



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA CLÁUDIA PEDREIRA DE ALMEIDA

“LIDOCAÍNA LIPOSSOMAL
PRODUZIDA EM PROCESSO ESCALONÁVEL:
FORMULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E TESTES BIOLÓGICOS”

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

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ana Cláudia Pedreira de Almeida
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

[Signature]

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

CAMPINAS, 2008

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

AL64L

Almeida, Ana Cláudia Pedreira de
Lidocaína lipossomal produzida em processo
escalonável: formulação, caracterização e testes biológicos
/ Ana Cláudia Pedreira de Almeida. – Campinas, SP: [s.n.],
2008.

Orientadora: Eneida de Paula.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Lipossomas. 2. Lidocaína. 3. Anestesia local.
4. Liberação sustentada. I. Paula, Eneida de. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Liposomal lidocaine prepared in a scale-up procedure: formulation, characterization and biological tests.

Palavras-chave em inglês: Liposomes; Lidocaine; Anesthesia, Local; Drug-delivery.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Eneida de Paula, Adriana Raffin Pohimann, José Antônio Dias Garcia, Maria Cristina Volpato, Patrícia da Silva Melo.

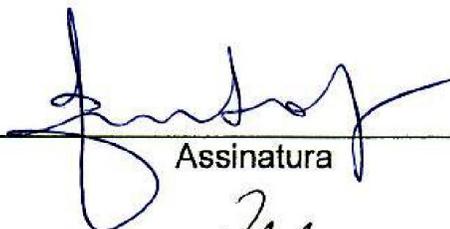
Data da defesa: 23/06/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 23 de junho de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Eneida de Paula
(Orientadora)


Assinatura

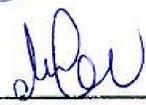
Profª Drª Adriana Raffin Pohlmann


Assinatura

Profª Dr José Antônio Dias Garcia


Assinatura

Profª Drª Maria Cristina Volpato


Assinatura

Profª Drª Patrícia da Silva Melo

Assinatura

Profª Drª Giovana Radomille Tofoli

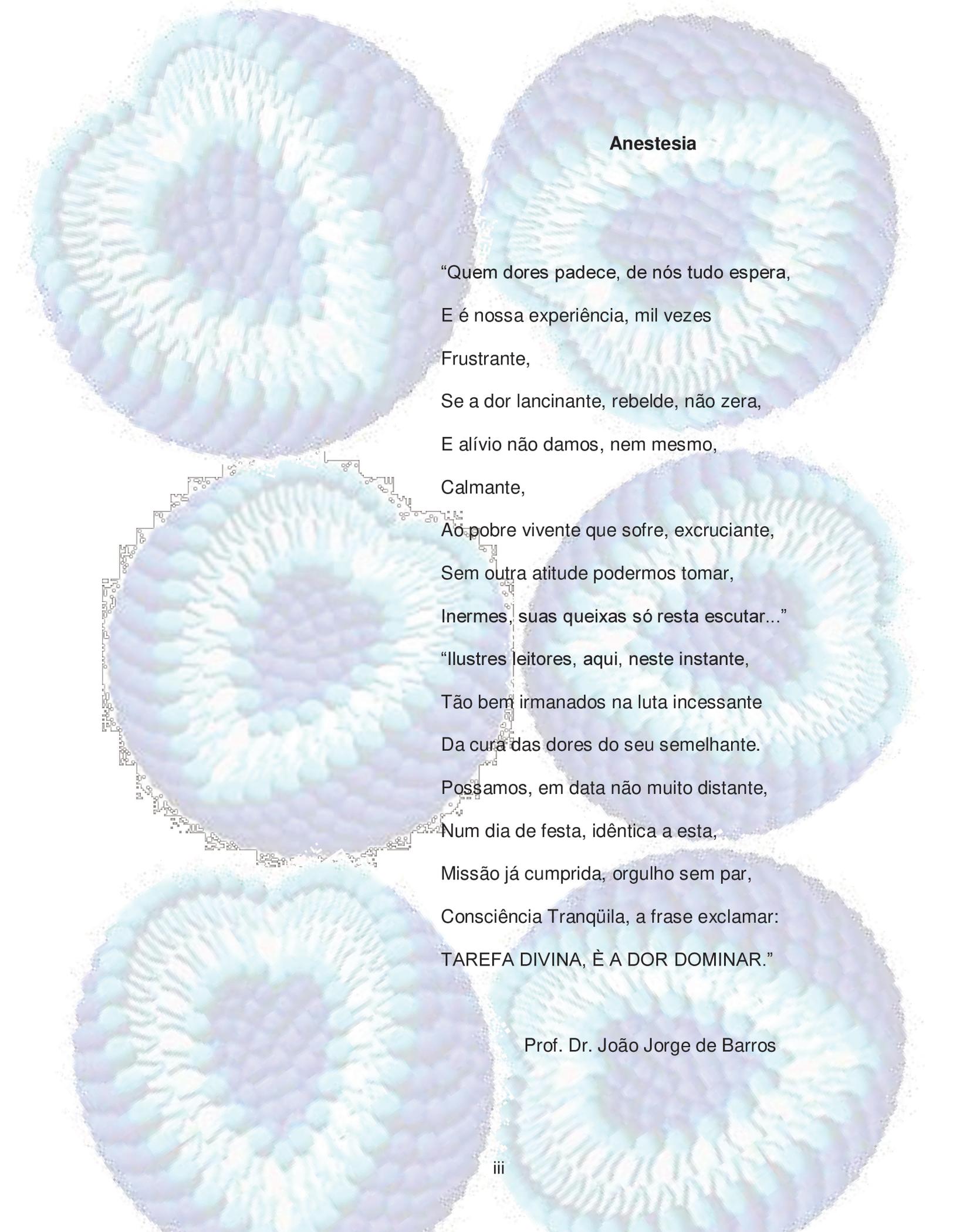

Assinatura

Profª Drª Andrea Grabe Guimarães

Assinatura

Profª Dr Nelson Eduardo Duran Caballero

Assinatura



Anestesia

“Quem dores padece, de nós tudo espera,
E é nossa experiência, mil vezes
Frustrante,
Se a dor lancinante, rebelde, não zera,
E alívio não damos, nem mesmo,

Calmante,

Ao pobre vivente que sofre, excruciante,
Sem outra atitude podermos tomar,
Inermes, suas queixas só resta escutar...”

“Ilustres leitores, aqui, neste instante,
Tão bem irmanados na luta incessante
Da cura das dores do seu semelhante.
Possamos, em data não muito distante,
Num dia de festa, idêntica a esta,

Missão já cumprida, orgulho sem par,
Consciência Tranqüila, a frase exclamar:
TAREFA DIVINA, È A DOR DOMINAR.”

Prof. Dr. João Jorge de Barros

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Ulisses e Idalina**, por tornarem possível mais um sonho, mais uma caminhada, mais uma vitória.

Às minhas filhas, **Taís e Bianca**, por suportarem bravamente a falta da mãe e pelo carinho incondicional. Amo vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Dr^a. **Eneida de Paula**, minha orientadora e amiga, pela sua sabedoria despertando-me para o processo de aprender aquilo que preciso saber para ter sucesso.

À Dr^a. **Maria Cristina Volpato**, pela amizade e conselhos em um dos momentos mais difíceis de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas, **UNIFAL-MG**, pelo apoio e incentivo à pesquisa;

À Universidade Estadual de Campinas, **UNICAMP**, pela estrutura de ensino e pesquisa;

Aos meus irmãos, **Ana Cristina e Ulisses Júnior**, pela força e companheirismo;

Ao meu namorado **Edson**, por estar sempre comigo apoiando e incentivando nas horas certas.

Às Dras. **Giuliana Piovesan Alves e Luciana Matos A. Pinto** pelo escalonamento das partículas sólidas;

À Dra. **Maria Helena Andrade Santana**, por me acolher prontamente e disponibilizar o seu laboratório;

À **Gilson**, pelo auxílio nas medidas do Light scattering;

Ao Drs. **Leonardo Fraceto, Luiz A. Beijo e Alexandre Giusti Paiva**, pela colaboração com o tratamento estatístico;

Ao Prof. **Glenan Singi e Fernando Ponciano**, pela colaboração com os ensaios de cardiotoxicidade;

À **Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda**, por fornecer drogas e equipamentos.

Às Dras. **Fernanda R. Gadelha, Patrícia S. Melo e Giselle Z. Justo**, membros da minha banca do exame de qualificação, pela contribuição ao trabalho;

Às secretárias **Marina Andresa e Andréia Vigilato**, pela competência e amizade;

Ao pessoal do **Laboratório de Biomembranas**:

- ❖ **Cíntia**, amiga do peito, muito obrigada;
- ❖ **Fernanda**, companheira de experimentos e conversas, saudades;
- ❖ **Daniele**, por toda sua ajuda;
- ❖ **Giovana Bruneto**, sempre sorrindo e encantando com seus olhos azuis;
- ❖ **Cleyton**, amigo de todas as horas, sempre alegre e animado;
- ❖ **Bispo**, o meu socorro pra todas as horas e “eu não estou nervosa hoje”...
- ❖ **André**, pelo carinho e conselhos sentimentais...
- ❖ **Paulinho**, pelos abraços e por ser a alegria do laboratório;
- ❖ **Giovana Tófoli**, a elegância do laboratório...
- ❖ **Beth**, a futura mamãe, parabéns;
- ❖ **Josi**, sempre meiga e carinhosa;
- ❖ **Carol**, por estar sempre pronta a ajudar;
- ❖ **Maribel**, pela ajuda com a cultura de células;
- ❖ **Márcio**, sempre organizado e ajudando a todos;
- ❖ **D. Cida**, pelo carinho e comidinhas tão gostosas...

RESUMO

Anestésicos locais se caracterizam pela capacidade de abolir a dor sem a perda da consciência; contudo, são moléculas pequenas facilmente redistribuídas do sítio de injeção, limitando a duração da anestesia. Uma maneira de prolongar a anestesia é encapsular os anestésicos locais com sistemas carreadores como lipossomas, que permaneçam no sítio de injeção por um tempo maior, liberando o anestésico gradualmente e diminuindo sua toxicidade sistêmica. Este trabalho teve por finalidade caracterizar físico-quimicamente uma nova formulação de lidocaína lipossomal, preparada por um processo escalonável; quanto à estabilidade e toxicidade local e avaliar a eficácia da formulação *in vivo*, quanto ao bloqueio sensorial e efeito sobre o sistema cardiovascular, em modelos animais, em comparação com preparações comerciais de LDC, associadas ou não a vasoconstritores. Partículas sólidas foram preparadas misturando-se fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol e manitol; após secagem em spray-dryer as partículas sólidas foram ressuspensas em tampão, a pH 7,4. A LDC foi incorporada na concentração de 2%. Análises por espalhamento de luz quase elástico revelaram uma população principal de lipossomas com 292,5 nm (100 %), cujo tamanho diminuiu para 227,0 nm após a incorporação da LDC. O coeficiente de partição determinado para o anestésico neste sistema foi de $23,5 \pm 7,9$. Experimentos de diálise mostraram que a encapsulação nos lipossomas reduziu a taxa de liberação da LDC em relação à LDC livre, o que pode levar a um prolongamento do efeito anestésico. O processo de esterilização por calor levou a um aumento significativo na peroxidação lipídica, porém os níveis de peróxido foram inferiores a 2nM por 10 meses após a preparação. Análises de espalhamento de luz indicaram que o tamanho dos lipossomas manteve-se estável por até 8 meses, a 4°C. Os ensaios *in vitro*, em cultura de fibroblastos 3T3, demonstraram que a encapsulação nos lipossomas não alterou de forma significativa a toxicidade da LDC em relação à LDC livre, mas apresentou menor citotoxicidade que a lidocaína associada ao vasoconstritor. Nos ensaios *in vivo*, o efeito anestésico da formulação de lidocaína lipossomal foi avaliado em relação à LDC livre e LDC com vasoconstritor, nas mesmas concentrações, pelo teste de bloqueio do nervo infraorbital, em ratos. Apesar do efeito anestésico da lidocaína lipossomal 2% não ser tão prolongado quanto o da lidocaína comercial associada à epinefrina, esta se mostrou vantajosa, pois aumentou em 67% o efeito anestésico total obtido, em relação à LDC livre 2% e teve efeito equivalente ao da LDC livre 3% ($p < 0,05$). A cardiotoxicidade foi avaliada através do eletrocardiograma (ECG), medindo-se a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC), em ratos. Os resultados mostraram que não houve alterações no ECG, com redução na FC e queda na PAM que foi 52% menor para o grupo da LDC lipossomal em relação ao uso da LDC livre ($p < 0,05$). Em conclusão, a nova formulação de lidocaína lipossomal aumentou a duração do bloqueio nervoso sensorial com menor cardiotoxicidade, podendo promover benefícios clínicos com uma margem de segurança maior, tornando-se uma formulação promissora na busca de anestésicos mais seguros e potentes.

ABSTRACT

Local anesthetics are characterized by their ability to suppress pain without losing awareness; however, these small molecules are quickly released from the site of injection, limiting the duration of anesthesia. One interesting approach to prolong anesthesia is to encapsulate local anesthetics with carrier systems as liposomes that will remain at the site of injection, gradually releasing the anesthetic and reducing its systemic toxicity. In this study we have performed the physicochemical characterization of a novel liposomal lidocaine formulation, prepared with a spray-dryer scale-up procedure, regarding its stability and local toxicity. The *In vivo* evaluation of the sensorial blockade and effect on the cardiovascular system caused by the formulation was essayed in animal models, in comparison to the commercially available preparation of LDC, associated or not with vasoconstrictors. Solid lipid particles were prepared mixing hydrogenated soybean phosphatidylcholine, cholesterol and mannitol; after the spray-drying process the particles were suspended in buffer at 7.4. LDC was incorporated in a 2% concentration. Laser light-scattering analysis showed a main liposome population with 292.5 nm (100%), which size slightly decreased (227.0 nm) after LDC incorporation. The partition coefficient of LDC in the system was determined as 23.5 ± 7.9 . Dialysis experiments showed that encapsulation into liposomes reduced the release rate of LDC in relation to free LDC, what can take to a longer anesthetic effect. The sterilization process significantly increased lipid peroxidation, but the levels were less than 2nM up to 10 months after preparation. Light scattering analysis indicated that the size of the vesicles remained stable up to 8 months, at 4°C. *In vitro* essays with 3T3 fibroblasts demonstrated that encapsulation into liposomes did not significantly change the LDC toxicity in relation to free LDC, but diminished the cytotoxicity in relation to the vasoconstrictor-associated LDC. *In vivo* essays the anesthetic effect of the liposomal lidocaine formulation was compared to that of free LDC and vasoconstrictor-associated LDC, at the same concentrations, through the infraorbital nerve blockade test in rats. Although the effect of liposomal lidocaine 2% was not comparable to that obtained with lidocaine plus epinefrine, that formulation was found to be very interesting since it increased 67% the anesthetic effect in relation to free lidocaine at 2% and it was equipotent to free lidocaine 3% ($p < 0.05$). Cardiotoxicity was evaluated through electrocardiograms (ECG), measuring the average arterial pressure (AAP) and heart rate (HR), in rats. Results showed no alterations in the ECG, but a decrease in the HR and a 52% reduction in the AAP in the liposome LDC group in comparison to the animals treated with free LDC were shown. In conclusion, the novel liposome lidocaine formulation presented here increased the sensorial nervous blockade duration and decreased the cardiotoxicity, promoting clinic benefits that include a higher drug-safety becoming a promising formulation in the search for safer and more potent anesthetics.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | | |
|-----------------------|---|--|
| AL | - | Anestésicos locais |
| ASC | - | Área sob a curva |
| AV | - | Àtrio-ventricular |
| BHI | - | <i>Brain-heart infusion</i> |
| bpm | - | Batimentos por minuto |
| BVC | - | Bupivacaína |
| CEEA | - | Comissão de Ética na Experimentação Animal |
| CEMIB | - | Centro de Bioterismo da Unicamp |
| COBEA | - | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal |
| ECG | - | Eletrocardiograma |
| EPC | - | Fosfatidilcolina de ovo |
| FC | - | Freqüência cardíaca |
| HEPES | - | Ácido4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico |
| LAL | - | Lisado de Amebócitos de <i>Limulus polyphemus</i> |
| LDC | - | Lidocaína |
| LDC _{LUV} | - | Lidocaína lipossomal |
| LDC _{LIVRE} | - | Lidocaína não encapsulada |
| LDC _{LUV} e | - | Lidocaína lipossomal esterilizada |
| LDC _{LUV} ne | - | Lidocaína lipossomal não esterilizada |
| LDC _{VASO} | - | Lidocaína com epinefrina 1:100.000 |

| | | |
|----------------------|---|---|
| LUV | - | Lipossomas unilamelares |
| LUV _e | - | Lipossomas esterilizados |
| LUV _{ne} | - | Lipossomas não esterilizados |
| MDA | - | Malondialdeídos |
| MLV | - | Vesículas multilamelares |
| MTT | - | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5- difeniltetrazólio |
| NIO | - | Nervo infraorbital |
| PA | - | Pressão arterial |
| PAM | - | Pressão arterial média |
| K _a | - | Constante de dissociação ou ionização |
| SCV | - | Sistema cardiovascular |
| DP | - | Desvio padrão |
| EP | - | Erro padrão |
| SNC | - | Sistema nervoso central |
| TBA | - | Ácido tiobarbitúrico |
| TEP | - | Tetraetoxi propano |
| <i>T_m</i> | - | Temperatura de transição de fases |
| UV | - | Ultra-violeta |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| FIGURA 1 – | Estruturas químicas de alguns anestésicos locais das famílias dos ésteres e amidas..... | 23 |
| FIGURA 2 – | Estrutura química dos vasoconstritores do tipo simpaticomimético, usados em associação medicamentosa com anestésicos locais.... | 36 |
| FIGURA 3 – | Composição do peptídeo vasoconstritor felipressina | 36 |
| FIGURA 4 – | Esquema de Lipossoma unilamelar (A) e Lipossoma multilamelar (B), com inserção de moléculas hidrossolúveis, lipossolúveis e anfipáticas | 42 |
| FIGURA 5 – | Representação do sistema para determinação da cinética de liberação de fármacos. A= Compartimento doador (amostra+membrana), B= compartimento receptor (solução tampão), C= barra magnética para agitação, D= local de retirada das alíquotas..... | 58 |
| FIGURA 6 – | Técnica de bloqueio do nervo infraorbital (a) Vista lateral do crânio de rato, forame infraorbital (adaptada de Fink <i>et al</i> , 1975); (b) Anestesia infiltrativa..... | 63 |
| FIGURA 7 – | Registro eletrocardiográfico normal..... | 65 |
| FIGURA 8 – | Esquema representativo do triângulo de Einthoven - R (<i>right</i>)-direito, L (<i>left</i>)- esquerdo e F (<i>foot</i>)- perna | 66 |

| | | |
|-------------|--|----|
| FIGURA 9 – | Equipamento para anestesia com mistura O ₂ /NO ₂ v/v e halotano .. | 68 |
| FIGURA 10 – | Animal com artéria femural e veia jugular esquerda canuladas | 69 |
| FIGURA 11 – | Sistema BIOPAC MP 100A para registro da pressão arterial | 69 |
| FIGURA 12 – | Eletrodos posicionados para registro do eletrocardiograma | 70 |
| FIGURA 13 – | Distribuição de tamanho dos lipossomas: sem LDC (a) e com LDC encapsulada (b), medidas por espalhamento de luz quase-elástico (light scattering) | 74 |
| FIGURA 14 – | Perfis da cinética de liberação (média ± EP) das formulações de lidocaína livre e lipossomal, em pH 7.4 e 25 °C (n= 4) | 79 |
| FIGURA 15 – | Concentração de MDA (nM) em lipossomas com lidocaína encapsulada (5mM), esterilizados (LDC _{LUV} e) e não esterilizados (LDC _{LUV} ne), armazenados a 4 °C e protegidos da luz (n=3-4). * # <i>p</i> <0,05 (ANOVA/ Tukey – Kramer) | 82 |
| FIGURA 16 – | Concentração de MDA nM em lipossomas com lidocaína encapsulada (LDC _{LUV} 5mM), esterilizados e não esterilizados, armazenados a 25 °C e protegidos da luz (n=4-5). * <i>p</i> <0,05 (ANOVA/ Tukey – Kramer) | 83 |
| FIGURA 17 – | Concentração de MDA (nM) em lipossomas com lidocaína encapsulada (5mM) armazenados a 4 e 25 °C, não esterilizados e protegidos da luz (n=3-4). # <i>p</i> <0,05 (ANOVA/ Tukey – Kramer)... | 84 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 18 – Concentração de MDA (nM) em lipossomas com lidocaína encapsulada (5mM) armazenados a 4º e 25 ºC, esterilizados e protegidos da luz (n=3-4). # $p < 0,05$ (ANOVA/ Tukey – Kramer)..... | 84 |
| FIGURA 19 – Distribuição de tamanho (%) da população principal de lipossomas não esterilizados (LUV <i>ne</i>) e esterilizados (LUV <i>e</i>) (média ± EP), mantidos a 4ºC | 87 |
| FIGURA 20 – Distribuição de tamanho (%) da população principal de LDC _{LUV} <i>ne</i> e LDC _{LUV} <i>e</i> (n=4), mantidas a 4ºC (média ± EP) | 88 |
| FIGURA 21 – Distribuição de tamanho (%) da população principal de LDC _{LUV} <i>e</i> (n=4), mantidas a 4º e 25ºC (média ± EP). | 89 |
| FIGURA 22 – Efeitos citotóxicos da LDC em solução sobre células 3T3, avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (médias ± DP, n= 3 experimentos). | 91 |
| FIGURA 23 – Efeitos citotóxicos da LDC _{LIVRE} , LDC _{LUV} e LDC _{VASO} (0,7, 3,5 e 7mM) sobre células 3T3, avaliados pelo teste de redução do corante MTT. Células incubadas por 2 h a 37 ºC e atm de 5% CO ₂ . Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT (médias ± DP, n= 3 experimentos). * $p < 0,001$ (ANOVA) | 91 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 24 – Tempo de recuperação da analgesia (min) no nervo infraorbital induzido pelas formulações lipossomais em função da concentração de lidocaína (n=7-8 animais/grupo)..... | 94 |
| FIGURA 25 – Porcentagem de animais com analgesia x tempo no bloqueio do nervo infraorbital induzido pelas formulações de LDC livre, lipossomal e com vasoconstritor: 2 % (A), 2,5 % (B) e 3 % (C) (n=7-8 animais/grupo) | 97 |
| FIGURA 26 – Traçados eletrocardiográficos do controle (tempo 0) e após aplicação de: tampão HEPES (A), lipossomas vazios (B), lidocaína livre (4mg/kg, i.v.) (C), lidocaína lipossomal (4 mg/kg, i.v.) (D), lidocaína com epinefrina (4 mg/kg, i.v.) (E)..... | 104 |
| FIGURA 27 – Efeito da injeção de (4 mg/kg, i.v.) de lidocaína livre, lipossomal e com vasoconstritor na PAM, imediatamente antes (tempo 0) e após aplicação. Dados expressos em média \pm EP (n= 10/grupo). *p < 0,05 comparação entre os tempos do mesmo grupo ANOVA one - way (teste Dunnett); # p < 0,05 comparação entre os grupos ANOVA one - way (teste Tukey). | 105 |

FIGURA 28 – Freqüência cardíaca imediatamente antes (tempo 0) e após aplicação de (4 mg/kg, i.v.) lidocaína livre, lipossomal e com vasoconstritor. Dados expressos em média \pm EP (n= 10 animais/grupo). *p < 0,05 comparação entre os tempos do mesmo grupo ANOVA one - way (teste Dunnet), # p < 0,05 comparação entre os grupos ANOVA one - way (teste Tukey)..... 107

