenvolvimento e caracterização de um sistema de duplo carregamento contendo complexos de inclusão de RVC com ciclodextrinas encapsulados em lipossomas, como uma alternativa para melhorar as propriedades farmacológicas deste anestésico local.

2. OBJETIVOS

2.1 Justificativa

O laboratório de Biomembranas do Departamento de Bioquímica, UNICAMP, tem realizado estudos relacionados à interação de anestésicos locais com lipossomas (de Paula & Schreier, 1995; de-Paula & Schreier, 1996; de Paula et al., 2010); (Pinto et al., 2000; Cereda et al., 2004; Cereda et al., 2006; Cereda et al., 2008) nos quais se demonstrou a inserção diferencial dos anestésicos em diferentes profundidades da bicamada lipídica e também com um peptídeo do canal de sódio voltagem-dependente (Fraceto et al., 2006).

Esses estudos foram estendidos para o desenvolvimento de formulações de liberação sustentada de AL baseados em lipossomas (Cereda et al., 2004; Cereda et al., 2006; Franz-Montan et al., 2007; Cereda et al., 2008; de Araujo et al., 2008a; Franz-Montan et al., 2010a; Franz-Montan et al., 2010b; Franz-Montan et al., 2011; Tofoli et al., 2011; Franz-Montan et al., 2012; Tofoli et al., 2012) ou ciclodextrinas (Pinto et al., 2005; Fraceto et al., 2007; Moraes et al., 2007).

Mais recentes estudos do grupo de pesquisa Biomembranas, permitiram a caracterização molecular de sistemas de duplo carreamento AL:ciclodextrinas:lipossomas (Cabeça et al., 2008; Cabeça et al., 2011), pela técnica de RMN.

Em relação ao anestésico local Ropivacaína, em estudo prévio do laboratório foi relatado o desenvolvimento e a avaliação farmacológica de formulação contendo ropivacaína em HP- β CD (de Araujo et al., 2008b) ou em lipossomas compostos de EPC:colesterol: α -tocoferol 4:3:0,07 mol% (Franz-Montan et al., 2007; de Araujo et al., 2008a), com resultados encorajadores, com o aumento do tempo de anestesia e diminuição da toxicidade na RVC em ambas formulações, em comparação com o anestésico local em solução.

2.2 Objetivos Gerais

O objetivo deste projeto foi desenvolver uma formulação de duplo carreamento contendo complexo de inclusão do fármaco RVC com HP- β CD (na estequiometria de 1:1) encapsulado em lipossomas de EPC: α -tocoferol 1:0,01 mol%, buscando com isso, aumentar a solubilidade do fármaco em questão, prolongar a duração de ação e reduzir sua toxicidade. Pretende-se também caracterizar o sistema de duplo carreamento: RVC:HP- β CD:lipossomas e comparar seu efeito *in vitro* (toxicidade) e *in vivo* (testes de analgesia, em animais) com o efeito de

formulações comerciais de RVC disponíveis, verificando se a formulação tem potencial para posterior uso clínico.

2.3 Objetivos específicos

- Preparar formulação do anestésico ropivacaína (8 mM) na forma de complexo de inclusão molecular com HP- β CD (1:1) e encapsulado em lipossomas de EPC (8 mM)
- Desenvolver e validar uma metodologia para quantificação da RVC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Caracterizar a nova formulação lipossomal de RVC preparada (sistema binário), em termos de tamanho, potencial zeta e porcentagem de encapsulação da RVC.
- Caracterizar o sistema de duplo carregamento: RVC: HP- β CD:lipossomas através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para avaliar a constante de associação com cada um dos carreadores (HP- β CD e lipossomas).
- Avaliar o sistema de duplo carregamento quanto à estabilidade física: tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão, em função do tempo de armazenamento.
- Avaliar o sistema de duplo carregamento quanto à estabilidade química: peroxidação lipídica; em função do tempo de armazenamento.
- Avaliar o perfil de liberação do fármaco RVC (no sistema de duplo carregamento) *in vitro*.
- Avaliar a toxicidade *in vitro* da formulação de RVC: HP- β CD:lipossomas em testes de cultura de células, em comparação com a RVC livre.
- Avaliar a atividade farmacológica da formulação RVC: HP- β CD:lipossomas (contendo RVC 0,125 a 0,25%) em comparação com a RVC livre, através de testes de atividade antinociceptiva (teste PWPT), em animais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fármacos, sais e solventes

- Anestésico Local: Cloridrato de Ropivacaína (doação da Cristália Ind. Química e Farmacêutica Ltda)

Lipídios: fosfatidilcolina de ovo (Sigma Chem. Co.) – grau de pureza > 99%

- Ciclodextrinas: Hidroxipropil β -CD (Roquette Serv.Tech. Lab., França)

- Soluções: HEPES 20 mM com NaCl 0,9% ou tampão fosfato de sódio 20mM, pH 7,0

- Outros: acetato de α -tocoferol, tetraetoxipropano, ácido tiobarbitúrico, glicina, butil-hidroxitolueno, dodecilsulfato de sódio, água deuterada (Sigma Chem. Co.), ácido acético glacial, clorofórmio, cloreto férrico, dimetilsulfóxido, formaldeído, (Labsynth Ltda.), etanol, xilol, (Ecibra Reag. Anal.).

3.2 Equipamentos

- Espectrofotômetro Varian Cary 50

- Extrusora (Lipex Biomembranes Inc.)

- Analisador de Tamanho de partículas e potencial zeta por espalhamento de luz (Zeta Sizer NanoZS – Malvern Instruments Corp.)

- Ultracentrífuga (Beckman® L8-80M)

- Liofilizador (Labconco-*freeze dry system*/Freezone®)

- Cromatógrafo líquido com detector de DAD (Merck Hitach®)

- Cromatógrafo líquido com detector de UV (Varian ProStar)

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Varian 600 MHz (14,1 T), pertencente ao Laboratório Nacional de luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP).

- Microscópio eletrônico de transmissão Zeiss – LEO 906, Laboratório de Microscopia eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp

- Analgesímetro (Ugo Basile-Itália)

3.3 Quantificação da ropivacaína

- Análises cromatográficas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) -

A concentração de ropivacaína total da formulação, sob a forma de complexo de inclusão e encapsulada, foi determinada por CLAE. O equipamento utilizado consistia de uma bomba com injetor automático (*auto sampler*), um detector de arranjo de diodo (Diodo array detector), Merck Hitachi e foi utilizada uma coluna Purospher Star RP 18e (Octadecilsilano) (150 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm, da Merck. A temperatura do forno foi de 30°C e a fase móvel empregada foi uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato pH 8,0 numa razão de 60:40 (v/v), sob fluxo de 1,2 mL/min. O comprimento de onda para detecção UV foi de 240 nm, de acordo com adaptações do método descrito por (Jönsson et al., 2000) e pela USP 32 (Zuo et al., 2004).

A validação da metodologia analítica foi conduzida segundo parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 e pela *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*. Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e estabilidade de soluções.

3.3.1 Validação da metodologia analítica

3.3.1.1 Seletividade/Especificidade e Pureza de Pico

A seletividade é avaliada demonstrando que o método analítico separa duas ou mais substâncias, sendo elas ativas ou não, de qualquer outro componente presente na formulação (excipientes, compostos de degradação e impurezas). A especificidade é avaliada quando o método é capaz de fornecer resposta para um único analito. As soluções utilizadas neste ensaio foram preparadas conforme segue abaixo:

- solução padrão de ropivacaína: Pesou-se quantidade suficiente de RVC de forma que a concentração final teórica do fármaco fosse de 0,76mM, diluindo-se em tampão HEPES pH 7,0 (20mM).

- solução contendo placebo da formulação: Foi preparada a suspensão lipossomal (EPC) a 8mM contendo 8 mM de HP- β CD encapsulada por ressuspensão do filme lipídico em tampão HEPES 20 mM pH 7,0 contendo a ciclodextrina. Desta solução, pipetou-se 2,375 mL para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com tampão HEPES 20 mM pH 7,0 obtendo uma concentração final de 0,76 mM de HP- β CD e LUV.

- solução contendo o sistema de duplo carregamento proposto neste trabalho: Foi preparada a suspensão lipossomal (EPC) a 8 mM contendo RVC:HP- β CD 8 mM encapsulada por ressuspensão do filme lipídico em tampão HEPES 20 mM pH 7,0 contendo o complexo de inclusão. Desta solução, pipetou-se 2,4 mL para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com tampão HEPES 20 mM pH 7,0, de forma a se obter uma concentração final de 0,76 mM de RVC, HP- β CD e LUV.

As três soluções foram injetadas em triplicata no cromatógrafo líquido com detector de DAD (Merck Hitach®), conforme método analítico descrito no **item 3.3**. Foi avaliado o cromatograma do placebo, padrão e amostra a fim de verificar se havia interferentes do placebo coeluinto com o pico da RVC, bem como a pureza dos picos do padrão e amostra. Além disso, foi calculada a recuperação da solução amostra frente à solução padrão para confirmar a especificidade do método empregado na quantificação de RVC. Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação.

3.3.1.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada para demonstrar que os resultados obtidos com o método de análise eram diretamente proporcionais à concentração de RVC na amostra, dentro de um intervalo especificado, sendo adotado como critério mínimo aceitável um coeficiente de correlação (r) de 0,99 (RE n° 899, de 29 de maio de 2003). Neste sentido, foi preparada uma curva de calibração com um padrão de RVC na faixa de concentração de 0,08 a 1,16 mM de RVC, diluído em tampão HEPES 20 mM pH 7,0. Esta faixa foi adotada para contemplar a

faixa de concentração das amostras no ensaio de liberação *in vitro*, descrito mais adiante neste trabalho. Cada concentração foi injetada em triplicata no cromatógrafo líquido com detector de DAD (Merck Hitach®), conforme método analítico descrito no **item 3.3** e os resultados obtidos foram apresentados num gráfico de área vs concentração de RVC.

3.3.1.3 Exatidão

A exatidão de um método representa a proximidade entre o valor da concentração analisada de uma amostra conhecida e o valor de concentração calculado, através da curva de calibração (linearidade). O estudo foi conduzido em 3 níveis de concentrações da amostra (80%, 100% e 120%). Para isso, a formulação lipossomal proposta (LUV:RVC:HP- β CD) contendo RVC na concentração de 8mM foi diluída em tampão HEPES 20 mM pH 7,0 de forma a se obter as concentrações do estudo (0,66 mM = 80%; 0,83 mM = 100% e 0,99 mM = 120%). As soluções foram injetadas em triplicata no cromatógrafo líquido com detector de DAD (Merck Hitach®), conforme método analítico descrito no **item 3.3**. O conjunto de dados obtidos foi transformado em um conjunto de “recuperações”, onde a concentração calculada foi dividida pela concentração real e os dados foram multiplicados por 100 para que o resultado fosse dado em porcentagem. Segundo a ANVISA, a média de recuperação das amostras deve estar compreendida entre 98,0 e 102,0% para que o método seja considerado exato (RE nº 899, de 29 de maio de 2003).

3.3.1.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragem múltipla da mesma amostra. A repetibilidade (precisão intracorrida) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, obtidos pelo mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária (precisão intercorridas) revela a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. Foram realizados 6 preparos de solução amostra a partir da formulação proposta (LUV:RVC:HP- β CD) contendo RVC na concentração de 8 mM, a qual foi diluída em tampão HEPES 20 mM pH 7,0 para obter uma solução a 100% (0,83 mM). As soluções foram injetadas em triplicata no cromatógrafo líquido

com detector de DAD (Merck Hitach®), conforme método analítico descrito no **item 3.3**. No dia seguinte foi realizado o mesmo procedimento para se obter a precisão intermediária. Segundo a ANVISA, o coeficiente de variação da repetitividade deve ser no máximo 2,0% e o coeficiente de variação da precisão intermediária, no máximo 4,0% (RE n° 899, de 29 de maio de 2003).

3.3.1.5 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez, sendo que, se for constatada susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas devem ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento experimental, para evitar erros. As amostras foram preparadas em triplicata seguindo o mesmo procedimento descrito no **item 3.3.1.4** (Precisão). As alterações propostas para avaliar o método foram:

- a) Variação de fluxo: 1,0 mL/min; 1,2 mL/min (condição original) e 1,4mL/min
- b) Variação de temperatura: 25 °C e 30 °C (condição original)
- c) Variação na composição da fase móvel (acetonitrila / tampão): 70:30 (v/v); 60:40 (v/v) (condição original) e 50:50 (v/v).

Após o preparo das amostras o sistema de cromatografia líquida foi acondicionado nas condições a serem testadas e as soluções foram injetadas (cada uma) em triplicata no cromatógrafo líquido com detector de DAD (Merck Hitach®). O conjunto de dados obtidos foi transformado em um conjunto de “recuperações” para cada condição testada, onde a concentração calculada foi dividida pela concentração real e os dados foram multiplicados por 100 para que o resultado fosse dado em porcentagem. Os resultados foram expressos num gráfico da recuperação vs condição alterada. Segundo a ANVISA, a variação máxima da recuperação das amostras deve ser de no máximo $\pm 5\%$ em relação à condição original do método (RE n° 899, de 29 de maio de 2003).

3.3.1.6 Estabilidade das soluções contendo RVC (padrão e amostra)

O estudo da estabilidade de solução visa determinar o tempo durante o qual o princípio ativo presente tanto na solução padrão como na solução amostra mantém, dentro dos limites especificados, as mesmas propriedades e características que possuía no momento do seu preparo, de forma que a variação pode estar entre 98,0 e 102,0% (RE nº 899, de 29 de maio de 2003). As amostras foram preparadas em triplicata seguindo o mesmo procedimento descrito no **item 3.3.1.4** (Precisão). Duas soluções padrão de RVC foram preparadas na concentração final teórica de 0,76mM, diluídas em tampão HEPES 20 mM pH 7,0. As soluções foram injetadas em triplicata no cromatógrafo líquido com detector de DAD (Merck Hitachi®), conforme método analítico descrito no **item 3.3**, nos tempos 0, 6, 12, 24, 42 e 48 horas após o preparo. Os dados obtidos foram transformados em um conjunto de “recuperações”, em relação à resposta inicial (tempo 0h).

3.4 Preparo das formulações

3.4.1 Complexos de inclusão de RVC em HP- β ciclodextrina (1:1)

Seguindo metodologia já estabelecida em nosso laboratório, complexos de inclusão sólidos foram obtidos misturando-se quantidades apropriadas de HP- β CD e RVC em água, para uma razão molar de 1:1, respeitando a estequiometria do complexo, previamente determinada (de Araujo et al., 2008b). As amostras foram submetidas à agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi liofilizada e armazenada a -20 °C para posterior uso (Dollo et al., 1998; Loftsson & Masson, 2001).

Foi preparada uma solução contendo o complexo acima, em tampão adequado (HEPES 20 mM pH 7,0 com NaCl 150mM), de forma que a concentração final de RVC fosse de 8 mM (0,25%), a qual foi utilizada para ressuspender o filme lipídico preparado em seguida.

3.4.2 Lipossomas

Vesículas lipossomais multilamelares (MLV) foram preparadas pelo método de hidratação de filme seco, retirando-se alíquotas de fosfatidilcolina de ovo e α -tocoferol (na proporção molar de 1,0:0,01) de soluções estoque em clorofórmio (grau de purza - > 99%). Em seguida as alíquotas foram evaporadas sob fluxo de N₂ e mantidas sob vácuo (350 mmHg) (2 h)

à temperatura ambiente, para retirada do clorofórmio residual (Boogaerts et al., 1993a; Boogaerts et al., 1993b; Boogaerts et al., 1994).

Após secagem, o filme lipídico aderido à parede do tubo foi ressuspenso em tampão HEPES 20 mM pH 7,0 contendo ou não, RVC livre ou na forma de complexo de inclusão com HP- β CD de forma que a concentração total do AL fosse a mesma encontrada nas preparações de uso clínico (0,25% ou 8 mM), e agitado em vórtex por 5 minutos. Essa metodologia de preparo foi adaptada de (Cereda et al., 2004; de Araujo et al., 2004).

Com isso, houve formação de vesículas multilamelares concêntricas - separadas por cavidades aquosas, que foram utilizadas para preparo dos lipossomas unilamelares (LUV), por extrusão (Boogaerts et al., 1993a; Boogaerts et al., 1993b; Boogaerts et al., 1994; Malinovsky et al., 1997a; Malinovsky et al., 1997b). Sucintamente, as vesículas lipossomais unilamelares grandes (LUV) foram obtidas por extrusão das MLV, sob pressão de N₂ (3,0 kgf/cm² ou 40 psi) à temperatura ambiente, isto é acima da temperatura de transição de fases da EPC (-5 °C segundo (Huang & Mason, 1978); passando-se a amostra de MLV por um disco de drenagem e duas membranas de policarbonato (Poretics) com poros de tamanho controlado (0,4 μ m). Foram realizadas 12 passagens da amostra com o intuito de que houvesse homogeneidade no tamanho das vesículas obtidas. Os lipossomas obtidos (LUV) foram deixados em repouso, por pelo menos 2h para equilíbrio das vesículas. A concentração final de lipídio na formulação foi de 8mM e foi quantificada como descrito no item 3.5.1 desta dissertação, através do ensaio de fosfato inorgânico (Rouser et al., 1970; Brito et al., 1996).

3.5 Caracterização das formulações

3.5.1 Medida da concentração total de fosfolipídios

A concentração total de fosfolipídios foi medida através do ensaio de fosfato, segundo o método descrito por (Rouser et al., 1970), com modificações introduzidas por (Brito et al., 1996). Este método baseia-se na degradação total dos lipídios pela digestão com ácido perclórico e aquecimento a 180°C, com liberação do fósforo inorgânico (Pi). O ortofosfato formado reage com molibdato de amônio na presença de ácido ascórbico, que o reduz, levando ao aparecimento de coloração azul (fosfomolibdato de amônio), cuja intensidade é proporcional à concentração de fósforo na amostra, quantificado em 795 nm, através de uma curva de calibração.

O procedimento utilizado neste ensaio seguiu os passos descritos a seguir:

Foi preparada uma solução de fosfato de sódio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1 mM. Foram pipetados para tubos falcon 10, 30, 60 e 90 μL desta solução. As soluções acima foram utilizadas como curva padrão de calibração. Em paralelo, pipetou-se 50 μL dos lipossomas e 450 μL de tampão HEPES 20 mM pH 7,0 para outros tubos falcon. Todas as soluções foram mantidas em estufa durante uma noite (overnight) para secagem do material.

Após secagem, adicionou-se aos tubos, 50 μL de ácido perclórico (HClO_4). Os tubos foram então, colocados no bloco digestor a 180 °C durante 1 hora. Em seguida, adicionou-se 900 μL de reagente de trabalho, agitou-se e os tubos foram levados ao aquecimento em banho-maria a 45 °C durante 15 a 20 minutos.

Para o reagente de trabalho foram utilizados:

Molibdato de Amônio ($\text{Mo}(\text{NH}_4)_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,1757 g
Água	38 mL
Ácido Ascórbico	3,8 g
Ácido Sulfúrico	1,1 mL

Após aquecimento em banho-maria, foram medidas as absorvâncias das amostras e padrão da curva de calibração a 795 nm, utilizando reagente de trabalho e ácido perclórico como branco (para zerar o equipamento).

Foi calculada a quantidade de fosfolípido presente na formulação através da comparação das leituras das amostras com as leituras do padrão.

3.5.2 Distribuição de tamanho e Potencial Zeta – lipossomas

As medidas de espalhamento de luz (*light scattering*) são muito importantes na estimativa do tamanho, forma e interação de partículas lipossomais, além de ser esta uma técnica que oferece vantagens como rapidez das medidas, não interferir no sistema e promover análise representativa das amostras, uma vez que o número de partículas é relativamente grande.

O princípio da técnica considera que quando um feixe de luz é direcionado a uma suspensão coloidal ou dispersão, parte dessa luz pode ser absorvida, parte é dispersa e a restante é transmitida através da amostra. A luz dispersa ou “espalhada” (*scattered*) resulta de um campo elétrico associado à luz incidente, induzindo oscilações periódicas na nuvem

eletrônica dos átomos do material analisado, que são detectadas pelo aparelho ao longo de um intervalo de tempo; a dinâmica das oscilações permite calcular o raio hidrodinâmico e a distribuição das partículas (SHAW, 1991).

O equipamento utilizado para determinar o tamanho dos lipossomas (Zeta Sizer) também mede o potencial zeta das partículas. Quase todos os materiais macroscópicos ou particulados adquirem uma carga elétrica superficial quando estão em contato com um líquido. O potencial zeta é um indicador dessa carga e é importante nos estudos de química de superfície, visto que pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Sua medida é obtida a partir de fenômenos decorrentes da movimentação das partículas em relação ao meio em que estão dispersas, provocando o rompimento da dupla camada elétrica, no plano de cisalhamento (Carafa et al., 2009; Katsamenis et al., 2009; Uskokovic et al., 2010).

Foram realizadas medidas contínuas do raio hidrodinâmico das vesículas, na presença e ausência de AL (livre e na forma de complexo de inclusão com ciclodextrinas), com o objetivo de verificar o tamanho médio, potencial zeta e a homogeneidade das suspensões lipossomais antes e após a encapsulação. As formulações foram diluídas em água Milli-Q na proporção de 5 μ L da formulação para 955 μ L de água. Foram preparadas amostras em triplicata e realizadas 16 varreduras de cada amostra e as medidas de tamanho (em intensidade de luz espalhada) e potencial zeta foram obtidas à 25°C com um ângulo de detecção de 173°.

Foi utilizada água Milli-Q para diluição das amostras ao invés de cloreto de potássio (KCl), pois quando utilizou-se KCl o potencial zeta medido estava sempre em torno de zero. De qualquer forma, a suspensão lipossomal foi preparada num sistema tamponado, onde há íons presentes, o que permitiu a leitura de carga de superfície.

3.5.3 Eficiência de encapsulação e coeficiente de partição da RVC em lipossomas

A porcentagem de AL (livre e na forma de complexo de inclusão) encapsulado foi determinada em suspensões lipossomais (MLV), na concentração de 8 mM, sendo adicionadas soluções de RVC para ressuspender o filme lipídico, tal que se obtivesse uma concentração final de 0,25% de AL (livre ou na forma de complexo de inclusão). Todas as amostras foram preparadas em tampão HEPES 20 mM pH 7,0 contendo NaCl 150 mM e deixadas em repouso por pelo menos duas horas, para que ocorresse a restauração do equilíbrio.

Em seguida, as suspensões foram submetidas à ultracentrifugação (120.000 x g) por duas horas à temperatura de 10°C, obtendo-se o pellet lipossomal e o sobrenadante, onde se encontrava a fração do anestésico (livre ou na forma de complexo de inclusão) que não foi encapsulada. Após separação, alíquotas do sobrenadante foram analisadas por espectrofotometria UV em 260nm, onde o coeficiente de absorvidade molar da RVC é cerca de 500 M⁻¹ cm⁻¹ (de Araujo et al., 2008a; de Araujo et al., 2008b).