LISTA DE TABELAS

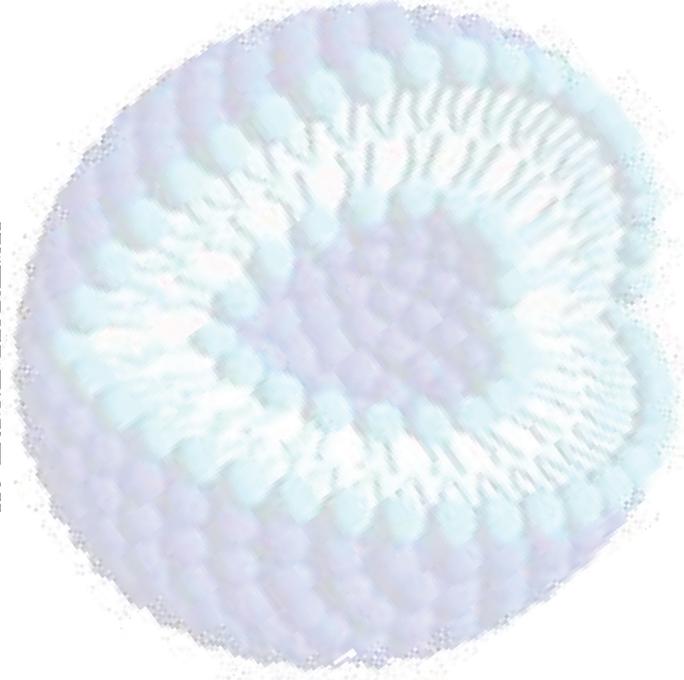
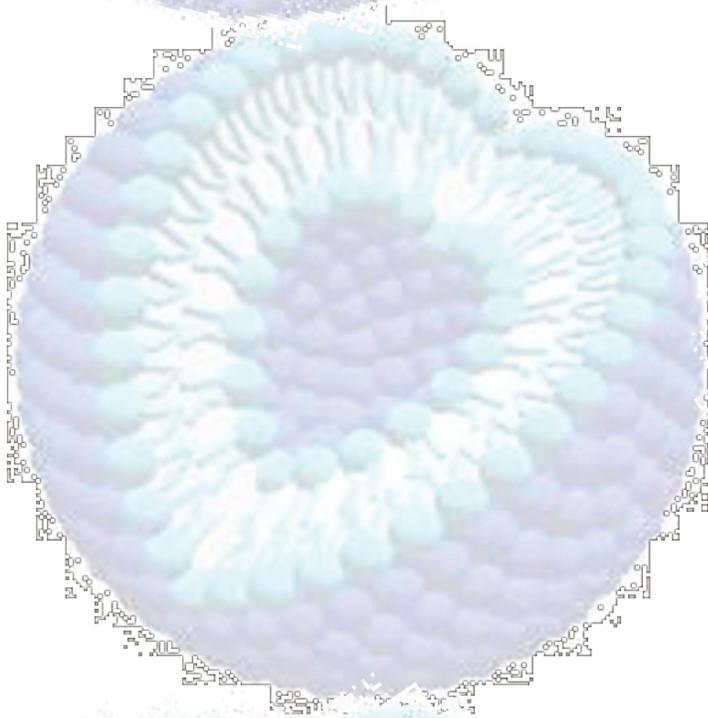
| | | |
|------------|---|-----|
| TABELA 1 - | Algumas propriedades farmacológicas de anestésicos locais do tipo amida | 28 |
| TABELA 2 - | Formulações lipossomais aprovadas para aplicação clínica..... | 46 |
| TABELA 3 - | Diâmetro médio das vesículas lipossomais (média \pm EP) e índice de polidispersidade, antes e após a encapsulação do anestésico (n=4) | 75 |
| TABELA 4 - | Diâmetro médio da população principal das vesículas (n = 4), antes e após o processo de esterilização das formulações lipossomais sem LDC e com LDC encapsulada | 86 |
| TABELA 5 - | Tempo de recuperação e efeito total do bloqueio sensorial (área sob a curva, ASC) induzido pelas formulações de LDC em solução, lipossomal e com vasoconstritor, durante o bloqueio do nervo infraorbital, em ratos. Dados expressos em mediana (mínimo-máximo) (n = 7) | 95 |
| TABELA 6 - | Características basais (antes da aplicação das amostras) de peso, FC e PAM de cada grupo. Dados expressos em média \pm EP | 101 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 Anestésicos locais..... | 22 |
| 1.2 Relação estrutura-atividade e propriedades físico-químicas..... | 26 |
| 1.3 Mecanismo de ação dos anestésicos locais | 29 |
| 1.4 Metabolismo dos anestésicos locais..... | 30 |
| 1.5 Toxicidade dos anestésicos locais | 31 |
| 1.5.1. Toxicidade ao sistema nervoso central..... | 31 |
| 1.5.2. Toxicidade ao sistema cardiovascular..... | 32 |
| 1.5.3. Toxicidade local | 34 |
| 1.6. Vasoconstritores | 34 |
| 1.7 Lidocaína..... | 38 |
| 1.8 Lipossomas..... | 40 |
| 2 OBJETIVOS..... | 47 |
| 2.1 Objetivos gerais | 48 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 48 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 49 |
| 3.1 Material | 50 |
| 3.2 Equipamentos | 50 |
| 3.3 Animais | 51 |
| 3.4 Preparação da formulação lipossomal | 51 |
| 3.5 Caracterização da formulação lipossomal | 53 |

| | |
|---|----|
| 3.5.1 Dosagem da concentração total de fosfolípidios | 53 |
| 3.5.2 Concentração total de colesterol | 54 |
| 3.5.3 Determinação do tamanho das vesículas | 54 |
| 3.5.4 Eficiência de encapsulação e determinação do coeficiente de partição | 54 |
| 3.6 Testes de esterilização da formulação | 56 |
| 3.7 Teste de liberação <i>in vitro</i> | 57 |
| 3.7.1 Tratamento matemático das cinéticas de liberação..... | 58 |
| 3.8 Avaliação da estabilidade físico-química da formulação anestésica lipossomal, antes e após esterilização | 59 |
| 3.8.1 Estabilidade física da formulação lipossomal | 59 |
| 3.8.2 Estabilidade química dos componentes lipídicos | 59 |
| 3.9 Avaliação da citotoxicidade | 60 |
| 3.9.1 Ensaio colorimétrico MTT | 61 |
| 3.10 Testes em modelos animais | 62 |
| 3.10.1 Bloqueio do nervo infraorbital | 62 |
| 3.10.2 Avaliação da toxicidade cardiovascular | 64 |
| 3.10.2.1 Eletrocardiograma | 64 |
| 3.10.2.2 Medidas do eletrocardiograma..... | 67 |
| 3.11 Análise estatística | 72 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 73 |
| 4.1 Caracterização da formulação lipossomal | 74 |
| 4.1.1 Tamanho | 74 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.1.2 | Eficiência de encapsulação e coeficiente de partição | 76 |
| 4.2 | Testes de esterilidade e pirogeneicidade da formulação..... | 78 |
| 4.3 | Teste de liberação <i>in vitro</i> | 78 |
| 4.4 | Estabilidade físico-química da formulação lipossomal | 80 |
| 4.4.1 | Estabilidade química dos componentes lipídicos..... | 80 |
| 4.4.2 | Estabilidade física da formulação lipossomal | 85 |
| 4.5 | Avaliação da citotoxicidade (ensaios em cultura de células)..... | 90 |
| 4.6 | Experimentos <i>in vivo</i> | 93 |
| 4.6.1 | Bloqueio do nervo infraorbital | 93 |
| 4.6.2 | Toxicidade cardiovascular dos anestésicos locais | 100 |
| 5 | CONCLUSÕES | 110 |
| 6 | REFERÊNCIAS | 113 |
| 7 | ANEXOS | 131 |



1 INTRODUÇÃO

1.1 Anestésicos locais

No século XIX, o interesse pelas propriedades analgésicas da folha de coca (*Erythroxylon coca*) levou ao isolamento da cocaína por Niemann, em 1860, e ao seu estudo farmacológico por Von Anrep, a partir de 1879. Em 1884, Carl Koller introduziu seu uso clínico cirúrgico como anestésico local para o controle da dor em procedimentos oftalmológicos, 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).

Com o uso dessa substância química, capaz de suprimir a dor sem provocar a perda da consciência, deu-se um passo importante para o avanço da medicina e da odontologia. No entanto, já em 1892, as reações adversas ao uso da cocaína como a toxicidade e a indução do paciente ao vício, tornaram-se evidentes. Einhorn (1905), sintetizou a procaína, um anestésico local derivado do ácido benzóico e pertencente à classe dos amino-ésteres (Bennett, 1986; Malamed, 2001; Cox *et al.*, 2003). Seguiu-se a síntese de análogos da procaína com maior atividade anestésica como a clorprocaína, a benzocaína e a tetracaína. Somente em 1943 é que um novo composto, denominado lidocaína, iniciou a era dos anestésicos locais do tipo amino-amida que, embora menos potentes que os amino-ésteres (Covino e Vassalo, 1976) são praticamente isentos das reações alérgicas tão comuns àqueles compostos (Collins, 1993). Na busca de moléculas mais potentes e menos tóxicas foram sintetizados novos compostos, dentre os quais destacamos a mepivacaína, a bupivacaína e a ropivacaína, conforme mostra a Figura 1 (Alves e Guanais, 1998; Rang *et al.*, 2001).

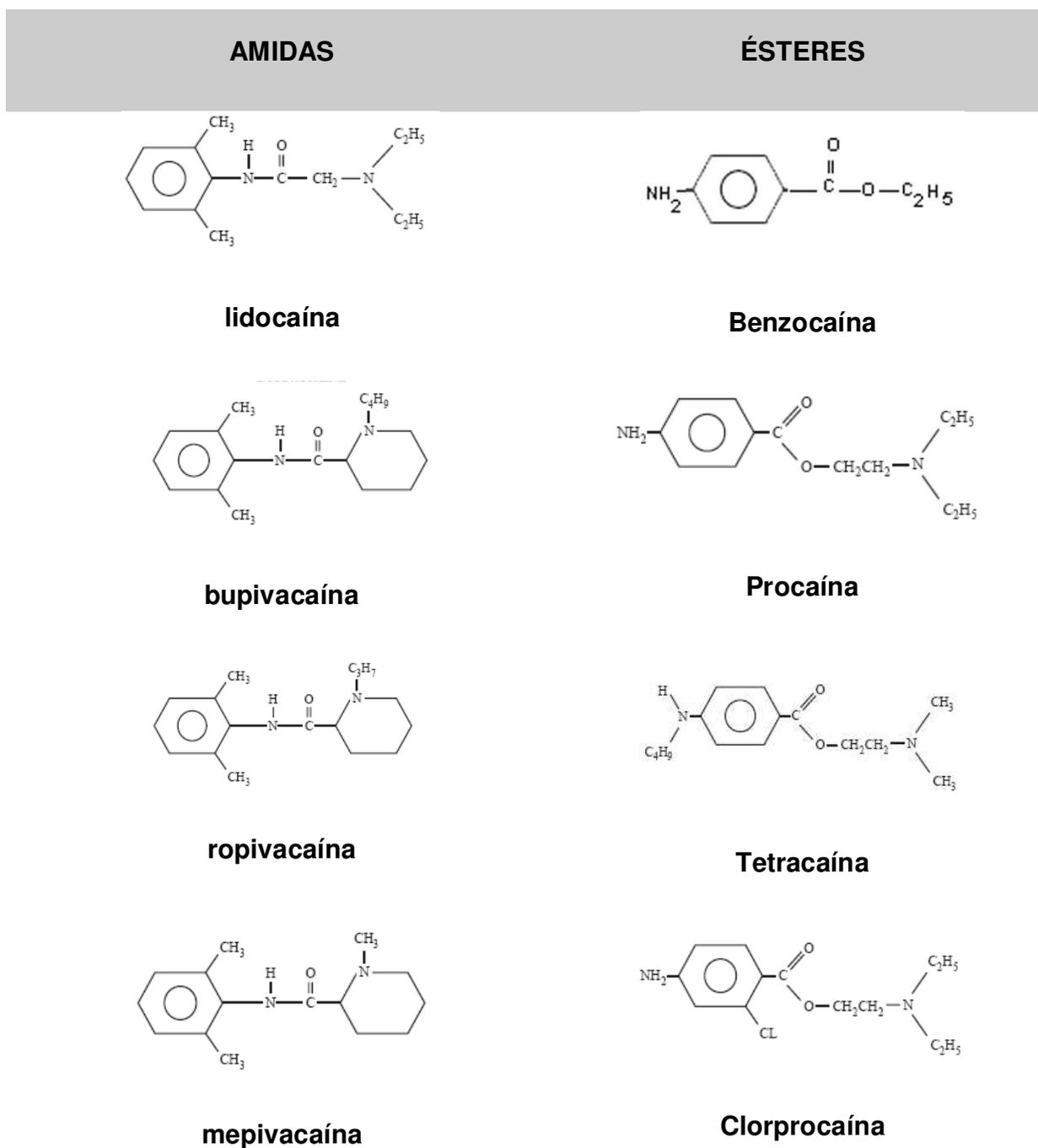


Figura 1 – Estruturas químicas de alguns anestésicos locais das famílias dos ésteres e das amidas.

Os anestésicos locais (AL) são compostos químicos que evitam ou aliviam a dor interrompendo a condução nervosa reversivelmente, sem perda da consciência, quando aplicados a uma superfície restrita do corpo, em contraste com os anestésicos gerais que são administrados por via inalatória ou endovenosa e causam perda da consciência e inibição dos reflexos sensoriais e autônomos (Strichartz e Covino, 1993; Katsung, 1998; McLure e Rubin, 2005).

O sucesso da anestesia local exige o conhecimento das propriedades farmacológicas dos vários anestésicos locais e da habilidade técnica da execução do bloqueio em questão. Bennett (1986) e Malamed (2001) citam várias propriedades consideradas ideais, do ponto de vista clínico, para um anestésico local:

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

Embora os anestésicos locais utilizados atualmente não satisfaçam a todos esses critérios, eles atendem à maioria deles. Continua, no entanto, a pesquisa por novos compostos que possuam o máximo de fatores desejáveis, principalmente no que diz respeito à diminuição da toxicidade e ao aumento da duração do efeito anestésico (Malamed, 2001).

O desenvolvimento de anestésicos de longa duração é necessário, por exemplo, para a analgesia pós-operatória e para controle da dor crônica. Pacientes com dor crônica tem se beneficiado com repetidos bloqueios de nervos autônomos, periféricos ou centrais, induzidos com AL. Um anestésico local de longa duração poderia diminuir a frequência desses procedimentos, enquanto possivelmente melhoraria sua eficácia pelo prolongamento do bloqueio (Kuzma *et al.*, 1997). Como os anestésicos locais são moléculas pequenas que são rapidamente redistribuídas do sítio de injeção, limitando a duração da analgesia, uma abordagem para prolongar a analgesia é complexar estes compostos com moléculas carreadoras, como lipossomas, polímeros e ciclodextrinas, que permaneçam no sítio de injeção por um tempo prolongado, liberando o anestésico gradualmente (Grant e Bansinath, 2001; Araújo *et al.*, 2003).

Desde o final do século XIX sabe-se que quanto mais hidrofóbico um composto, maior sua potência anestésica, porém também maior seu potencial tóxico (Lei de Meyer-Overton, *apud* Cantor, 2001). Por este motivo, além do aumento do tempo de anestesia, os sistemas de liberação sustentada de fármacos podem também ser úteis para produzir formulações anestésicas menos tóxicas. Podem ser observadas ações adversas quando ocorre um aumento adicional no nível sanguíneo de um anestésico local acima do seu “índice terapêutico”. Os sinais e sintomas clínicos têm relação com a ação depressora direta do anestésico local sobre o SNC (Malamed, 2001; Cox *et al.*,

2003). Já no sistema cardiovascular, os anestésicos locais têm uma ação direta no miocárdio e vasculatura periférica (Strichartz e Ritchie, 1987; Sisk, 1992; Cox *et al.*, 2003).

1.2 Relação estrutura-atividade e propriedades físico-químicas

Assim como a cocaína, a maioria dos AL de uso clínico apresenta estrutura química com três regiões distintas (Covino, 1986; Gupta, 1991): uma extremidade aminoterminal secundária ou terciária que sofre ionização em pH próximo ao fisiológico e que confere hidrossolubilidade à molécula, separada de um grupo aromático que confere caráter lipofílico à molécula por uma cadeia intermediária.

Os AL podem ser classificados de acordo com esta cadeia intermediária como ésteres ou amidas. Os do tipo éster apresentam a cadeia intermediária contendo uma ligação éster e são derivados do ácido benzóico; foram os primeiros anestésicos locais a serem sintetizados e por muitos anos foram as únicas opções para anestesia local em odontologia (Bennett, 1986) e clínica médica. Os AL do tipo amida são os mais popularmente usados até os dias de hoje, devido a sua menor toxicidade, metabolização mais lenta, e menor alergenicidade em comparação com os do grupo éster (Yagiela *et al.*, 2000; Malamed, 2001).

Alguns fatores físicos e químicos influenciam diretamente o efeito clínico de um anestésico local. Os anestésicos locais, por serem bases fracas, não se dissociam completamente em solução aquosa e, por isso, produzem espécies protonadas e não protonadas (neutras) que co-existem em equilíbrio químico em pH 7,4. Esse equilíbrio é

determinado pela constante de dissociação ou ionização (K_a) do grupo amônio. No caso dos anestésicos o pK_a situa-se entre 7 a 9 (Tabela 1).

Embora ambas as formas dos AL sejam importantes no bloqueio nervoso, os fármacos com pK_a elevado (maior proporção da forma protonada em pH fisiológico) possuem um início mais lento de ação do que aquelas com um pK_a mais baixo (Ritchie *et al.*, 1965). A forma neutra é capaz de sofrer maior difusão através da membrana do nervo (Covino, 1986; Malamed, 2001).

É essencial que haja um balanço entre a lipossolubilidade e hidrossolubilidade do anestésico local (de Paula e Schreier, 1995, 1996). A hidrossolubilidade é essencial para o transporte do fármaco até as fibras nervosas, enquanto a lipossolubilidade permite que o anestésico penetre na membrana nervosa, que é formada por grande proporção de lipídios. Portanto, quanto maior a lipossolubilidade do anestésico, maior será sua facilidade de penetração na membrana nervosa e conseqüente acesso ao(s) sítio(s) de ação no canal de sódio voltagem-dependente, o que refletirá biologicamente em maior potência anestésica (Butterworth e Strichartz, 1990) (Tabela 1).

O grau de ligação do anestésico com proteínas plasmáticas (Tabela 1) também está relacionado com a duração de sua atividade. Acredita-se que os anestésicos que possuem maior afinidade por proteínas plasmáticas apresentam uma ligação maior aos sítios de ação na proteína-canal de sódio e, por isso, permaneceriam mais tempo ligados ao canal, o que resultaria em uma duração maior da atividade anestésica (Malamed, 2001).

Tabela 1 - Algumas propriedades farmacológicas de anestésicos locais do tipo amida

| AL | Meia-vida (h) ^a | Potência anestésica ^b | (%) Ligação às proteínas plasmáticas | pKa (25°C) ^c | Início da ação (min) ^b | Hidrofobicidade ^d |
|-------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Lidocaína | 1,6 | 2 | 65 | 7,9 | 2 a 3 | 366 |
| Prilocaína | 1,6 | 2 | 55 | 7,9 | 2 a 4 | 129 |
| Mepivacaína | 1,9 | 2 | 75 | 7,6 | 1,5 a 2 | 130 |
| Bupivacaína | 2,7 | 8 | 95 | 8,1 | 6 a 10 | 3420 |

Nota: a- Malamed (2001); b- comparado com a procaína (Malamed, 2001), c- Covino (1986); d- coeficiente de partição entre octanol/tampão (Strichartz *et al.*, 1990).

Além disso, a atividade vasodilatadora intrínseca (vasoatividade) de cada composto afeta a potência e a duração do efeito anestésico. Quanto maior a vasoatividade, mais rápidas serão a absorção do anestésico pela corrente circulatória e sua retirada do local de ação, o que proporciona uma menor duração do efeito anestésico e também uma potência reduzida do fármaco. Em animais, os efeitos vasculares da mepivacaína, lidocaína e bupivacaína são bifásicos e dose-dependentes. Esses AL em baixas concentrações exercem vasoconstrição e em concentrações usadas clinicamente têm efeito vasodilatador ou não (Aberg e Wahlström, 1972; Johns

et al., 1986). O efeito vasodilatador varia de acordo com o sítio de injeção (Dhunér e Lewis, 1966) e depende do tônus vascular (Aberg e Wahlström, 1972).

1.3 Mecanismo de ação dos anestésicos locais

Os AL atuam na membrana nervosa, onde exercem suas ações farmacológicas interferindo na transmissão do impulso nervoso, bloqueando especificamente a entrada de íons sódio e a despolarização da membrana (Strichartz e Ritchie, 1987; Yagiela *et al.*, 2000).

Há evidências da ligação das formas protonada (Frazier *et al.*, 1970; Narahashi *et al.*, 1970) e neutra (Rasgdale *et al.*, 1994, 1996) dos anestésicos locais em regiões específicas no canal de sódio voltagem-dependente dos axônios. A ligação do anestésico local diminui ou abole a permeabilidade aos íons sódio, bloqueando a despolarização da membrana e a condução do impulso nervoso ao sistema nervoso central, não permitindo a percepção da dor (Butterworth e Strichartz, 1990). A ligação do anestésico local a estes canais depende da sua conformação, sendo favorecida por uma maior afinidade pelo canal em estado aberto ou inativado (Fraceto *et al.*, 2006).

A afinidade intrínseca do AL pelo canal deve ser considerada na avaliação do bloqueio, havendo diferenças entre a velocidade de ligação e de dissociação do canal entre os vários anestésicos locais (Pardo *et al.*, 2002).

Os AL também podem atuar de forma indireta, pela ligação à fase lipídica da membrana, levando a mudanças conformacionais no canal induzidas pela modificação da organização lipídica (de Paula e Schreier, 1996). De fato, a inserção dos anestésicos

locais nas membranas causa alteração da fluidez membranar, o que já foi reportado por técnicas como calorimetria diferencial de varredura, ressonância paramagnética eletrônica, ressonância magnética nuclear, fluorescência e outras (de Paula e Shreier, 1995, 1996, Fraceto *et al.*, 2005).

1.4 Metabolismo dos anestésicos locais

O conhecimento do metabolismo do anestésico local é importante, já que a toxicidade global de um fármaco depende do equilíbrio entre sua velocidade de absorção do local da administração para a corrente sanguínea e da velocidade de retirada do mesmo do sangue, através de processos de captação e metabolização (Malamed, 2001).

Os anestésicos locais do grupo dos ésteres são hidrolisados no plasma sanguíneo, pela enzima pseudocolinesterase (Kalow, 1952; Malamed, 2001; Haas, 2002). Os anestésicos locais do tipo amida são metabolizados por enzimas microssomais, tendo o fígado como principal local de biotransformação. A velocidade de metabolização influencia os efeitos tóxicos sistêmicos. A metabolização rápida, por exemplo, evita o acúmulo de anestésicos locais no plasma e torna improvável o aparecimento de efeitos tóxicos sistêmicos. As velocidades de biotransformação da lidocaína, mepivacaína, etidocaína e bupivacaína são muito semelhantes. A lidocaína é metabolizada por oxidases microssômicas até monoetilglicina e xilidida; a xilidida é um anestésico local potencialmente tóxico. A lidocaína não determina sedação; todavia,

acredita-se atualmente que dois metabolitos - monoetilglicinaxilidida e glicinaxilidida - são responsáveis por esta ação clínica (Malamed, 2001).

1.5 Toxicidade dos anestésicos locais

Os anestésicos locais bloqueiam reversivelmente os potenciais de ação em todas as membranas excitáveis e, por isso, o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Cardiovascular (SCV) são suscetíveis às suas ações. Em geral, o aparecimento dos sintomas de toxicidade sistêmica está relacionado à injeção intravascular inadvertida ou administração de dose excessiva do AL (Strichartz e Covino, 1993). O risco de injeção intravascular acidental e a conseqüente toxicidade aguda são inerentes na maioria das técnicas de bloqueio nervoso.

1.5.1. Toxicidade ao sistema nervoso central

A toxicidade sistêmica dos agentes anestésicos locais é caracterizada pela excitação do sistema nervoso central e atividade convulsiva. Os sintomas iniciais associados envolvem sensações de dor de cabeça leve e vertigens, seguidas freqüentemente de alterações visuais e auditivas como dificuldade de focalização e zumbidos. Outros sintomas incluem desorientação e sonolência. Os sinais objetivos de toxicidade são normalmente de natureza excitatória e incluem calafrios, contrações musculares e tremores. Isto pode evoluir para convulsões generalizadas de natureza tônico-clônicas. À medida que a dose é aumentada, instala-se uma fase inibitória que

se caracteriza pelo estado generalizado de depressão do SNC (Strichartz e Ritchie, 1987; Yagiela *et al.*, 2000; Horlocker e Wedel, 2002; Groban, 2003).

1.5.2. Toxicidade ao sistema cardiovascular

Os AL exercem uma variedade de efeitos sobre o SCV, que podem ser benéficos (como em casos de arritmia cardíaca) ou podem acentuar a toxicidade sistêmica, seja pela ação direta no miocárdio (modificando os eventos eletrofisiológicos por interação não específica com outros canais iônicos que não o canal de sódio voltagem-dependente) ou na vasculatura periférica, causando vasodilatação (Strichartz e Ritchie, 1987; Sisk, 1992; Yagiela *et al.*, 2000). A LDC é usada no tratamento de arritmias ventriculares causadas por infarto agudo do miocárdio, cirurgia cardíaca aberta e digitálicos. Exerce sua ação como antiarritmico diminuindo a despolarização, o automatismo e a excitabilidade nos ventrículos mediante uma ação direta sobre os tecidos (bloqueando os canais de sódio), tende a evitar a fibrilação ventricular primária na fase aguda do infarto do miocárdio (Goodman e Gilman, 1991). A ação dos AL sobre a musculatura vascular com um efeito de relaxamento, causa vasodilatação periférica, principalmente sobre as arteríolas, levando à hipotensão arterial (Covino e Giddon, 1981; Rang *et al.*, 2001). Os AL atuam também sobre o coração através do bloqueio dos canais de sódio da célula cardíaca, produzindo bradicardia (Tolas *et al.*, 1982; Thomas *et al.*, 1986; McCaughey, 1992). As alterações nos canais de cálcio (Ca^{2+}) e potássio (K^+), na produção do AMPc e síntese de ATP também contribuem para a cardiotoxicidade. O bloqueio do canal de K^+ prolonga o potencial de ação,

predispondo o coração para arritmias ventriculares. O efeito depressivo nos canais de Ca^{2+} , atenuando a entrada de cálcio, é importante no processo acoplamento, excitação e contração cardíaca. A depressão da contração do miocárdio também pode estar relacionada à interferência da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Groban e Dolinski, 2001). A inibição da formação de AMPc pode prejudicar os esforços para ressuscitação, após a ocorrência de parada cárdio-respiratória (Aberg, 1972).

A severidade da toxicidade nos sistemas cardiovascular e nervoso é diretamente proporcional à potência do anestésico local, dose e via de administração (Groban e Dolinski, 2001; Mather *et al.*, 2005). De fato existe uma relação estrutura-atividade, entre famílias de AL, que pode explicar diferenças no potencial cardiotoxíco dos compostos: AL mais potentes e de longa duração (bupivacaína, levobupivacaína e ropivacaína) têm mostrado nos modelos *in vitro* e *in vivo* serem mais arritmogênicos do que os AL menos potentes e de curta duração como a lidocaína (Covino e Vassalo, 1976; de Jong *et al.*, 1982; Nath *et al.*, 1986; Morrison *et al.*, 2000; Groban *et al.*, 2000; Heavner, 2002). As diferenças arritmogênicas nas extra-sístoles entre LDC e BVC têm sido atribuídas às diferenças entre os anestésicos locais nas cinéticas estado-dependentes de sua ligação ao canal de sódio. A bupivacaína desliga-se do canal de sódio lentamente enquanto a lidocaína dissocia-se relativamente rápido (Clarkson e Hondegheem, 1985; Moller e Covino, 1985).

A depressão respiratória, causada pela toxicidade no SNC, acompanhada de hipóxia, bradicardia e acidose pode contribuir para os sinais de cardiotoxicidade, aumentando a frequência de arritmia cardíaca (Strichartz e Covino, 1993; Cox *et al.*, 2003; Groban e Dolinski, 2001).

1.5.3. Toxicidade local

Existem evidências experimentais de que os AL causam marcadas lesões quando injetados dentro ou adjacente ao tecido muscular esquelético (Zink e Graf, 2004; Zink *et al.*, 2005). Injeções intramusculares de anestésicos locais regularmente resultam em danos e mionecrose no músculo estriado, com uma taxa de toxicidade agente-específica e dose-dependente (Zink *et al.*, 2005). Muitos anesthesiologistas não consideram a miotoxicidade dos AL um problema clínico, porque as injúrias musculares esqueléticas após a aplicação destas drogas permanecem clinicamente inaparentes em muitos casos e são supostamente reversíveis dentro de várias semanas (Foster e Carlson, 1980; Malamed, 2001). Entretanto, muitos casos relatados de complicações de miotoxicidade após administração de AL têm sido publicados (Zink *et al.*, 2005).

O aumento dos íons Ca^{2+} intracelular tem sido considerado como um mecanismo básico de toxicidade induzida pela lidocaína. O AL induz a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático levando à danos musculares (Radwam *et al.*, 2002). Apesar desta evidência, os AL empregados clinicamente raramente produzem lesões nervosas localizadas, nas concentrações usualmente empregadas (Strichartz e Covino, 1993; McLure e Rubin, 2005).

Para avaliar a possível ocorrência de reação inflamatória após aplicação de prilocaína lipossomal foram realizados testes de edema de pata e de avaliação histológica, em ratos. A prilocaína lipossomal não provocou aparecimento de edema. A avaliação histológica da mucosa oral frente à anestesia intra-oral (bloqueio do nervo infra-orbital) de prilocaína lipossomal mostrou uma reação inflamatória

significativamente menor da formulação lipossomal quando comparada à da formulação comercial associada ao vasoconstritor felipressina (Cereda, 2007).

1.6 Vasoconstritores

A atividade vasodilatadora das soluções de AL para uso clínico é modificada pela inclusão de vasoconstritores, diminuindo a taxa de absorção do anestésico, que fica mais tempo no sítio de ação, aumentando a duração do seu efeito e reduzindo a probabilidade de ocorrência de toxicidade sistêmica (Goodman e Gilman, 1991; Malamed, 2001).

Os vasoconstritores são quimicamente idênticos ou muito semelhantes à epinefrina e norepinefrina, que são mediadores do sistema nervoso simpático. São classificados como drogas simpaticomiméticas ou adrenérgicas por mimetizar as respostas dos receptores adrenérgicos à estimulação (Bennett, 1986; Yagiela *et al*, 2000; Malamed, 2001). Essas drogas podem ter ação indireta, ter ação mista ou agir diretamente nos receptores adrenérgicos. Os vasoconstritores mais utilizados em anestesia odontológica são a epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina), corbadrina (neocobefrina) e fenilefrina (Figura 2).

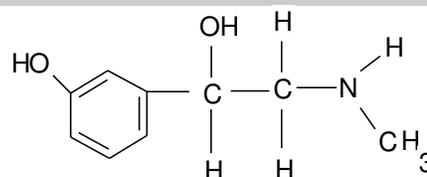
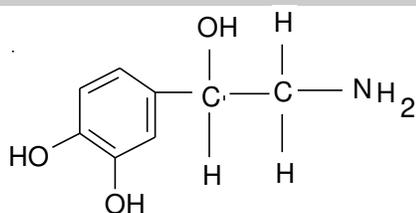
**Epinefrina****Corbadrina****Norepinefrina****fenilefrina**

Figura 2 – Estrutura química dos vasoconstritores do tipo simpaticomimético, usados em associação medicamentosa com anestésicos locais.

No Brasil e em muitos países (não estando incluídos nesse grupo os Estados Unidos e o Canadá), o anestésico local prilocaína está sendo comercializado associado a um vasoconstritor que não pertence ao grupo das drogas simpaticomiméticas – a felipressina (Figura 3), que é um análogo sintético do polipeptídeo vasopressina (hormônio antidiurético).

Cys-Phe-Phe-Gly-Asp-Cys-Pro-Lys-Gly NH₂

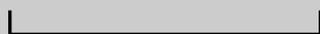


Figura 3- Composição do peptídeo vasoconstritor felipressina

Segundo Perusse e col. (Perusse *et al.*, 1992^a), na prática odontológica, o uso de vasoconstritores deve ser evitado em pacientes com as seguintes condições:

- ◆ hipertensão severa não tratada ou não controlada;
- ◆ doença cardiovascular grave:
 - menos de 6 meses após o infarto do miocárdio;
 - menos de 6 meses após acidente vascular encefálico
 - cirurgia recente das artérias coronárias;
 - *angina pectoris* instável;
 - arritmias cardíacas refratárias, apesar de tratamento adequado;
 - insuficiência cardíaca congestiva não tratada ou não controlada;
- ◆ *diabetes mellitus* não controlado;
- ◆ hipertireoidismo;
- ◆ feocromocitoma;
- ◆ sensibilidade aos sulfitos (que são substâncias incorporadas às soluções de vasoconstritores, com o objetivo de impedir a sua oxidação e inativação);
- ◆ pacientes que fazem uso de antidepressivos tricíclicos, compostos fenotiazínicos ou beta-bloqueadores não seletivos;
- ◆ usuários de cocaína ou “crack” .

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

aumento da dose, com risco da ocorrência de um efeito tóxico relacionado à própria solução anestésica (Perusse *et al.*, 1992a).

Existem ainda outras situações em odontologia em que os pacientes apresentam maior sensibilidade aos efeitos tóxicos dos anestésicos locais:

- ◆ na odontopediatria, onde o níveis plasmáticos elevados de anestésico podem ocorrer mais facilmente na criança, em comparação com o adulto;
- ◆ no atendimento a pacientes idosos que, por efeito da idade apresentam importantes alterações nos processos de distribuição, metabolização e excreção dos fármacos;
- ◆ no atendimento a gestantes, porque durante o período gestacional a mulher passa por uma série de mudanças físicas, fisiológicas e psicológicas, (Malamed, 2001).

Diante de todas essas situações, seria interessante o desenvolvimento de formulações anestésicas que aliassem aumento de potência com diminuição de toxicidade. Um caminho muito promissor tem sido aberto com o desenvolvimento de formulações anestésicas de liberação prolongada ou sustentada, capazes de manter o anestésico por mais tempo e em maior concentração no sítio de ação (Kuzma *et al.*, 1997, Araújo *et al.*, 2003).

1.7 Lidocaína

A lidocaína (cloridrato de 2-dietil amino -2',6-acetoxilidida) é um dos anestésicos locais mais utilizados na clínica odontológica, onde foi introduzida a partir de 1948. A

lidocaína (LDC) foi considerada como droga-padrão de comparação para todos anestésicos locais, o que ainda acontece nos dias atuais em muitos países (Malamed, 2001). É o anestésico local mais versátil e comumente usado em virtude de sua potência, rápida velocidade de ação, moderada duração de ação e atividade anestésica tópica; a LDC pode ser utilizada para infiltração, bloqueio de nervos periféricos, anestesia extradural e espinhal (Covino, 1986).

A lidocaína tem propriedade vasodilatadora mais acentuada que a de outros AL de ação moderada (como a mepivacaína e a prilocaína). Apesar da duração do bloqueio sensorial induzido por estes agentes apresentarem pouca diferença em nervo isolado, a duração da anestesia produzida *in vivo* pela lidocaína em tecidos moles é mais curta que a da mepivacaína ou prilocaína (Blair, 1975; Strichartz e Covino, 1993; Cereda *et al.*, 2006).

A LDC tem uma ação de relaxamento direto sobre o músculo liso vascular, induzindo hipotensão (Blinder *et al.*, 1998). Seus efeitos no coração incluem principalmente o bloqueio dos canais de cálcio e sódio, resultando em arritmias severas (Alves e Guanais, 1998) e redução da força cardíaca (Altura *et al.*, 1965; Newton *et al.*, 2007). Heavner (2002), após uma revisão de 13 artigos sobre toxicidade de AL em coração isolado, concluiu que, em ordem crescente, o potencial cardiotoxico dos AL estudados é: prilocaína, lidocaína, mepivacaína, ropivacaína, levobupivacaína, bupivacaína racêmica, etidocaína e tetracaína.

A efetividade de lidocaína sistêmica em aliviar a dor aguda ou crônica tem sido reconhecida por mais de 40 anos (Mao e Chen, 2002). Em particular pela via sistêmica a LDC tem sido amplamente utilizada como instrumento diagnóstico e terapêutico para

dor neuropática intratável, durante a última década (Mao e Chen, 2002; Koppert *et al.*, 2004; Carroll, 2007).

A anestesia com LDC é bastante segura para uso em liposucção (Ostad *et al.*, 1996) e a aplicação intravenosa melhora a analgesia pós-operatória, fadiga e função intestinal após colectomia laparoscópica (Kaba *et al.*, 2007). A lidocaína tem sido também bastante usada como anestésico tópico, em vários procedimentos (Wu *et al.* 1993; Taddio *et al.*, 1998; Speirs *et al.*, 2001).

Em odontologia, o interesse na pesquisa do uso da lidocaína tem sido crescente, seja como AL de uso tópico em associação com a prilocaína (McMillan *et al.*, 2000; Friskopp e Huledal, 2001; Primosch e Rolland-Aseni, 2001; Munshi *et al.*, 2001; Nayak e Sudha, 2006; Paschos *et al.*, 2006); na forma injetável, para avaliar sua influência nas respostas hemodinâmicas (Homma *et al.*, 1999; Enlund *et al.*, 2001; Meechan *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2005; Faraco *et al.*, 2007); em cirurgia de implante oral, pulpotomias, infiltração e bloqueio de nervo (Donohue *et al.*, 1993; Gidron *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2001; List *et al.*, 2006); em comparação a outros anestésicos locais no que diz respeito à duração do efeito anestésico (McLean *et al.*, 1993; Vahatalo *et al.*, 1993; Malamed *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2005) e quanto ao efeito antibacteriano (Kaya *et al.*, 2007).

1.8 Lipossomas

Lipossomas foram primeiramente descobertos por Alec Bangham, há cerca de quatro décadas. São vesículas que consistem de uma ou mais bicamadas lipídicas dispostas em lamelas concêntricas que envolvem compartimentos aquosos. Nos

lipossomas as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior da bicamada e as cabeças polares voltadas para o exterior, em contato com o solvente polar (Figura 4). Lipossomas são classificados pelo tamanho e de acordo com o número de camadas lipídicas concêntricas que contêm (Torchilin, 2005), em:

- ◆ vesículas multilamelares: consistem de várias bicamadas concêntricas e têm tamanho de 500 a 5000 nm.
- ◆ vesículas unilamelares pequenas: formadas por uma simples bicamada e com tamanho em torno de 100nm;
- ◆ vesículas unilamelares grandes: têm unibicamadas e variação no tamanho de 200 a 800 nm.

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).

Lipossomas como carreadores de drogas estão extensivamente descritos na literatura (Crommelin e Sindelar, 2002; Torchilin, 2005). Devido à biodegradabilidade e não toxicidade da lecitina (principal lipídio constituinte), lipossomas tem sido amplamente estudados, especialmente para administração intravenosa (Malinovsky *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2004).

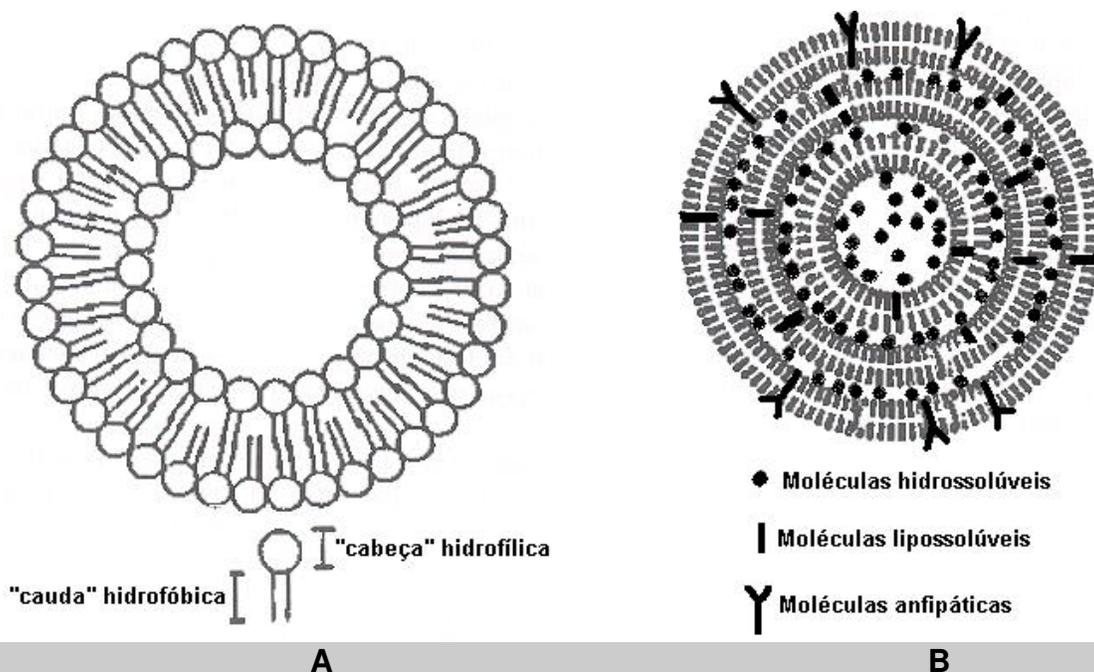


Figura 4 - Esquema de Lipossoma unilamelar (A) e Lipossoma multilamelar (B), com inserção de moléculas hidrossolúveis, lipossolúveis e anfipáticas. (Araújo *et al.*, 2003).

O comportamento lipossomal *in vivo* e as características de liberação do fármaco encapsulado são determinadas pelo tamanho, estrutura e composição dos lipossomas (Kirby e Gregoriadis, 1984; Sharata e Katz, 1996; 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 e Bansinath, 2001). A estrutura dos lipossomas afeta a cinética de liberação do composto encapsulado: fármacos tendem a escapar mais rapidamente de lipossomas compostos de uma simples bicamada lipídica, enquanto a liberação tende a ser retardada em sistemas multilamelares. O tipo de lipídio e a incorporação de outros componentes na bicamada, tais como colesterol, são importantes determinantes da permeabilidade da membrana lipossomal (Grant e Bansinath, 2001).

Fosfolipídios, usados no preparo dos lipossomas, constituem a principal classe de lipídios das membranas biológicas. A maioria dos fosfolipídios tem uma temperatura de transição de fases gel/líquido-cristalina (T_m) característica. A T_m é a temperatura na qual a estrutura dos fosfolipídios na bicamada muda de uma forma mais ordenada (fase gel) para uma mais frouxamente ordenada (fase líquida cristalina) ou flúida. A fase em que bicamada existe influencia grandemente a permeabilidade para o fármaco encapsulado. Se a temperatura ambiente é menor que a T_m do lipídio, a compactação da membrana dificulta a inserção e a passagem do fármaco pela bicamada. Entretanto, se a temperatura ambiente for maior do que T_m , a membrana será relativamente mais flúida, favorecendo a partição e a permeação do fármaco. As membranas biológicas, formadas por misturas lipídicas e proteínas, encontram-se na fase líquido cristalina, cuja fluidez é essencial para que ocorram os fenômenos de membrana (Singer e Nicolson, 1972). O colesterol, usado como constituinte de lipossomas, tem uma função moduladora, pois diminui a fluidez da membrana acima da T_m e aumenta a fluidez abaixo da T_m (New, 1990; Grant e Bansinath, 2001).

Devido a sua natureza anfifílica os AL, quando colocados em lipossomas, residem principalmente na região da bicamada (de Paula e Schreier, 1996), enquanto outra fração remanescente situa-se no interior aquoso dos mesmos (Pinto *et al.* 2000; Rose *et al.*, 2005).

Anestésicos locais têm sido encapsulados em lipossomas e testados em modelos animais e humanos. Boogaerts *et al.* (1993, 1995), Malinovsky *et al.* (1997; 1999), Grant *et al.* (1997; 2000) e Yu *et al.* (2002) testaram a bupivacaína lipossomal multilamelar em modelos animais, obtendo resultados satisfatórios quanto ao aumento da duração da ação anestésica e à diminuição de toxicidade. Em vesículas

unilamelares, bupivacaína, mepivacaína (Araújo *et al.*, 2004) e prilocaína (Cereda *et al.*, 2004) encapsuladas em lipossomas foram testadas em animais, tendo causado aumento na duração do efeito anestésico. Formulações de lidocaína lipossomal também foram testadas em vários estudos com animais (Mashimo *et al.*, 1992; Dyhre *et al.*, 2001; Cereda *et al.*, 2006) resultando num prolongamento do bloqueio anestésico.

Bucalo *et al.* (1998) e Glavas-Dodov *et al.* (2002) avaliaram a lidocaína lipossomal como agente anestésico tópico em humanos, observando um efeito mais duradouro, se comparado à lidocaína não encapsulada (livre). Lidocaína lipossomal 4% melhorou a taxa de sucesso, reduziu a dor, o tempo de procedimento e foi associada com menores mudanças dermais (eritema, coceira) quando usada para analgesia cutânea em crianças (Taddio *et al.*, 2005).

Franz-Montan *et al.* (2007) avaliaram a eficácia da ropivacaína encapsulada em lipossomas para anestesia tópica em humanos. O gel de ropivacaína lipossomal 1% foi equivalente ao EMLA® para reduzir a dor durante a inserção da agulha e para duração de anestesia de tecidos moles.

O grupo de Boogaerts (Lafont e Boogaerts, 1994; Boogaerts *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1996) avaliou o efeito da bupivacaína lipossomal multilamelar em humanos, tendo observado aumento na duração do efeito anestésico, em comparação com a bupivacaína livre. Grant e col. (2001; 2004), ao avaliarem o efeito da bupivacaína lipossomal no controle da dor pós-operatória em humanos, obtiveram resultados promissores, relacionados ao aumento da duração anestésica.

Estudos realizados em humanos com o teste “pin-prick” com uma preparação tópica de tetracaína 0,5% encapsulada em lipossoma multilamelar (Gesztes e Mezei,

1988) apresentou um maior efeito anestésico em relação à formulação comercial de tetracaína 1%.