A percentagem de AL (livre ou na forma de complexo de inclusão), encapsulado nas MLV, foi calculada a partir da medida da % do AL não encapsulado no sobrenadante. O cálculo foi feito da seguinte maneira: absorbância do sobrenadante do teste (RVC:MLV ou RVC:HP-βCD:MLV), subtraída daquela do sobrenadante de uma amostra-controle contendo somente lipossomas (MLV) ressuspensos em tampão (sem RVC), dividida pela absorbância da solução inicial do anestésico (RVC total), como mostrado na equação 1:

$$\% \text{ Não Encapsulada} = \frac{\text{Absorbância (RVC:MLV)} - \text{Absorbância (MLV)}}{\text{Absorbância (RVC total)}} \times 100 \quad (1)$$

Os valores de percentagem de encapsulação podem também ser expressos em termos de coeficiente de partição (P) do anestésico entre duas fases imiscíveis, pela razão das concentrações desse entre a fase membranar (m) e a aquosa (a):

$$P = \frac{n_m / V_m}{n_a / V_a} \quad (2)$$

Onde:

n : número de moles do AL

V_m : volume da fase membranar

V_a : volume da fase aquosa

n_m : número de moles do AL em membrana

n_a : número de moles do AL em água

$n_m + n_a$: número total de moles do AL na solução inicial

As transformações para os dados de P consideram a concentração de membrana no sistema (8 mM ou 4,6 mg/mL), tomando-se o valor da densidade lipídica igual a 1 (de-Paula &

Schreier, 1996). Os valores de % encapsulação foram usados, em fração, para compor o valor de n_m , enquanto $n_a = 1 - n_m$.

3.5.4 Avaliação da associação da RVC com ciclodextrina e lipossomas, por RMN

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido utilizada como uma técnica experimental para investigar interações intermoleculares, gerando evidências sobre a topologia e formação de complexos de inclusão, através de variações na absorção do núcleo do hidrogênio (Kapur et al., 2000) o qual tem alta sensibilidade e permite extrair um grande volume de informações a partir da análise de seus espectros. Muitos métodos de RMN de ^1H foram desenvolvidos e aplicados na triagem e caracterização de complexos supramoleculares tais como: *rotational frame nuclear Overhauser effect spectroscopy*, ROESY (Mo & Pochapsky, 1997), e *diffusion-ordered spectroscopy*, DOSY (Morris & Johnson, 1992).

Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY): esta sequência de pulsos, descrita por (Morris & Johnson, 1992) permite processar e apresentar dados de difusão obtidos a partir de uma série de experimentos de RMN coletados com gradiente de campo magnético pulsado (PFGSE), possibilitando a discriminação e caracterização dos diversos componentes de uma mistura (Dehner & Kessler, 2005; Nakakoshi et al., 2006). A técnica de DOSY separa os sinais de uma mistura de componentes de acordo com os seus coeficientes de difusão. Como o coeficiente de difusão¹ de uma determinada molécula, sob condições fixas, depende da sua massa molecular, tamanho e forma (raio hidrodinâmico), fica evidente que a difusão pode ser usada para estudo das interações moleculares ou eventos de complexações. De fato são muitas as aplicações desta técnica em diferentes áreas, mostrando a importância dos experimentos de difusão como uma ferramenta para o estudo de associações e movimentos (Diaz & Berger, 2000; Cabrita & Berger, 2001; Morris, 2002).

Neste sentido, o coeficiente de difusão pode fornecer informações importantes sobre a organização molecular. Valores típicos de coeficiente de difusão em líquidos, a temperaturas moderadas (25-30°C), vão desde $10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (polímeros de alta massa molar), 10^{-11} em lipossomas, até $10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (água e moléculas pequenas, em soluções pouco viscosas) (Stilbs,

¹ Coeficiente de difusão é um valor que representa a facilidade com que cada soluto em particular se move em um solvente determinado. Depende de três fatores: tamanho e forma do soluto, viscosidade do solvente e temperatura.

1987). O coeficiente de difusão observado (D_{obs}) para os ligantes livres e associados a sistemas macromoleculares (ciclodextrinas, lipossomas) submetidos à troca rápida em relação ao tempo que permite ocorrer difusão, reflete a média ponderada dos coeficientes das populações das espécies em troca (sistema macromolecular e seu ligante), de acordo com a equação 3 (Laverde et al., 2002):

$$D_{obs} = f_{compl} D_{compl} + f_{livre} D_{livre} \quad (3)$$

Pressupondo que a troca ocorre entre um estado livre e ligado (ligante na forma de complexo de inclusão ou encapsulado à macromolécula) a fração do ligante em quaisquer dos estados, livre ou ligado, é representada por f_{livre} e f_{ligado} , tal que D_{ligado} e D_{livre} seriam os valores de coeficiente de difusão do complexo macromolecular do ligante livre, respectivamente. A fração do ligante ligado (f_{ligado}) e a constante de associação (K_a) podem ser calculadas, através das equações 4 e 5, respectivamente.

$$f_{ligado} = \frac{(D_{livre} - D_{observado})}{(D_{livre} - D_{ligado})} \quad (4)$$

$$K_a = \frac{f_{ligado}}{((1 - f_{ligado}) ([macromolécula] - f_{ligado} [ligante]))} \quad (5)$$

Aplicando os valores de difusão medidos experimentalmente ($D_{observado}$) na equação 4, calcula-se os valores aproximados da percentagem das populações de moléculas receptoras complexadas com os ligantes e, com esse valor (f_{ligado}), obtém-se K_a (equação 5). As formulações contendo RVC foram avaliadas por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) em espectrômetro Varian 600 MHz (LNLS, Campinas) com auxílio do Dr. Luis Fernando Cabeça, a 25°C. Foram utilizadas as seguintes amostras para o estudo:

- RVC:HP- β CD, 8mM cada.
- LUV: HP- β CD: RVC contendo 8 mM do AL, CD e lipossomas.

As formulações foram liofilizadas e então, ressuspensas em tampão fosfato 20 mM pH 7,0 preparado em água deuterada (D_2O), no momento do uso. Os espectros de DOSY foram

obtidos utilizando uma sequência de pulsos DgcteSL (*gradient compensated stimulated echo spin lock*) (Arantes et al., 2009), com uma diminuição na intensidade de ressonância de aproximadamente 80 a 90%. O tempo de difusão usado foi de 0,06 segundos. O programa de processamento (macro DOSY no espectrômetro Varian) usou $f_n = 32$ K.

3.5.5 Morfologia das formulações: Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica de microscopia na qual um feixe de elétrons é emitido em direção a uma amostra ultra fina, interagindo com a mesma enquanto a atravessa. A interação dos elétrons transmitidos através da amostra forma uma imagem que é ampliada e focada em um dispositivo de imagem que permite resolução significativamente maior que as obtidas com microscópios ópticos, devido ao pequeno comprimento de onda dos elétrons.

A técnica de MET foi utilizada para analisar diretamente a morfologia das amostras contendo RVC encapsulada em lipossomas (LUV:RVC) e do complexo de RVC encapsulado em lipossomas (LUV:RVC:HP- β CD).

A fim de preparar o material para a microscopia, uma gota de cada formulação foi adicionada a uma grade de ouro. Após 10 segundos, o excesso da amostra foi retirado com papel filtro, e em seguida, uma gota de solução aquosa de uranila a 2% (p/p) foi adicionada sobre a mesma, no intuito de melhorar o contraste das imagens. Após 8 segundos, o excesso foi novamente retirado com papel filtro e, na sequência, uma gota de água MilliQ foi adicionada à grade, seguindo-se o mesmo procedimento para a retirada do excesso, após 5 segundos. A grade permaneceu em repouso, em temperatura ambiente, até a secagem das amostras. O preparo das amostras e a microscopia foram realizados no mesmo dia.

3.6 Medidas da estabilidade físico-química dos componentes estruturais em lipossomas

3.6.1 Estimativa da oxidação de fosfolipídios

Por apresentarem constituição semelhante às membranas celulares, os lipossomas também são suscetíveis aos efeitos da peroxidação lipídica (Estepa et al., 2001). Os lipossomas usados neste trabalho foram constituídos de EPC, cujos ácidos graxos apresentam grau variado de saturação (Grobas et al, 2001). A retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia acila, etapa inicial da oxidação, pode ser o resultado de exposição à radiação eletromagnética ou à

contaminação por metais de transição. Os produtos da peroxidação lipídica apresentam natureza instável, portanto a avaliação dos níveis desse dano é realizada através da determinação de metabólitos dos lipoperóxidos, sendo necessário considerar alguns fatores no processo de oxidação como: conjugação de duplas ligações; formação de peróxidos e produção de aldeídos de alta reatividade, especialmente o malondialdeído MDA (NEW, 1990).

Existe uma variedade de métodos analíticos desenvolvidos para determinar o dano oxidativo dos lipídios (quantificação de hidroperóxidos, dienos conjugados e endoperóxidos ou peróxidos cíclicos), dentre eles, o mais comumente utilizado baseia-se na reação, em altas temperaturas, do MDA com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formando um cromóforo vermelho que pode ser detectado por espectrofotometria de absorção VIS (532 nm) ou por fluorescência, sendo o método específico para determinação de endoperóxidos (Ohkawa et al., 1979).

A estabilidade química e física dos lipossomas é um importante fator a ser considerado para sua utilização eficaz como veículos de formulações farmacêuticas. Quaisquer alterações na natureza de seus componentes refletem mudanças de propriedades como a permeabilidade da bicamada e interações entre as vesículas (agregação e/ou fusão, **Figura 5**).

Algumas medidas preventivas devem ser utilizadas para evitar a peroxidação lipídica dos lipossomas como: estocagem ao abrigo da luz (proteção contra fotoperoxidação) e em baixas temperaturas (preferencialmente a 4 °C), redução dos níveis de oxigenação na amostra (utilização de vácuo ou substituição do ar por nitrogênio), além de evitar a exposição à irradiação (Lichtenberg & Barenholz, 1988) e uso de agentes redutores como α -tocoferol.

Para a realização do teste, foi determinada uma curva de calibração com o padrão tetraetoxipropano (TEP) em concentrações que variaram de 0,01 a 0,12mM (**Figura 6**). Em seguida, foram retiradas alíquotas das amostras a serem analisadas (MLV), adicionando-se os seguintes reagentes:

- cloreto férrico (0,3%, reagente catalizador)
- solução etanólica de butilidroxitolueno (BHT 0,2%, reativo antioxidante)
- tampão glicina (0,2 M, pH 3,6)
- ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5%, reativo cromogênico) em solução de dodecilsulfato de sódio (SDS 0,3%)

As amostras foram colocadas em banho a 100 °C por 15 minutos e, posteriormente, foram resfriadas em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se ácido acético glacial e clorofórmio (1:2 v/v) e então, foram centrifugadas até separação das duas fases (500xg, 20 minutos a 4 °C). A absorbância do sobrenadante foi medida (532 nm) e comparada com a curva padrão de TEP.

A análise de endoperóxidos, expressos em concentração de MDA (nM), foi realizada para avaliar a estabilidade dos lipossomas preparados, sob diversas condições como tempo e temperatura de armazenamento.

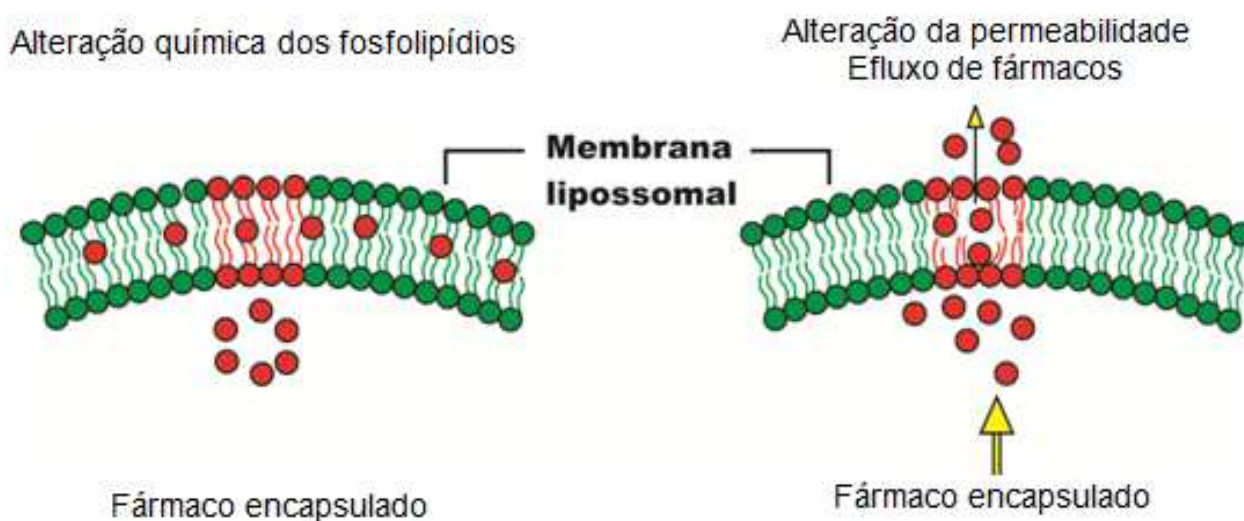


Figura 5 - Representação esquemática das alterações químicas em fosfolípidios com consequente alteração na permeabilidade dos lipossomas – (adaptado de (Torchilin, 2005).

As amostras foram avaliadas logo após o preparo e após 15, 30 e 60 dias, sendo mantidas a 4 °C, 25 °C e 37 °C.

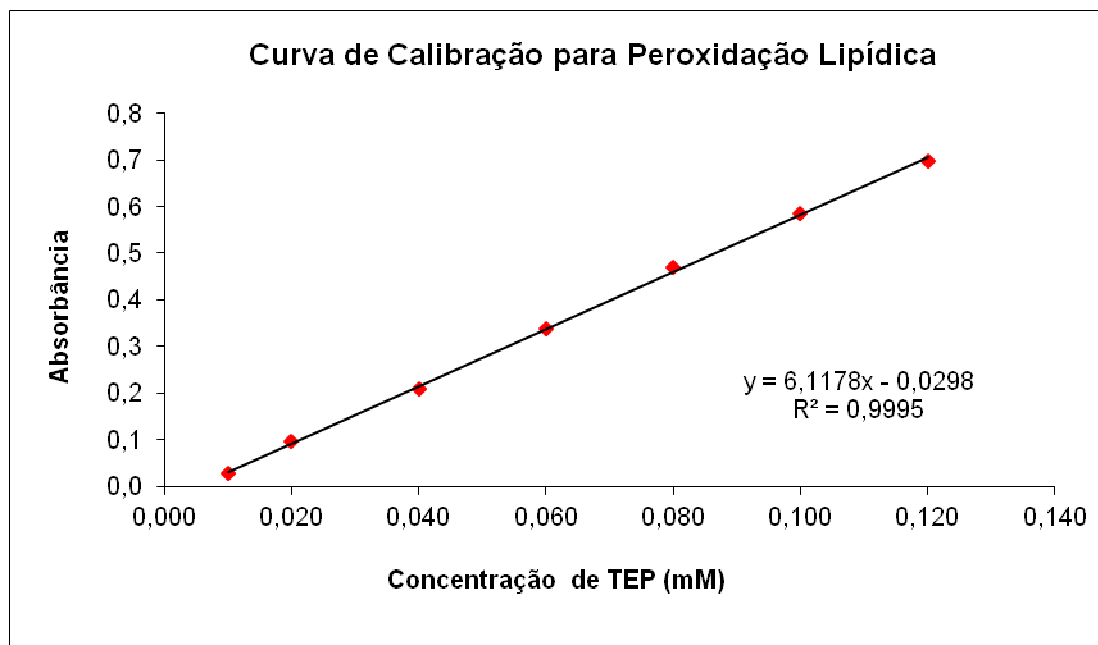


Figura 6 – Curva de calibração de TEP utilizada para o cálculo de peroxidação lipídica das formulações avaliadas.

3.6.2 Medidas de tamanho e potencial Zeta

As medidas de tamanho e potencial zeta foram usadas para acompanhar a estabilidade física das formulações durante armazenamento. Esse experimento foi realizado conforme item **3.5.2** deste trabalho e as amostras foram estudadas desde o tempo inicial e após 15, 30 e 60 dias de preparo, sendo mantidas a 4 °C.

3.7 Teste de liberação *in vitro*

Foi realizado ensaio para avaliar a liberação *in vitro* da RVC livre, na forma de complexo de inclusão com ciclodextrinas ou encapsulada em lipossomas através do teste de diálise descrito por (Paavola et al., 1995). O sistema consistiu de dois compartimentos: o doador (contendo 400 µL da amostra) e o receptor (com 4 mL de tampão HEPES 20 mM em NaCl 150 mM, pH 7,0, volume suficiente para permitir as condições “sink”, ou seja, não saturar o meio), mantido sob agitação leve e à temperatura de 37 °C (**Figura 7**). Uma membrana de celulose (Spectrapore®, com poros para exclusão molecular de 1000 Da) foi usada para separar esses dois compartimentos.

Amostras foram retiradas do compartimento receptor (com subsequente reposição do volume retirado – 300 μ L) nos seguintes tempos: 15 e 30 minutos; 1; 2; 3; 4; 6 e 8 horas e analisadas por CLAE conforme método descrito na validação da metodologia analítica (item 3.3).

Foram testados e comparados quatro sistemas: RVC livre, RVC:HP- β CD , LUV:RVC, LUV:RVC:HP- β CD, para poder avaliar o comportamento da liberação do ativo nas condições citadas.

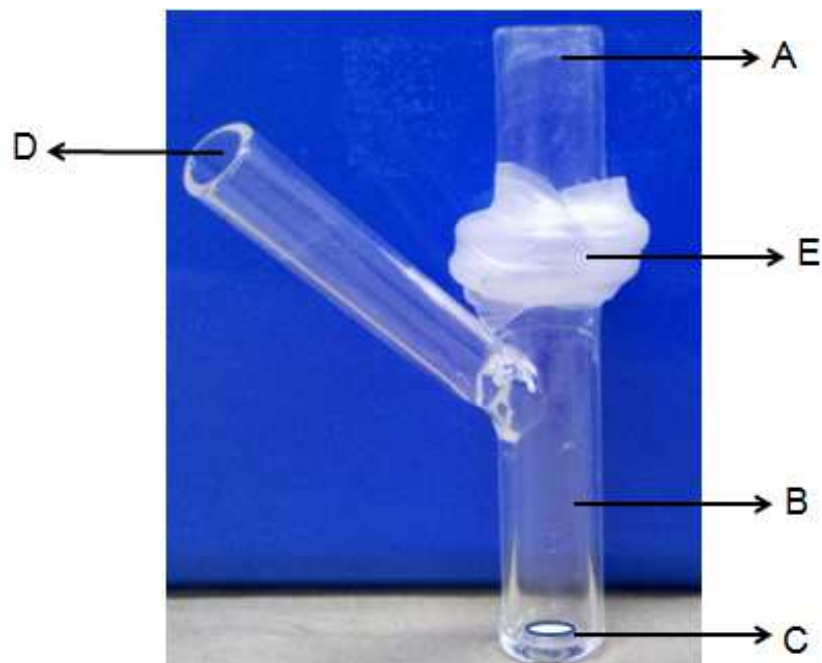


Figura 7 - Representação do sistema usado nos ensaios para determinação da cinética de liberação de fármacos. A= Compartimento doador (amostra), B= compartimento receptor , C= barra magnética para agitação, D= local de retirada das alíquotas e reposição de meio, E = membrana.

3.8 Avaliação da toxicidade *in vitro*

3.8.1 Cultivo e tratamento das células

A cultura de células é um teste útil para avaliar os potenciais efeitos tóxicos que os compostos químicos podem apresentar *in vitro*, isto é, sem expor um organismo vivo aos possíveis efeitos tóxicos. Sendo assim, para estimar a citotoxicidade foram realizados testes *in vitro* a partir de cultura de células de fibroblastos de camundongos, da linhagem 3T3. A

viabilidade celular foi determinada através do teste de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) (**Figura 8**). O princípio do teste consiste na captação do MTT pelas células e sua redução a formazan (composto púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais, resultando em acúmulo desse composto colorido, somente em células viáveis. A solubilização das células possibilita a liberação do formazan, que pode ser facilmente detectado por espectrofotometria VIS em 570 nm (Denizot & Lang, 1986; Welder, 1992).

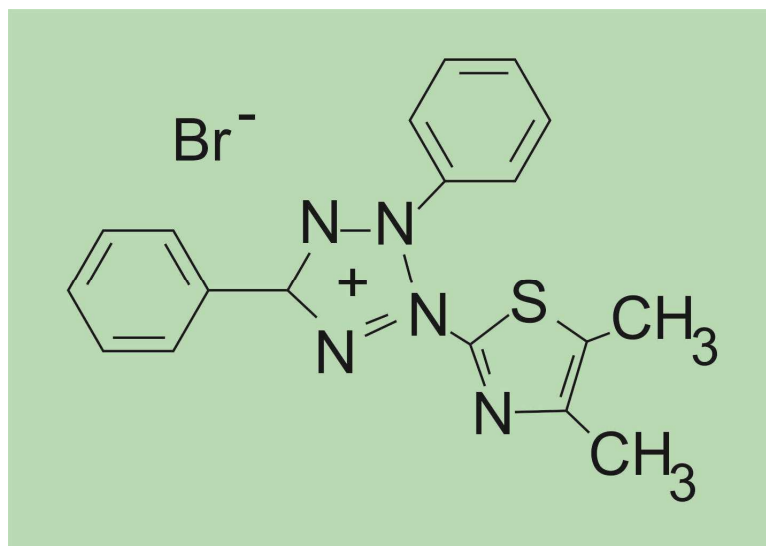


Figura 8 – Estrutura química do MTT.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em células da linhagem 3T3 (fibroblastos de camundongos Balb/c) mantidas em cultura contínua (meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, pH 7,2-7,4, 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂) através de repiques periódicos.

O plaqueamento foi realizado inoculando-se 2 x 10⁴ células viáveis em placas de 48 cavidades, incubadas por 48 horas, até atingirem a semiconfluência. As células foram incubadas por 2 horas com:

- veículos: LUV ou HP-βCD
- anestésico local: RVC (0,4 a 7,2mM)
- complexo de inclusão: RVC:HP-βCD (0,4 a 7,2mM)
- formulações lipossomais: LUV:RVC (0,4 a 7,2mM) e LUV:RVC:HP-βCD (0,4 a 7,2mM).

Em seguida, o meio de cultura foi substituído e as células foram incubadas com MTT (1mg/mL) por 1 hora. Ao final desse período, o meio contendo MTT reduzido foi removido cuidadosamente e a cada placa foi adicionado 0,1 mL de HCl:isopropanol (1:24 v/v), a fim de dissolver os cristais de formazan produzidos pela redução do MTT. As placas foram agitadas vigorosamente por cerca de 20 minutos para garantir a solubilização do formazan. A absorbância da solução em cada cavidade foi medida por espectrofotometria na região do visível (570 nm).

3.9 Ensaios *in vivo*: avaliação farmacológica

Para o desenvolvimento desta etapa do projeto, foram utilizados camundongos albinos *Swiss*, machos e com peso médio de 25 g. Os animais provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da Unicamp), foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada a $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, alojados coletivamente (7 animais por gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos 7 dias.