Algumas formulações lipossomais de LDC já se encontram disponíveis no mercado. O creme de LDC lipossomal a 4% (Maxilene, RGR *Pharma.*) foi lançado no Canadá em 2003. Lidocaína lipossomal (ELA-Max *Topical Anesthetic*) está disponível comercialmente há vários anos nos Estados Unidos e oferece um início de ação mais rápido, sendo uma alternativa menos dispendiosa do que a mistura eutética de lidocaína e prilocaína - EMLA® (Eidelman *et al.*, 2005).

Os avanços nas pesquisas com lipossomas como sistemas de liberação de fármacos (drug-delivery) resultaram no desenvolvimento de formulações lipossomais já aprovadas para uso clínico (Tabela 2). No entanto, ainda não é fácil preparar em grande escala fármacos lipossomais para uso clínico (Amselem *et al.*, 1993 *apud* Chunlei e Yingjie, 2004), principalmente devido à necessidade de se obter vesículas estáveis química (com baixa peroxidação lipídica) e fisicamente (que mantenham o tamanho) por vários meses de armazenamento. O interesse no campo continua alto. Segundo Torchilin (2005), cerca de 2000 artigos e mais de 150 revisões sobre os vários aspectos da “lipossomologia” foram publicados somente no ano de 2003.

Tendo em vista o exposto, na tentativa de se obter vesículas lipossomais química e fisicamente mais estáveis e economicamente menos dispendiosas para futura produção em grande escala optamos por usar a lecitina de soja hidrogenada neste estudo.

Tabela 2 – Formulações lipossomais aprovadas para aplicação clínica

| Fármaco | Nome produto | Indicações^a |
|---|-----------------------------------|--|
| Daunorubicina | DaunoXome | Sarcoma de Kaposi |
| Doxorubicina | Mycet | Terapia combinada de câncer de mama recorrente |
| Doxorubicina em lipossomas - PEG | Doxil/Caelyx | Sarcoma Kaposi refratário; câncer ovariano; câncer de mama recorrente |
| Anfotericina B | AmBisome | Infecções fúngicas |
| Citarabina | Depocyt | Meningite Linfomatosa |
| Vincristina | Onco TCS | Linfoma não-Hodgkins |
| Lurtotecan | NX211 | Câncer ovariano |
| Nistatina | Nyotran | Agente antifúngico tópico |
| Ácido retinóico todo-trans | Altragen | Leucemia promielocítica aguda; limfoma não-Hodgkins; carcinoma renal; sarcoma Kaposi |
| Complexos de Platina | Platar | Tumores sólidos |
| Anamicina | | Tumores resistentes a Doxorubicina |
| Gen E1A | | Vários tumores |
| Complexo DNA/lipossoma com o gen HLA-B7 | Allovectin-7 | Melanoma metastático |
| Complexo Lidocaína/lipossoma | Maxilene ELA-Max | Anestesia tópica ^b |

Fonte: a-Torchilin (2005); b- Eidelman (2005).

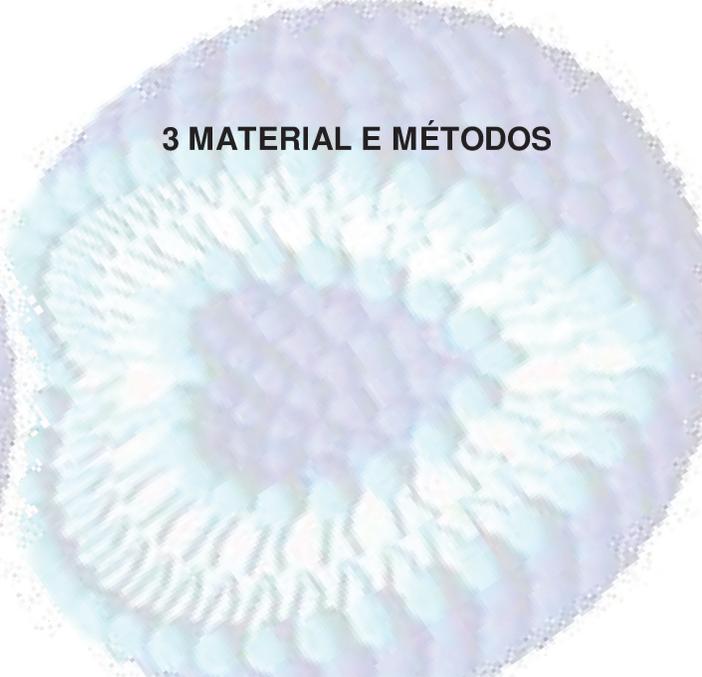
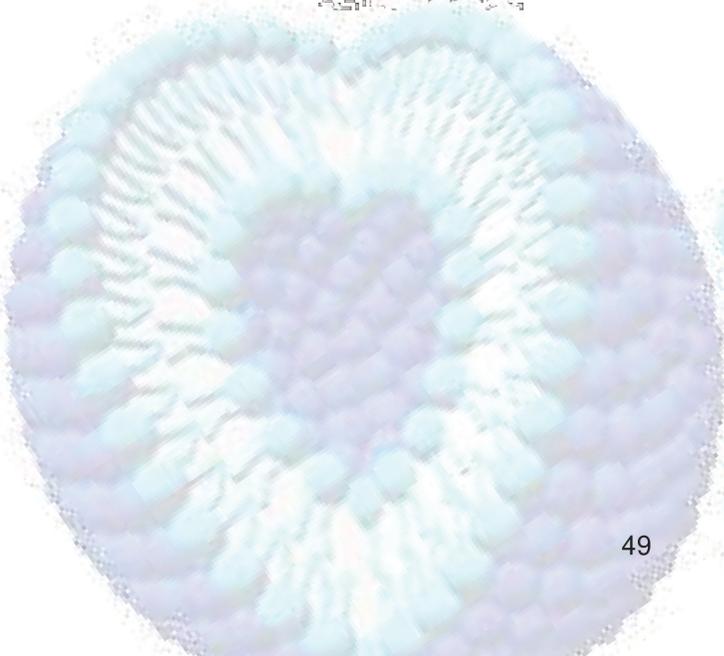
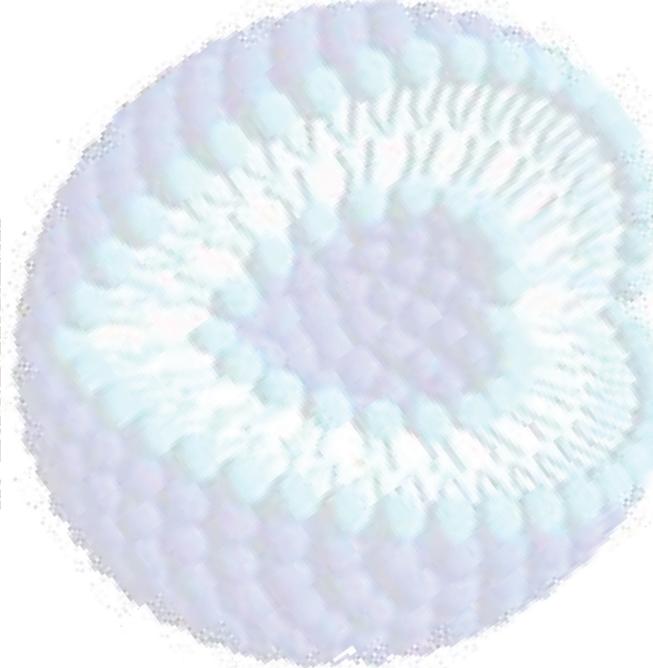
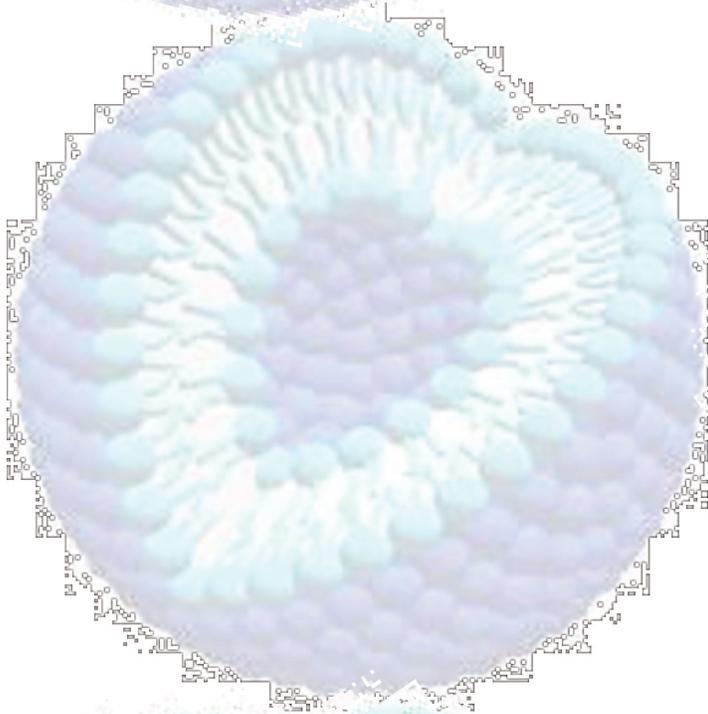
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

A principal linha de pesquisa do laboratório de Biomembranas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia/UNICAMP é voltada ao desenvolvimento de formulações lipossomais de AL para uso clínico. Dentro desta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo preparar uma formulação escalonável de lidocaína em lipossomas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada/colesterol e comparar sua atividade nociceptiva e cardiotoxica em animais, com preparações comerciais de lidocaína, associadas ou não à vasoconstritores, de uso em odontologia.

2.2 Objetivos específicos

- ◆ Preparar uma formulação lipossomal com o anestésico local lidocaína em concentrações clínicas (2% a 3%), adotando composição lipídica e método de preparo previamente estabelecido, apropriado para o processo de produção em escala piloto.
- ◆ Caracterizar a formulação preparada, quanto à eficácia de encapsulação, tamanho e estabilidade da mesma e cinética de liberação do fármaco.
- ◆ Avaliar a atividade biológica da formulação, quanto ao bloqueio sensorial e cardiotoxicidade comparando com preparações comerciais de lidocaína, associadas ou não à vasoconstritores, de uso em odontologia.



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Cloridrato de lidocaína e tiopental sódico foram doados pela Cristália-Ind. Quím. Farm. Ltda (Itapira, Brazil). Alphacaine® (Cloridrato de Lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000, Bissulfito de sódio, Cloreto de Sódio) foi comprada de DFL- Indústria e Comércio S/A (Rio de Janeiro, Brazil); a fosfatidilcolina de soja hidrogenada (Epikuron 200 SH) foi comprada da Lukas Meyer Inc. (Hamburg, Germany); o manitol foi adquirido da LabSynth Prod. Lab. Ltda (Diadema, SP) e o colesterol de Sigma Chem. Co. (MO, USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Equipamentos

- ◆ Espectrofotômetro (*Beckman® DU-70*);
- ◆ Extrusor (Lipex Biomembranes Inc.);
- ◆ *Light Scattering* - Malvern® Autosizer 4700 (*Malvern Instruments*), Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP;
- ◆ Ultracentrífuga (Beckman®)
- ◆ Transdutor de pressão TSA 104 A acoplado a um sistema BIOPAC MP 100 A (Santa Bárbara-California) conectado a um computador;
- ◆ Eletrocardiógrafo (ECG-4-FUNBEC-SP-BRASIL);
- ◆ Cânulas de polietileno P50 e P10 (CPL-medical's-SP-BRASIL).

3.3 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, adultos, machos, pesando entre 350-450g; estes animais, alojados coletivamente (5 animais por gaiola), foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada a $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) para os experimentos de avaliação sensorial e pelo Biotério da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG para os estudos de cardiotoxicidade.

Todos os experimentos encontravam-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido seus protocolos aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEA)-IB-UNICAMP protocolo nº1004-1 (Anexo 1) e pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da UNIFAL-MG protocolo nº109/2006 (Anexo 2).

3.4 Preparação da formulação lipossomal

Os lipossomas usados nesta dissertação são resultado de um desenvolvimento de processos, regido pelo convênio estabelecido entre a UNICAMP e a Cristália- Ind. Quím. Farm. Ltda (Proc. 07-P 2756/2004) com intermediação da Ag. de Inovações da UNICAMP (INOVA), tendo como executoras, pela UNICAMP, as Dras Eneida de Paula (Instituto de Biologia) e Maria Helena A. Santana (Fac. Engenharia Química). Através deste convênio as Dras Giuliana P. Alves e Luciana de Matos A. Pinto padronizaram as

condições operacionais do processo de secagem por atomização (“spray-drying”) para produção de partículas sólidas, usadas para produção de lipossomas em escala piloto.

Suscintamente, após o planejamento estatístico de experimentos - que teve como finalidade a produção de partículas sólidas dos componentes lipossomais em função das variáveis operacionais do processo de secagem por *spray-drying* (Golbach *et al.*, 1993) - foram realizados experimentos que levaram a obtenção da máxima produção mássica de partículas sólidas, constituídas de Epikuron 200SH, colesterol e manitol (excipiente), com rendimento da ordem de 50%, e manutenção da relação mássica entre os componentes antes e após a secagem (Epikuron 200SH = 77%, colesterol = 15% e manitol = 8%).

Lipossomas multilamelares foram obtidos pela adição de tampão HEPES 20 mM com NaCl 150mM, pH 7,4 ao material particulado, sob agitação mecânica, em duas etapas. Inicialmente uma quantidade de partículas foi colocada em um béquer encamisado, mantido a 65 °C, o tampão foi adicionado em volume correspondente ao de formação de fase lamelar plana (menos de 30%), sob agitação a 100 rpm durante 15 minutos com um agitador do tipo âncora. Posteriormente, o restante do tampão foi adicionado, sob agitação, para a obtenção de fase lamelar com excesso de água, e formação dos lipossomas utilizando um agitador mecânico especial de alto cisalhamento do tipo rotor-estator, com orifícios de 0,3 mm de diâmetro, dispostos lateralmente ao fluxo, a uma velocidade de agitação de 2000 rpm por 1 hora.

A dispersão de lipossomas resultante foi extrudada por 15 vezes consecutivas, através de membrana de policarbonato, com poro de 0,4 µm de diâmetro, sob pressão de nitrogênio, para obtenção de lipossomas unilamelares grandes (LUV), em Extrusor da marca Lipex Biomembranes Inc. a 65°C. Os lipossomas assim preparados ficaram

em repouso por 2 horas, a 65°C (acima da temperatura de transição de fases do Epikuron 200SH) para que houvesse o intumescimento das vesículas (Mowat *et al.*, 1996; Araújo *et al.*, 2004; Cereda *et al.*, 2004).

A incorporação da lidocaína foi realizada após a preparação das vesículas, para uma concentração final de 2%, 2,5% ou 3%; isto é, comparável à dosagem clínica do anestésico local comercial 2%, permanecendo as amostras em repouso por 2 horas, a 65°C.

3.5 Caracterização da formulação lipossomal

3.5.1 Dosagem da Concentração total de fosfolipídios

As partículas secas foram caracterizadas quanto à concentração total de fosfolipídios através do ensaio 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 com liberação do fósforo inorgânico (Pi) pela digestão com ácido perclórico e aquecimento a 180°C. O ortofosfato forma um complexo com o molibdato de amônio; quando este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico há o aparecimento da cor azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de fósforo na amostra, quantificado espectrofotometricamente em 795 nm, através de uma curva de calibração.

3.5.2 Concentração total de colesterol

O colesterol foi quantificado nas formulações utilizando-se kit de dosagem de colesterol total no soro (Laborlab Prod. Lab. Ltda, Guarulhos). O método utilizado baseia-se na produção de H₂O₂ por ação do colesterol oxidase sobre o colesterol. O peróxido de hidrogênio formado, proporcional à concentração de colesterol, reage com a aminofenazona gerando uma quinoneimina de coloração rósea que pode ser detectada, espectrofotometricamente, em 505 nm (Abell *et al.*, 1952).

3.5.3 Determinação do tamanho das vesículas

O diâmetro hidrodinâmico de partículas em difusão foi determinado pela técnica de Espalhamento Quase-elástico de Luz (*Light Scattering*) através da observação das medidas de flutuação tempo-dependente da luz espalhada pelas partículas (Shaw, 1991). Foi utilizado laser de alta potência, e equipamento *Malvern Autosizer 4700*, pertencente à Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, em colaboração com a Prof^a Dra. Maria Helena Andrade Santana. As medidas foram realizadas na presença e na ausência do anestésico local, para verificar o tamanho médio, a homogeneidade e a estabilidade das formulações lipossomais, antes e após a encapsulação.

3.5.4 Eficiência de encapsulação e determinação do coeficiente de partição

Amostras da formulação lipossomal contendo lidocaína, preparadas em tampão HEPES 20mM, NaCl 150mM a pH 7,4, foram submetidas à ultracentrifugação (120.000

x g) por duas horas, em temperatura de 20°C (*Ultracentrífuga Beckman*® modelo L-8-80M). Uma amostra de lipossomas sem anestésico local foi usada para controle da dispersão de luz (Abs_{MLV} , equação 1).

Alíquotas dos sobrenadantes (sbn) foram analisadas por espectrofotometria UV, em 260nm (de Paula e Schreier, 1995), onde o coeficiente de extinção molar da lidocaína, em pH 7,4 é igual a 380. Os valores de absorbância permitiram o cálculo da porcentagem de anestésico local (AL) não encapsulado, de acordo com a equação 1:

$$\% \text{ Não encapsulada } a = \frac{Abs_{sbn} - Abs_{MLV}}{Abs_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde $Abs_{inicial}$ refere-se à solução de anestésico (100%) antes da separação de fases. A porcentagem de AL encapsulado foi obtida por subtração da porcentagem não encapsulada.

Os resultados obtidos podem também ser expressos em termos do coeficiente de partição (P) do anestésico local entre duas fases não miscíveis, membrana (m) e aquosa (a), de acordo com a equação 2 (de Paula e Schreier, 1995; Cereda *et al.*, 2006).

$$P = \frac{n_m / V_m}{n_a / V_a} \quad \text{Equação 2}$$

Onde **n** é o número de moles do anestésico e **V** é o volume de fases membrana (m) e aquosa (a). Como o número de moles do soluto em membrana (**n_m**) adicionado

ao número de moles do anestésico em água (n_a) corresponde ao número de moles total (na solução inicial), pôde-se determinar o valor de P para a lidocaína entre lipossomas e água, usando-se os valores de % encapsulada e não encapsulada (n_m e n_a , respectivamente). Para tanto, calculamos o volume de membrana nas condições experimentais (4 mM de lipídios totais) usando o peso molecular médio dos lipídios e considerando densidade = 1 (de Paula e Schreier, 1996).

A expressão dos valores de % de encapsulação em termos de coeficiente de partição tem como vantagem o fato de a concentração de membrana utilizada no ensaio de separação de fases ser levada em consideração, sendo P uma constante.

3.6 Testes de esterilização da formulação

As amostras de lidocaína lipossomal foram preparadas em câmara de fluxo laminar (com materiais e soluções estéreis) e acondicionadas em frascos-ampola estéreis. Esses frascos foram levados para esterilização com calor úmido em autoclave a temperatura de 121°C e 1atm de pressão por um período de 15 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram rapidamente resfriadas e armazenadas em geladeira (4°C).

A esterilidade das amostras foi verificada com teste microbiológico realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biologia – UNICAMP, em colaboração com a Dr^a Maria Sílvia Viccari Gatti. Esse teste microbiológico consistiu na incubação de amostras estéreis em meio de cultura BHI (*Brain-Heart Infusion*) por um período de 48

horas, e na observação da presença ou ausência de microorganismos viáveis – bactérias ou fungos (Tortora *et al.*, 2000).

Verificou-se também a presença ou não de endotoxinas produzidas pelo metabolismo bacteriano comumente conhecidas como pirogênio. O método utilizado para a determinação da presença dessas endotoxinas foi o teste do pirogênio *in vitro*, que consiste na utilização do Lisado de Amébócitos de *Limulus polyphemus* (Richardson *et al.*, 1983). Esse método é baseado na gelificação de certas proteínas do lisado de amébócitos na presença de endotoxinas. Amostras das formulações preparadas foram enviadas para o setor de controle de qualidade da empresa Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos Ltda, onde os testes foram realizados com o kit “Endosafe® Limulus Amebocyte Lysate” (Alko do Brasil Ind. e Com. Ltda).

3.7 Teste de liberação *in vitro*

O método descrito por Paavola *et al.* (1995) foi utilizado para avaliar a liberação *in vitro* de fármacos livres ou encapsulados, e consiste em um sistema de dois compartimentos: o doador (contendo 1 mL da amostra) e o receptor (com 100 mL de tampão HEPES 20 mM com NaCl 150 mM, pH 7,4), mantidos sob agitação leve a 25°C. Uma membrana de celulose (spectrapore, com poros para exclusão molecular de 12000 a 14000 Da) separa esses dois compartimentos (Figura 5). Amostras foram retiradas do compartimento receptor nos seguintes tempos: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 e 300 minutos e analisadas por espectrofotometria no UV (260nm) para detectar a liberação de lidocaína. Foram testados e comparados dois sistemas, um contendo a formulação lipossomal e o outro, lidocaína em solução, no compartimento doador.

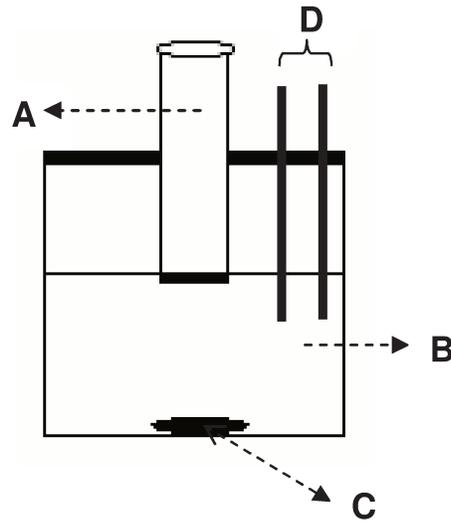


Figura 5 - Representação do sistema para determinação da cinética de liberação de fármacos. A= Compartimento doador (amostra + membrana), B= compartimento receptor (solução tampão), C= barra magnética para agitação, D= local de retirada das alíquotas.

3.7.1 Tratamento matemático das cinéticas de liberação

O programa Sigma Plot ® 8.0 foi usado para analisar os perfis de liberação obtidos. Para interpretação dos perfis testamos equações para liberação monoexponencial (Equação 3) e biexponencial (Equação 4).

$$C = C_o + a.(1 - e^{-k.t})$$

Equação 3

$$C = C_o + a.(1 - e^{-k_1 t}) + b.(1 - e^{-k_2 t})$$

Equação 4

Onde k , k_1 e k_2 são as constantes de liberação, C_0 é a concentração inicial. A seleção do modelo foi baseada no melhor coeficiente de correlação obtido para ajuste das curvas experimentais.

3.8 Avaliação da estabilidade físico-química da formulação anestésica lipossomal, antes e após esterilização

3.8.1 Estabilidade física da formulação lipossomal

A estabilidade física da lidocaína lipossomal foi avaliada pela observação de possíveis alterações no tamanho das vesículas antes e após o processo de esterilização, e em função do tempo, até que alterações significativas fossem observadas. O método utilizado para essa avaliação foi o de espalhamento de luz quase elástico (*Quasi Elastic Light Scattering*), já descrito na seção 3.5.3.

3.8.2 Estabilidade química dos componentes lipídicos

Os lipossomas foram avaliados quanto à estabilidade química de seus componentes estruturais, por meio da medida de oxidação de fosfolípidios. A oxidação de ácidos graxos dos fosfolípidios, na ausência de agentes oxidantes específicos, pode ocorrer por mecanismos de formação de radicais livres. O passo inicial, a retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia lipídica, comumente se dá como resultado de exposição à radiação eletromagnética ou por contaminação de íons metálicos de

transição. Na avaliação da oxidação dos fosfolipídios pode-se considerar o desenvolvimento de conjugação de duplas ligações, a produção de aldeído com cisão de cadeia ou a formação de peróxidos (New, 1990).

Um método amplamente usado para avaliação de peroxidação lipídica consiste na detecção de endoperóxidos pela reação de produtos de sua quebra em altas temperaturas - os malondialdeídos (MDA) - com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Essa reação gera um cromóforo vermelho com absorvância em 532 nm (Sinnhuber *et al.*, 1958; Asakawa e Matsushita, 1980). Em tubos contendo 0,1 mL das amostras de formulação lipossomal foram adicionados 0,1 mL de solução de cloreto férrico (0,27 mg/mL), 0,1 mL de solução etanólica de hidroxitolueno butilado (0,22 mg/mL), 1,5 mL de tampão glicina (0,2 M / pH 3,6) e 1,5 mL de reagente TBA (0,5 mg/mL) em solução de dodecilsulfato de sódio (0,3 mg/mL). Após a incubação em banho fervente por 15 minutos, os tubos foram resfriados rapidamente até a temperatura ambiente. Adicionou-se, então, 1 mL de ácido acético glacial e 2 mL de clorofórmio, os tubos foram agitados e centrifugados (500 x g, por 20 min. a 4°C). Fez-se a leitura do sobrenadante em 532 nm. A quantidade de MDA foi determinada em comparação com uma curva de calibração preparada com tetraetoxipropano (TEP 0,2 mM) hidrolisado sob as mesmas condições experimentais.

3.9 Avaliação da citotoxicidade

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, 100 UI/mL de penicilina e 100

$\mu\text{g/mL}$ de sulfato de espstreomicina, pH 7,2-7,4, 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO_2) através de repiques periódicos. O plaqueamento foi realizado inoculando-se 2×10^4 células viáveis em placas de 48 cavidades, incubadas por 48 horas, até atingirem a semiconfluência.

O número de células viáveis após tratamento com as amostras teste foi determinado usando ensaio colorimétrico baseado na redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) como proposto por Mosmann (1983). O princípio do teste consiste na captação do MTT pelas células vivas e redução a formazan (composto púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais, resultando em acúmulo desse composto somente nas células vivas. A solubilização das células possibilita a liberação do formazan, que pode ser facilmente detectado por espectrofotometria no visível (570 nm).

3.9.1 Ensaio colorimétrico MTT

O MTT foi dissolvido em meio de cultura a 5 mg/mL e filtrado para esterilizar e remover pequenas quantidades de resíduos insolúveis e reservado.

As células foram incubadas por 2 horas com amostras de: – lipossomos, LUV (5 mM); lidocaína, LDC (0,7, 3,5 e 7 mM) ou formulações lipossomais contendo lidocaina, LDC_{LUV} (0,7, 3,5 e 7 mM). Em seguida, o meio de cultura foi substituído e as células incubadas com MTT a 37 °C por 3 horas. Ao final desse período, o meio contendo MTT não 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 corante. As placas foram agitadas vigorosamente por cerca de 20 min. para garantir a solubilização do formazan. A absorbância da solução em cada cavidade foi medida em 570 nm.

Todos os experimentos foram executados no Laboratório de Cultura de Células, Departamento de Bioquímica, IB-UNICAMP.

3.10 Testes em modelos animais

3.10.1 Bloqueio do nervo infraorbital

A avaliação do bloqueio do nervo infraorbital (NIO) é importante devido à sua proximidade anatômica com regiões de interesse em odontologia. Os dentes, ossos e a maior parte dos tecidos moles da cavidade oral são inervados pelo nervo trigêmio. O nervo infraorbital faz parte da divisão maxilar da raiz sensitiva do nervo trigêmio e inerva pele da face, nariz, pálpebra inferior e lábio superior (Malamed, 2001). O NIO nos ratos chega até o lábio superior, incluindo os bigodes; tem dois milímetros de diâmetro e é homólogo com o NIO do homem. Assim, na falta de uma órbita fechada no rato, o nervo se prolonga até abaixo do olho e emerge da maxila através de uma chanfradura profunda ao invés de um forame. De cada lado da maxila do rato existe uma lacuna entre os molares superiores (que estão atrás) e o incisivo superior (na frente) e a chanfradura está situada acima desta lacuna (Fink *et al.*, 1975).

Desta maneira, para avaliar o efeito anestésico da lidocaína foi selecionado o método de bloqueio do NIO descrito por (Fink *et al.*, 1975; Ready e Fink, 1980; Hassan *et al.*, 1985 a, b), tendo sido observada a resposta aversiva do animal ao pinçamento do

lábio superior (movimentação brusca da cabeça), registrada de acordo com os escores: 0 (presença de resposta aversiva) e 1 (ausência de resposta aversiva). Esses valores foram expressos em porcentagem de animais com anestesia (Grant *et al*, 2004).

As amostras testadas foram injetadas na região infraorbital de um dos lados da face do animal (Figura 6) e, o outro lado intacto, serviu como controle, após os animais terem sido levemente anestesiados intraperitonealmente com tiopental (25 mg/kg) de modo que o grau de sedação não interferiu na resposta aversiva do animal (Ready e Fink, 1980).

Cada grupo de animais (n=7) recebeu 0,1 mL das seguintes preparações:

- LDC_{LIVRE} - Solução de lidocaína (2%, 2,5%, 3%);
- LDC_{LUV} - Lidocaína lipossomal (2%, 2,5%, 3%);
- LDC_{VASO} - Solução comercial de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000
- LUV - Suspensão lipossomal (livre de anestésico).

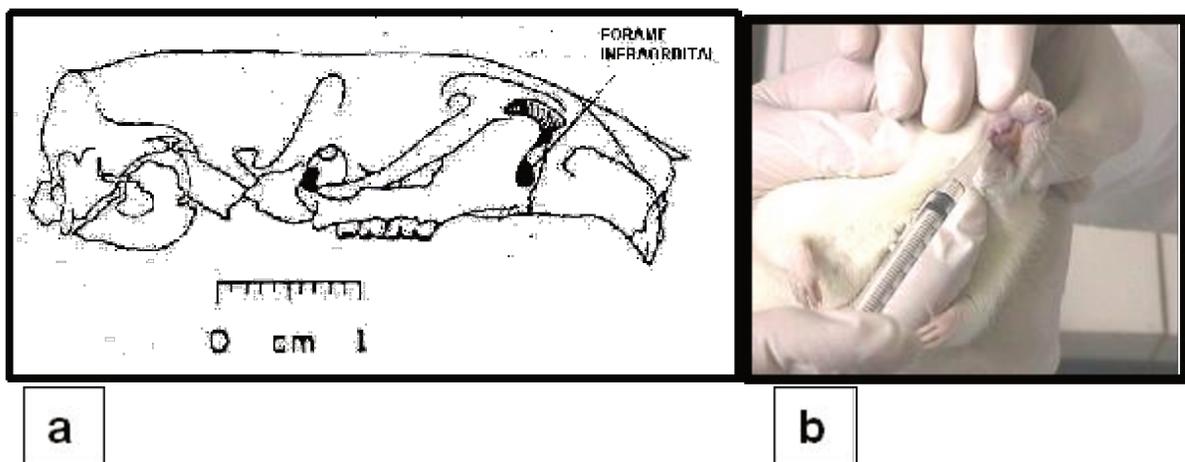


Figura 6 – (a) Técnica de bloqueio do nervo infraorbital (b) Vista lateral do crânio de rato, forame infraorbital (adaptada de Fink *et al*, 1975).

Os animais foram testados em intervalos de cinco em cinco minutos até o aparecimento dos primeiros sinais de retorno da resposta aversiva ao pinçamento no lado injetado. Todas as amostras foram codificadas e usadas em uma seqüência randômica. Os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo observador.

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

3.10.2 Avaliação da toxicidade cardiovascular

A avaliação da toxicidade cardiovascular da formulação de lidocaína lipossomal foi feita através da análise do eletrocardiograma, pressão arterial média e da frequência cardíaca, em ratos.

3.10.2.1 Eletrocardiograma

O eletrocardiograma é o registro da atividade elétrica do coração. Quando um potencial de ação percorre a massa cardíaca a corrente elétrica também se propaga para os tecidos adjacentes ao coração. A colocação de eletrodos na superfície do tórax, em locais estratégicos, permite o registro da atividade elétrica cardíaca, com uso do eletrocardiógrafo.

O traçado eletrocardiográfico normal (Figura 7) é composto por um ciclo elétrico formado pelas ondas: P, intervalo PR, complexo QRS, segmento ST e onda T (Deccache e Crasto, 1993; Singi, 2007). Cada uma destas ondas e segmentos associa-

se a um evento cardíaco: A **onda P** é causada pela corrente elétrica gerada durante a despolarização atrial. Da mesma maneira o **complexo QRS** é formado pela despolarização ventricular. A **onda T** é provocada pela repolarização dos ventrículos. Observa-se também na figura um **intervalo PR**, que representa a geração e a condução do potencial de ação cardíaco, desde sua formação no nódulo átrio-ventricular (SA) até sua chegada nos ventrículos, que é medido do início da onda P até o início da primeira onda do complexo QRS. O período compreendido entre o final da onda S e o início da onda T é chamado **segmento ST** e corresponde a uma total inatividade elétrica dos ventrículos, representando a repolarização ventricular. A atividade completa dos ventrículos (despolarização e repolarização) pode ser avaliada através do **intervalo QT**. O intervalo entre duas ondas R consecutivas determina o ritmo cardíaco.

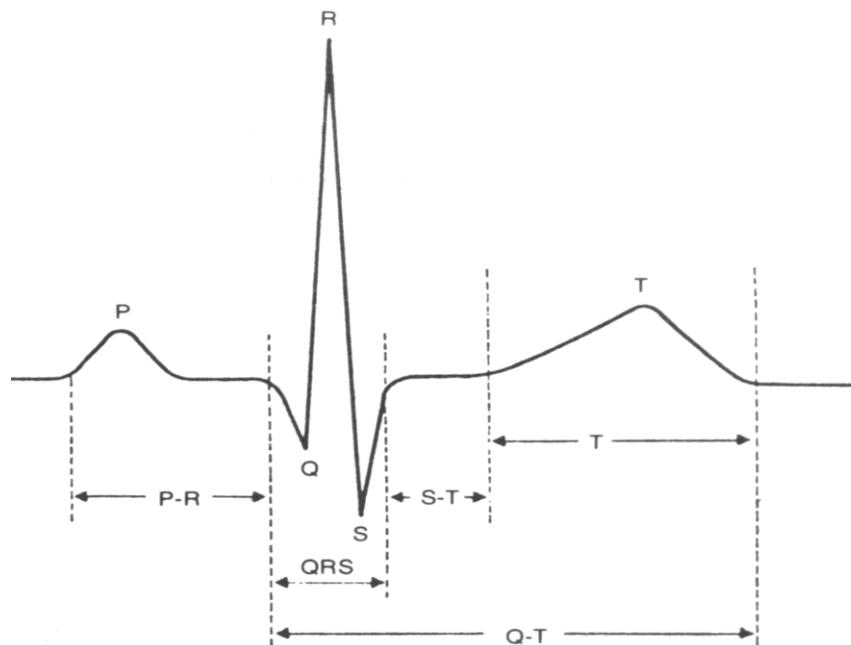


Figura 7 - Registro eletrocardiográfico normal (Deccache e Crasto, 1993).

As conexões elétricas entre os membros do paciente e o eletrocardiógrafo formam, através da diferença de potencial gerado, derivações bipolares. Chama-se de derivação, a linha que une esses dois eletrodos (Singi, 2007; Carvalho, 2007). A derivação não é um fio único conectado ao corpo, mas um circuito completo (Goodman e Gilman, 1991). A disposição clássica dos eletrodos nos membros obedece a uma convenção estabelecida por Einthoven (Figura 8).

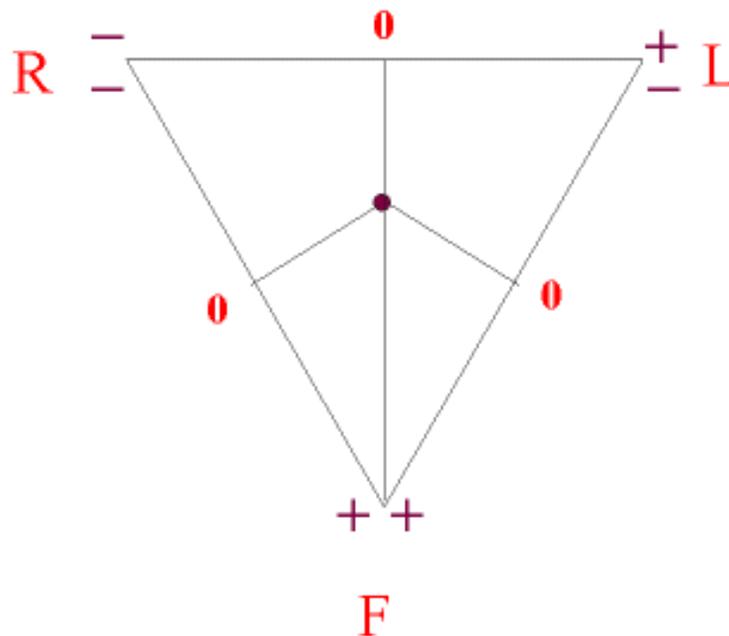


Figura 8 - Esquema representativo do triângulo de *Einthoven* R (*right*)- direito, L (*left*)- esquerdo e F (*foot*)- perna (Deccache e Crasto, 1993).

As derivações são obtidas da seguinte maneira: DI - eletrodo positivo no braço esquerdo e o negativo no braço direito; DII - o eletrodo positivo é colocado na perna esquerda e o negativo no braço direito; DIII - o eletrodo positivo é conectado a perna esquerda e o negativo no braço esquerdo.

Cada derivação é dividida por uma perpendicular entre uma metade positiva e uma negativa. Assim, quando um vetor, com a origem no centro do triângulo se projetar na metade positiva de uma derivação, ocorrerá uma deflexão positiva, e se o vetor se projetar na metade negativa, ocorrerá uma deflexão negativa (Deccache e Crasto, 1993).

3.10.2.2 Medidas do eletrocardiograma

Os experimentos foram realizados no laboratório de Farmacologia e Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Para avaliar os efeitos cardiovasculares seguiu-se a metodologia descrita por Carbajal *et al.* (1989).

Os animais foram anestesiados pela técnica de anestesia geral inalatória, sob ventilação espontânea em circuito semi-fechado com mistura oxigênio/óxido nitroso e halotano (Figura 9).



Figura 9 - Equipamento para anestesia com mistura O_2/NO_2 v/v e halotano.

Em seguida, a veia jugular esquerda dos animais foi dissecada e canulada (P50) para a administração das preparações. A artéria femoral esquerda foi canulada (P10) e a extremidade distal da cânula foi conectada ao transdutor de pressão, acoplado a um sistema BIOPAC MP 100A conectado a um computador, para registro da pressão arterial (PA) (Figuras 10 e 11).



Figura 10 - Animal com artéria femoral e veia jugular esquerda canuladas.



Figura 11 - Sistema BIOPAC MP 100A para registro da pressão arterial.

Para o registro da frequência cardíaca (FC) foram feitas pequenas incisões circulares na região proximal da face anterior das patas dianteiras e traseiras dos animais. Sob a pele foram introduzidos os eletrodos do eletrocardiógrafo, o que permitiu o registro nas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e nas três derivações unipolares dos membros (AVR, AVL e AVF), porém os traçados foram analisados em DII (Figura 12).

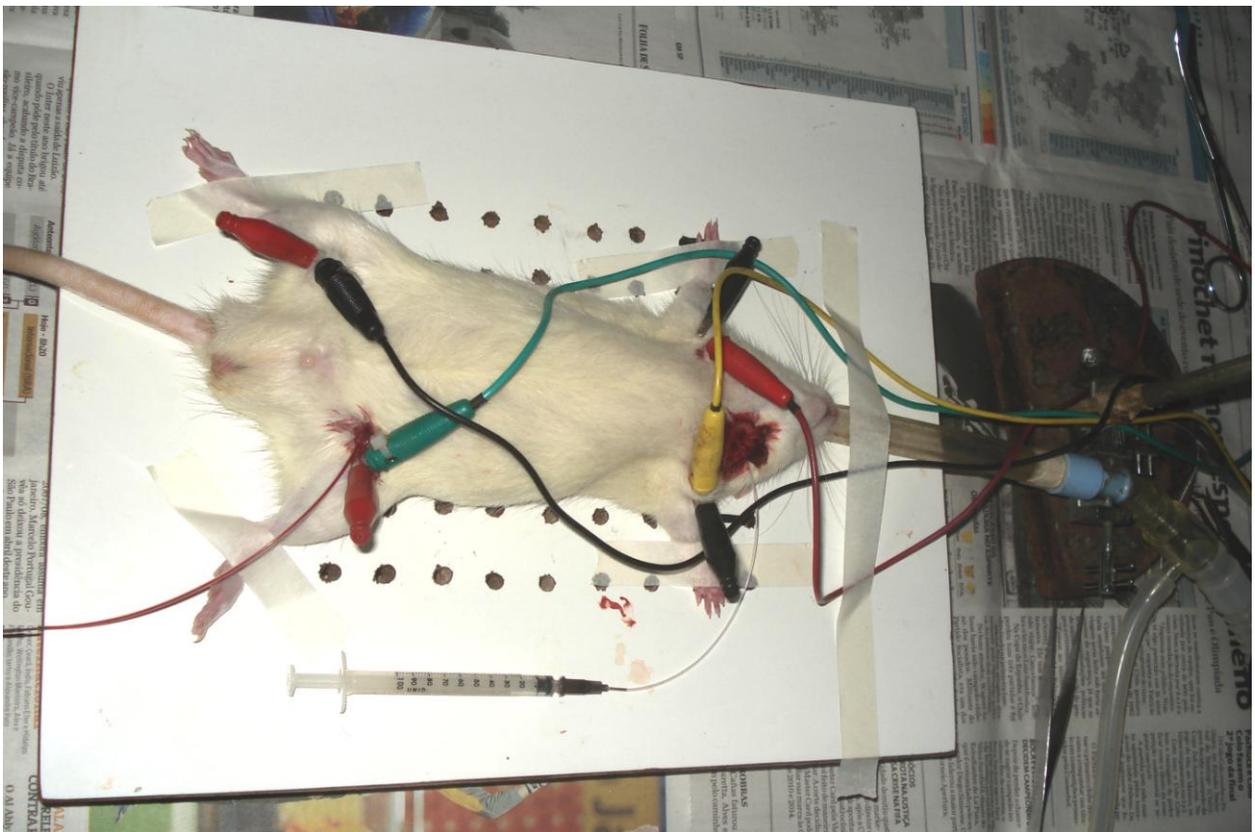


Figura 12 - Eletrodos posicionados para registro do eletrocardiograma.

O eletrocardiógrafo foi ajustado com velocidade padrão (25 mm/s) e a amplitude foi de 2 cm=1mV, devido ao fato de o traçado eletrocardiográfico do rato ser pequeno.

Os registros da PA, ECG e frequência cardíaca (estimada pelo intervalo entre duas ondas R consecutivas e expressa em batimentos por minutos – bpm) foram realizados antes (controle) e depois da injeção das preparações, em tempos pré-determinados, até o término em 5 minutos.

Kashimoto *et al.* (1997), estudando ratos anestesiados, registrou dose subconvulsiva de LDC administrada intravenosamente de 2 mg/kg, sendo que a dose de 8 mg/kg causou uma queda acentuada da PA e FC e alguns dos ratos tiveram convulsões. Após um estudo piloto de dosagem optamos pela dose de (4 mg/kg), que está de acordo com a dose máxima de lidocaína com ou sem vasoconstritor (4,4 mg/kg) recomendada para humanos pelo Conselho de Terapêutica Odontológica da Associação Americana de Odontologia (Malamed, 2001).

Os animais, mantidos em jejum de 12 horas, foram divididos em cinco grupos (n=10) que receberam, respectivamente:

- ◆ LDC_{LIVRE} - Solução de lidocaína 2%;
- ◆ LDC_{LUV} - Lidocaína lipossomal 2%;
- ◆ LDC_{VASO} - Solução comercial de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000
- ◆ LUV - Suspensão lipossomal
- ◆ Tampão - HEPES 20 mM com NaCl 0,9% (pH 7,4).

O protocolo foi iniciado com a injeção de 0,4 mL de NaCl 0,9%, temperatura ambiente, simulando a aplicação das amostras, o que serviu de controle para avaliação das condições hemodinâmicas dos animais; quando estas condições eram instáveis os animais eram descartados. Então, a amostra foi injetada (0,2 mL para todos os animais,

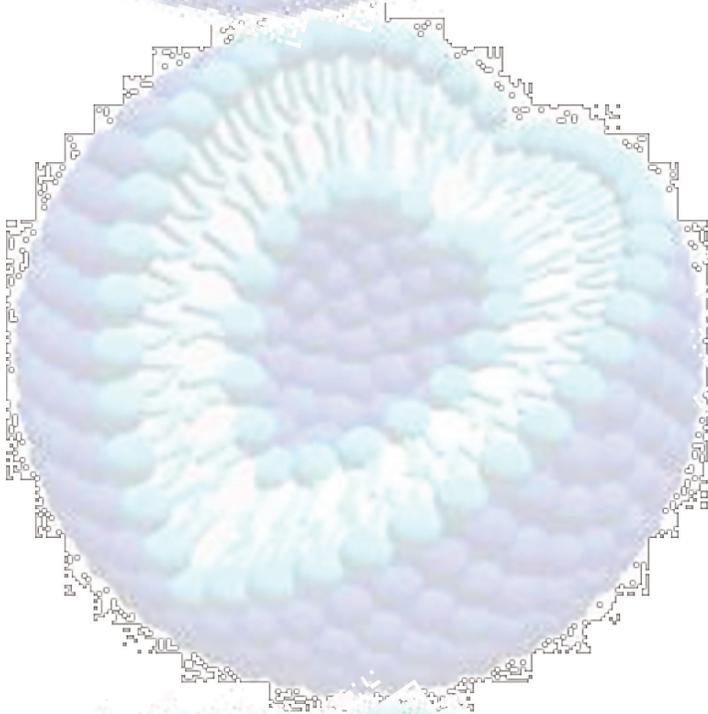
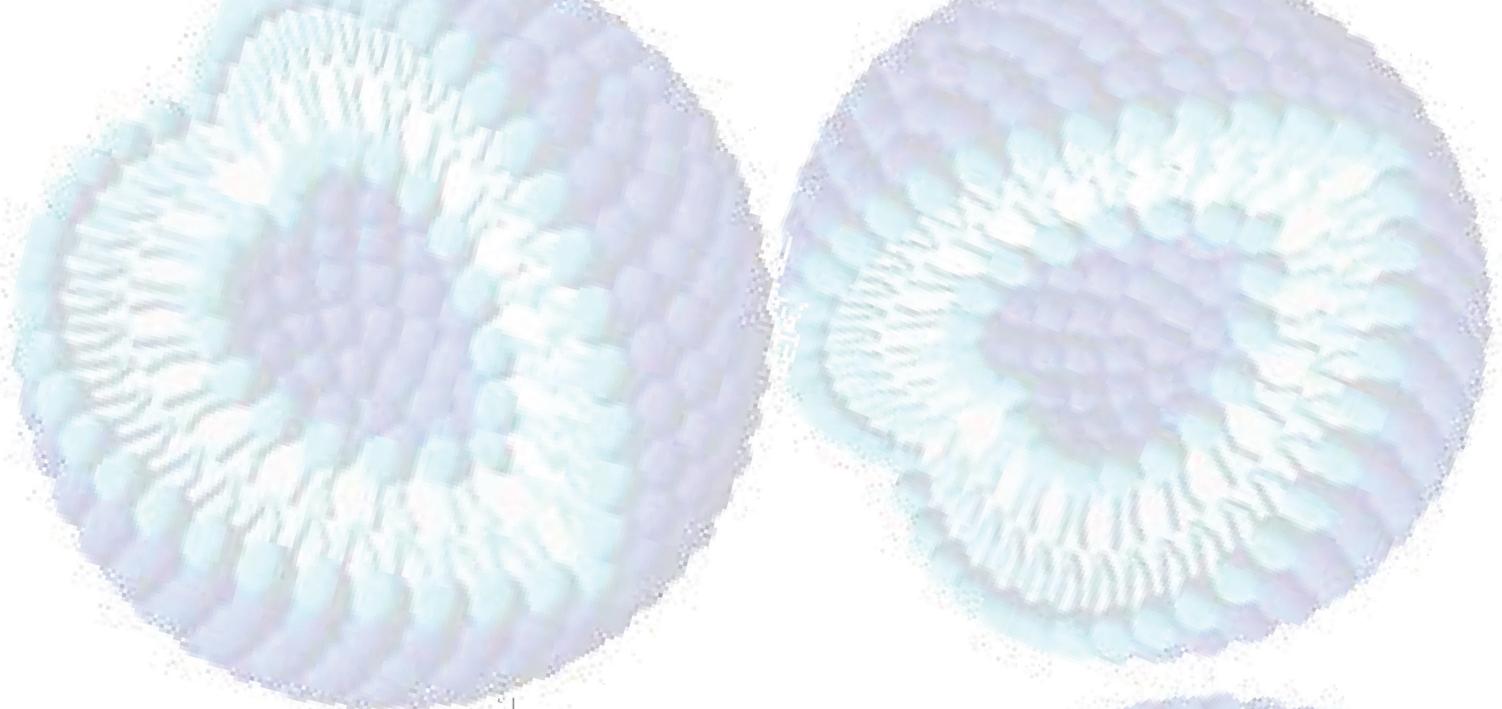
temperatura ambiente) em 5 segundos, seguindo-se a aplicação de 0,2 mL de NaCl 0,9% para lavagem de possíveis resíduos na cânula.