Todos os experimentos encontravam-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a Legislação vigente, **lei nº 11.794**, de 8 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **Decreto nº 6.899**, de 15 de julho de 2009, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/Unicamp, conforme ANEXO I (protocolo nº 2596-1). Para a realização dos testes farmacológicos (bloqueio motor e sensorial) foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais, com 7 animais por grupo:

- Grupos controle

- veículos: LUV, HP- β CD e LUV:HP- β CD

- Formulações e concentrações

- RVC 0,125%

- LUV:RVC 0,125%

- RVC:HP- β CD 0,125%

- LUV:RVC:HP- β CD 0,125%

- RVC 0,25%
- LUV:RVC 0,25%
- RVC:HP- β CD 0,25%
- LUV:RVC:HP- β CD 0,25%

Os animais foram imobilizados em um contensor de acrílico, para que fosse possível a aplicação das formulações na pata direita.

3.9.1 Avaliação do bloqueio motor do nervo ciático

A presença da anestesia foi definida como a perda do controle motor da pata injetada após injeção da formulação, sendo evidenciada pelo “arrastamento” do membro posterior e/ou fechamento dos dedos da pata (Feldman & Covino, 1988).

A intensidade do bloqueio motor foi avaliada de acordo com valores de *score*: 0 (uso normal da pata injetada), 1 (incapacidade de flexionar completamente o membro injetado) e 2 (impossibilidade do uso da pata injetada) (Gantenbein et al., 1996; Gantenbein et al., 1997). A avaliação foi feita a cada minuto durante os 5 primeiros minutos após a administração e, posteriormente, em intervalos de 5-10 minutos até que fosse verificada a total recuperação dos movimentos do animal (pelo menos 1 h de observação).

3.9.2 Avaliação do bloqueio sensorial do nervo ciático

O bloqueio sensorial foi medido pelo limiar de remoção da pata dos animais frente a um estímulo mecânico, como descrito por (Randall & Selitto, 1957). Para a execução do teste utilizou-se um equipamento apropriado, chamado analgesímetro, que gera um aumento gradual da força (em gramas) exercida por uma extremidade plástica sobre a superfície dorsal da pata do animal (Fletcher et al., 1997).

Vinte minutos após a injeção das formulações, a pata do animal tratado foi colocada sob a extremidade plástica do analgesímetro onde a pressão foi sendo aplicada e aumentada a um ritmo constante até que o animal retirasse a pata como sinal indicativo de nocicepção (*Pain Withdrawal Threshold to Pressure – PWTP*).

A analgesia foi definida como um aumento no limiar de pressão dos animais, pelo menos 50% maior que o observado nos grupos controle. O ponto final da analgesia foi estabelecido quando não houvesse diferença estatística entre os grupos teste e controle.

Estabeleceu-se um valor máximo de pressão (*cut-off*) de 150 g (camundongos) para evitar lesões nas patas e estimulação excessiva dos nociceptores. As medidas foram realizadas durante 5 horas, com intervalos de 20, 30, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 240 e 300 minutos. As medidas de pressão exercida para cada grupo experimental foram relacionadas graficamente em função do tempo.

3.10 Análise Estatística

Nos testes *in vitro*, os valores de porcentagem para o ensaio de viabilidade celular foram transformados em proporções e analisados por análise de variância, teste de Tukey-Kramer. Para avaliação dos níveis de endoperóxidos os valores foram comparados por ANOVA (teste de Tukey). No ensaio de liberação *in vitro* e nos testes de pressão na pata (PWTP, análises entre valores de tempos individuais) os dados foram comparados por análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) com teste posterior de Tukey-Kramer.

Os dados foram apresentados como médias e desvio padrão (DP) dos experimentos realizados. Para a avaliação do bloqueio motor (latência, tempo máximo, tempo de recuperação, ASC) os valores foram expressos em mediana (limites mínimo e máximo) e comparados através do teste de Kruskal-Wallis. Os softwares utilizados foram: Graph Pad InStat e Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., versão 3.0, 1997 – 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação da ropivacaína por absorção no UV com CLAE

4.1.1 Validação da metodologia analítica

O método analítico foi validado de acordo com as recomendações do órgão regulatório brasileiro (ANVISA).

As condições cromatográficas utilizadas foram consideradas adequadas, pois foi obtido um pico simétrico da Ropivacaína (**Figura 09**), com os demais parâmetros experimentais do sistema estando de acordo com as normas requeridas pela ANVISA, conforme **Tabela 3**.

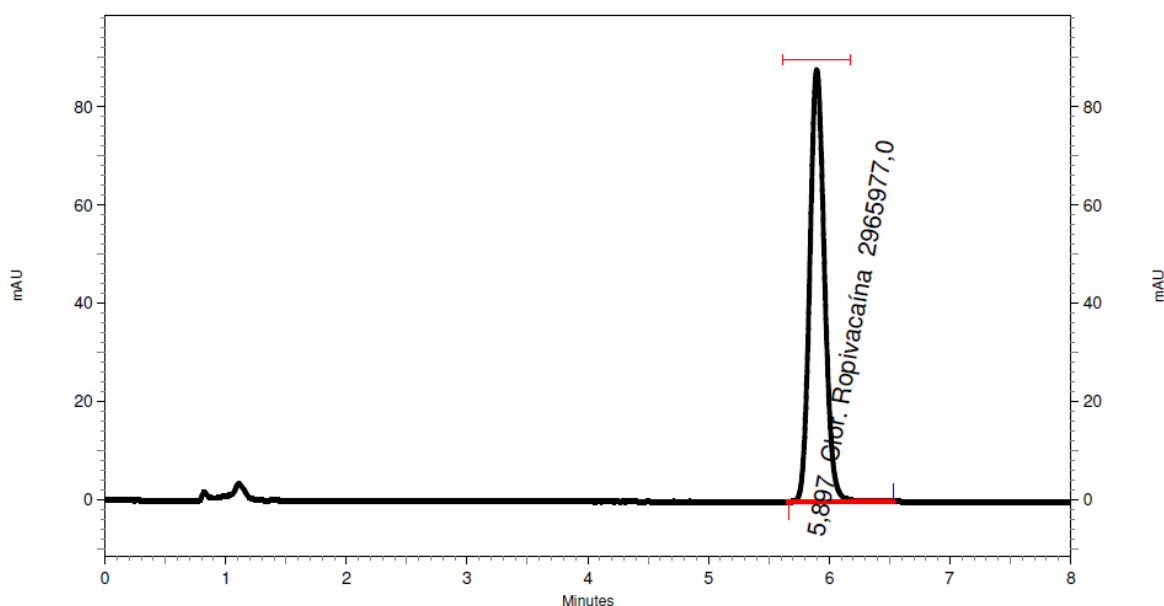


Figura 9 – Cromatograma representativo de uma injeção de solução padrão de ropivacaína (coluna Purospher Star RP 18e, Fase Móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH 8,0 numa razão de 60:40 (v/v) e comprimento de onda de 240 nm, no equipamento Merck Hitach®, conforme detalhado em “Materiais e métodos” – **item 3.3**).

Tabela 3 – Parâmetros de adequabilidade obtidos na corrida cromatográfica de ropivacaína usando uma coluna Purospher Star RP 18e.

Número de pratos teóricos	11146
Fator de capacidade	2,37
Assimetria	1,13
Pureza de pico	1,0

4.1.1.1 Seletividade

O método também se mostrou específico, uma vez que no cromatograma do placebo (**Figura 10A**) não foi detectada nenhuma interferência no tempo de retenção correspondente ao pico cromatográfico da ropivacaína obtido com a solução padrão (**Figura 10B**) e amostra (**Figura 10C**).

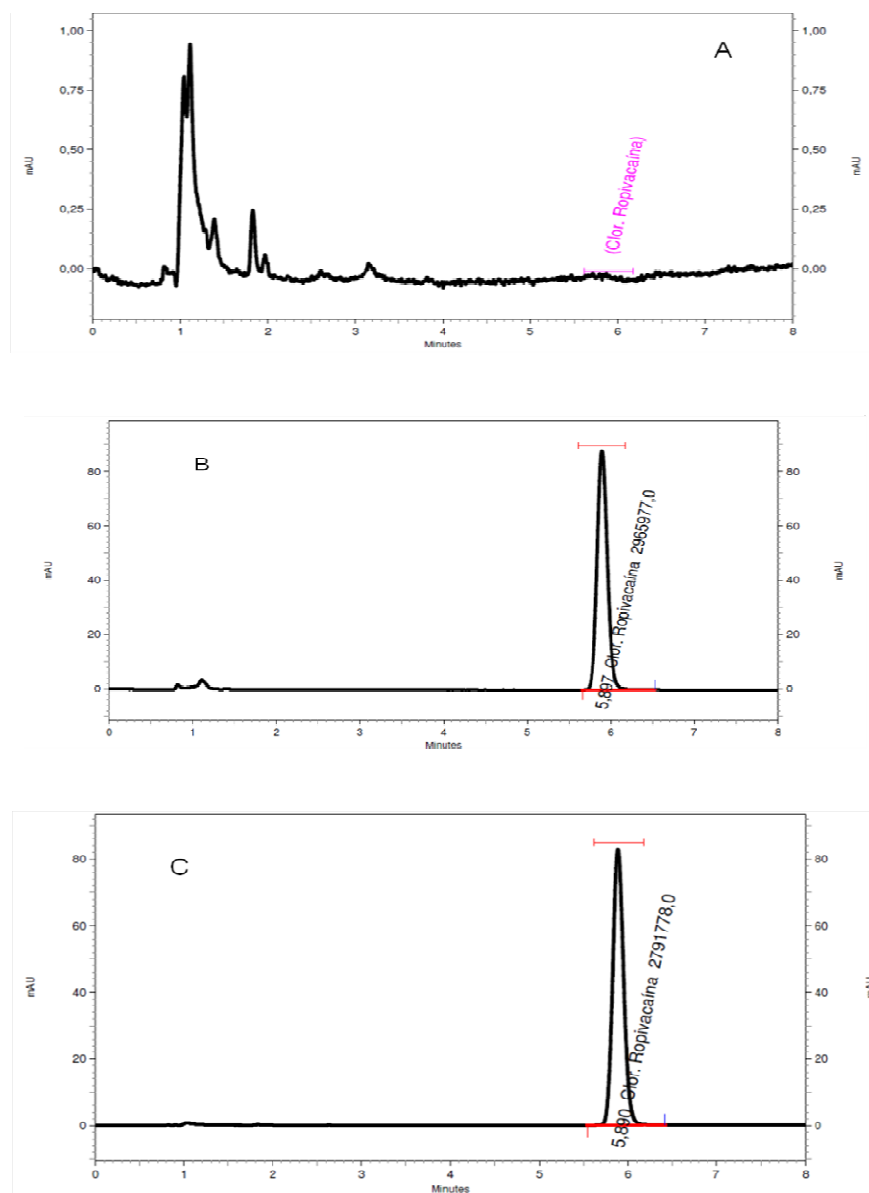


Figura 10 – Cromatograma referente a uma injeção de solução placebo (A), padrão de ropivacaína (B) e amostra (C) (coluna Purospher Star RP 18e, Fase Móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH 8,0 numa razão de 60:40 (v/v) e comprimento de onda de 240 nm, no equipamento Merck Hitach®, conforme detalhado em “Materiais e métodos” – **item 3.3**).

Foi avaliada a recuperação da solução amostra para confirmar a seletividade e especificidade do método empregado (**Figura 11**), bem como a pureza de pico da solução padrão (**Figura 12**) e amostra (**Figura 13**). Após esses experimentos, pode-se dizer que os picos de amostras e padrões de Ropivacaína apresentaram-se puros na condição testada e que o parâmetro “Seletividade/Especificidade e Pureza de Pico” do método analítico está validado (RE nº 899, de 29 de maio de 2003).

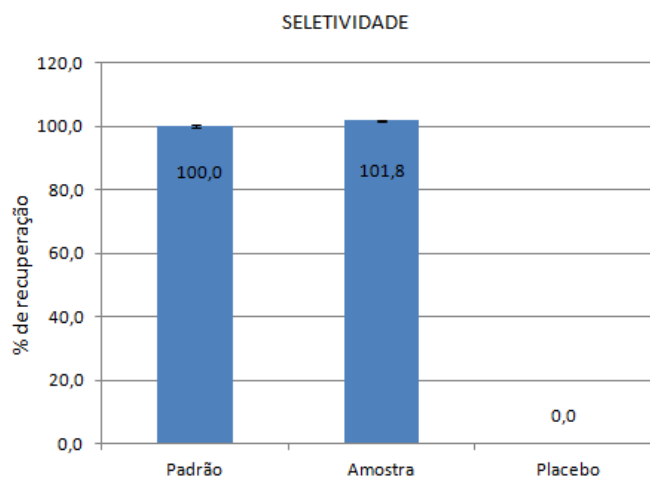


Figura 11 – Recuperação da solução amostra frente à solução padrão (n=3).

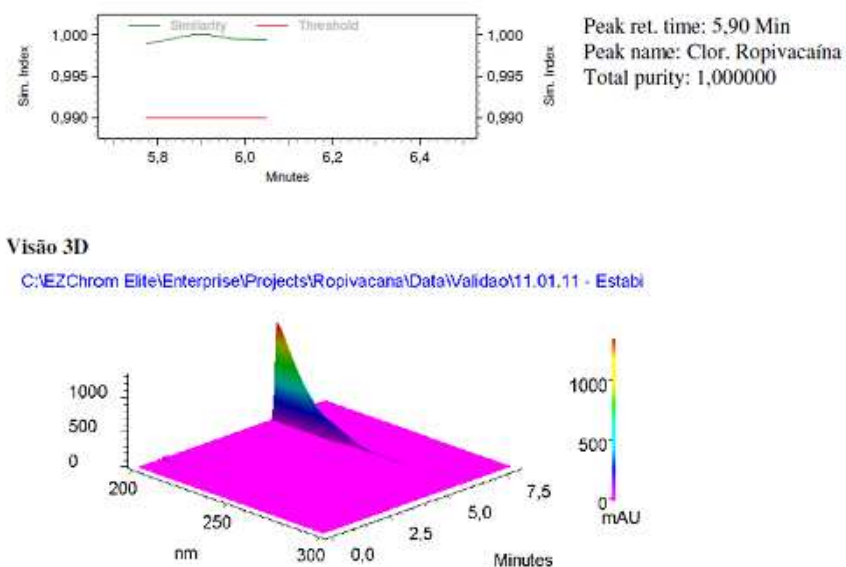


Figura 12 – Pureza cromatográfica referente à solução padrão de ropivacaína (coluna Purospher Star RP 18e, Fase Móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH 8,0 numa razão de 60:40 (v/v) e comprimento de onda de 240 nm, no equipamento Merck Hitach®, conforme detalhado em “Materiais e métodos” – item 3.3).

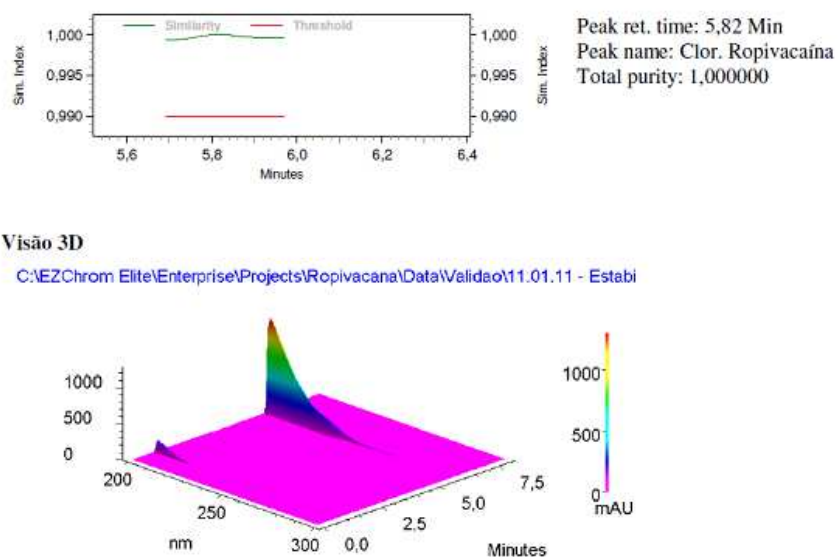


Figura 13 – Pureza cromatográfica referente à solução amostra (coluna Purospher Star RP 18e, Fase Móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH 8,0 numa razão de 60:40 (v/v) e comprimento de onda de 240 nm, no equipamento Merck Hitach®, conforme detalhado em “Materiais e métodos” – **item 3.3**).

4.1.1.2 Linearidade

A curva de calibração contendo RVC com concentração variando de 0,08 a 1,16mM (**Figura 14**) apresentou coeficiente de correlação linear de 0,99996, estando, portanto, de acordo com os limites requeridos pela RE n° 899, de 29 de maio de 2003.

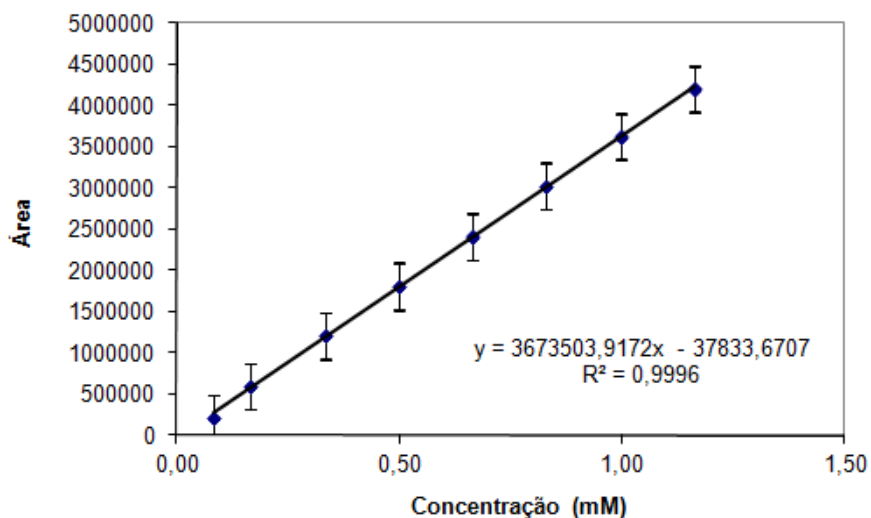


Figura 14 – Curva de calibração para ropivacaína ($r = 0,99996$), medida por absorção em UV em 240nm, por CLAE, conforme descrito no **item 3.3.1.2** de “Materiais e Métodos”.

4.1.1.3 Exatidão

Um intervalo de confiança está associado à recuperação média desse conjunto. O método é declarado exato se a recuperação teórica de 100% estiver inclusa dentro do intervalo de confiança. Conforme pode ser observado na **Tabela 4**, o método de quantificação da RVC foi considerado exato.

Tabela 4 – Recuperação média para o teste de exatidão de quantificação da RVC por CLAE.

Nível de confiança	99,00
Recuperação media (%)	101,37
Varição (+-)	0,30

4.1.1.4 Precisão

Conforme **Tabela 5**, o parâmetro precisão do método analítico de quantificação da RVC está de acordo com a RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Tabela 5 – Coeficiente de variação para o parâmetro Precisão, no teste de quantificação da RVC por CLAE.

Coeficiente de variação da repetibilidade Especificação máxima: 2,00	0,24
Coeficiente de variação de Precisão Intermediária Especificação máxima: 4,00	0,65

4.1.1.5 Robustez

Conforme descrito em “Materiais e Métodos” (**item 3.3.1.5**) foram avaliados os seguintes parâmetros de robustez: temperatura (**Figura 15A**), fluxo (**Figura 15B**) e composição de fase móvel (**Figura 15C**), de tal forma que o método mostrou-se robusto frente a essas pequenas variações, uma vez que a recuperação da ropivacaína permaneceu entre 95,0 a 105,0%.

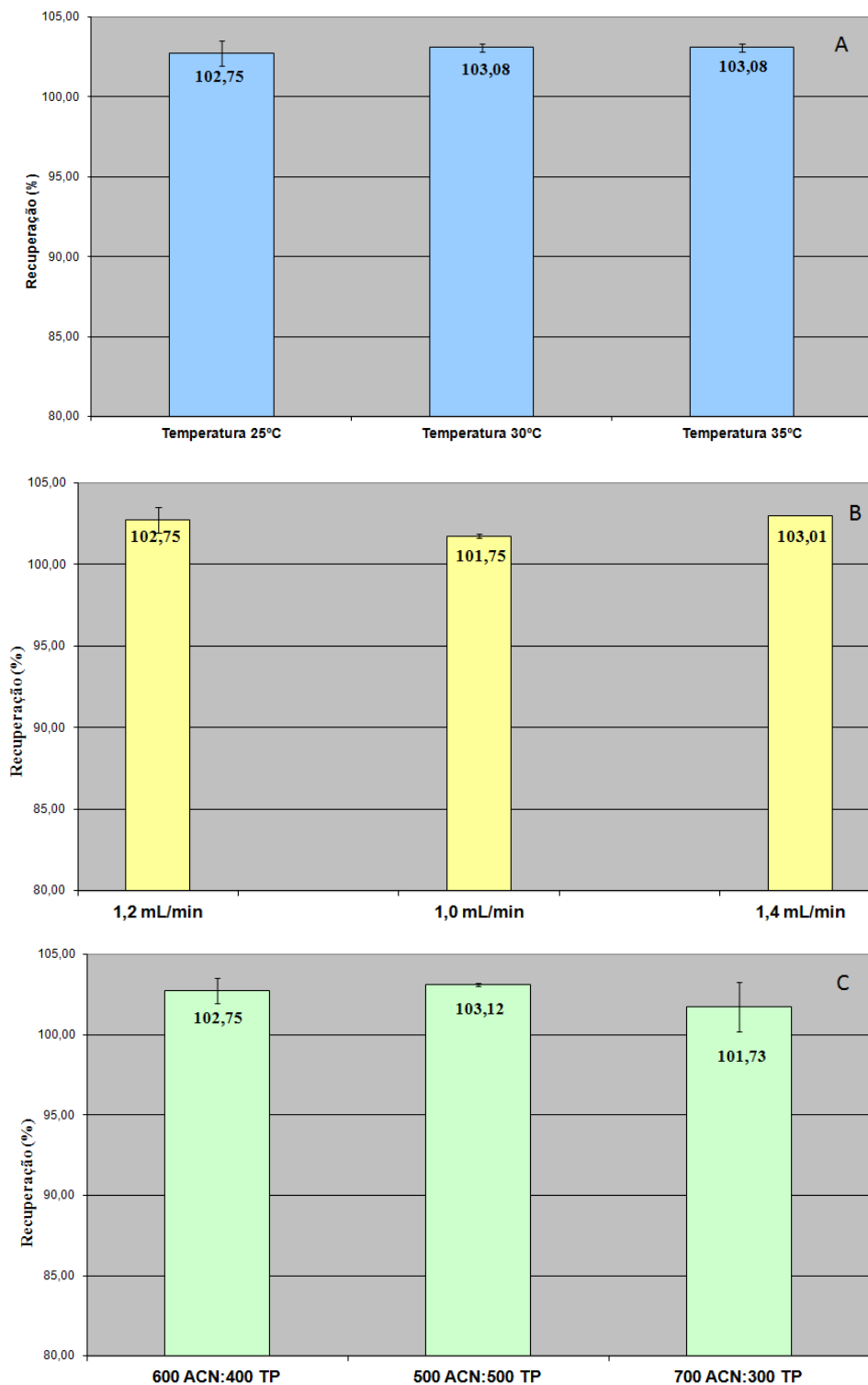


Figura 15 – Avaliação de Robustez do método analítico: (A) alteração de temperatura; (B) alteração de fluxo de fase móvel e (C) alteração de proporção da fase móvel (n=3).