3.11 Análise estatística

Para a avaliação do bloqueio do nervo infraorbital (medidas de ASC e tempo de recuperação) os valores foram expressos em mediana (limites mínimo e máximo) e comparados utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Na avaliação da cardiotoxicidade os valores da pressão arterial média e frequência cardíaca (análise entre valores de tempo individuais) foram comparados por *ANOVA one - way (teste de Dunnet)* e para análise dos valores de tempo entre os grupos por *ANOVA one - way (teste de Tukey)*. Os dados foram apresentados como médias e erro padrão (EP) dos experimentos realizados.

Nos testes *in vitro* de cultura de células, os valores foram transformados em porcentagem e analisados também pelo teste de Kruskal-Wallis. Para avaliação de endoperóxidos os valores foram comparados por *ANOVA (teste de Tukey)*.

Os softwares utilizados foram: Graph Pad Instat e Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software Inc., versão 3.0, 1997 – 1998).



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO



4.1 Caracterização da formulação lipossomal

4.1.1 Tamanho

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das vesículas foram analisados por espalhamento de luz quase-elástico. As medidas foram realizadas a 25°C, com um ângulo de detecção de 90° em relação ao feixe de raio laser incidente, antes e após a incorporação da lidocaína. Dados de espalhamento revelaram uma única população de vesículas com $292,5 \pm 2,05$ nm e baixo índice de polidispersidade ($0,16 \pm 0,04$) antes da incorporação de lidocaína (Figura 13a e Tabela 3). Após encapsulação a polidispersividade de tamanho das vesículas aumentou ($0,75 \pm 0,07$), o diâmetro médio da população principal diminuiu para $227,0 \pm 2,35$ nm ($n=4$) e uma população de vesículas maiores, com mais de 1 μm foi detectada (Figura 13b; Tabela 3).

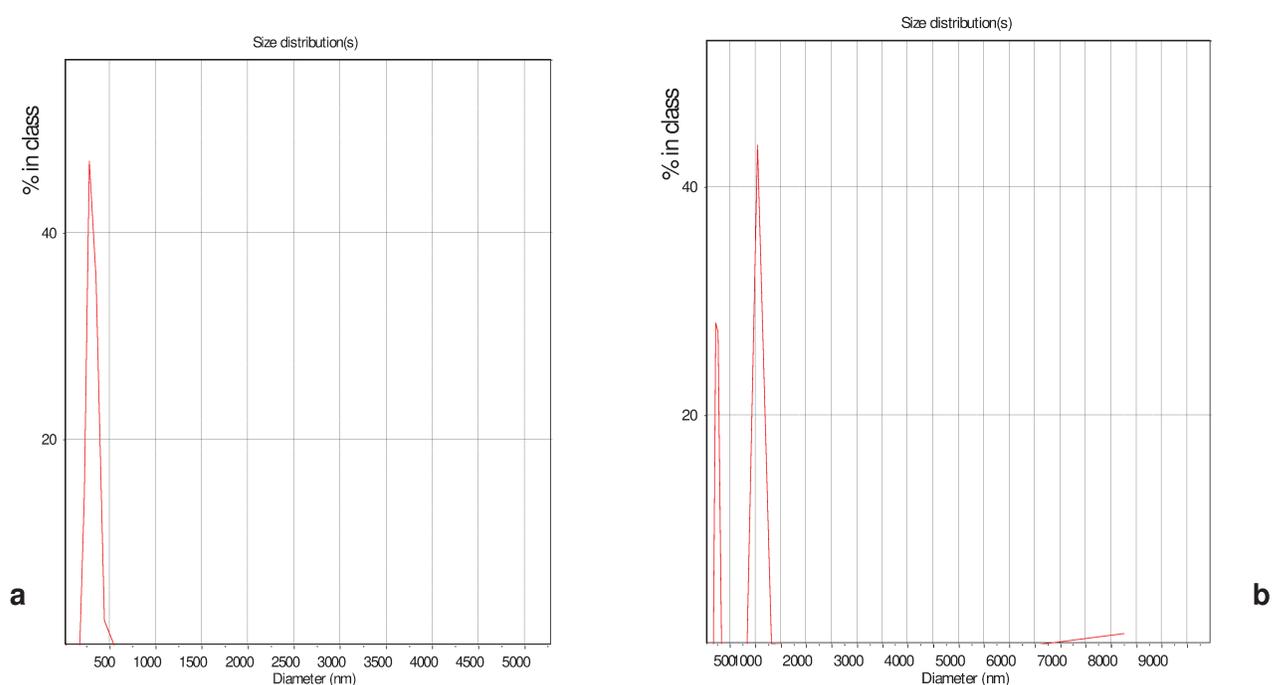


Figura 13 – Distribuição de tamanho dos lipossomas: sem LDC (a) e com LDC encapsulada (b), medidas por espalhamento de luz quase-elástico (light scattering).

Tabela 3 - Diâmetro médio das vesículas lipossomais (média ± EP) e índice de polidispersidade, antes e após a encapsulação do anestésico (n=4)

| Lipossomas | Diâmetro | Diâmetro | Diâmetro | Diâmetro | Diâmetro médio ± EP | Índice de Polidispersi- dade .± EP |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|--|
| | (nm) | (nm) | (nm) | (nm) | | |
| | amostra 1 | amostra 2 | amostra 3 | amostra 4 | | |
| LUV | 293 | 297 | 287 | 293 | 292,5 ± 2,05 | 0,16 ± 0,04 |
| | (100%)* | (100%)* | (100%)* | (99%)* | | |
| LDC _{LUV} | 222 | 233 | 229 | 225 | 227,0 ± 2,35 | 0,75 ± 0,07 |
| | (67%)* | (69%)* | (79%)* | (78%)* | | |
| | 1197 | 1038 | 1234 | 1352 | 1205 ± 65 | |
| | (33%)* | (31%)* | (30%)* | (22%)* | | |

Nota; * Os números entre parênteses indicam a percentagem da população de vesículas com este diâmetro.

A redução no tamanho dos lipossomas, observada após incorporação da lidocaína, embora pequena, está de acordo com os dados relatados por Müller *et al.* (2004), com lipossomas unilamelares pequenos compostos de lecitina de soja; naquele trabalho as vesículas contendo lidocaína encapsulada tiveram diâmetros médios menores (85-125 nm) do que os lipossomas livres de lidocaína (102-150 nm). Dentre as possíveis explicações para a redução no tamanho dos lipossomas acreditamos que modificações no grau de empacotamento dos lipídios (Israelachvili *et al.*, 1976) por interação da lidocaína com as moléculas lipídicas (Schütze e Muller-Goymann, 1998)

sejam determinantes. Dentre os anestésicos locais a LDC é considerada uma molécula volumosa, sendo a mais eficiente dentre 9 anestésicos análogos estudados, em reduzir a organização de lipossomas de lecitina de ovo medida pela técnica de Ressonância Paramagnética eletrônica (de Paula e Schreier, 1995). A LDC se insere entre os fosfolípidios da bicamada, em região próxima a da cabeça polar das moléculas de fosfatidilcolina (Fraceto *et al*, 2002; 2005), diminuindo o empacotamento lipídico e conferindo diâmetro menor aos lipossomas aqui estudados. Cabe lembrar que lipossomas a base de lecitina de soja hidrogenada tem alto grau de empacotamento molecular, devido à saturação de suas cadeias acila; nestes lipossomas a fluidização da membrana pela LDC é evidenciada, justificando a diminuição de tamanho da população principal dos lipossomas extrudados em poros de 400nm, bem como o aparecimento de uma segunda população de vesículas de maior tamanho, formadas por fusão daquelas (Yeagle, 2005; Ruozi *et al.*, 2005; Sabin *et al.*, 2007).

As alterações de tamanho descritas não descaracterizaram as vesículas (LUV) preparadas, tendo sido usadas nos testes subseqüentes.

4.1.2 Eficiência de encapsulação e coeficiente de partição

A porcentagem de lidocaína encapsulada foi determinada em suspensões lipossomais multilamelares preparadas na concentração de 4 mM (de lípidios totais) e o AL foi adicionado de maneira a atingir uma concentração final de 2 mM. A taxa de encapsulação da LDC dentro dos lipossomas e o coeficiente de partição (P), calculado a partir destes dados, em pH 7,4 foram $6,0 \pm 1,9\%$ e $23,5 \pm 7,9$ (média \pm DP), respectivamente. Estes resultados revelam a natureza hidrofílica da LDC, quando

comparada com outros anestésicos locais da família das amidas, com maiores coeficientes de partição (de Paula e Schreier, 1995). Além disso, em estudos prévios de nosso laboratório, a incorporação de AL dentro de vesículas de fosfatidilcolina de ovo e colesterol foi sempre maior: $24,8 \pm 4,2\%$ para bupivacaína, $23,8 \pm 3,5\%$ para ropivacaína e $18,4 \pm 3,9\%$ para mepivacaína (Araújo *et al.*, 2004; Araújo, 2005), $12,1 \pm 1,1\%$ para prilocaína (Cereda *et al.*, 2004) e $19,1 \pm 3,6\%$ para lidocaína (Cereda *et al.*, 2006) do que a aqui determinada em lipossomos à base de Epikuron.

A incorporação da LDC em lipossomas é mais baixa do que a de outros AL mais hidrofóbicos (como a bupivacaína e a ropivacaína), porém a baixa % de encapsulação da LDC em relação a lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (Cereda *et al.*, 2006) é certamente explicada pelo alto grau de empacotamento da lecitina de soja hidrogenada (temperatura de transição de fases, T_m , alta = 65°C) usada neste trabalho. Lipídios com alta T_m produzem lipossomas menos fluidos (Yeagle, 2005), diminuindo a incorporação de moléculas convidadas, como relatado para o dipropionato de beclometasona (Darwis e Kellaway, 2001).

É importante ressaltar que, embora a encapsulação de LDC dentro dos lipossomas seja baixa, o restante do anestésico (solubilizado no meio aquoso) não foi retirado da formulação, como de praxe nas formulações lipossomais preparadas em nosso grupo de pesquisa (Araújo *et al.*, 2004; Cereda *et al.* 2004, 2006) e diferentemente de outros trabalhos na literatura (Grant *et al.*, 2004). Mostraremos a seguir que mesmo este pequeno aumento na quantidade de lidocaína veiculada através da fase lipídica dos lipossomas é capaz de alterar a cinética de liberação do fármaco e induzir significativa melhoria na atividade nonciceptiva medida em animais.

4.2 Testes de esterilidade e pirogênicidade da formulação

Os testes microbiológicos em meio BHI confirmaram a esterilidade de todos os lotes de lidocaína lipossomal avaliados, pelo não crescimento de microorganismos, tanto em meio aeróbico quanto anaeróbico, por 2 semanas.

Os testes de pirogênio (*Endosafe® Limulus Amebocyte Lysate*) também confirmaram ausência de endotoxinas nas amostras da formulação lipossomal de lidocaína (dados não mostrados).

4.3 Teste de liberação *in vitro*

A cinética de liberação da LDC dos lipossomas é mostrada na Figura 14. A lidocaína lipossomal (LDC_{LUV}) mostrou uma diminuição na taxa de liberação através da membrana de diálise, se comparada com o controle de solução aquosa de lidocaína (LDC_{LIVRE}). Observou-se uma liberação sustentada a partir dos lipossomas tal que, no tempo em que a LDC_{LIVRE} atingiu o equilíbrio (142,3 min) somente 78% de LDC_{LUV} havia sido liberada do compartimento doador.

O perfil de liberação da lidocaína em solução e da lidocaína lipossomal foi modelado usando as equações mono (Equação 3) e biexponenciais (Equação 4) como descrito em material e métodos, item 3.7. A LDC_{LIVRE} apresentou melhor ajuste dos dados experimentais com o ajuste monoexponencial ($r=0,9997$), com constante de $0,0396 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$. Para a LDC_{LUV} a melhor adequação dos dados foi observada com o modelo biexponencial ($r=0,9998$); as constantes da inicial fase (k_1) e da fase sustentada (k_2) foram $0,052 \pm 0,015 \text{ min}^{-1}$ e $0,0253 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. A

partir destas constantes, o tempo de equilíbrio de liberação foi calculado em 142,3 min e 225,9 min, para as formulações de lidocaína livre e lidocaína lipossomal, respectivamente.

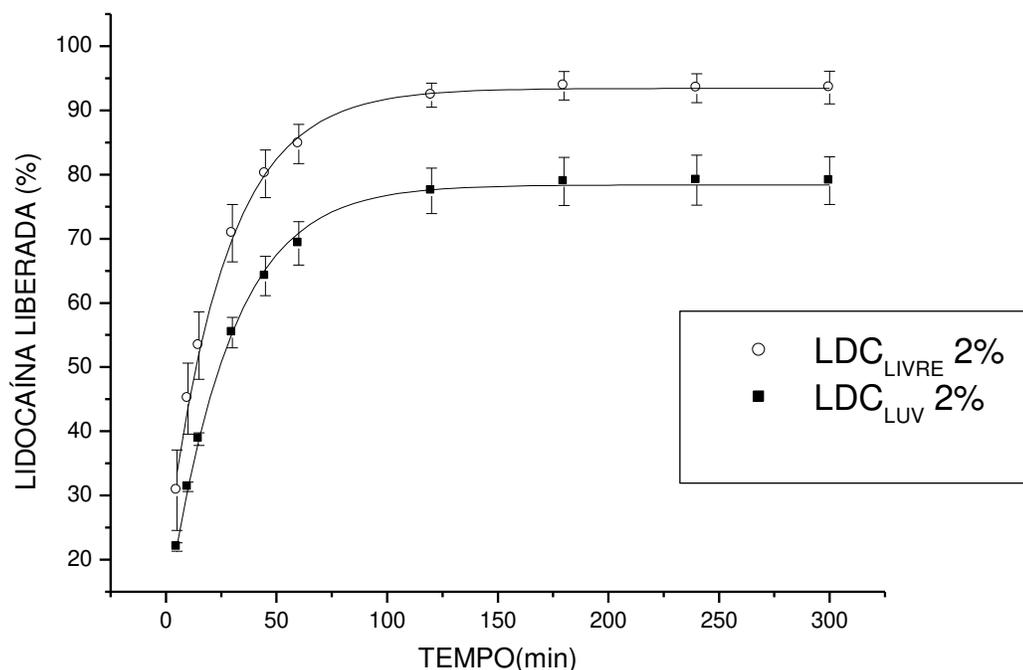


Figura 14 - Perfis da cinética de liberação (média \pm EP) das formulações de lidocaína livre e lipossomal, em pH 7,4 e 25 °C (n = 4).

As fases inicial e sustentada da LDC_{LUV} refletem a cinética de liberação de ambas as populações de lidocaína (livre e encapsulada) nesta preparação. A presença de lipossomas prolongou a liberação da LDC, principalmente por causa da fase sustentada, o que é indicativo: 1) de encapsulação da LDC dentro dos lipossomas e 2) que a LDC encapsulada no lipossoma pode possibilitar aumento da duração do efeito anestésico da lidocaína, devido ao tempo de permanência prolongado da droga no local de injeção (Mashimo *et al.*, 1992).

4.4 Estabilidade físico-química da formulação lipossomal

Em estudos prévios, realizados em nosso laboratório, avaliamos a estabilidade de uma formulação lipossomal de anestésicos locais esterilizada por radiações ionizantes (Araújo, 2005); a dose de radiação utilizada foi de até 3,5 Mrad, que, embora de acordo com dados da literatura (Boogaerts *et al.*, 1994), alterou a estabilidade do sistema lipossomal proposto, levando a peroxidação lipídica. Em trabalhos posteriores adotamos o método de esterilização por calor úmido e não encontramos diferença significativa entre as formulações lipossomais de prilocaína preparadas com lecitina de ovo não esterilizadas e esterilizadas, por um período de até 30 dias após o preparo (Cereda, 2007). Em vista do exposto e considerando ainda a menor propensão da lecitina de soja hidrogenada a oxidação, o método de esterilização por calor úmido foi escolhido para uso neste trabalho.

4.4.1 Estabilidade química dos componentes lipídicos

Durante a estocagem mudanças físicas e químicas nas suspensões de lipossomas podem ocorrer, levando a alterações nas vesículas, degradação química e vazamento da droga encapsulada (Darwis e Kellaway, 2001; Chunlei *et al.*, 2004). Por estas razões testes de peroxidação lipídica foram feitos nas formulações de lidocaína lipossomal esterilizadas e não esterilizadas, armazenadas a 4°C e a 25°C ao abrigo da luz.

A estabilidade química dos lipossomas foi avaliada pela detecção de endoperóxidos pela reação de produtos de oxidação lipídica em altas temperaturas, com ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito em métodos.

Os resultados obtidos pela reação com o TBA mostraram que a estabilidade química dos lipídios que não foram esterilizados por calor úmido e permaneceram a 4 °C e ao abrigo da luz foi mantida por até 8 meses. Entretanto, quando a formulação foi esterilizada os níveis de endoperóxido mantiveram-se baixos e iguais aos dos lipossomas não esterilizados somente até o 1º mês após o preparo ($p < 0,05$). De qualquer maneira, os níveis de peróxido mensurados durante 10 meses de armazenamento a 4 °C nunca atingiram 2 nM, considerado como limite máximo tolerável nas formulações, de acordo com Boogaerts *et al.* (1994).

Concluimos que o método de esterilização por calor úmido não é adequado para estocagem de longa duração desta formulação, pois houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras esterilizadas e não esterilizadas a partir do segundo mês de estocagem a 4 °C, (Figura 15).

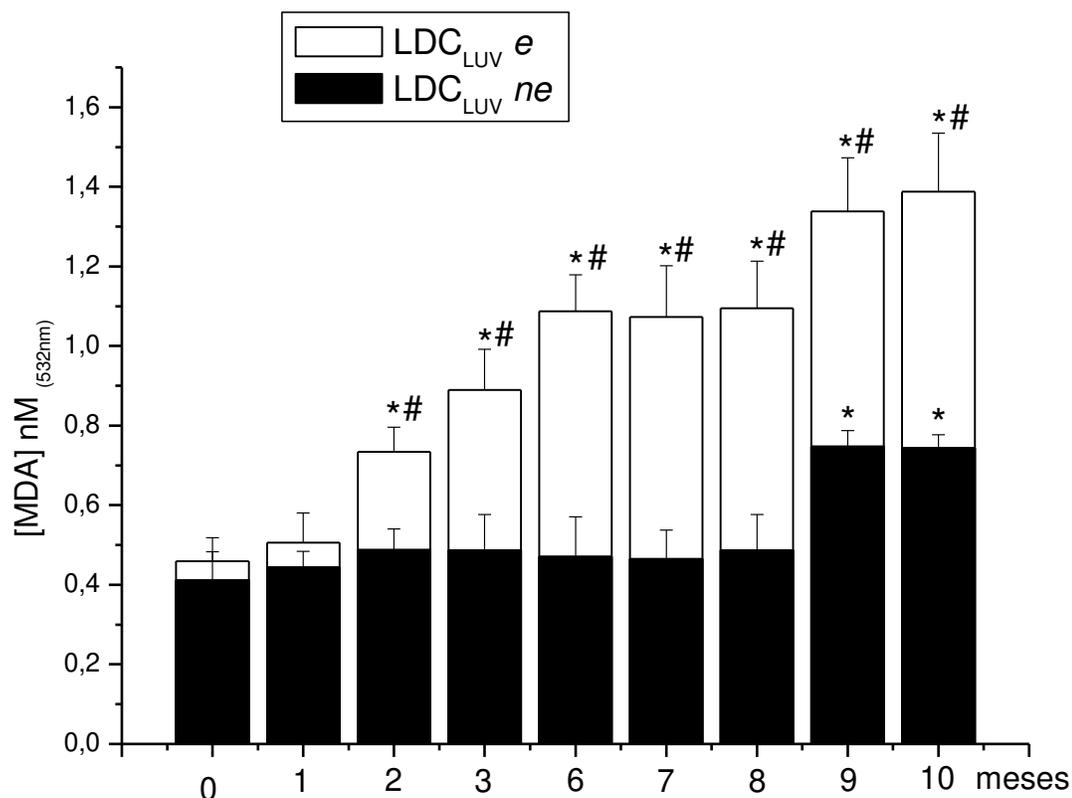


Figura 15 - Concentração de MDA (nM) em lipossomas com lidocaína encapsulada (5mM), esterilizados (LDC_{LUV} e) e não esterilizados (LDC_{LUV} ne), armazenados a 4 °C e protegidos da luz (n=3-4). * # $p < 0,05$ (ANOVA/ Tukey – Kramer).

Estas formulações também foram armazenadas a 25 °C e os lipídios permaneceram quimicamente estáveis por 2 meses ($p < 0,05$) em relação ao controle, tanto para as formulações não esterilizadas quanto para as esterilizadas (Figura 16). Nesta temperatura não houve diferença significativa entre as amostras esterilizadas e não esterilizadas, até 7 meses de armazenamento.