4.1.1.6 Estabilidade do método de quantificação de ropivacaína

No estudo de estabilidade, as soluções padrão de ropivacaína mostraram-se estáveis por pelo menos 48 h após o seu preparo (**Figura 16**), enquanto as amostras contendo RVC mostraram-se estáveis por até 24 horas após preparo (**Figura 17**), sendo que a partir daí começa a haver queda no teor do fármaco, o que pode ter ocorrido devido ao fato de as amostras conterem a matriz da formulação (placebo), ou seja, lipossomas e/ou ciclodextrinas ou talvez por uma sedimentação no vial contendo as soluções, que podem influenciar no tempo de estabilidade da solução de trabalho.

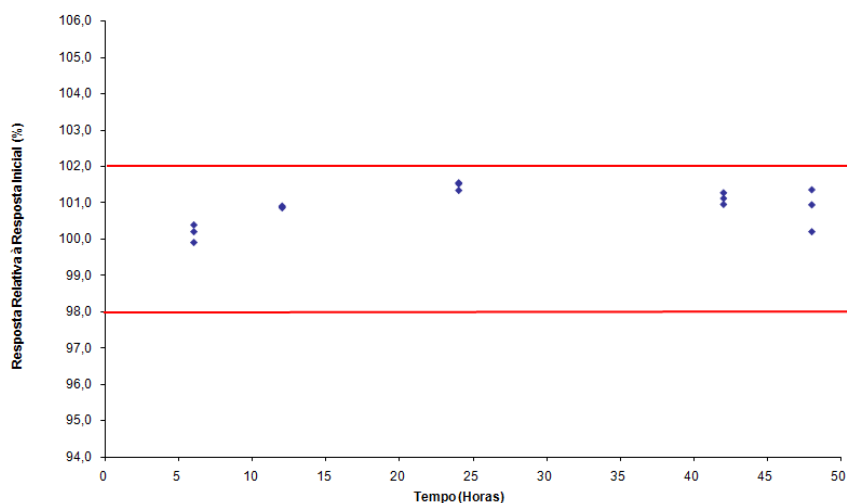


Figura 16 – Estabilidade – porcentagem de recuperação da solução padrão de ropivacaína, medida por até 48 h após preparo (n=3).

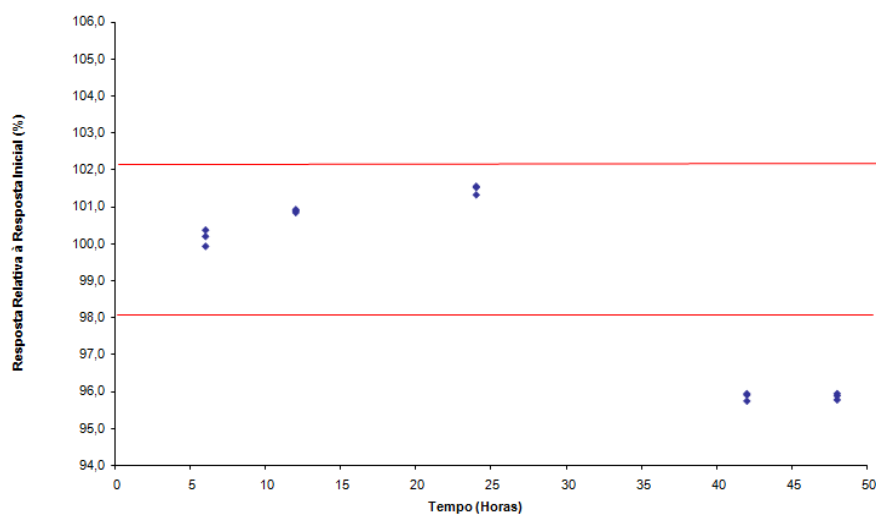


Figura 17 – Estabilidade – porcentagem de recuperação da solução amostra de ropivacaína, acompanhada por até 48h após preparo (n=3).

Além dos resultados apresentados neste trabalho para a validação da metodologia analítica de quantificação da ropivacaína, envolvendo os parâmetros exigidos pelo órgão regulador brasileiro para registro de medicamentos no Brasil (ANVISA), dados adicionais foram tratados de acordo com um software de validação de métodos (Valition Manager, Versão 2.20E), também reconhecido pela ANVISA, apenas a título de complemento para confirmar a validade do método, de forma que os dados estão em acordo com a legislação. O arquivo completo contendo o relatório de validação da metodologia em questão pode ser visualizado no seguinte link: <https://www.dropbox.com/home/Public?select=VALIDA%C3%87%C3%83O.pdf>.

4.2 Caracterização da nova formulação de RVC para liberação sustentada

4.2.1 Distribuição de tamanho e potencial Zeta dos lipossomas

Nesta dissertação, o diâmetro médio e a distribuição de tamanho das vesículas foram analisados por espalhamento de luz dinâmico. As medidas foram realizadas a 25°C, com um ângulo de detecção de 173° em relação ao feixe de raio laser incidente (conforme descrito em “Materiais e Métodos – **item 3.5.2**), antes e após a incorporação da RVC (livre ou na forma de complexo de inclusão com HP- β CD).

Inicialmente, os lipossomas (LUV 8mM) foram preparados contendo fosfatidilcolina de ovo, colesterol e alfa-tocoferol, na proporção 4:3:0,07 mol%. As medidas dessa formulação no tempo zero mostraram que 91,4% das vesículas contendo o complexo RVC:HP- β CD apresentaram diâmetro médio (baseado em intensidade de luz espalhada) de $498,4 \pm 96,0$ nm, enquanto que 97,1% das vesículas contendo RVC livre apresentaram diâmetro médio de $352,7 \pm 16,7$ nm, coerente com resultados anteriores, LUV 4mM e RVC 2mM com tamanho médio de 356 ± 83 nm, para 85% da população avaliada (de Araujo et al., 2008a). Porém, após 15 dias do preparo, novas medidas revelaram desestabilização das vesículas, possivelmente com presença de grande quantidade de aglomerados devido ao aumento considerável no diâmetro médio das vesículas.

Sabendo que as ciclodextrinas podem complexar-se com o colesterol, sequestrando-o de membranas biológicas (Piel et al., 2006) e desestabilizando assim a membrana lipídica, consideramos a possibilidade de esta interação estar ocorrendo no sistema de duplo

carreamento LUV:RVC:HP- β CD, explicando a aglomeração das vesículas e instabilidade da formulação.

Tendo em vista esses resultados, foi decidido retirar o colesterol da formulação lipossomal, utilizando-se apenas EPC e α -tocoferol nos ensaios subsequentes. Assim, todos os dados aqui apresentados, referem-se à formulação sem colesterol, conforme descrito no **item 3.4.2** de “materiais e métodos” deste trabalho.

As medidas do raio hidrodinâmico das vesículas unilamelares de EPC: α -tocoferol 1:0,01 mol%, medidas por intensidade de espalhamento de luz (**Figura 18**), mostraram a presença de uma população majoritária com diâmetro médio em torno de 200 nm e índice de polidispersão em torno de 0,2 (**Tabela 6**).

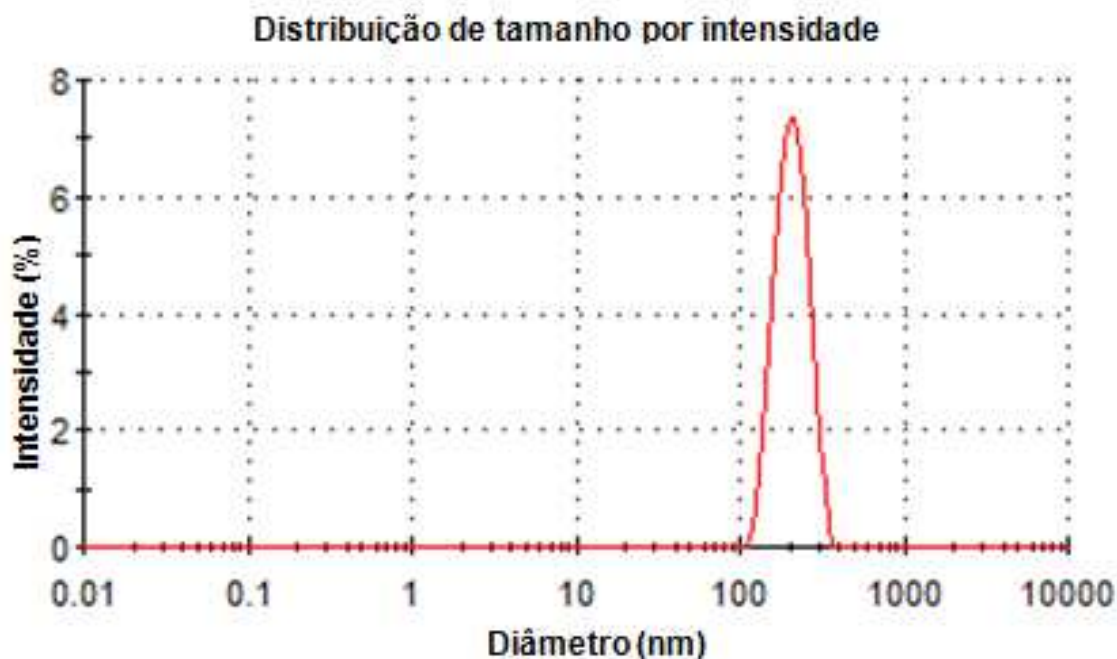


Figura 18 – Distribuição de tamanho por intensidade de luz espalhada da vesícula lipossomal de EPC: α -tocoferol (1:0,01 mol %) após encapsulação do complexo de inclusão RVC:HP- β CD.

Observou-se ainda, que a encapsulação do AL (livre ou na forma de complexo de inclusão com CD) não modificou o diâmetro médio das vesículas de forma significativa ($p > 0,05$), quando comparado ao das vesículas sem o AL ou o complexo de inclusão (**Tabela 6**). Valores de polidispersão pequenos como os valores aqui medidos (em torno de 0,2) são desejáveis, pois indicam homogeneidade das partículas produzidas (Schaffazick et al., 2003; Gasco, 2007).

Vale ressaltar que o Zeta Sizer utilizado neste trabalho faz boas medidas para vesículas com diâmetro médio de até 1000 nm, portanto, os valores encontrados para o segundo pico no

sistema de duplo carregamento (**Tabela 6**), podem não traduzir valores exatos, fornecem apenas dados aproximados, sendo que medidas mais precisas poderão ser futuramente obtidas por difratometria a laser.

O tamanho médio das vesículas preparadas sem colesterol, foi significativamente menor que o daquelas preparadas anteriormente, com colesterol (356±83nm) (de Araujo et al., 2008a), o que é compatível com uma maior fluidez dessas membranas, já que a presença do colesterol aumenta a ordem e diminui a dinâmica molecular de membranas no estado líquido-cristalino (Yeagle, 2012).

Tabela 6: Diâmetro médio das vesículas lipossomais de EPC:α-tocoferol (1:0,01 mol %) extrudadas (média ± DP), contendo ou não RVC encapsulada (n=3). T = 25°C

Diâmetro médio das vesículas (nm)				
(EPC:α-toc) (1:0,01)		Diâmetro	Proporção	Pdl+DP
	Amostra	± DP	%	
Pico 1	LUV 8 mM	221,4±6,2	100,0	0,252±0,004
Pico 2		0,0	0,0	0,0
Pico 1	LUV 8 mM : HP-βCD 8 mM	244,3±9,2	100,0	0,242±0,011
Pico 2		0,0	0,0	0,0
Pico 1	LUV 8mM : RVC 8 mM	224,2±19,7	100,0	0,256±0,016
Pico 2		0,0	0,0	0,0
Pico 1	LUV 8 mM : (RVC:HP-βCD) 8 mM	220,2±20,3	99,6±0,6	0,250±0,010
Pico 2		1395,0±2416,0	0,4±0,6	0,251±0,012

NOTA: análise estatística – ANOVA: Tukey Kramer. Não significativa p>0,05.

A maior fluidez aumenta a deformabilidade das partículas durante o processo de extrusão, levando à vesículas de menor tamanho. Esta observação é importante, porque a partição de compostos anfífilos como a RVC tende a aumentar em bicamadas mais fluidas, de forma que os lipossomas aqui preparados podem apresentar maior eficiência de encapsulação do que os preparados anteriormente, com colesterol.

Também foram realizadas medidas de potencial zeta (**Figura 19**) dos lipossomas de EPC:α-tocoferol (1:0,01 mol %), de forma que a adição de RVC não alterou o potencial de

cargas de superfície dos lipossomas no sistema binário, o que indica que a RVC não deve se localizar preferencialmente na superfície da bicamada lipídica, o que alteraria grupamentos polares carregados como o fosfato das EPCs, como já foi demonstrado para a partição da tetracaína protonada, em vesículas multilamelares de EPC (Boulanger et al., 1980).

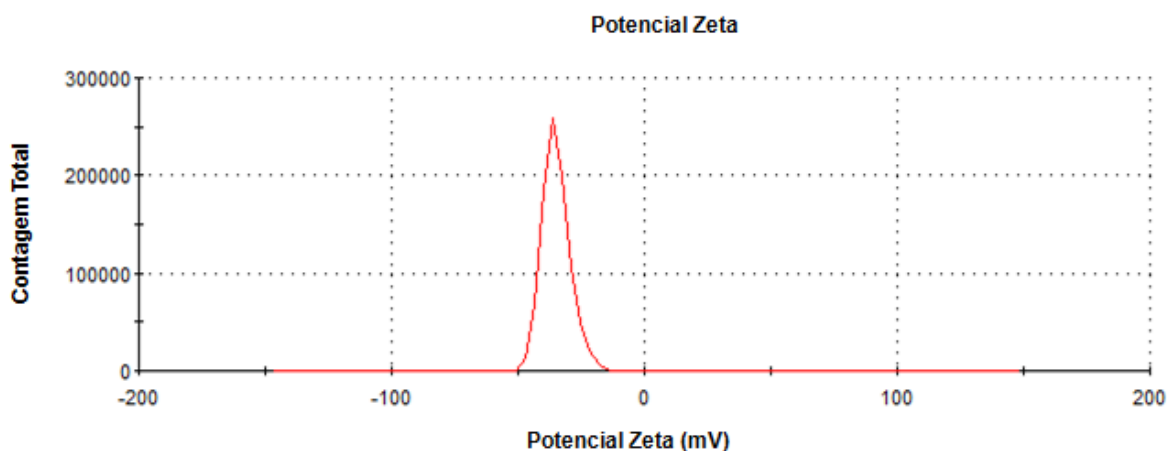


Figura 19 – Medida do potencial zeta da vesícula lipossomal de EPC: α -tocoferol (1:0,01 mol %) após encapsulação do complexo de inclusão RVC:HP- β CD.

Analisando as propriedades químicas de EPC, sabe-se que é uma estrutura química zwitteriônica (a parte polar da molécula apresenta cargas positiva e negativa que se anulam), não possuindo, portanto carga residual, porém a formulação lipossomal foi preparada em Tampão HEPES pH 7,0 (20 mM), de forma que a maior parte dos contra íons deve ser negativa, o que pode ter originado a carga negativa mostrada no potencial zeta.

Conforme relatado acima, a análise estatística dos dados não revelou diferença significativa ($p > 0,05$) para os valores obtidos de carga de superfície entre a vesícula lipossomal sem RVC (-20,8 mV) e o sistema binário contendo RVC encapsulada em lipossomas (-18,6 mV), como mostra a **Tabela 7**.

Já em relação ao sistema binário contendo LUV e HP- β CD (-12,1 mV) e o sistema de duplo carregamento (ternário) contendo LUV, HP- β CD e RVC (-31,7 mV), o valor de carga de superfície foi significativamente diferente ($p < 0,05$), indicando que de alguma forma, o fato da cavidade da HP- β CD estar ocupada com a RVC influencia na carga de superfície dos lipossomas (**Tabela 7**). Esse mesmo efeito de superfície causado provavelmente pelo complexo (RVC:HP- β CD) também pôde ser observado na avaliação das formulações através do ensaio por microscopia eletrônica de transmissão, onde ocorreu nítida alteração na morfologia da

formulação ternária proposta quando comparada ao sistema binário, o que será discutido mais à frente, no **item 4.2.6**.

Outra hipótese que pode explicar a mudança no potencial zeta para o sistema de duplo carregamento que está sendo proposto neste trabalho pode ser devido à presença de vesículas muito grandes (maiores que 1000 nm) neste sistema, pois embora elas estejam em menor proporção (0,4%) na formulação, as mesmas podem influenciar na carga de superfície pela presença de micropartículas.

Tabela 7: Medidas de potencial zeta das vesículas lipossomais de EPC: α -tocoferol (1:0,01 mol %) extrudadas (média \pm DP), contendo ou não RVC encapsulada (n=3).

		Potencial Zeta
	Amostra	mV
Média	LUV 8 mM	-20,8
DP		1,0
Média	LUV 8 mM : HP- β CD 8 mM	-12,1
DP		0,7
Média	LUV 8 mM : RVC 8 mM	-18,6 ^a
DP		1,5
Média	LUV 8 mM : (RVC:HP- β CD) 8 mM	-31,7 ^{b*}
DP		1,1

NOTA: análise estatística – ANOVA: Tukey Kramer.

a- LUV vs LUV:RVC ($p > 0,05$) - não significativo

b- LUV:HP- β CD vs LUV:RVC:HP- β CD ($p < 0,05$)*

4.2.2 Eficiência de encapsulação e coeficiente de partição da RVC nos lipossomas

A porcentagem de RVC (livre ou na forma de complexo de inclusão em ciclodextrina) encapsulada foi determinada em suspensões lipossomais de EPC: α -tocoferol 1:0,01 mol%, preparadas na concentração de 8 mM de lipídios totais e 8 mM de RVC. A taxa de encapsulação da RVC dentro destes lipossomas, em pH 7,0, calculada de acordo com a equação 1 foi de 25% para RVC no sistema binário (**Tabela 8**), coerente com dados de literatura - que mostram taxa de encapsulação de 23,0 a 23,8% para a RVC em lipossomas de

EPC:colesterol (de Araujo et al., 2008a) - e ligeiramente superior àqueles, o que é esperado para vesículas preparadas sem colesterol e, por isso, mais fluidas (Warren, 1987).

A porcentagem de encapsulação registrada é coerente também quando comparada à encapsulação registrada com outros anestésicos locais da série das amido-amidas cíclicas, em vesículas de fosfatidilcolina de ovo e colesterol em pH fisiológico: $24,8 \pm 4,2\%$ para bupivacaína e $18,4 \pm 3,9\%$ para mepivacaína (de Araujo et al., 2004). A porcentagem de encapsulação não atinge valores maiores pela limitação na quantidade de lipossomas que se consegue preparar pelo método de extrusão (ca 10 mM).

Apesar disso, trabalhos já publicados anteriormente, mostram que os sistemas lipossomais alteram a cinética de liberação desses anestésicos e induzem significativa melhoria na atividade antinociceptiva medida em animais (Cereda et al., 2004; de Araujo et al., 2004; Cereda et al., 2006).

Tabela 8- Eficiência de encapsulação e partição de RVC (livre e na forma de complexo de inclusão) em MLV (n = 3)

Formulação	*E (%)	*P
LUV 8mM: RVC8 mM	$25,0 \pm 0,8$	$69,1 \pm 2,9$
LUV 8mM: (RVC:HP- β CD) 8 mM	$33,0 \pm 2,4$	$102,2 \pm 10,9$

Nota: *E: Eficiência de Encapsulação e P: Coeficiente de Partição

A **Tabela 8** mostra ainda que, na presença do complexo RVC:HP- β CD, a porcentagem de encapsulação aumenta para 33%. Esse resultado indica haver sinergismo entre os dois carreadores, o que é altamente desejável para aumentar a quantidade total de RVC carregada pelo sistema de liberação sustentada (RVC na forma de complexo de inclusão + RVC encapsulada + RVC livre).

Os valores de coeficiente de partição P (**Tabela 8**) puderam ser calculados a partir do mesmo experimento de separação de fases por ultracentrifugação, usando-se os valores de porcentagem de encapsulação, na equação 2 (**item 3.5.3** de Materiais e Métodos). A medida do valor de P leva em consideração o volume das fases membranar e aquosa, tal que valores de P permitem a comparação entre sistemas diferentes (de Paula & Schreier, 1995). O valor de P determinado para a RVC no sistema lipossomal de EPC: α -tocoferol 1:0,01 (69,1) – **Tabela 8**, está de acordo com o esperado, sendo ligeiramente inferior ao valor de P da bupivacaína – seu análogo mais hidrofóbico – 96 (Malheiros et al., 2004) nos mesmos lipossomas e medido em pH 7,1. A presença de um radical propil como substituinte no anel piperidínico da RVC confere à

molécula uma menor hidrofobicidade em relação à BVC (radical butil). Por outro lado, essa característica confere diferenças em termos de anestesia como início e duração de ação e toxicidade sistêmica, colocando a RVC como um possível substituto para a BVC, já que a primeira apresenta perfil de bloqueio nervoso semelhante, porém com toxicidade menor que o da Bupivacaína (McClure, 1996; Wang et al., 2011).

4.2.3 Avaliação da interação de RVC com ciclodextrina e com lipossomas, analisada por RMN

Através dos valores de coeficiente de difusão, obtidos de experimentos de DOSY (^1H -RMN) foram obtidos dados como fração molar (f_x) de RVC ligada aos carreadores ciclodextrina e lipossomas (separadamente e no sistema de duplo carregamento - ternário) e a constante de associação (K_a) do anestésico com sistemas carreadores.

Analisando os resultados de DOSY para as espécies livres: RVC, HP- β CD e lipossomas de EPC, observa-se uma diferença consideravelmente grande nos coeficientes de difusão (D), uma vez que lipossomas de EPC apresentam grande volume e, portanto, uma difusão mais lenta ($0,80 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) em relação à HP- β -CD ($2,47 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) e RVC ($5,21 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) (**Tabela 9**). Estes valores estão de acordo com a literatura (Cabeça et al., 2008; Cabeça et al., 2011).

No entanto, quando se consideram os sistemas binários de RVC em HP- β CD, bem como RVC com lipossomas de EPC, os valores de coeficiente de difusão da RVC diminuem substancialmente, (para $4,5\text{-}4,6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) em relação ao da RVC livre, o que sugere a formação do complexo RVC:HP- β CD e também a encapsulação do anestésico nos lipossomas (**Tabela 9**). Mais ainda, quando o sistema de duplo carregamento (ternário) é formado (LUV: RVC:HP- β CD) a difusão é ainda mais lenta ($4,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) em relação à RVC livre.

Os coeficientes de difusão (D) das espécies livres RVC, HP- β CD, lipossomas de EPC e na forma de complexo de inclusão RVC:HP- β CD, LUV: RVC:HP- β CD (**Tabela 9**) foram utilizados para determinar a fração molar (f_x) e a constante de associação (K_a) da RVC em cada amostra, através das Eq. 4 e 5, descritas em “Materiais e Métodos” (**item 3.5.4**).

Os resultados de DOSY indicam que a interação da RVC com os lipossomas de EPC é mais fraca (constante de associação= 22 L/mol) que a interação entre o anestésico e a HP- β CD ($K_a=128 \text{ L/mol}$) (**Tabela 9**). Resultados semelhantes (maior interação com o carreador ciclodextrina do que com lipossomas) foram encontrados para os anestésicos locais prilocaina e prilocaína (Cabeça et al., 2008; Cabeça et al., 2011).

Para avaliar o sistema de duplo carreamento, há 2 formas de cálculo, que levam em consideração a difusão da HP- β CD ou dos lipossomas. Assim, os valores de K_a calculados devem ser comparados com os valores obtidos com o respectivo sistema macromolecular. Nota-se (**Tabela 9**) que para o sistema de duplo carreamento (ternário), a constante de associação da RVC aumenta (em relação ao sistema binário), tanto quando se leva em consideração a HP- β CD ($K_a = 342$ L/mol vs. 128 L/mol) quanto em relação aos lipossomas de EPC ($K_a = 79$ L/mol vs. 22 L/mol).

Tabela 9 – Coeficientes de Difusão (D) da RVC, HP- β CD e lipossomas de EPC e constantes de associação (K_a) da RVC nos sistemas binários: RVC:HP- β CD, LUV:RVC e sistema de duplo carreamento (ternário) LUV: RVC:HP- β CD medidos em experimentos de DOSY-RMN.

Complexos	Compostos	$D (10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1})$	Fração molar do complexo $\times 100$ (%)	K_a (L/mol)
-	RVC	$5,21 \pm 0,044$	-	-
-	HP- β CD	$2,47 \pm 0,011$	-	-
-	LUV de EPC	$0,80 \pm 0,023$	-	-
RVC em HP- β CD	RVC	$4,47 \pm 0,006$	27	128
RVC em LUV de EPC	RVC	$4,61 \pm 0,018$	14	22
RVC em HP- β CD em LUV de EPC ^a	RVC	$4,20 \pm 0,011$	36	342K ₁
RVC em HP- β CD em LUV de EPC ^b	RVC	$4,20 \pm 0,011$	23	79K ₂

^a Cálculo da constante de associação do sistema LUV: RVC:HP- β CD levando-se em consideração a difusão da macromolécula HP- β CD.

^b Cálculo da constante de associação do complexo LUV: RVC:HP- β CD levando-se em consideração a difusão do lipossoma de EPC.

O coeficiente de difusão da molécula de HDO (água residual) em D₂O a 25°C foi $21,8 \pm 0,3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ sec}^{-1}$.

600MHZ, D₂O, 298 K, pH 7 e sinal residual de HDO em 4,68 ppm foi usado como referência.

$$[\text{RVC}] = 8 \text{ mM} \quad [\text{HP-}\beta\text{CD}] = 8 \text{ mM} \quad [\text{lipossomas}] = 8 \text{ mM}$$

Além disso, medidas de RMN registraram a fração molar do complexo de inclusão levando-se em consideração a difusão da HP- β CD (36%) e também a difusão do lipossoma (23%). Esses valores vão de encontro com os resultados de eficiência de encapsulação (**Tabela**

8), em que para o sistema binário composto por RVC e LUV a eficiência de encapsulação foi de 25% e para o sistema de duplo carregamento (LUV: RVC:HP- β CD) foi de 33%.

Essas medidas de RMN confirmam o efeito sinérgico de carregamento da RVC pela ciclodextrina e pelos lipossomas e, conforme indicava o maior valor de % de encapsulação (**Tabela 8**), confirmam a capacidade do sistema de duplo carregamento preparado, em carrear maiores quantidades de RVC para liberação sustentada, bem como a alta afinidade da RVC pela CD.

4.2.4 Morfologia das formulações: análise por microscopia eletrônica de transmissão

As análises por MET facilitaram a observação da estrutura das amostras e mostraram mais um indício da encapsulação da RVC e formação do sistema de duplo carregamento proposto, coerente com os resultados apresentados no estudo de caracterização (encapsulação e RMN) e estudos previamente publicados em no laboratório de Biomembranas (de Araujo et al., 2008b).

As **Figuras 20A e 20B** mostram a imagem de uma vesícula lipossomal de EPC sem a presença de RVC. Já a figura **19C** mostra a imagem de uma suspensão lipossomal contendo RVC, que apresenta em sua grande maioria, vesículas na forma esférica. A **Figura 20D** mostra a imagem de um lipossoma contendo RVC, a partir da ampliação da **Figura 20C**, onde se pode observar tamanho compatível com as medidas de espalhamento de luz (cerca de 200nm) e manutenção da forma esférica, comparável ao de uma vesícula sem RVC, conforme ilustrado nas **Figuras 20A e 20B**.

Por outro lado, quando foi obtida a imagem do sistema de duplo carregamento (LUV:RVC:HP- β CD), ocorreu modificação na morfologia da vesícula que passou a ter uma forma menos esférica (**Figura 20E e 20F**), que pode indicar a presença de ciclodextrina influenciando na morfologia do composto formado. Essa morfologia nitidamente alterada após encapsulação do complexo corrobora com os dados de potencial zeta, sugestivos de que o complexo possa estar localizado preferencialmente na superfície da vesícula lipossomal, de forma que a presença do complexo alterou significativamente a carga de superfície, isso não ocorre quando a RVC é encapsulada na sua forma livre, sendo que nesse caso, nem a morfologia nem o potencial zeta são alterados de maneira significativa. Além disso, como já discutido no ensaio de RMN (**item 4.2.5**), o equilíbrio da reação está mais voltado para a formação do complexo, ou seja, a afinidade da RVC é muito maior pela CD em relação ao lipossoma, o que contribui novamente para sugerir a grande influência da CD na formulação.

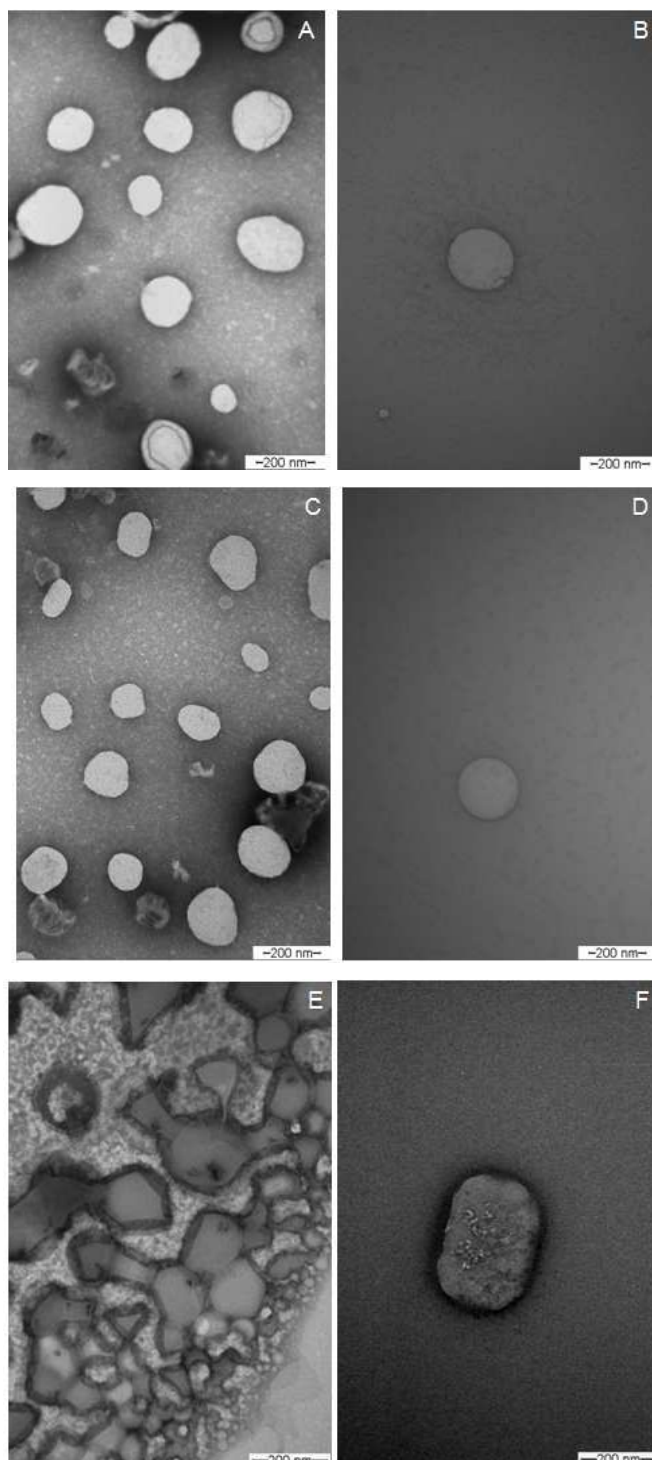


Figura 20 – Imagem de MET para: suspensão lipossomal de EPC sem AL - Aumento de 60000x (A); lipossoma de EPC sem AL - Aumento de 100000x (B); suspensão lipossomal de EPC contendo ropivacaína - Aumento de 60000x (C); lipossoma de EPC contendo RVC – Aumento de 100000x (D); suspensão lipossomal de EPC contendo o complexo de inclusão RVC:HP-βCD - Aumento de 60000x (E) e lipossoma de EPC contendo o complexo RVC:HP-βCD - Aumento de 100000x (F) - todas as formulações foram preparadas contendo 8mM do AL e dos carreadores.

Após avaliação das medidas de potencial zeta, que indicaram uma possível influência da CD na carga de superfície para o sistema de duplo carregamento, bem como da análise por microscopia eletrônica de transmissão, onde ocorreu nítida alteração da morfologia no sistema de duplo carregamento, e também com os dados obtidos no ensaio de RMN, onde foi possível notar que existe uma forte afinidade da RVC pela CD, pode-se sugerir, que o complexo de inclusão formado por RVC e HP- β CD deve-se localizar preferencialmente, na superfície do lipossoma de EPC e que o equilíbrio da reação deve estar mais voltado para a formação do complexo de inclusão e em menor proporção para a encapsulação da RVC (livre ou na forma de complexo de inclusão).

Os dados obtidos e relatados aqui, permitem propor a possível relação entre as 3 entidades na formação do sistema de duplo carregamento, através da **Figura 21**, que mostra esquematicamente a formação do sistema sugerido.

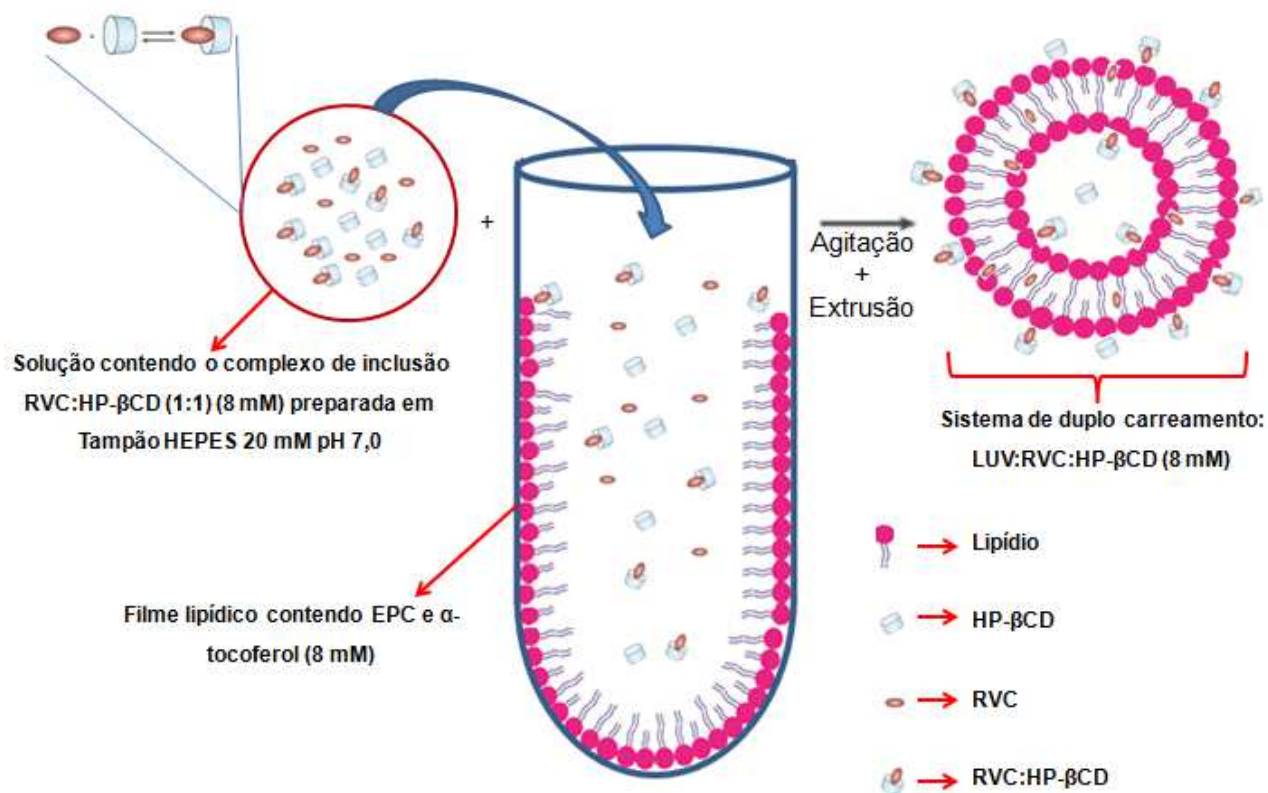


Figura 21 – Esquema da possível formação do sistema de duplo carregamento proposto (LUV:RVC:HP- β CD).

De fato, medidas de STD (Cabeça et al., 2011) (*Saturation Transfer Difference* ou Diferença de Transferência de Saturação) mostraram interação da CD com a superfície dos lipossomas de EPC, sustentando o modelo proposto da **Figura 21**.

4.3 Estabilidade físico-química dos lipossomas na formulação

Durante a estocagem mudanças físicas e químicas nas suspensões de lipossomas podem ocorrer, levando a alterações nas vesículas, degradação química e vazamento do fármaco encapsulado (Darwis & Kellaway, 2001). Por isso testes de peroxidação lipídica foram feitos nas formulações de ropivacaína lipossomal (livre ou na forma de complexo de inclusão com ciclodextrina), armazenadas a 4°C, a 25°C ao abrigo da luz e a 37°C. Também foram acompanhados o tamanho e o potencial zeta dessas partículas, medidas tempo 0 e após 15, 30 e 60 dias de preparo armazenados a 4°C.

4.3.1 Medidas de peroxidação lipídica

A estabilidade química dos lipossomas foi avaliada pela detecção de endoperóxidos através da reação de produtos de oxidação lipídica em altas temperaturas, com ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito em “materiais e métodos” (**item 3.6.1**).

Os resultados obtidos pela reação com o TBA mostraram mudanças significativas nos níveis de peroxidação lipídica ao longo dos 60 dias de estocagem, tanto para a formulação lipossomal binária (LUV:RVC) (**Figura 22**), como para a formulação proposta em sistema de duplo carregamento (LUV:RVC:HP-βCD) (**Figura 23**), mantidas sob diferentes condições de armazenamento (4, 25 e 37 °C). Embora essas mudanças tenham sido significativas ($p < 0,05$), o aumento de endoperóxidos não atingiu valores superiores a 0,025mM ($2,5 \times 10^{-5}$ M), confirmando resultados anteriores do grupo, em que o nível de peroxidação foi extremamente baixo (menor que 1%), considerando-se a concentração total de lipídios presente na formulação (de Araujo et al., 2008a; de Araujo et al., 2008b).

De uma forma geral, mesmo com o aumento significativo da peroxidação lipídica, as concentrações de endoperóxidos em LUV armazenadas durante todo o período analisado não ultrapassaram 0,02mM para o sistema binário (LUV:RVC) e 0,03mM para o sistema ternário (LUV:RVC:HP-βCD), isto é, não chegaram a 0,5% da quantidade total de lipídios presente nas formulações, indicando estabilidade química dos lipossomas no período avaliado. Além disso, as alterações de temperatura (4, 25 e 37 °C) não influenciaram no aumento da formação de endoperóxidos, tanto para a formulação lipossomal binária (LUV:RVC) como para o sistema ternário proposto (LUV:RVC:HP-βCD).

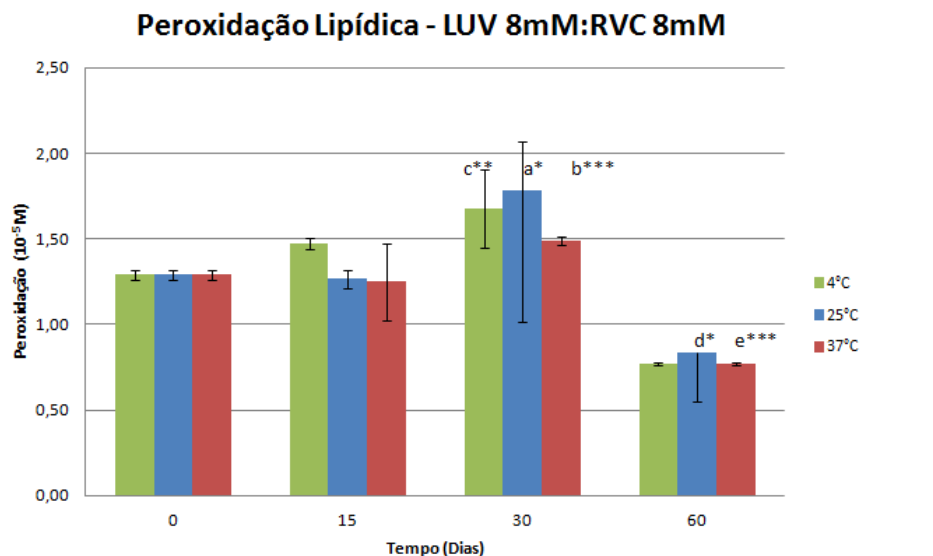


Figura 22 – Concentração de endoperóxidos medida pelo teste de TBA na formulação LUV: RVC ao longo de 60 dias de armazenamento a 4, 25 e 37°C. Análise estatística: ANOVA / Tukey_Kramer: a- LUV:RVC_inicial vs LUV:RVC_30 dias ($p < 0,05$)*; b- LUV:RVC_inicial vs LUV:RVC_30dias_37°C ($p < 0,001$)***; c- LUV:RVC_inicial vs LUV:RVC_30dias_4°C ($p < 0,01$)**; d- LUV:RVC_inicial vs LUV:RVC_60 dias ($p < 0,05$)*; e- LUV:RVC_inicial vs LUV:RVC_60dias_37°C ($p < 0,001$)***.

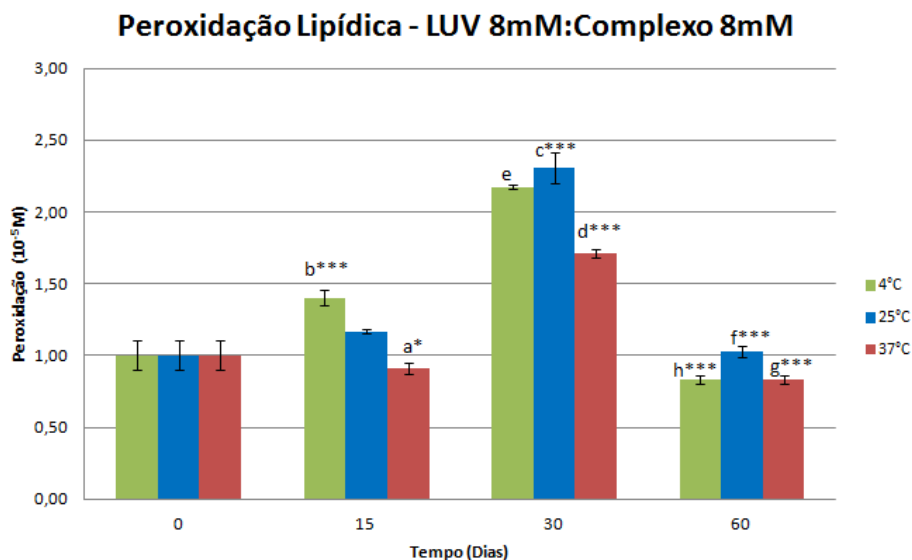


Figura 23 – Concentração de endoperóxidos medida pelo teste de TBA na formulação LUV:RVC:HP-βCD ao longo de 60 dias de armazenamento a 4, 25 e 37°C. Análise estatística: ANOVA / Tukey_Kramer: a- LUV:RVC:HP-βCD_inicial vs LUV:RVC:HP-βCD_15dias_37°C ($p < 0,05$)*; b- LUV:RVC:HP-βCD_inicial vs LUV:RVC:HP-βCD_15dias_4°C ($p < 0,001$)***; c- LUV:RVC:HP-βCD_inicial vs LUV:RVC:HP-βCD_30dias ($p < 0,001$)***; d- LUV:RVC:HP-βCD_inicial vs LUV:RVC:HP-βCD_30dias_37°C ($p < 0,001$)***; e- LUV:RVC:HP-βCD_inicial vs LUV:RVC:HP-βCD_30dias_4°C ($p > 0,05$) - não significante; f- LUV:RVC:HP-βCD_inicial vs LUV:RVC:HP-βCD_60dias ($p < 0,001$)***; g- LUV:RVC:HP-βCD_inicial vs LUV:RVC:HP-βCD_60dias_37°C ($p < 0,001$)***; h- LUV:RVC:HP-βCD_inicial vs LUV:RVC:HP-βCD_60dias_4°C ($p < 0,001$)***.

4.3.2 Medidas de tamanho e potencial Zeta

Medidas do diâmetro e potencial zeta dos lipossomas foram realizadas em até 60 dias após o preparo das formulações, armazenadas sob refrigeração (4°C). Pode-se observar (**Tabela 10**) que as vesículas sem anestésico não sofreram alteração significativa de tamanho ($p>0,05$) ao longo de todo o período avaliado. Já para o sistema binário (LUV:RVC) as vesículas aumentaram significativamente de tamanho após 60 dias ($p<0,001$), com possível fusão das vesículas após esse período. Igualmente a amostra controle, contendo lipossomas e ciclodextrina (LUV:HP- β CD) mostrou aumento de tamanho das vesículas com o tempo.

Tabela 10- Diâmetro médio das partículas lipossomais (EPC: α -tocoferol 1:0,01 mol %) sem e com RVC (livre ou na forma de complexo de inclusão com ciclodextrinas) medido por 60 dias após preparo, armazenadas a 4 °C e medidas por espalhamento dinâmico de luz (n = 3).