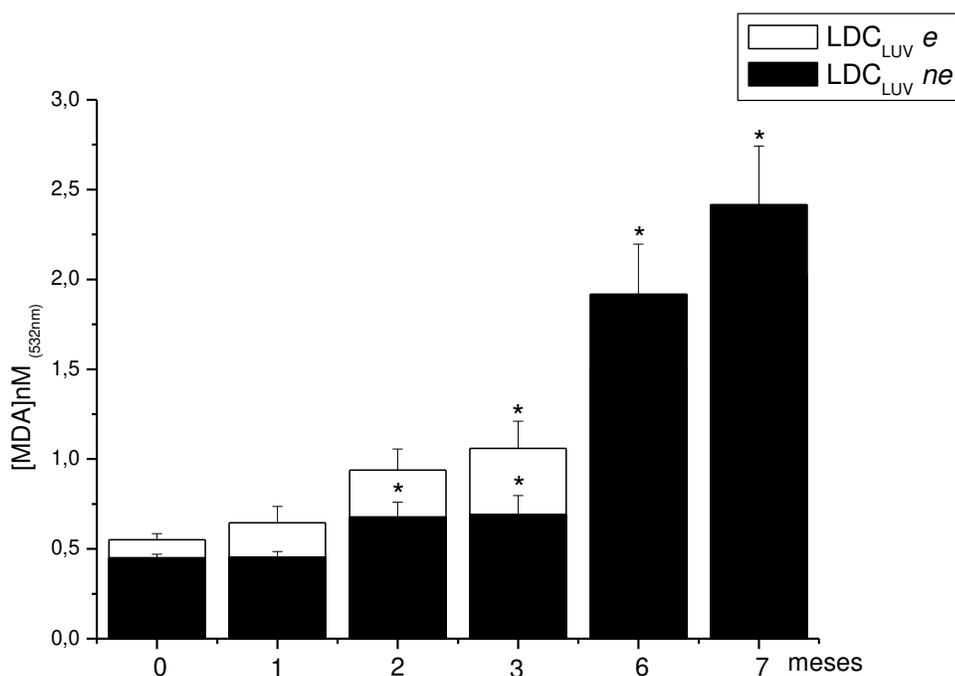


Figura 16 - Concentração de MDA nM em lipossomas com lidocaína encapsulada (LDC_{LUV} 5mM), esterilizados e não esterilizados, armazenados a 25 °C e protegidos da luz (n=4-5). * $p < 0,05$ (ANOVA/ Tukey – Kramer).

Quando comparamos separadamente as amostras *não esterilizadas* armazenadas em temperaturas diferentes, notamos que não houve diferença significativa entre elas até 3 meses de estocagem, $p > 0,05$ (Figura 17). Entretanto, após 6 meses as amostras mantidas a 25 °C apresentaram um grau de peroxidação lipídica 4 vezes maior do que as mantidas a 4 °C.

Igualmente, quando comparamos as amostras *esterilizadas* e armazenadas em temperaturas diferentes, não houve diferença entre elas até 6 meses de estocagem. Contudo, as amostras mantidas a 25 °C apresentaram um grau de peroxidação lipídica 2 vezes maior do que as mantidas a 4 °C, após 7 meses de estocagem (Figura 18). Desta forma, podemos concluir que a melhor temperatura para armazenagem da formulação de lidocaína lipossomal é a 4 °C.

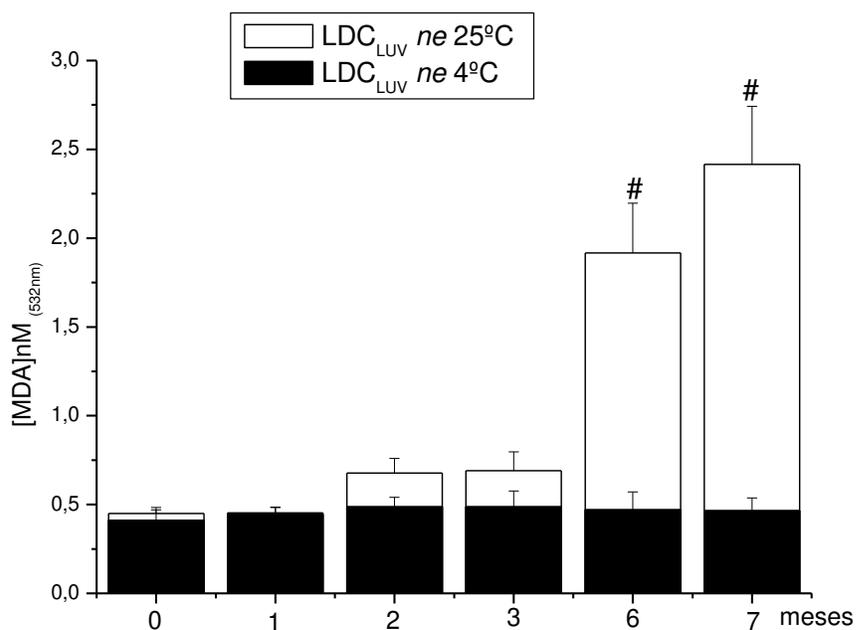


Figura 17 - Concentração de MDA (nM) em lipossomas com lidocaína encapsulada (5mM) armazenados a 4 e 25 °C, não esterilizados e protegidos da luz (n=3-4). # $p < 0,05$ (ANOVA/ Tukey – Kramer)

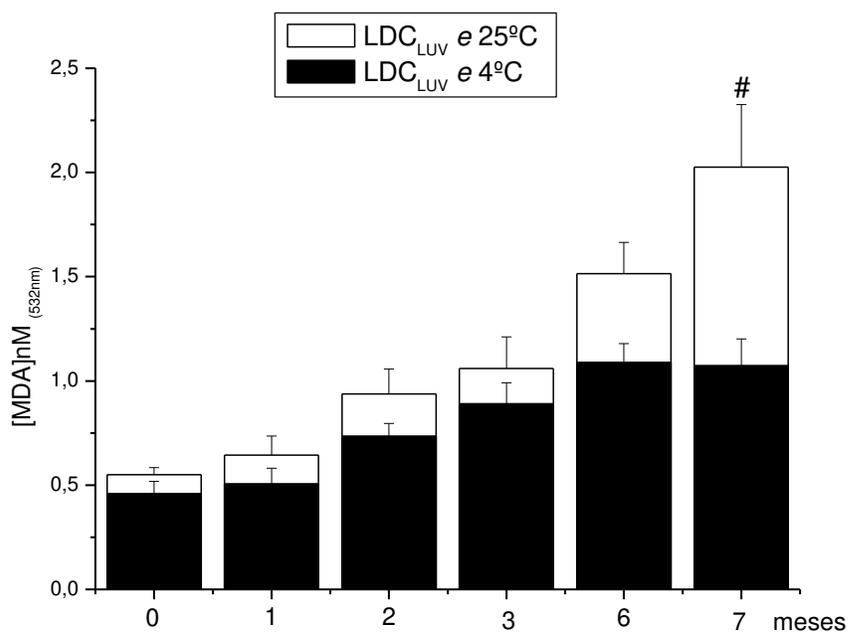


Figura 18 - Concentração de MDA (nM) em lipossomas com lidocaína encapsulada (5mM) armazenados a 4° e 25 °C, esterilizados e protegidos da luz (n=3-4). # $p < 0,05$ (ANOVA/ Tukey – Kramer)

4.4.2 Estabilidade física da formulação lipossomal

O diâmetro médio dos lipossomas sem e com lidocaína encapsulada, imediatamente após a preparação, foi mensurado, levando-se em consideração o processo de esterilização (Tabela 4). Os dados de espalhamento de luz revelaram que após o processo de esterilização por calor úmido, tanto as vesículas livres quanto as vesículas com lidocaína encapsulada aumentaram ligeiramente de tamanho, mas este aumento não foi significativo ($p > 0,05$) mantendo-se a estabilidade física da formulação lipossomal.

Como as preparações de lipossomas podem estar sujeitas a uma série de efeitos adversos tais como agregação, fusão e hidrólise fosfolipídica, que levam a diminuição do tempo de estocagem (Chunlei *et al.*, 2004), o tamanho médio dos lipossomas foi acompanhado ao longo do tempo, observando-se a porcentagem da população principal que apresentou tamanho entre 200 a 400 nm. De acordo com a Figura 19, o tamanho dos lipossomas das formulações lipossomais sem LDC, não esterilizadas (LUV *ne*) e esterilizadas (LUV *e*) foi estável e comparável, durante 8 meses de estocagem a 4°C e ao abrigo da luz.

Tabela 4 - Diâmetro médio da população principal das vesículas (n = 4), antes e após o processo de esterilização das formulações lipossomais sem LDC e com LDC encapsulada.

| Lipossomas | | Diâmetro | Diâmetro | Diâmetro | Diâmetro | Média ± EP |
|--------------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| | | [nm] | [nm] | [nm] | [nm] | |
| | | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Amostra 4 | |
| LUV | Antes da esterilizaçã o | 293 (100 %) | 297 (100 %) | 287 (100 %) | 293 (99 %) | 292,5±2,05 |
| | Após esterilizaçã o | 307 (100 %) | 297 (100 %) | 310 (100 %) | 298 (100 %) | 303,0±3,24 |
| LDC _{LUV} | Antes da esterilizaçã o | 222 (68 %) | 233 (69 %) | 229 (79 %) | 225 (78 %) | 227,0±2,35 |
| | Após esterilizaçã o | 227 (80 %) | 234 (69 %) | 231 (81 %) | 227 (67 %) | 229,7±1,70 |

Nota: Os números entre parênteses indicam a porcentagem de vesículas da população principal.

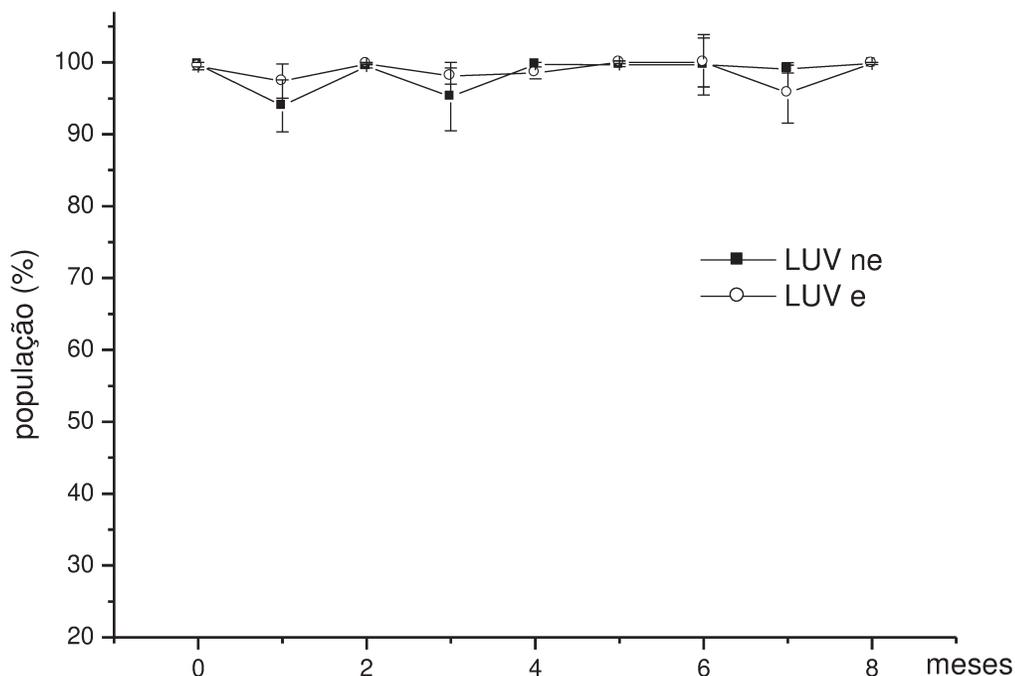


Figura 19 - Distribuição de tamanho (%) da população principal de lipossomas não esterilizados (LUV *ne*) e esterilizados (LUV *e*) (média \pm EP), mantidos a 4°C

Como mostrado anteriormente (Tabela 3) a presença de LDC nas formulações lipossomais causa maior polidispersidade de tamanho e diminui a porcentagem de lipossomas na população principal, com tamanho de cerca de 230 nm. Por este motivo, a porcentagem da população principal da formulação de lidocaína lipossomal foi 25% menor do que a da formulação lipossomal sem lidocaína (Figura 20); porém após 8 meses de armazenamento, as formulações de LDC_{LUV *ne*} e LDC_{LUV *e*} permaneceram estáveis quanto à distribuição de tamanho e diâmetro médio (Figura 20). Para ambas as formulações a pequena diminuição na porcentagem de vesículas da população principal foi acompanhada por um aumento gradativo na proporção de vesículas com tamanhos

maiores (acima de 400 nm), provavelmente devido à maior agregação e fusão dos lipossomas (Cabral *et al.*, 2003; Ruozi *et al.*, 2005; Sabin *et al.*, 2007), em função do tempo.

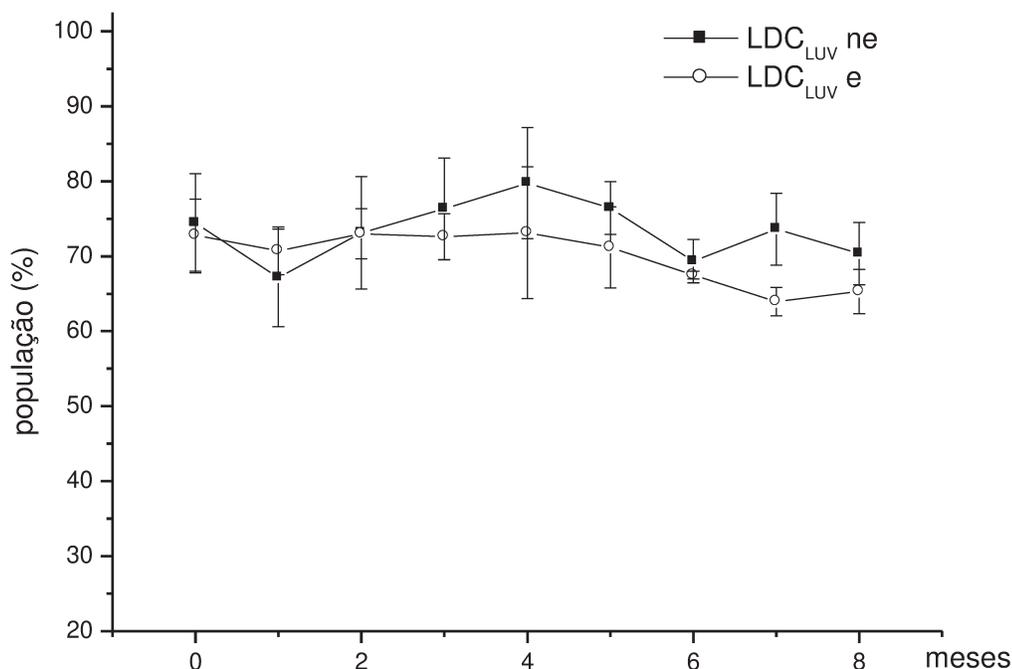


Figura 20 - Distribuição de tamanho (%) da população principal de LDC_{LUV} ne e LDC_{LUV} e (n=4), mantidas a 4°C (média ± EP).

Para controle da estabilidade das amostras, as formulações de lidocaína lipossomal foram estocadas a temperatura ambiente (25°C) e a 4°C protegidas da luz.

Os lipossomas mostraram a mesma estabilidade, tanto a 4°C quanto na temperatura ambiente, por até 6 meses após o preparo. Depois disso, apresentaram uma queda na porcentagem de vesículas da população principal acompanhada por um

aumentando na proporção de vesículas com tamanhos maiores. Esta queda foi mais acentuada para a formulação estocada a 25°C (Figura 21), indicando mais uma vez que a armazenagem a 4°C é a mais adequada para a formulação.

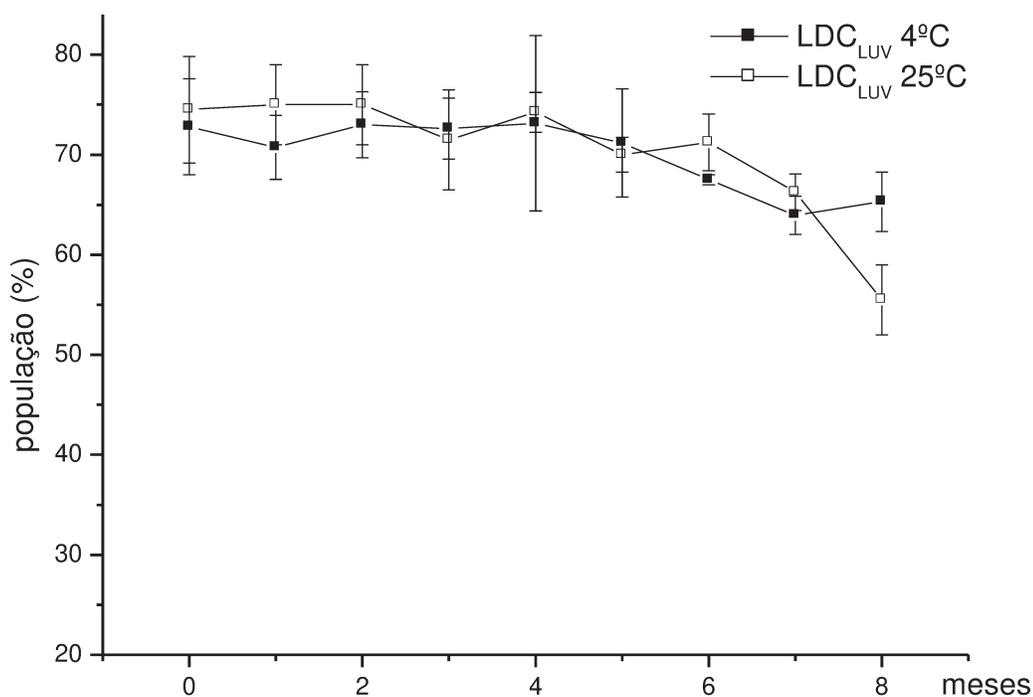


Figura 21 - Distribuição de tamanho (%) da população principal de LDC_{LUV} e (n=4), mantidas a 4° e 25°C (média ± EP).

Avaliando-se conjuntamente os resultados de estabilidade química e física, concluímos que os lipossomas preparados apresentam um “tempo de prateleira” limitado, mas suficiente para escala industrial, mormente considerando-se que os mesmos podem ser armazenados na forma de material particulado (preparado por spray-dryer), e os lipossomas serem preparados sob demanda, contando-se a partir daí seu tempo de armazenamento.

4.5 Avaliação da citotoxicidade (ensaios em cultura de células)

A avaliação do efeito tóxico do veículo (LUV), do anestésico livre (LDC), encapsulado em lipossomas (LDC_{LUV}) e livre com vasoconstritor (LDC_{VASO}) foi realizada através do ensaio de viabilidade celular, por redução do corante MTT sobre culturas de células não metabolizantes (fibroblastos de camundongos, da linhagem 3T3).

A Figura 22 mostra os resultados de um teste de citotoxicidade com lidocaína em solução. Foram escolhidas as concentrações de 0,7; 3,5 e 7 mM de LDC para os experimentos, pois nessas concentrações detectamos variação significativa da % de células viáveis (de 100 a 0%) nas condições de ensaio padronizadas, tal que concentrações clínicas de LDC (37 e 74 mM) causariam morte de 100% das células, impedindo a comparação da citotoxicidade das diferentes formulações. As concentrações testadas para as formulações LDC_{LUV} e LDC_{VASO} foram as mesmas utilizadas com o anestésico livre.

De uma forma geral, o tratamento das células com LDC em solução, encapsulada ou com vasoconstritor diminuiu a porcentagem de células viáveis de maneira dose-dependente em relação ao controle (tratado apenas com o corante MTT). Os lipossomas (LUV, 5 mM) não apresentaram efeitos citotóxicos na concentração testada, com 100% de células viáveis após tratamento (Figura 23).

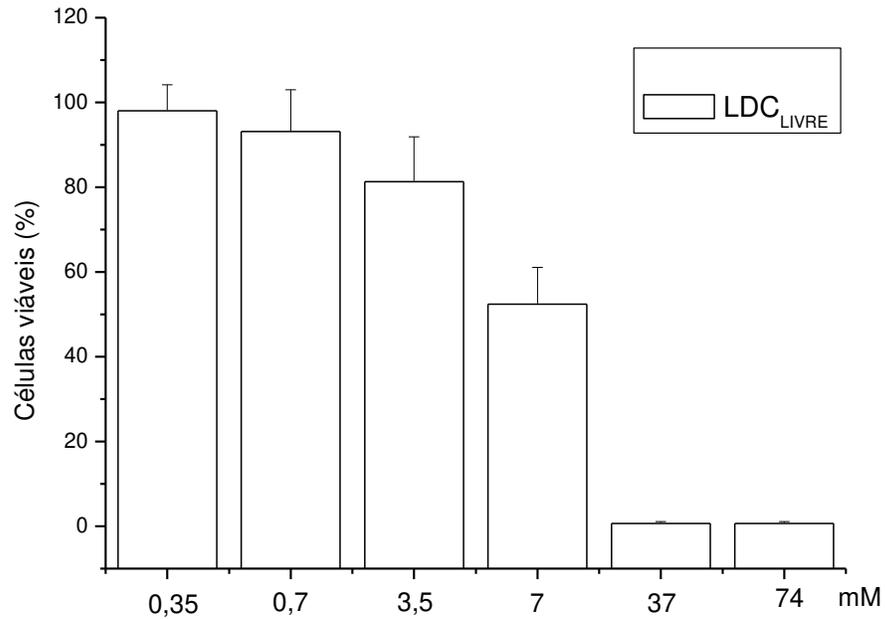


Figura 22 - Efeitos citotóxicos da LDC em solução sobre células 3T3, avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (médias \pm DP, n= 3 experimentos).

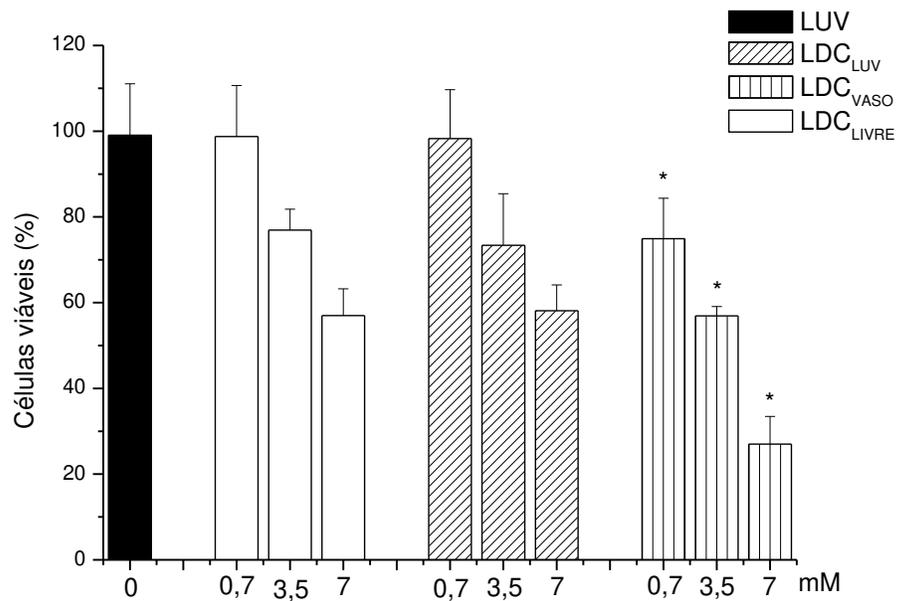


Figura 23 - Efeitos citotóxicos da LDC_{LIVRE}, LDC_{LUV} e LDC_{VASO} (0,7, 3,5 e 7mM) sobre células 3T3, avaliados pelo teste de redução do corante MTT. Células incubadas por 2 h a 37 °C e atm de 5% CO₂. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT (médias \pm DP, n= 3 experimentos). * p < 0,001 (ANOVA)

O tratamento com LDC induziu efeitos tóxicos em células 3T3 nas concentrações de 3,5 e 7 mM (77 e 57% de células viáveis). A encapsulação de LDC nos lipossomas teve efeito similar (74 e 58%), isto é, não alterou de forma significativa a toxicidade do anestésico, em relação à droga livre, em todas as concentrações ($p > 0,05$) (Figura 23). Embora este resultado possa ser associado ao fato da quantidade de anestésico local encapsulado ser relativamente baixa (6%) permanecendo grande quantidade de AL livre na formulação, evidencia também que a LDC é de fato liberada dos lipossomas, atingindo a célula-alvo, *in vitro*. No entanto, comparando-se a citotoxicidade induzida por LDC_{VASO} nas concentrações de 0,7, 3,5 e 7 mM, com os dados do AL livre e encapsulado, nas mesmas concentrações, observou-se maior toxicidade da LDC_{VASO}, com 75, 56 e 27% de células viáveis, respectivamente.