Tempo	0 DIAS		15 DIAS		30 DIAS		60 DIAS	
	diâmetro nm	proporção %	diâmetro nm	proporção %	diâmetro nm	proporção %	diâmetro nm	proporção %
LUV 8mM	221,4±6,2 ^a	100,0	220,9±18,5	98,3±1,7	202,3±15,4	98,3±1,6	213,4±66,5	97,3±4,0
			3056,0±2654,0	1,4±1,3	3099,0±2684,0	1,7±1,6	1311,0±2271,0	2,3±4,0
			9,9±17,1	0,3±0,5				
LUV 8mM : HP- β CD 8mM	244,3±9,2	100,0	232,8±22,0	97,4±2,4	186,9±9,1	98,7±1,4	291,3±19,8	91,8±4,3
			2420,0±2372,0	2,2±2,4	3074,0±2669,0	1,3±1,4	1640,0±2748,0	7,1±4,4
			13,4±23,3	0,5±0,8			1543,0±2373,0	1,0±1,8
LUV 8mM : RVC 8mM	224,2±19,7	100,0	212,4±12,9	98,5±2,2	186,7±12,4	98,8±1,2	357,1±16,2 ^{b***}	92,9±8,6
			1441,0±2574,0	1,5±1,3	3049,0±2664,0	1,2±1,2	1559,0±2637,0	6,3±9,0
							8,08±13,99	0,8±1,3
LUV 8mM : (RVC:HP- β CD) 8mM	220,2±20,3	99,6±0,6	188,9±19,3	98,5±1,3	166,7±4,3 ^{c*}	99,2±1,2	162,1±9,6 ^{d***}	98,9±1,1
	1395,0±2416,0	0,4±0,6	2997,0±2599,0	1,5±1,3	1432,0±2480,0	0,7±1,2	3194,0±2774,0	1,1±1,1

NOTA: Análise Estatística: ANOVA/Tukey-Kramer:

a- LUV inicial vs LUV tempos de estabilidade. Não significativa ($p > 0,05$);

b- LUV:RVC_inicial vs LUV:RVC_60dias ($p < 0,001$)***;

c- LUV:RVC:HP- β CD_inicial vs LUV:RVC:HP- β CD_30dias ($p < 0,05$)*;

d- LUV:RVC:HP- β CD_inicial vs LUV:RVC:HP- β CD_60dias ($p < 0,001$)***.

Em relação ao sistema de duplo carregamento (LUV:RVC:HP- β CD) observou-se uma pequena diminuição no diâmetro médio das vesículas após 30 e 60 dias de preparo ($p < 0,05$ e

$p < 0,001$ respectivamente), o que pode se explicado talvez pela morfologia do sistema proposto (**Figura 20F**), onde a vesícula mostrou uma forma mais quadrada e o equipamento (Zeta Sizer) faz medidas de vesículas esféricas. Entretanto esta formulação apresentou também a maior proporção de população de vesículas com tamanho médio estável (99,2%) em relação às demais, no mesmo período de 30 dias.

Também foram realizadas medidas de potencial zeta (**Tabela 11**) e os valores obtidos mostraram uma maior estabilidade do sistema de duplo carreamento (formulação proposta de complexo de RVC em ciclodextrina encapsulado em lipossomas) em relação ao sistema binário (RVC livre encapsulada em lipossomas), uma vez que a carga de superfície do sistema de duplo carreamento manteve-se mais homogêneo ao longo dos 60 dias analisados.

Os resultados da **Tabela 11** mostram que, em todas as formulações binárias, os valores de potencial zeta aumentaram (em módulo), indicando maior estabilidade das partículas com o decorrer dos dias de armazenamento, que é o caso do sistema binário LUV:RVC em que o valor de carga de superfície alterou significativamente ($p < 0,01$) de -18,6 mV na medida inicial para -46,9 mV após 60 dias de armazenamento, resultado equiparável ao reportado para lipossomas de EPC:colesterol contendo RVC (de Araujo et al., 2008a; de Araujo et al., 2008b).

Embora essa alteração possa ser um indício de mudança na agregação entre os componentes da formulação binária e que poderia, inclusive, alterar o perfil de liberação do fármaco ao longo do tempo, os valores de tamanho médio (**Tabela 10**) não apontam para uma desestabilização dos lipossomas.

Além disso, o sistema de duplo carreamento (ternário) desde a sua medida inicial já se apresentou mais estável em relação aos demais, uma vez que suas medidas ao longo dos 60 dias avaliados não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) (**Tabela 11**).

Conforme se observa na **Tabela 11**, para o sistema ternário, a carga de superfície manteve-se praticamente constante durante o período avaliado (de -30,7 mV inicialmente para -32,1 mV após 60 dias), sugerindo maior estabilidade desse sistema em relação aos demais avaliados, não apresentando alterações significativas na fusão das partículas ao longo desse período. Esses dados são muito relevantes para a proposta inicial do projeto e contribuem para mostrar um grande diferencial da formulação proposta em relação aos sistemas binários trabalhados anteriormente.

Tabela 11- Potencial zeta das partículas lipossomais (EPC: α -tocoferol 1:0,01 mol %) sem e com RVC (livre ou na forma de complexo de inclusão com ciclodextrina) medido por até 60 dias de armazenamento a 4°C (n = 3)

Potencial Zeta		0 DIAS	15 dias	30 dias	60 dias
Amostra		mV	mV	mV	mV
Média	LUV 8mM	-20,8	-25,5	-28,3	-40,7
DP		0,9	2,5	1,4	2,9
Média	LUV 8mM : HP- β CD 8mM	-12,1	-18,7	-35,6	-46,1
DP		0,7	0,3	2,5	0,6
Média	LUV 8mM : RVC 8mM	-18,6	-13,0	-27,8	-46,9 ^{a**}
DP		1,5	0,8	1,5	1,9
Média	LUV 8mM : (RVC:HP- β CD) 8mM	-30,7	-22,6	-31,7	-32,1 ^b
DP		1,1	10,0	2,3	3,7

NOTA: análise estatística – ANOVA: Tukey Kramer.^a LUV:RVC_inicial vs LUV:RVC_60dias (p<0,01)**

^b LUV:RVC:HP- β CD_inicial vs LUV:RVC:HP- β CD_60dias (p>0,05) - Não significante

4.4 Ensaio de liberação *in vitro*

Para os testes de liberação *in vitro* foram realizados experimentos com os sistemas LUV:RVC; RVC:HP- β CD e LUV:RVC:HP- β CD, sendo os resultados obtidos comparados com os perfis de liberação do fármaco livre, presente em formulações de uso clínico. Como observado em estudos prévios com sistemas binários de RVC encapsulada em lipossomas (de Araujo et al., 2008a) ou em ciclodextrinas (de Araujo et al., 2008b) ocorre uma liberação mais lenta do fármaco, quando o mesmo encontra-se encapsulado em lipossomas ou na forma de complexo de inclusão com HP- β CD (**Figura 24**).

Neste trabalho, em geral, foi possível notar uma liberação mais lenta da formulação lipossomal ternária proposta, contendo LUV:RVC:HP- β CD em relação à RVC livre e ao sistema lipossomal binário (LUV:RVC), porém não houve diferença significativa na liberação de RVC (p>0,05), quando o sistema ternário foi comparado ao complexo de inclusão RVC:HP- β CD (**Figura 24**). O mesmo comportamento também foi evidenciado no estudo *in vivo* (**Figuras 26 e 27**), mostrando que, possivelmente, a taxa de associação da RVC à HP- β CD (maior em relação aos lipossomas conforme mostrado nos ensaios de RMN apresentados anteriormente), justifique a liberação mais lenta da RVC.

No experimento de liberação *in vitro* realizado nesta dissertação, após 0,5 h de ensaio para a amostra de RVC livre, a liberação do fármaco para a solução receptora havia atingido um percentual de 50%. Após encapsulação de RVC em lipossomas de EPC ocorreu redução na taxa de liberação de RVC, em comparação ao fármaco livre, mostrando um início de liberação mais lento, sendo que para atingir os mesmos 50% de RVC liberada, foi gasto o dobro do tempo em relação à RVC livre, ou seja, cerca de 1 h para liberar 50% de RVC do sistema lipossomal binário, conforme mostra a **Figura 24**.

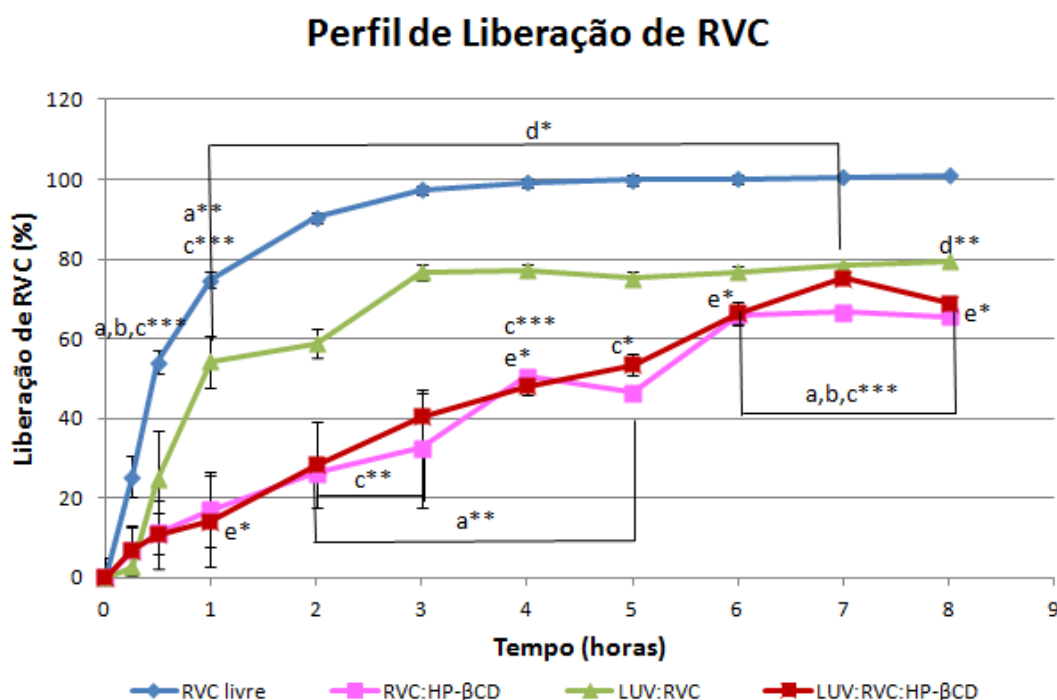


Figura 24 – Liberação cumulativa para as formulações RVC livre; RVC:HP-βCD ; LUV:RVC e LUV:RVC:HP-βCD a partir de sistemas em pH 7,0 e 37 °C; [RVC]=8 mM, [EPC]=8 mM e [HP-βCD]=8 mM. Dados representados como médias±PD (n=3).

Análise estatística: One-way: ANOVA / Tukey

- a- RVC vs RVC:HP-βCD (p<0,01) ** (p<0,001) ***
- b- RVC vs LUV:RVC (p<0,001) ***
- c- RVC vs LUV:RVC:HP-βCD (p<0,05)* (p<0,01)** (p<0,001) ***
- d- RVC:HP-βCD vs LUV:RVC (p<0,05)* (p<0,01)**
- e- LUV:RVC vs LUV:RVC:HP-βCD (p<0,05)*

Já o perfil de liberação da RVC na forma de complexo de inclusão (RVC:HP-βCD) mostrou uma taxa mais lenta tanto em relação à RVC livre quanto à encapsulada em lipossomas, de forma que foram gastos pouco menos de 4 h para liberar os mesmos 50% de RVC da formulação; após 8 h de experimento não havia sido atingido 70% de RVC liberada na solução receptora (**Figura 24**), valor atingido em menos de 3 h com o sistema binário

lipossomal (50% de RVC havia sido liberada após cerca de 1 h de experimento) (**Figura 24**), o que é coerente com os resultados de RMN que mostraram uma maior afinidade (constante de associação) entre RVC e HP- β CD, em relação aos lipossomas de EPC.

Observou-se também, uma diminuição na liberação do AL na forma de complexo de inclusão com HP- β CD e encapsulado em lipossomas (sistema de duplo carreamento ou ternário) em relação à RVC livre, sendo que, assim como observado para o complexo de inclusão, somente após cerca de 4 h de experimento é que foi atingido o percentual de 50% de RVC liberada na solução receptora, indicando que o uso desses carreadores alterou a cinética de liberação do anestésico, entre o compartimento doador e receptor (**Figura 24**), além de reforçar mais uma vez, a participação da CD determinando o perfil de liberação da RVC.

A liberação de RVC do sistema de duplo carreamento proposto nesse projeto (LUV:RVC:HP- β CD), também mostrou diminuição na taxa de liberação da RVC em relação ao sistema lipossomal LUV:RVC, sendo que o perfil de liberação do sistema ternário mostrou-se muito semelhante ao medido para o sistema binário composto pelo complexo de inclusão contendo RVC:HP- β CD (**Figura 24**).

Para a pesquisa e desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada, alguns fatores devem ser considerados: i) o fármaco deve ser encapsulado ou na forma de complexo de inclusão, possibilitando a manutenção das concentrações terapêuticas por um longo tempo e ii) a eliminação do sistema carreador/AL (*clearance*) deve ser reduzida o suficiente para que concentrações de fármaco sejam mantidas no local da injeção (importante para fármacos de ação regional, como os AL) (Langerman et al., 1992; Mowat et al., 1996).

Nesse sentido, os testes de liberação *in vitro* possibilitaram avaliar a liberação dos fármacos através de membranas, sendo que as formulações que mantiveram os menores níveis de liberação possivelmente apresentam uma maior interação do fármaco com os carreadores.

Observou-se assim, que as formulações estudadas retardaram a liberação de RVC (LUV:RVC:HP- β CD \geq RVC:HP- β CD > LUV:RVC), quando comparados à solução controle (RVC livre) no mesmo tempo de experimentação, indicando que a RVC beneficia-se da utilização de ambos, lipossomas e ciclodextrinas, como carreadores.

Acredita-se que esta liberação sustentada seja efeito da complexação do anestésico com CD, evidenciado pelo aumento da solubilidade aquosa do anestésico RVC (de Araujo et al., 2008b) interferindo na cinética de transferência através da interface água/membrana. Já na encapsulação em lipossomas, há carreamento do AL incorporado na bicamada lipídica (de Araújo et al., 2003; de Araujo et al., 2008a), que se dissocia lentamente em meio aquoso. Em relação às propriedades farmacológicas do AL, cujo sítio de ação é a membrana do axônio,

ambos os sistemas proporcionariam um aumento na concentração de fármaco disponível no local de ação.

Os perfis de liberação obtidos foram importantes para a comparação entre os sistemas de AL com HP- β CD e em lipossomas, evidenciando que a interação RVC com HP- β CD é mais forte em relação a sua interação com LUV, porém não o suficiente para limitar a liberação do fármaco aos tecidos-alvo, o que é altamente desejável.

O ensaio mostrou, portanto, que aparentemente, os lipossomas não oferecem grande resistência à liberação de RVC da formulação ternária proposta, porém dão estabilidade coloidal para melhorar as condições de estocagem, conforme observado nas medidas de potencial zeta vistas anteriormente, além de indicar que possivelmente, é a CD quem está limitando/determinando o perfil de liberação da RVC.

Acreditamos que os lipossomas tem como limitação a baixa concentração (há um limite máximo de 5 - 10 mM de lipídios para preparo de suspensões estáveis). Este seria o motivo de não haver maior encapsulação de RVC e, conseqüentemente, menor liberação sustentada.

Os resultados de liberação sugerem ainda que os carreadores podem proporcionar um benefício adicional aos AL, sendo evidenciado (*in vitro*) pelo aumento no tempo para liberação do fármaco e estabilidade da formulação, determinada pela manutenção da carga de superfície conforme discutido anteriormente (**item 4.3.2**).

4.5 Avaliação da toxicidade *in vitro*

A avaliação do efeito tóxico do anestésico livre (RVC), na forma de complexo de inclusão com ciclodextrina (HP- β CD:RVC) e encapsulado em lipossomas (LUV:RVC e LUV:RVC:HP- β CD) foi realizada através do ensaio de viabilidade celular, por redução do corante MTT sobre culturas de células (fibroblastos de camundongos, da linhagem 3T3).

Foram escolhidas as concentrações de 0,8; 1,6; 4,8 e 6,4 mM de RVC para os experimentos, sendo que nessas concentrações foi detectada uma variação significativa no percentual de células viáveis (de 100 a 0%). A **Figura 25** mostra uma tendência a aumentar a toxicidade celular à medida que aumentam as concentrações de RVC livre, ou seja, que o anestésico reduz o percentual de células viáveis de maneira concentração dependente. Nota-se que existe diferença significativa entre o anestésico livre e o complexo de inclusão RVC:HP- β CD a 0,8 mM ($p < 0,001$), 1,6 mM ($p < 0,01$) e 6,4 mM ($p < 0,05$), bem como em relação ao sistema binário LUV:RVC (0,8 mM e 1,6 mM - $p < 0,01$).

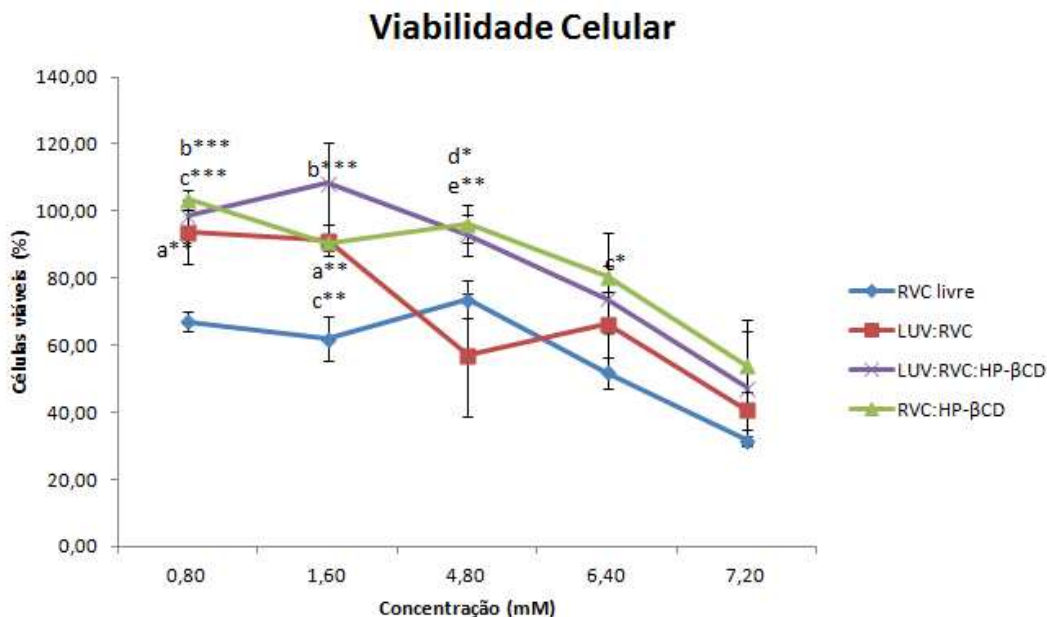


Figura 25 – Ensaio de viabilidade celular em fibroblastos 3T3 em cultura, após tratamento com RVC livre, ou carreada: na forma de complexo de inclusão com HP-βCD, encapsulada em lipossomas de EPC ou no sistema de duplo carreamento LUV:RVC:HP-βCD.

Análise estatística: ANOVA / Tukey_Kramer

a- RVC livre vs LUV:RVC ($p < 0,01$)**

b- RVC livre vs LUV:RVC:HP-βCD ($p < 0,001$)***

c- RVC livre vs RVC:HP-βCD ($p < 0,01$)** ($p < 0,001$)***

d- Sistema binário (LUV:RVC) vs Sistema de duplo carreamento (LUV:RVC:HP-βCD) ($p < 0,05$)*

e- Sistema binário (LUV:RVC) vs Complexo (RVC:HP-βCD) ($p < 0,01$)**

O mesmo ocorre para a formulação proposta (sistema de duplo carreamento contendo complexos de inclusão de RVC encapsulados em lipossomas), onde o percentual de células viáveis é significativamente maior quando se compara com a RVC livre em várias concentrações testadas (0,8 mM $p < 0,001$; 1,6 mM $p < 0,01$ e 6,4 mM $p < 0,05$), indicando de menor toxicidade do AL quando encapsulado em lipossomas e na forma de complexo de inclusão com HP-βCD.

Desta maneira, a curva de viabilidade celular mostrou que o sistema lipossomal binário (LUV:RVC) foi menos efetivo que o complexo de inclusão (RVC: HP-βCD) e o sistema ternário (LUV:RVC:HP-βCD). Além disso, a interação do anestésico local simultaneamente com HP-βCD e com a vesícula lipossomal, reforça que o sistema de duplo carreamento e o complexo de inclusão RVC: HP-βCD são menos tóxicos que o sistema lipossomal LUV:RVC, o que se justifica pela menor associação (K_a) e estão de acordo com os resultados de cinética de liberação (**Figura 24**).

De uma forma geral, o tratamento das células com formulações de RVC diminuiu a porcentagem de células viáveis de maneira dose-dependente em relação ao controle, sendo que todas as formulações de liberação sustentada reduziram este efeito tóxico do fármaco.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa ($p > 0,05$) entre o complexo de inclusão (RVC: HP- β CD) e o sistema ternário proposto neste trabalho (LUV:RVC:HP- β CD), e ainda que este ensaio seja apenas um indicativo de citotoxicidade e não mimetize o comportamento no organismo, onde o fármaco estará sob influência de outros fatores, o sistema de duplo carregamento apresentou efeitos citotóxicos menores em comparação com a RVC livre ou encapsulada em lipossomas de EPC, indicando que a formulação proposta pode ser adequada para futuras aplicações clínicas.

4.6 Ensaio *in vivo*: Avaliação farmacológica

Uma consideração importante na escolha das concentrações de RVC testadas para o sistema *in vivo*, envolveu a correlação com as concentrações de uso clínico do anestésico local, 4,8 a 16 mM (0,125 a 0,5%, respectivamente) (Cánovas Martínez et al., 2004; de Araujo et al., 2008a). Neste sentido, foram preparadas formulações contendo 0,125 e 0,25% de RVC. Ressaltamos que não foi possível preparar uma formulação contendo 0,5% do AL, pois nesta concentração a RVC não se mostrou solúvel no pH utilizado (pH 7,0), onde a solubilidade foi de 8 mM.

4.6.1 Avaliação do bloqueio motor do nervo ciático

A latência, o tempo para o efeito máximo ($T_{m\acute{a}x}$), tempo de recuperação e o efeito total (ASC) das formulações de liberação sustentada contendo RVC foram os parâmetros medidos e comparados para todos os grupos experimentais (**Tabela 12**).

Conforme apresentado na **Tabela 12**, a injeção das formulações avaliadas alterou, de maneira dose-dependente, a função motora dos animais após os bloqueios do nervo ciático (infiltração), havendo a perda reversível dos reflexos motores em todos os animais tratados.

Os resultados apresentados na **Tabela 12** sugerem que todas as formulações testadas não modificaram significativamente o tempo de duração do bloqueio motor e o efeito anestésico total (potência do bloqueio motor) induzido por RVC, o que é desejável, uma vez que o interesse maior é em relação ao bloqueio sensorial e não, ao bloqueio motor.

Tabela 12 - Latência, T_{máx}, tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (ASC) induzido pelas formulações de RVC livre e lipossomal (contendo RVC livre ou na forma de complexo de inclusão com HPβ-CD) durante o bloqueio do nervo ciático em camundongos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 7/grupo). Análise Estatística: Kruskal-Wallis: não significativo.