As soluções de anestésicos locais com vasoconstritor disponíveis comercialmente contêm também um antioxidante, para garantir a estabilidade química da amina simpatomimética. O bissulfito de sódio é o antioxidante mais comum, pois prolonga o tempo de prateleira destas soluções, além de tornar a preparação anestésica consideravelmente mais ácida. Segundo Holroyd e Watts (1963) a ação prolongada do agente vasoconstritor fenilefrina, que tem ação quase que exclusiva sobre receptores adrenérgicos do tipo alfa, contribui para aumentar a irritabilidade dos tecidos, seja pelo efeito intrínscico do vasoconstritor (aumento do consumo de oxigênio nos tecidos como resultado do metabolismo celular acelerado) seja pelo aumento na acidez tecidual local, com sérias implicações no processo de reparo alveolar em ratos (Klingeström e Westermarck, 1964; Okamoto *et al.*, 1994). Além disso, existem vários estudos em animais alertando que a epinefrina pode potencializar injúrias neuroaxiais induzidas por AL, provavelmente devido à redução do clearance e a uma exposição

prolongada aos anestésicos locais promovida pela isquemia induzida pela epinefrina (Yagiela, 1982; Neal, 2003).

Os efeitos de LDC 2% livre e em combinação com vários agentes foram examinados no músculo esquelético de ratos. A inclusão de epinefrina na solução de lidocaína aumentou marcadamente a quantidade de tecido destruído. Em concentrações mais elevadas ampliou a zona de destruição mais profunda no interior da fibra muscular e alterou qualitativamente o padrão do dano, confirmando relatos de que a combinação de lidocaína e epinefrina é mais danosa para o músculo esquelético do que lidocaína sozinha (Yagiela *et al.*, 1982; Foster e Carlson, 1988).

4.6 Experimentos *in vivo*

4.6.1 Bloqueio do nervo infraorbital

A formulação lipossomal usada como controle não apresentou nenhum efeito no bloqueio do NIO (dados não mostrados). A eficácia do bloqueio do nervo infraorbital em ratos foi avaliada pelo tempo de recuperação da função sensorial e pelo efeito total do anestésico local (Tabela 5), medido como a área sob a curva, ASC em gráficos como o da Figura 24.

O tratamento com as formulações de lidocaína lipossomal a 2, 2,5 e 3% e com lidocaína 2% com vasoconstritor (epinefrina) provocou aumento significativo no tempo de recuperação da função sensorial e no efeito total (ASC) em todos os animais tratados, em comparação com aqueles que receberam lidocaína livre (Tabela 5) em concentrações equivalentes ($p < 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). O

prolongamento da anestesia para as formulações lipossomais foi dose-dependente e pode ser explicado pelo maior tempo de permanência da formulação lipossomal no sítio de injeção (Figura 24).

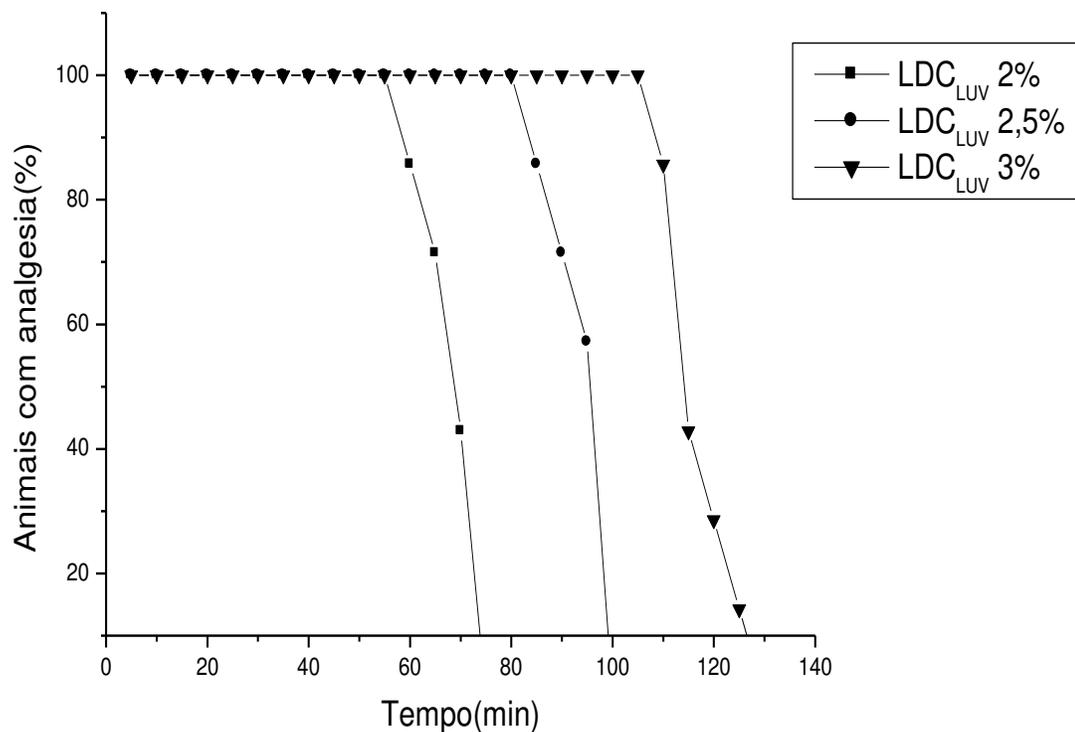


Figura 24 - Tempo de recuperação da analgesia (min) no nervo infraorbital induzido pelas formulações lipossomais em função da concentração de lidocaína.

Tabela 5 - Tempo de recuperação e efeito total do bloqueio sensorial (área sob a curva, ASC) induzido pelas formulações de LDC em solução, lipossomal e com vasoconstritor, durante o bloqueio do nervo infraorbital, em ratos. Dados expressos em mediana (mínimo-máximo) (n = 7)

| Grupos | Concentração (%) | Tempo de recuperação (min) | ASC (escore/h) |
|----------------------------|------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| LDC_{LIVRE} | 2 | 45 (40-55) | 37,5 (32,5-47,5) |
| | 2,5 | 70 (60-70) | 62,5 (52,5-62,5) |
| | 3 | 70 (65-85) | 62,5 (57,5-77,5) |
| LDC_{LUV} | 2 | 70 (60-75) a * | 62,5 (52,5-62,5) a * |
| | 2,5 | 95 (85-100) a * | 87,5 (77,5-92,5) a * |
| | 3 | 115 (110-130) a ** | 107,5 (102,5-122,5) a ** |
| LDC_{VASO} | 2 | 130 (125-130) b ***, c * | 122,5 (117,5-122,5) b ***, c * |

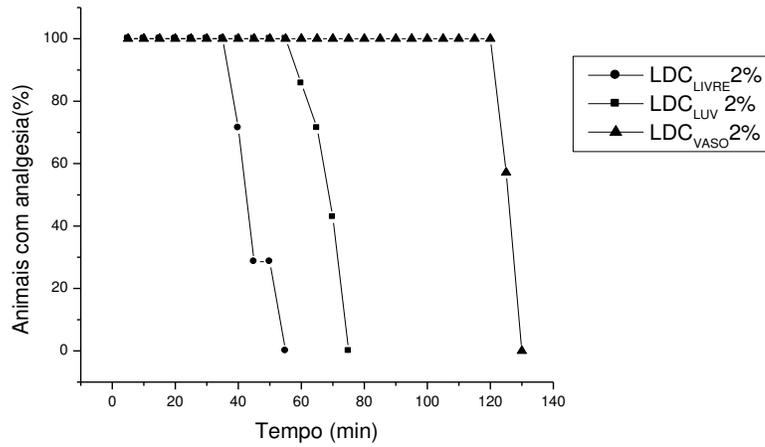
Nota: Análises estatísticas para uma dada concentração de lidocaína: a LDC_{LIVRE} vs. LDC_{LUV} – p<0,05 (*) e p<0,01 (); b LDC_{LIVRE} vs. LDC_{VASO} – p<0,001 (**); c LDC_{LUV} vs. LDC_{VASO} – p< 0,05 (*). Kruskal-Wallis Test**

A LDC está disponível comercialmente para uso odontológico na concentração de 2%, associada ou não ao vasoconstritor. A Tabela 5 e a Figura 25 mostram que a duração do bloqueio do nervo após o tratamento com a lidocaína lipossomal (2%, 2,5%, 3%) foi significativamente mais longa que o bloqueio produzido pela lidocaína livre em solução, nas mesmas concentrações. O tratamento com LDC_{LUV} 2% prolongou a anestesia de 45 para 70 min após a injeção, em relação à LDC_{LIVRE} (p<0, 05) (Tabela 5) ou, em outras palavras, a LDC_{LUV} 2% produziu um aumento de 55% no tempo de duração do bloqueio do nervo infraorbital em comparação ao uso da LDC_{LIVRE} 2%. Em

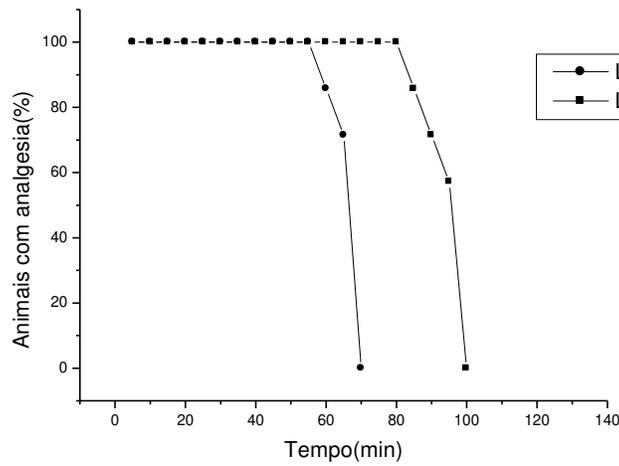
termos da área sob a curva o aumento foi de 67%, mostrando ser a formulação de grande interesse para o bloqueio nervoso. Este resultado está de acordo com resultados prévios da literatura que relatam analgesia prolongada em animais tratados com lipossomas de fosfatidilcolina de ovo contendo lidocaína (Mashimo *et al.*, 1992, Cereda *et al.*, 2006), bupivacaína (Malinovsky *et al.*, 1999), prilocaína (Cereda *et al.*, 2004), mepivacaína (Araújo *et al.*, 2004) e ainda para lidocaína em lipossomas de fosfatidilcolina de soja com diacilglicerol (Dyhre *et al.*, 2001).

Notamos ainda que a LDC_{LUV} 2%, quando comparada à LDC_{LIVRE} 3%, promoveu um tempo de duração do bloqueio do nervo infraorbital equivalente. Com esse resultado pôde-se observar que a encapsulação da LDC em lipossomas proporcionou o mesmo efeito anestésico com uma concentração menor de LDC. Este fato é de extrema importância clínica, uma vez que a possibilidade de se obter o mesmo efeito com uma menor dose, traz maior segurança ao procedimento anestésico.

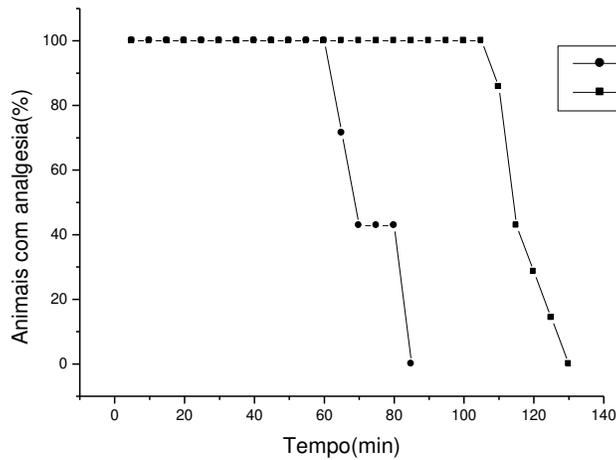
O efeito da associação de epinefrina com anestésicos locais avaliado pelo teste de bloqueio do nervo infra-orbital em ratos já foi relatado por Fink *et al.* (1975). Estes autores encontraram um aumento de 80% no bloqueio induzido pela lidocaína a 1% associada à epinefrina 1:200.000. Os resultados da Tabela 5 revelam que a lidocaína 2% associada à epinefrina 1:100.000 aumentou em 188-227% o bloqueio (tempo de recuperação e ASC, respectivamente), em comparação a LDC_{LIVRE} ($p < 0,001$). Os resultados da Tabela 5 mostram ainda que, para LDC 2%, a associação com vasoconstritor mostrou-se mais efetiva no aumento do efeito anestésico do que a encapsulação em lipossomas.



A



B



C

Figura 25 - Porcentagem de animais com analgesia x tempo no bloqueio do nervo infraorbital induzido pelas formulações de LDC livre, lipossomal e com vasoconstritor: 2 % (A), 2,5 % (B) e 3 % (C) (n=7-8 animais/grupo).

A lidocaína possui atividade vasodilatadora acentuada, em relação aos demais anestésicos de igual potência (Strichartz e Ritchie, 1987; Collins, 1993). Acreditamos que a atividade vasodilatadora intrínseca da lidocaína, ao favorecer seu clearance, contrabalanceie o efeito de liberação prolongada dos lipossomas, levando a uma menor quantidade de moléculas disponíveis para o bloqueio neural, explicando assim porque o efeito antinociceptivo da LDC_{LUV} não superou o da LDC_{VASO} na concentração de 2%.

Além disso, a baixa porcentagem de encapsulação da lidocaína nos lipossomas de lecitina de soja aqui apresentados também explica o efeito mais discreto das formulações LDC_{LUV} em comparação com a LDC_{VASO}. Porém, a atividade vasodilatadora da lidocaína parece ser o fator determinante no menor efeito anestésico da LDC já que, em comparação com outros anestésicos locais amino-amidas de potência similar (mepivacaína e prilocaína) encapsulados em lipossomas de fosfatidilcolina de ovo na concentração de 2%, a lidocaína foi o AL que menos se beneficiou da encapsulação em lipossomas (apresentou menor aumento do tempo de anestesia no bloqueio do nervo infraorbital), apesar de sua eficiência de encapsulação ser a maior dos três análogos (Cereda *et al.*, 2006).

Gissen e colaboradores compararam o bloqueio induzido por LDC e mepivacaína em modelos *in vitro* e *in vivo*, tendo encontrado uma correlação direta entre a partição destes AL nas membranas neuronais e sua potência anestésica, com o nervo isolado (Gissen *et al.*, 1980). No entanto, ambos AL tiveram efeito equivalente no bloqueio *in vivo* o que, segundo aqueles autores, deve-se a absorção vascular mais rápida da LDC, explicada por sua ação vasodilatadora (Gissen *et al.*, 1982).

Por fim, analisando uma vez mais os dados da Tabela 5 vemos que a formulação lipossomal na dose de 3% induz aumento significativo (de 155% e 187% no tempo de

duração e ASC, respectivamente, em relação à LDC_{LIVRE} 2%) i.e., bem próximo ao aumento observado com a LDC_{VASO}. Estes dados indicavam que a formulação lipossomal a 3% poderia ser uma alternativa interessante ao uso da LDC_{VASO}. Contudo, os animais apresentaram uma resposta aversiva mais acentuada (vocalização) durante a aplicação dessa formulação e posterior edema no local da aplicação. Os AL podem causar injúrias no músculo estriado e neuronal no sítio de injeção. Com relação à neurotoxicidade (central) “sintomas neurológicos transientes” e “síndrome da cauda eqüina” tem sido amplamente reconhecidos. Entretanto, a relevância clínica da miotoxicidade induzida pelos AL é ainda controversamente discutida (Zink e Graf, 1980).

De acordo com Kasaba *et al.* (2003) a lidocaína carrega um maior risco de dano nervoso após anestesia espinal em culturas de neurônios do que outros anestésicos: procaína, mepivacaína, ropivacaína e bupivacaína. Radwan *et al.* (2002) encontraram uma neurotoxicidade relativa similar a destes autores. Em um estudo *in vivo* Sakura *et al.*, (2005) demonstraram que a LDC foi mais neurotóxica do que a bupivacaína quando ambas foram administradas intratecalmente como soluções equipotentes, em doses maiores do que as usadas clinicamente, em um modelo de ratos. Injeções intramusculares de anestésicos locais regularmente resultam em danos e mionecrose no músculo estriado (Yagiela *et al.*, 1982; Foster e Carlson, 1988), com uma taxa de toxicidade droga-específica e dose-dependente (Zink *et al.*, 2005). Em vista do exposto, o aumento de 50% na dose de lidocaína precisa ser avaliado, do ponto de vista da toxicidade local e sistêmica, antes que se possa concluir pelo uso da mesma.

4.6.2 Toxicidade cardiovascular dos anestésicos locais

A toxicidade sistêmica dos agentes anestésicos locais primariamente resulta de injeção intravascular acidental e é caracterizada pela excitação do sistema nervoso central e atividade convulsionante (Horlocker e Wedel, 2002). Claramente, a situação clínica que causa com maior frequência estas respostas indesejadas é quando uma grande e rápida dose intravascular de AL é injetada inadvertidamente (Groban *et al.*, 2000; Mulroy, 2002). Deste modo, neste estudo escolhemos a aplicação do AL “in bolus”, simulando uma injeção intravascular acidental.

Os anestésicos locais tem uma ação direta no miocárdio e vasculatura periférica que está relacionada com o nível sangüíneo atingido. A ação do anestésico local diminui a excitabilidade elétrica do miocárdio, reduz a velocidade de condução e diminui a força de contração (Goodman e Gilman, 1991; Malamed, 2001). A condução mais lenta se manifesta por prolongamento do intervalo PR e complexo QRS, e arritmias ventriculares (Reiz e Nath, 1986; Knudsen *et al.*, 1997; Cox *et al.*, 2003). Sua atuação sobre a musculatura vascular causa vasodilatação periférica, principalmente sobre as arteríolas, levando à hipotensão arterial (Covino e Giddon, 1981; Rang *et al.*, 2001).

Neste experimento não fizemos testes com LDC_{LUV} 3% devido aos efeitos adversos observados nos testes de bloqueio do NIO e descritos anteriormente (item 4.6.1).

A Tabela 6 mostra que os animais utilizados nos cinco grupos estudados (I = LDC_{LIVRE}; II = LDC_{LUV}; III = LDC_{VASO}; IV = LUV; V = tampão) não diferiram com respeito ao peso, frequência cardíaca e pressão arterial média. Os parâmetros da eletrofisiologia

basal dos animais (intervalo PR, complexo QRS e intervalo QT) também não diferiram, antes da aplicação das amostras, entre os grupos estudados.

Tabela 6 - Características basais (antes da aplicação das amostras) de peso, FC e PAM de cada grupo. Dados expressos em média \pm EP

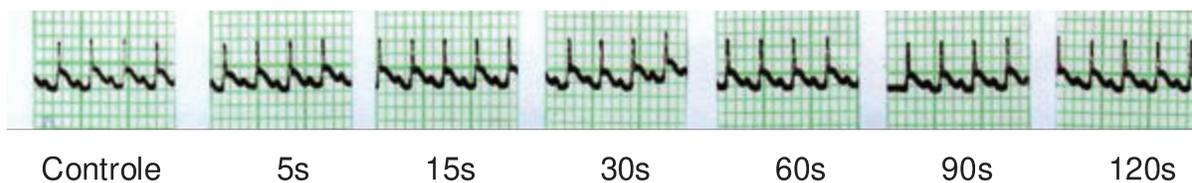
| Grupo | N | Peso (g) | FC (bpm) | PAM (mmHg) |
|----------------------|----------|-----------------|-----------------|-------------------|
| LDC _{LIVRE} | 10 | 400 \pm 11 | 397 \pm 11 | 107 \pm 01 |
| LDC _{LUV} | 10 | 399 \pm 11 | 401 \pm 09 | 105 \pm 01 |
| LDC _{VASO} | 10 | 397 \pm 09 | 407 \pm 09 | 115 \pm 05 |
| LUV | 10 | 398 \pm 11 | 401 \pm 09 | 109 \pm 05 |
| Tampão | 10 | 400 \pm 11 | 396 \pm 09 | 111 \pm 04 |

Neste modelo experimental o halotano foi usado para anestesia basal (de Jong *et al.*, 1982; Mashimo *et al.*, 1992). A administração de halotano é caracterizada por redução dose-dependente da PA, resultante da depressão do miocárdio (Goodman e Gilman, 1991, Bisinotto e Braz, 2003). Contudo, a suplementação da anestesia de halotano com óxido nítrico proporciona uma substancial redução da quantidade de halotano requerida para manter a anestesia e assim, diminui a hipotensão (Goodman e Gilman, 1991). Ventilamos os animais com oxigênio para evitar a hipóxia e seus efeitos adversos no coração e na circulação (de Jong *et al.*, 1982). Assim, e tendo em vista que o halotano tem sido empregado em estudos similares (de Jong, 1982; Mashimo *et al.*, 1992, Kashimoto *et al.*, 1997), os resultados obtidos neste estudo são válidos, uma vez

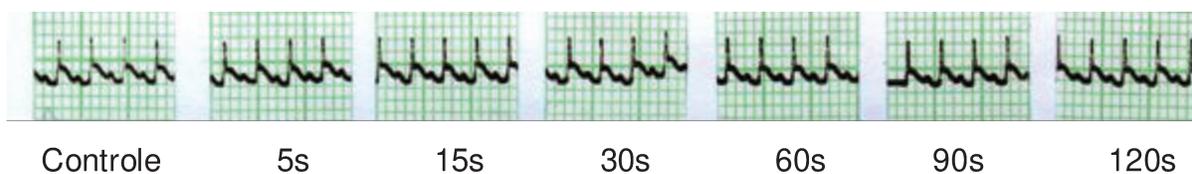
que o halotano foi administrado nos animais dos cinco grupos e, durante a administração do placebo (solução salina), não foi detectada nenhuma alteração na PAM ou na FC dos animais.

Baseado em experimentos semelhantes de avaliação da cardiotoxicidade de anestésicos locais já realizados (Morrison *et al.*, 2000; Araújo, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Singi *et al.*, 2006) os registros dos parâmetros eletrocardiográficos avaliados foi feito no intervalo de tempo de 0 a 300 segundos. O tempo anotado como de “5 segundos” corresponde aos segundos decorridos imediatamente após a injeção de cada amostra. Para os grupos Tampão e LUV as medidas do intervalo PR, complexo QRS e intervalo QT foram feitas somente até 120 segundos, visto que não houve alteração desses parâmetros. A Figura 26 mostra que em todos os grupos de animais estudados os valores de PR, QT e QRS não se alteraram de maneira significativa em relação ao controle, mostrando que as injeções de tampão, lipossomas vazios, lidocaína livre ou encapsulada e de lidocaína com epinefrina não provocaram alterações no ECG, na dose administrada, exceto pela desaceleração dos batimentos cardíacos.