Concentração (%)	Grupos	Latência (seg)	T _{máx} (min)	T _{recuperação} (min)	ASC (score/min)
0,125	RVC	50,0 (20,0-60,0)	1 (1-3)	34,3 (20,0-50,0)	26,9 (14,0-44,0)
	LUV:RVC	40,0 (20,0-60,0)	1 (1-4)	27,1 (10,0-40,0)	26,9 (14,0-44,0)
	RVC:HP-βCD	25,0 (15,0-40,0)	1 (-)	22,9 (10,0-30,0)	15,8 (6,5-24,0)
	LUV:RVC :HP-βCD	25,0 (15,0-45,0)	1 (-)	21,4 (10,0-30,0)	12,2 (6,5-24,0)
0,250	RVC	35,0 (30,0-50,0)	1(1-4)	48,6 (40,0-60,0)	32,9 (14,5-46,5)
	LUV:RVC	40,0 (25,0-60,0)	1(1-5)	50,0 (40,0-60,0)	48,8 (24,0- 108,0)
	RVC:HP-βCD	20,0 (15,0-25,0)	1(1-5)	41,4 (30,0-50,0)	32,4 (14,0-45,5)
	LUV:RVC :HP-βCD	20,0 (10,0-25,0)	1(1-5)	41,4 (30,0-50,0)	29,6 (14,0-48,0)

4.6.2 Avaliação do bloqueio sensorial do nervo ciático

A avaliação do efeito antinociceptivo, através do teste PWTP em camundongos albinos *Swiss*, mostrou as relações dose – efeito para a RVC livre, lipossomal e na forma de complexo de inclusão com CD. Os efeitos do tratamento com os veículos (HP-βCD e LUV) e formulações de AL livre (RVC), na forma de complexo de inclusão (RVC:HP-βCD), encapsulada em lipossomas (LUV:RVC) ou no sistema de duplo carreamento (LUV:RVC:HP-βCD) foram avaliados ao longo do tempo, para duas diferentes concentrações de AL (0,125% e 0,25%).

A administração dos veículos na região do nervo ciático não modificou os valores de linha basal para o limiar da dor em camundongos. Porém, todas as formulações de RVC, tanto na forma de complexo de inclusão com ciclodextrina, como encapsuladas em lipossomas de EPC aumentaram a duração e a intensidade do bloqueio sensorial, quando comparados ao fármaco livre.

A administração de RVC:HP-BCD 0,25% modificou a resposta dos animais ao estímulo mecânico no PWTP, aumentando a duração do efeito antinociceptivo em até 300 minutos (5 h) após a administração (**Figura 27**). A injeção das formulações na concentração de 0,125% mostrou que o complexo RVC:HP- β CD prolongou a duração da analgesia até 240 minutos (4 h) e aumentou a intensidade do efeito analgésico significativamente ($p < 0,001$) quando comparada com o fármaco livre após 150 minutos de experimento e também quando comparado ao sistema lipossomal binário em 180 minutos ($p < 0,05$) e em 240 minutos ($p < 0,01$) (**Figura 26**).

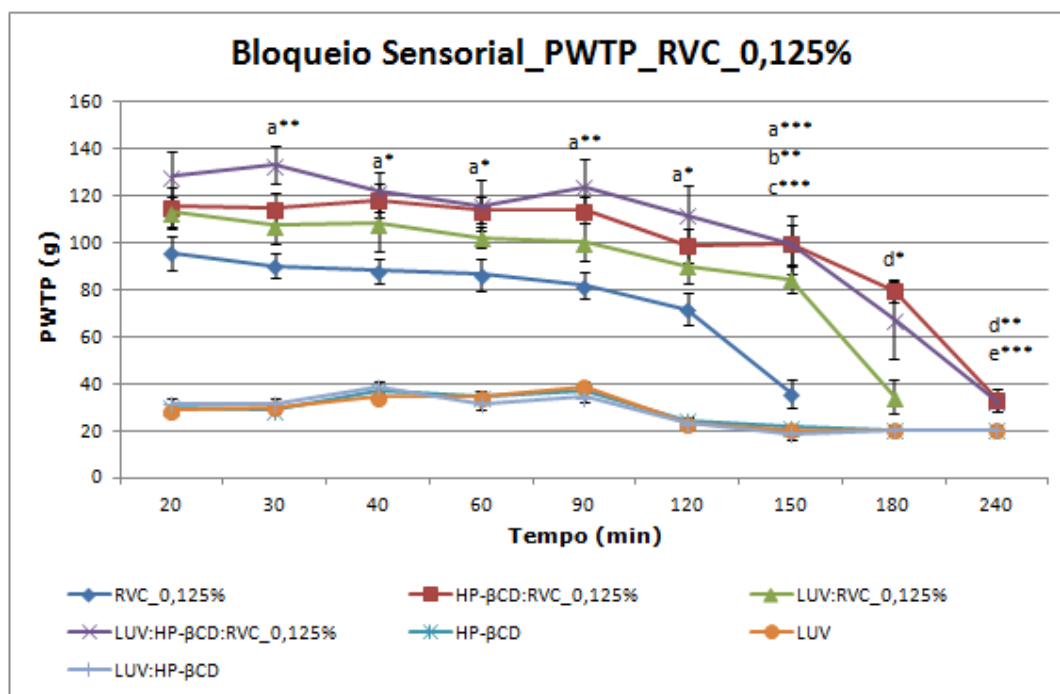


Figura 26 – Efeito anestésico x tempo no ensaio PWTP para os grupos tratados com RVC; RVC:HP- β CD; LUV:RVC e LUV:RVC:HP- β CD) – todas as formulações contendo RVC na concentração final de 0,125%.

Análise estatística: One-way / ANOVA

a - RVC vs LUV:RVC:HP- β CD ($p < 0,001$)^{***} ($p < 0,01$)^{**} ($p < 0,05$)^{*}

b - RVC vs LUV:RVC ($p < 0,01$)^{**}

c - RVC vs RVC:HP- β CD ($p < 0,001$)^{***}

d - LUV:RVC vs RVC:HP- β CD ($p < 0,05$)^{*} ($p < 0,001$)^{***}

e - LUV:RVC vs LUV:RVC:HP- β CD ($p < 0,001$)^{***}

O tratamento com a concentração de 0,25% também mostrou o sistema RVC:HP- β CD como uma formulação mais eficaz em potencializar o efeito analgésico nos animais tratados, quando comparado com a RVC livre na mesma concentração após 40 minutos de experimento ($p < 0,05$) e até 180 minutos ($p < 0,01$) (**Figura 27**).

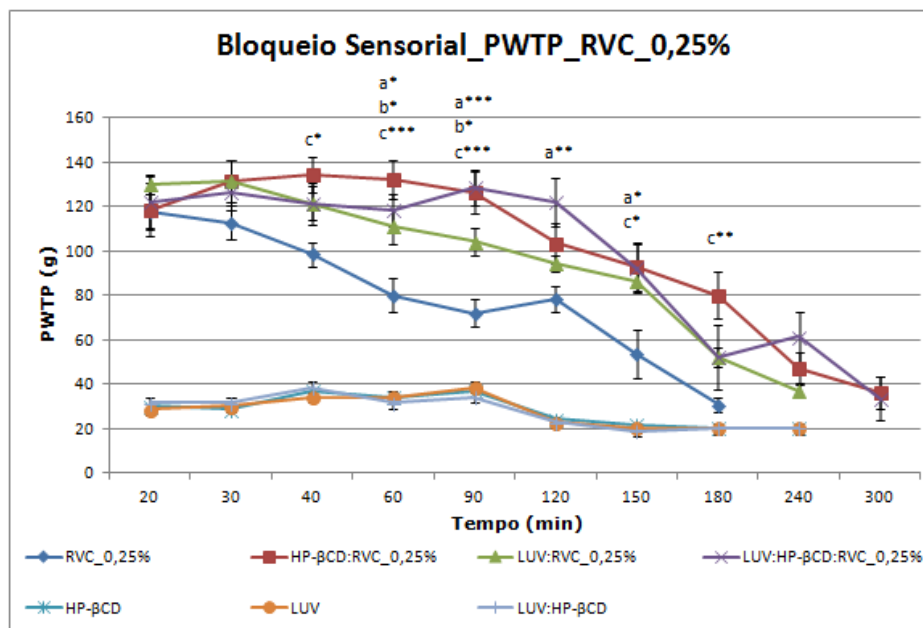


Figura 27 – Efeito anestésico x tempo no ensaio PWTP para os grupos tratados com RVC; RVC:HP-βCD; LUV:RVC e LUV:RVC:HP-βCD – todas as formulações contendo RVC na concentração final de 0,25%.

Análise estatística: One-way / ANOVA

a - RVC vs LUV:RVC:HP-βCD ($p < 0,001$)^{***} ($p < 0,01$)^{**} ($p < 0,05$)^{*}

b - RVC vs LUV:RVC ($p < 0,05$)^{*}

c - RVC vs RVC:HP-βCD ($p < 0,05$)^{*} ($p < 0,01$)^{**} ($p < 0,001$)^{***}

Com relação ao sistema lipossomal binário, o tratamento com LUV:RVC 0,125 % (**Figura 26**) foi significativamente diferente ($p < 0,01$) daquele com RVC livre 0,125% até 150 minutos de observação e a analgesia foi prolongada por até 180 minutos após a injeção. Além disso, a formulação LUV:RVC induziu um aumento no efeito analgésico em relação à RVC livre.

A infiltração de LUV:RVC 0,25% (**Figura 27**) mostrou resultados semelhantes aos obtidos com a concentração de 0,125%, tal que a formulação LUV:RVC aumentou o efeito analgésico em relação ao fármaco livre. O ponto final da analgesia induzida por RVC 0,25 % ocorreu 240 minutos após a injeção.

Assim como observado para RVC:HP-βCD, os grupos tratados com LUV:RVC:HP-βCD apresentaram melhores efeitos em relação à duração de ação e à intensidade da analgesia induzida pelo anestésico. O tratamento dos animais com LUV:RVC:HP-βCD 0,125% (**Figura 26**) mostrou um efeito analgésico significativamente maior quando comparado à RVC livre, após 30 minutos ($p < 0,01$) e até 150 minutos ($p < 0,001$) de experimentação. Quando comparado com o sistema lipossomal binário, a formulação LUV:RVC:HP-βCD mostrou efeito analgésico significativamente maior, até 240 minutos de experimentação ($p < 0,01$) (**Figura 26**).

A infiltração de LUV:RVC:HP- β CD 0,25% (**Figura 27**) mostrou resultados semelhantes aos obtidos com a concentração de 0,125%. Diferenças estatísticas em relação à RVC livre foram observadas durante quase todo o período de experimentação (de 40 minutos - $p < 0,05$, até 180 minutos - $p < 0,01$).

Os sistemas RVC:HP- β CD e LUV:RVC:HP- β CD mostraram diferenças na intensidade do efeito analgésico em relação ao fármaco livre e à formulação lipossomal (LUV:RVC). Além disso, o complexo de inclusão RVC:HP- β CD e o sistema de duplo carregamento LUV:RVC:HP- β CD induziram um aumento significativo no efeito do bloqueio sensorial em relação à RVC livre e ao sistema lipossomal binário LUV:RVC.

O ponto final da analgesia induzida por RVC:HP- β CD 0,25% e LUV:RVC:HP- β CD 0,25% ocorreu 300 minutos após a injeção e ambas formulações mostraram respostas semelhante ao longo do experimento, sendo que ambos mostraram uma analgesia significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao fármaco livre.

Na maior concentração testada, a administração de RVC:HP- β CD e LUV:RVC:HP- β CD prolongou a analgesia, aumentando também a intensidade do efeito durante os 300 minutos (5 h) de experimentação (**Figura 27**).

Desta forma, os resultados apresentados para o sistema lipossomal de duplo carregamento proposto (LUV:RVC:HP- β CD) evidenciaram melhorias significativas tanto em termos de analgesia, como viabilidade celular, liberação *in vitro* e estabilidade (física e química) da formulação, quando comparados com o sistema lipossomal LUV:RVC, similar ao caracterizado e publicado anteriormente pelo laboratório de Biomembranas (de Araujo et al., 2008a), conforme avaliado ao longo desse trabalho.

Em geral, não ocorreu diferença significativa entre o complexo de inclusão RVC:HP- β CD e o sistema de duplo carregamento proposto LUV:RVC:HP- β CD, nas duas concentrações testadas. Mas para ambos o efeito analgésico foi mais prolongado, quando comparado ao fármaco livre e ao sistema lipossomal (LUV:RVC), conforme discutido, sendo que o efeito da analgesia no sistema de duplo carregamento proposto foi cerca de 1,6 vezes maior em relação ao fármaco livre e 1,3 vezes maior em relação ao sistema lipossomal binário.

Esse resultado é coerente com os resultados *in vitro*, que não evidenciaram diferença significativa entre o perfil de liberação de RVC nas formulações RVC:HP- β CD e LUV:RVC:HP- β CD, que mostraram uma liberação significativamente mais lenta quando comparados à RVC livre ($p < 0,001$) e ao sistema lipossomal (LUV:RVC) ($p < 0,05$). Esses dados também condizem com o estudo realizado por Bragagni e colaboradores, que relataram que a encapsulação do

complexo de inclusão de prilocaína com ciclodextrina (HP- β CD) em lipossomas (sistema de duplo carregamento) aumentou a duração de ação anestésica em relação à prilocaína lipossomal. (Bragagni et al., 2010).

5. CONCLUSÕES

Uma nova formulação lipossomal para liberação sustentada do anestésico local ropivacaína, contendo complexo de inclusão deste AL encapsulado em lipossomas de EPC foi preparada e caracterizada nesta dissertação. A constituição lipídica desses lipossomas (sem colesterol) mostrou-se adequada para encapsulação da RVC nas concentrações de até 0,25%.

Testes de estabilidade química não indicaram aumento significativo dos níveis de endoperóxidos na formulação lipossomal, mesmo variando a temperatura de armazenamento, de forma que durante 60 dias de acompanhamento, não ultrapassaram 1% da concentração total de lipídios presentes na formulação. Análises de espalhamento dinâmico de luz indicaram que as vesículas permaneceram estáveis quanto ao tamanho dos lipossomas por até 30 dias de armazenamento.

A porcentagem de encapsulação da RVC neste sistema de duplo carregamento aumentou em relação ao sistema binário (RVC em lipossomas) e medidas de RMN mostraram que houve interação molecular entre RVC, ciclodextrina e lipossomas, tal que a constante de associação do anestésico no sistema LUV:RVC:HP- β CD foi maior que no sistema binário (RVC:HP- β CD) que por sua vez foi maior que no sistema lipossomal (LUV:RVC), evidenciando ainda que a RVC interage mais fortemente com a HP- β CD do que com os lipossomas de EPC.

Nos ensaios de liberação *in vitro*, em geral, observou-se uma diminuição na liberação do AL quando na forma de complexo de inclusão com ciclodextrinas ou encapsulado em lipossomas em relação à RVC livre, indicando que o uso de ambos carreadores retarda a cinética de liberação do fármaco.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, em cultura de fibroblastos 3T3, demonstraram que o sistema de duplo carregamento proposto (complexo de inclusão de ropivacaína encapsulado em lipossomas) apresentou efeito citotóxico menor em comparação com a RVC livre e LUV:RVC indicando que a formulação proposta pode ser adequada para futuras aplicações de uso clínico.

A avaliação dos efeitos *in vivo* (testes antinociceptivos em animais) da formulação proposta, mostrou que o sistema de duplo carregamento proposto induz analgesia significativamente maior que aquela induzida pelo fármaco livre e pelo sistema lipossomal binário. No entanto, não foi detectada diferença significativa entre o sistema de duplo carregamento e o complexo de inclusão RVC:HP- β CD nas concentrações de RVC de 0,125 e 0,25%.

Embora o complexo de inclusão RVC:HP- β CD e o sistema de duplo carregamento tenham se mostrado semelhantes quanto ao efeito antinociceptivo, testes *in vitro* realizados mostraram que a formulação proposta apresentou menor toxicidade e maior estabilidade física

e química, sugerindo que o sistema de duplo carregamento Ropivacaína-Ciclodextrina-lipossomas, pode representar uma nova alternativa de formulação anestésica de liberação sustentada. De fato, a formulação obtida apresenta boa taxa de encapsulação do complexo, possui estabilidade física e química, reforçada principalmente nas medidas de carga de superfície, além de mostrar citotoxicidade reduzida, alterar o perfil de liberação do fármaco (*in vitro*) em relação à droga livre e prolongar o efeito anestésico (*in vivo*).

Considerando que o sistema de duplo carregamento (ternário) mostrou melhorias significativas em relação ao fármaco livre, bem como ao sistema lipossomal binário, conforme mostrado nos experimentos de RMN, potencial zeta, liberação *in vitro*, avaliação do efeito analgésico *in vivo* e ensaios de citotoxicidade, a formulação proposta sugere uma nova abordagem prática para o uso de RVC em sistemas de liberação sustentada de fármacos.

Os experimentos relatados neste trabalho mostram que existe maior afinidade da RVC pela HP- β CD (maior constante de associação) que pelos lipossomas de EPC, explicando porque o sistema ternário e o complexo de inclusão (RVC:HP- β CD) não apresentaram diferenças significativas entre si. A RVC sofre influência maior da CD e com isso, no sistema de duplo carregamento proposto, seu efeito seria ditado mais pela presença do carreador ciclodextrina do que pelos lipossomas.

Neste sentido, os resultados aqui apresentados e discutidos, foram muito importantes na investigação, pesquisa e caracterização de formas farmacêuticas de liberação sustentada para AL e podem levantar perspectivas para buscar melhorias ainda mais expressivas em relação ao sistema lipossomal ternário proposto, levando a uma formulação eficaz e viável para uso clínico da ropivacaína.

6. PERSPECTIVAS

Com o intuito de obter melhoras no sistema de duplo carreamento que está sendo proposto, considera-se a possibilidade de realizar ensaios futuros com aumento na concentração de lipídio (maiores que 8 mM), buscando melhorar a encapsulação. Esse aumento poderá trazer resultados ainda mais expressivos com a associação com ciclodextrinas, visto que já foi possível notar a forte interação da RVC com CD influenciando fortemente na alteração da cinética de liberação do AL e efeito analgésico quando comparado ao fármaco livre e ao sistema lipossomal binário.

Para tanto será necessário encapsular o complexo de inclusão em vesículas lipossomais multilamelares, em substituição às unilamelares aqui utilizadas, que possivelmente, contribuirá para o aumento da partição do AL juntamente com o aumento da concentração de lipídios e talvez até o aumento na concentração de HP- β CD, permitindo atingir melhorias ainda mais impactantes em relação ao efeito da RVC quando do uso conjugado desses dois carreadores (lipossoma de EPC e HP- β CD) em formulações de liberação sustentada de anestésico local de uso clínico.

Além disso, como foi mostrado neste trabalho, as formulações foram preparadas em Tampão HEPES 20 mM pH 7,0. Sabe-se que neste pH a RVC encontra-se cerca de 91% em sua forma ionizada e 9% em sua forma neutra. Uma investigação em termos de pH, seria o preparo dessas formulações em pH 7,4, de forma que a fração ionizada da RVC neste pH deve ser em torno de 80% e sua fração neutra cerca de 20%, o que poderá contribuir para aumentar sua potência e seu efeito analgésico, em termos de duração da analgesia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, J. L., MENDIOLA, M. A. & PEDRERO, A. (1999). [Ropivacaine]. — *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 46, 453-9.
- ARANTES, L. M., SCARELLI, C., MARSAIOLI, A. J., DE PAULA, E. & FERNANDES, S. A. (2009). Proparacaine complexation with beta-cyclodextrin and p-sulfonic acid calix[6]arene, as evaluated by varied (1)H-NMR approaches. — *Magn. Reson. Chem.* 47, 757-63.
- BOOGAERTS, J., DECLERCQ, A., LAFONT, N., BENAMEUR, H., AKODAD, E., DUPONT, J. & LEGROS, F. (1993a). Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. — *Anesth Analg* 76, 553-5.
- BOOGAERTS, J., LAFONT, N., DECLERCQ, A., LUO, H., GRAVET, E., BIANCHI, J. & LEGROS, F. (1994). Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. — *J Clin Anesth* 6, 315-20.
- BOOGAERTS, J., LAFONT, N., LUO, H. & LEGROS, F. (1993b). Plasma concentrations of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome-associated and plain solutions to rabbits. — *Can J Anaesth* 40, 1201-4.
- BOULANGER, Y., SCHREIER, S., LEITCH, L. C. & SMITH, I. C. (1980). Multiple binding sites for local anesthetics in membranes: characterization of the sites and their equilibria by deuterium NMR of specifically deuterated procaine and tetracaine. — *Can J Biochem* 58, 986-95.
- BRAGAGNI, M., MAESTRELLI, F., MENNINI, N., GHELARDINI, C. & MURA, P. (2010). Liposomal formulations of prilocaine: effect of complexation with hydroxypropyl-ss-cyclodextrin on drug anesthetic efficacy. — *J Liposome Res.*
- BRITO, M., SILVA, R., MATOS, D., DA SILVA, A. & BRITES, D. (1996). Alterations of erythrocyte morphology and lipid composition by hyperbilirubinemia. — *Clin Chim Acta* 249, 149-65.
- CABEÇA, L. F., FERNANDES, S. A., DE PAULA, E. & MARSAIOLI, A. J. (2008). Topology of a ternary complex (proparacaine-beta-cyclodextrin-liposome) by STD NMR. — *Magn Reson Chem* 46, 832-7.
- CABEÇA, L. F., FIGUEIREDO, I. M., DE PAULA, E. & MARSAIOLI, A. J. (2011). Prilocaine-cyclodextrin-liposome: effect of pH variations on the encapsulation and topology of a ternary complex using 1H NMR. — *Magn Reson Chem* 49, 295-300.
- CABRITA, E. J. & BERGER, S. (2001). DOSY studies of hydrogen bond association: tetramethylsilane as a reference compound for diffusion studies. — In: *Magnetic Resonance in Chemistry* p. 39: S142-S148.
- CARAFÁ, M., MARIANECCI, C., MARZIO, L., CARO, V., GIANDALIA, G., GIANNOLA, L. & SANTUCCI, E. (2009). Potential dopamine prodrug-loaded liposomes: preparation, characterization, and in vitro stability studies. — *J Liposome Res.*
- CARPENTER, K. & DICKENSON, A. (2002). Molecular aspects of pain research. — *Pharmacogenomics J* 2, 87-95.
- CATTERALL, W. A. & MACKIE, K. (1996). *As bases farmacológicas da terapêutica.* . — McGraw-Hill Interamericana., Mexico.
- CEDERHOLM, I. (1997). Preliminary risk-benefit analysis of ropivacaine in labour and following surgery. — *Drug Saf* 16, 391-402.
- CEREDA, C., BRUNETTO, G., DE ARAUJO, D. & DE PAULA, E. (2006). Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. — *Canadian Journal of Anaesthesia-Journal Canadien D Anesthesie*, 1092-1097.

- CEREDA, C., DE ARAUJO, D., BRUNETTO, G. & DE PAULA, E. (2004). Liposomal prilocaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation. — *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 235-240.
- CEREDA, C. M., TÓFOLI, G. R., DE BRITO JUNIOR, R. B., DE JESUS, M. B., FRACETO, L. F., GROppo, F. C., DE ARAUJO, D. R. & DE PAULA, E. (2008). Stability and local toxicity evaluation of a liposomal prilocaine formulation. — *J Liposome Res* 18, 329-39.
- COHEN, R., KANAAN, H., GRANT, G. J. & BARENHOLZ, Y. (2012). Prolonged analgesia from Bupisome and Bupigel formulations: from design and fabrication to improved stability. — *J Control Release* 160, 346-52.
- COLLINS, V. J. (1993). *Principles of Anesthesiology: general and regional*. — Lea & Febiger, U.S.A. .
- COVINO, B. (1986). Pharmacology of local anaesthetic agents. — *Br J Anaesth* 58, 701-16.
- COVINO, B. G. & VASSALO, H. G. (1985). Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico — Colina, Rio de Janeiro.
- COX, B., DURIEX, M. E. & MARCUS, M. A. E. (2003). Toxicity of local anesthetics. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. —
- CÁNOVAS MARTÍNEZ, L., BARROS NÚÑEZ, C., GALLARDO, E., GONZÁLEZ GONZÁLEZ, D., LÓPEZ PIÑEIRO, S. & CASTRO MÉNDEZ, A. (2004). [Clinical effects and pharmacokinetics of ropivacaine and bupivacaine for epidural analgesia during labor]. — *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 51, 128-32.
- DARWIS, Y. & KELLAWAY, I. (2001). Nebulisation of rehydrated freeze-dried beclomethasone dipropionate liposomes. — *International Journal of Pharmaceutics*, 113-121.
- DAVIS, M. & BREWSTER, M. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. — *Nat Rev Drug Discov* 3, 1023-35.
- DE ARAUJO, D., CEREDA, C., BRUNETTO, G., PINTO, L., SANTANA, M. & DE PAULA, E. (2004). Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. — *Can J Anaesth* 51, 566-72.
- DE ARAUJO, D., CEREDA, C., BRUNETTO, G., VOMERO, V., PIERUCCI, A., NETO, H., DE OLIVEIRA, A., FRACETO, L., BRAGA, A. F. & DE PAULA, E. (2008a). Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. — *J Pharm Pharmacol* 60, 1449-57.
- DE ARAUJO, D., TSUNEDA, S., CEREDA, C., DEL G F CARVALHO, F., PRETÉ, P., FERNANDES, S., YOKAICHIYA, F., FRANCO, M., MAZZARO, I., FRACETO, L., DE F A BRAGA, A. & DE PAULA, E. (2008b). Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. — *Eur J Pharm Sci* 33, 60-71.
- DE ARAÚJO, D., PINTO, L. M., BRAGA, A. F. & DE PAULA, E. (2003). Drug-delivery systems for local anesthetics: therapeutic applications. — *Rev Bras Anesthesiol* 53, 663-71.
- DE JONG, R. H. (1994). *Local Anesthetics*. — Mosby-Year Book, Saint Louis.
- DE PAULA, E., CEREDA, C., TÓFOLI, G., FRANZ-MONTAN, M., FRACETO, L. & DE ARAÚJO, D. (2010). Drug delivery systems for local anesthetics. — *Recent Pat Drug Deliv Formul* 4, 23-34.
- DE PAULA, E. & SCHREIER, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. — *Biochim Biophys Acta* 1240, 25-33.
- DE-PAULA, E. & SCHREIER, S. (1996). Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. — *Braz J Med Biol Res* 29, 877-94.

- DEHNER, A. & KESSLER, H. (2005). Diffusion NMR spectroscopy: Folding and aggregation of domains in p53. — In: *ChemBiochem*, p. 1550-1565.
- DENIZOT, F. & LANG, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. — *J Immunol Methods* 89, 271-7.
- DIAZ, M. D. & BERGER, S. (2000). Studies of the complexation of sugars by diffusion-ordered NMR spectroscopy. — In: *Carbohydrate Research*, p. 1-5.
- DOLLO, G., THOMPSON, D., LE CORRE, P., CHEVANNE, F. & LE VERGE, R. (1998). Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with beta-cyclodextrin and its derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7-beta CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. — *International Journal of Pharmaceutics*, 11-19.
- DONY, P., DEWINDE, V., VANDERICK, B., CUIGNET, O., GAUTIER, P., LEGRAND, E., LAVAND'HOMME, P. & DE KOCK, M. (2000). The comparative toxicity of ropivacaine and bupivacaine at equipotent doses in rats. — *Anesth Analg* 91, 1489-92.
- EIDELMAN, A., WEISS, J. M., LAU, J. & CARR, D. B. (2005). Topical anesthetics for dermal instrumentation: a systematic review of randomized, controlled trials. — *Ann. Emerg. Med.* v.46, p.343-51.
- ESTEPA, V., RÓDENAS, S. & MARTÍN, M. C. (2001). Optimización de un método para La determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. . — *Anal. Real Acad. Farm.* 67, 1-17.
- FATOUROS, D., HATZIDIMITRIOU, K. & ANTIMISIARIS, S. (2001). Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: Comparison of membrane integrity and drug release. — *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 287-296.
- FELDMAN, H. S. & COVINO, B. G. (1988). Comparative motor-blocking effects of bupivacaine and ropivacaine, a new amino amide local anesthetic, in the rat and dog. — *Anesth Analg* 67, 1047-52.
- FLETCHER, D., LE CORRE, P., GUILBAUD, G. & LE VERGE, R. (1997). Antinociceptive effect of bupivacaine encapsulated in poly(D,L)-lactide-co-glycolide microspheres in the acute inflammatory pain model of carrageenin-injected rats. . — In: *Anesth. Analg*, p. 84, 90-94.
- FRACETO, L., GONCALVES, M., MORAES, C., DE ARAUJO, D., ZANELLA, L., DE PAULA, E. & PERTINHEZ, T. (2007). Characterization of the inclusion complex ropivacaine: beta-cyclodextrin. — *Quimica Nova*, 1203-1207.
- FRACETO, L., OYAMA, S. J., NAKAIE, C., SPISNI, A., DE PAULA, E. & PERTINHEZ, T. (2006). Interaction of local anesthetics with a peptide encompassing the IV/S4-S5 linker of the Na⁺ channel. — *Biophys Chem* 123, 29-39.
- FRANZ-MONTAN, M., DE PAULA, E., GROPPA, F. C., RANALI, J. & VOLPATO, M. C. (2011). Efficacy of liposome-encapsulated 0.5% ropivacaine in maxillary dental anaesthesia. — *Br J Oral Maxillofac Surg*.
- FRANZ-MONTAN, M., DE PAULA, E., GROPPA, F. C., SILVA, A. L., RANALI, J. & VOLPATO, M. C. (2010a). Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia. — *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110, 800-4.
- . (2012). Liposomal delivery system for topical anaesthesia of the palatal mucosa. — *Br J Oral Maxillofac Surg* 50, 60-4.

- FRANZ-MONTAN, M., SILVA, A., COGO, K., BERGAMASCHI, C., VOLPATO, M., RANALI, J., DE PAULA, E. & GROppo, F. (2007). Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. — *Anesthesia and Analgesia*, 1528-1531.
- FRANZ-MONTAN, M., SILVA, A. L., FRACETO, L. F., VOLPATO, M. C., PAULA, E., RANALI, J. & GROppo, F. C. (2010b). Liposomal encapsulation improves the duration of soft tissue anesthesia but does not induce pulpal anesthesia. — *J Clin Anesth* 22, 313-7.
- GANTENBEIN, M., ABAT, C., ATTOLINI, L., PISANO, P., EMPERAIRE, N. & BRUGUEROLLE, B. (1997). Ketamine effects on bupivacaine local anaesthetic activity and pharmacokinetics of bupivacaine in mice. — *Life Sci* 61, 2027-33.
- GANTENBEIN, M., ATTOLINI, L. & BRUGUEROLLE, B. (1996). Potassium channel agonists modify the local anaesthetic activity of bupivacaine in mice. — *Can J Anaesth* 43, 871-6.
- GASCO, M. R. (2007). Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. — *Adv Drug Deliv Rev* 59, 377-8.
- GORFINE, S. R., ONEL, E., PATOU, G. & KRIVOKAPIC, Z. V. (2011). Bupivacaine extended-release liposome injection for prolonged postsurgical analgesia in patients undergoing hemorrhoidectomy: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. — *Dis Colon Rectum* 54, 1552-9.
- GRANT, G. & BANSINATH, M. (2001). Liposomal delivery systems for local anesthetics. — *Reg Anesth Pain Med* 26, 61-3.
- HARVEY, R. A., CHAMPE, P. C. & MYCEK, M. J. (1998). Anestésicos. — In: **Farmacologia Ilustrada** (A. Editora, ed). Ricardo M. Oliveira-Filho, Porto Alegre, p. 117-118.
- HEAVNER, J. (2002). Cardiac toxicity of local anesthetics in the intact isolated heart model: a review. — *Reg Anesth Pain Med* 27, 545-55.
- HUANG, C. & MASON, J. T. (1978). Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 308-10.
- JÖNSSON, J., ANDERSSON, M., MELANDER, C., NORBERG, J., THORDARSON, E. & MATHIASSEN, L. (2000). Automated liquid membrane extraction for high-performance liquid chromatography of Ropivacaine metabolites in urine. — *J Chromatogr A* 870, 151-7.
- KAPUR, G. S., CABRITA, E. J. & BERGER, S. (2000). The qualitative probing of hydrogen bond strength by diffusion-ordered NMR spectroscopy. — *Tetrahedron Letters* 41(37), 7181-7185.
- KATSAMENIS, O., BOUROPOULOS, N. & FATOUROS, D. (2009). Interaction of fullerenes C60 with large unilamellar vesicles. — *J Biomed Nanotechnol* 5, 416-20.
- KENNEDY, M., READER, A., BECK, M. & WEAVER, J. (2001). Anesthetic efficacy of ropivacaine in maxillary anterior infiltration. — *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91, 406-12.
- KOEHLER, A., OERTEL, R. & KIRCH, W. (2005). Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacain, prilocaine and ropivacain in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. — *J Chromatogr A* 1088, 126-30.
- KOTWANI, R. N., GOKHALE, P. C., BODHE, P. V., KIRODIAN, B. G., KSHIRSAGAR, N. A. & PANDYA, S. K. (2002). A comparative study of plasma concentrations of liposomal amphotericin B (L-AMP-LRC-1) in adults, children and neonates. — *Int J Pharm* 238, 11-5.
- KUZMA, P., KLINE, M., CALKINS, M. & STAATS, P. (1997). Progress in the development of ultra-long-acting local anesthetics. — *Reg Anesth* 22, 543-51.

- LANGERMAN, L., GRANT, G., ZAKOWSKI, M., GOLOMB, E., RAMANATHAN, S. & TURNDORF, H. (1992). Prolongation of epidural anesthesia using a lipid drug carrier with procaine, lidocaine, and tetracaine. — *Anesth Analg* 75, 900-5.
- LAVERDE, A., DA CONCEICAO, G. J. A., QUEIROZ, S. C. N., FUJIWARA, F. Y. & MARSAIOLI, A. J. (2002). An NMR tool for cyclodextrin selection in enantiomeric resolution by high-performance liquid chromatography. — In: *Magnetic Resonance in Chemistry*, p. 40(7): 433-442.
- LAW, S. L., HUANG, K. J. & CHIANG, C. H. (2000). Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption. — *J Control Release* 63, 135-40.
- LEONE, S., DI CIANNI, S., CASATI, A. & FANELLI, G. (2008). Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. — *Acta Biomed* 79, 92-105.
- LICHTENBERG, D. & BARENHOLZ, Y. (1988). Liposomes: preparation, characterization, and preservation. — *Methods Biochem Anal* 33, 337-462.
- LOFTSSON, T. & BREWSTER, M. E. (2011). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. — *J Pharm Pharmacol* 63, 1119-35.
- LOFTSSON, T. & DUCHÊNE, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. — *Int J Pharm* 329, 1-11.
- LOFTSSON, T. & MASSON, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. — *Int J Pharm* 225, 15-30.
- LOUKAS, Y. (1998). A computer-based expert system designs and analyzes a 2(k - p) fractional factorial design for the formulation optimization of novel multicomponent liposomes. — *J Pharm Biomed Anal* 17, 133-40.
- MAESTRELLI, F., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M., RABASCO, A. & MURA, P. (2005). Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. — *Int J Pharm* 298, 55-67.
- MALAMED, S. F. (2001). Manual de anestesia local. — Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- MALHEIROS, S. V., PINTO, L. M., GOTTARDO, L., YOKAICHIYA, D. K., FRACETO, L. F., MEIRELLES, N. C. & DE PAULA, E. (2004). A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4. — *Biophys Chem* 110, 213-21.
- MALINOVSKY, J., BENHAMOU, D., ALAFANDY, M., MUSSINI, J., COUSSAERT, C., COUARRAZE, G., PINAUD, M. & LEGROS, F. (1997a). Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. — *Anesth Analg* 85, 1331-6.
- MALINOVSKY, J., BERNARD, J., BAUDRIMONT, M., DUMAND, J. & LEPAGE, J. (1997b). A chronic model for experimental investigation of epidural anesthesia in the rabbit. — *Reg Anesth* 22, 80-5.
- MALINOVSKY, J. M., LE CORRE, P., MEUNIER, J. F., CHEVANNE, F., PINAUD, M., LEVERGE, R. & LEGROS, F. (1999). A dose-response study of epidural liposomal bupivacaine in rabbits. — *J Control Release* 60, 111-9.
- MCCLURE, J. (1996). Ropivacaine. — *Br J Anaesth* 76, 300-7.
- MCCORMACK, B. & GREGORIADIS, G. (1998). Drugs-in-cycle dextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo. — *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 59-69.

- MELO, M. S., SILVA, W., MORAES, A. & UDELSMANN, A. (2009). [Comparison of hemodynamic changes in acute intoxication with intravenous bupivacaine and ropivacaine in swine]. — *Rev Bras Anesthesiol* 59, 592-601.
- MERCADO, P. & WEINBERG, G. L. (2011). Local anesthetic systemic toxicity: prevention and treatment. — *Anesthesiol Clin* 29, 233-42.
- MESSNER, M., KURKOV, S., JANSOOK, P. & LOFTSSON, T. (2010). Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. — *Int J Pharm* 387, 199-208.
- MO, H. P. & POCHAPSKY, T. C. (1997). "Intermolecular interactions characterized by nuclear Overhauser effects." *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* — 30, 1-38.
- MORAES, C., ABRAMI, P., DE PAULA, E., BRAGA, A. & FRACETO, L. (2007). Study of the interaction between S(-) bupivacaine and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. — *International Journal of Pharmaceutics*, 99-106.
- MORRIS, G. A. (2002). Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY)." *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* — In, p. 9: 35-44.
- MORRIS, K. F. & JOHNSON, C. S. (1992). "Diffusion-Ordered 2-Dimensional Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy." — *Journal of the American Chemical Society* 114(8), 3139-3141.
- MOWAT, J., MOK, M., MACLEOD, B. & MADDEN, T. (1996). Liposomal bupivacaine. Extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient. — *Anesthesiology* 85, 635-43.
- MURA, P., MAESTRELLI, F., GONZALEZ-RODRIGUEZ, M., MICHELACCI, I., GHELARDINI, C. & RABASCO, A. (2007). Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. — *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS*, 86-95.
- NAKAKOSHI, M., UEDA, M., SAKURAI, S., MIYATA, O., SUGIURA, M. & NAITO, T. (2006). Structure elucidation of the intermediate in triethylborane-mediated radical addition of oxime ethers with 2D-and 3D-DOSY NMR. — In: *Magnetic Resonance in Chemistry*, p. 807-812.
- NEW, R. R. C. (1990). **Liposomes-a practical approach**. — Oxford: IRL.
- OHKAWA, H., OHISHI, N. & YAGI, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. — *Anal Biochem* 95, 351-8.
- 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* 12, 1997-2002.
- PIEL, G., PIETTE, M., BARILLARO, V., CASTAGNE, D., EVRARD, B. & DELATTRE, L. (2006). Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. — *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, 75-82.
- PINTO, L., FRACETO, L., SANTANA, M., PERTINHEZ, T., JUNIOR, S. & DE PAULA, E. (2005). Physico-chemical characterization of benzocaine-beta-cyclodextrin inclusion complexes. — *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS*, 956-963.
- PINTO, L., YOKAICHIYA, D., FRACETO, L. & DE PAULA, E. (2000). Interaction of benzocaine with model membranes. — *Biophys Chem* 87, 213-23.
- RAJEWSKI, R. & STELLA, V. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. — *J Pharm Sci* 85, 1142-69.

- RANADE, V. (1989). Drug delivery systems. 1. site-specific drug delivery using liposomes as carriers. — *J Clin Pharmacol* 29, 685-94.
- RANDALL, L. O. & SELITTO, J. J. (1957). A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. — In: *Archiv. Int. Pharmacodyn*, p. 409-419.
- REIF, S., LE CORRE, P., DOLLO, G., CHEVANNE, F. & LE VERGE, R. (1998). High-performance liquid chromatographic determination of ropivacaine, 3-hydroxy-ropivacaine, 4-hydroxy-ropivacaine and 2',6'-pipecoloxylidide in plasma. — *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 719, 239-44.
- RICHARD, B. M., OTT, L. R., HAAN, D., BRUBAKER, A. N., COLE, P. I., NELSON, K. G., ROSS, P. E., REBELATTO, M. C. & NEWTON, P. E. (2011). The safety and tolerability evaluation of DepoFoam bupivacaine (bupivacaine extended-release liposome injection) administered by incision wound infiltration in rabbits and dogs. — *Expert Opin Investig Drugs* 20, 1327-41.
- RONGEN, H. A., BULT, A. & VAN BENNEKOM, W. P. (1997). Liposomes and immunoassays. — *J Immunol Methods* 204, 105-33.
- ROUSER, G., FKEISCHER, S. & YAMAMOTO, A. (1970). Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. — *Lipids* 5, 494-6.
- SBED. (2012). Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED). — In, p. DOR.
- SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DALLA-COSTA, T. & GUTERRES, S. S. (2003). Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. — *Eur J Pharm Biopharm* 56, 501-5.
- SHAW, D. J. (1991). **Introduction to colloid & surface chemistry**. — In, Oxford: Butterworth-Heinemann.
- SIDDALL, P. & COUSINS, M. (1995). Pain mechanisms and management: an update. — *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22, 679-88.
- STEVENS, C. (1992). Alternatives to the use of mammals for pain research. — *Life Sci* 50, 901-12.
- STEVENSON, C. L., SANTINI, J. T. & LANGER, R. (2012). Reservoir-based drug delivery systems utilizing microtechnology. — *Adv Drug Deliv Rev*.
- STILBS, P. (1987). Fourier transform pulsed-gradient spin-echo studies of molecular diffusion. — In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, p. 19: 1-45.
- STRICHARTZ, G. R. & RITCHIE, J. M. (1987). **Local anesthetics. Handbook of Experimental Pharmacology**. —, Berlin.
- STUART, D. D., KAO, G. Y. & ALLEN, T. M. (2000). A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. — *Cancer Gene Ther* 7, 466-75.
- TOFOLI, G. R., CEREDA, C. M., ARAÚJO, D. R., FRANZ-MONTAN, M., GROPPA, F. C., QUAGLIO, D., PEDRAZZOLI JUNIOR, J., CALAFATTI, S. A., BARROS, F. A. & DE PAULA, E. (2012). Pharmacokinetic study of liposome-encapsulated and plain mepivacaine formulations injected intra-orally in volunteers. — *J Pharm Pharmacol* 64, 397-403.
- TOFOLI, G. R., CEREDA, C. M., GROPPA, F. C., VOLPATO, M. C., FRANZ-MONTAN, M., RANALI, J., DE ARAÚJO, D. R. & DE PAULA, E. (2011). Efficacy of liposome-encapsulated mepivacaine for infiltrative anesthesia in volunteers. — *J Liposome Res* 21, 88-94.
- TORCHILIN, V. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. — *Nat Rev Drug Discov* 4, 145-60.

- TORCHILIN, V. P. (2012). Liposomes in Drug Delivery. In: Drug Delivery, Advances in Delivery Science and Technology. — R.A. Siegel, M.J. Rathbone (eds.) Control Rel Soc; 11: 289-328.
- USKOKOVIC, V., CASTIGLIONE, Z., CUBAS, P., ZHU, L., LI, W. & HABELITZ, S. (2010). Zeta-potential and particle size analysis of human amelogenins. — J Dent Res 89, 149-53.
- WANG, R. D., DANGLER, L. A. & GREENGRASS, R. A. (2001). Update on ropivacaine. — Expert Opin Pharmacother 2, 2051-63.
- WANG, X., DENG, L., CAI, L., ZHANG, X., ZHENG, H., DENG, C., DUAN, X., ZHAO, X., WEI, Y. & CHEN, L. (2011). Preparation, characterization, pharmacokinetics, and bioactivity of honokiol-in-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-in-liposome. — J Pharm Sci 100, 3357-64.
- WARREN, R. C. (1987). Physics and architecture of cell membranes. — Adam-Hilger, Bristol.
- WEINIGER, C. F., GOLOVANEVSKI, M., SOKOLSKY-PAPKOV, M. & DOMB, A. J. (2010). Review of prolonged local anesthetic action. — Expert Opin Drug Deliv 7, 737-52.
- WELDER, A. (1992). A primary culture system of postnatal rat heart cells for the study of cocaine and methamphetamine toxicity. — Toxicol Lett 60, 183-96.
- WHITESIDE, J. & WILDSMITH, J. (2001). Developments in local anaesthetic drugs. — Br J Anaesth 87, 27-35.
- WILES, M. D. & NATHANSON, M. H. (2010). Local anaesthetics and adjuvants--future developments. — Anaesthesia 65 Suppl 1, 22-37.
- WIZIACK ZAGO, P. M., BARONI, D. B., GROPPA, F. C., DE PAULA, E., RANALI, J. & VOLPATO, M. C. (2011). Anesthetic efficacy of liposomal prilocaine in maxillary infiltration anesthesia. — J Liposome Res 21, 81-7.
- YEAGLE, P. (2012). The structure of biological membranes. — FL : CRC Press, Boca Raton.
- ZUO, M., DUAN, G. & GE, Z. (2004). Simultaneous determination of ropivacaine and antipyrine by high performance liquid chromatography and its application to the in vitro transplacental study. — Biomed Chromatogr 18, 752-5.

ANEXO I – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

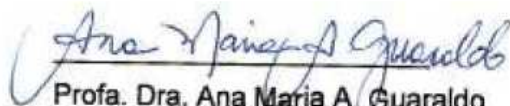
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

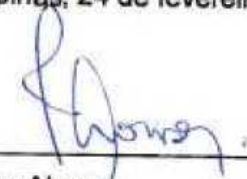
Certificamos que o projeto "Complexos de Anestésicos Locais em ciclodextrinas encapsulados em lipossomas: Preparo, caracterização, estudos de estabilidade, citotoxicidade, liberação *in vitro* e atividade analgésica" (protocolo nº 2596-1), sob a responsabilidade de Prof. Dra. Eneida de Paula / Ana Lais Nascimento Vieira, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 24 de fevereiro de 2012.

Campinas, 24 de fevereiro de 2012.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guinaldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva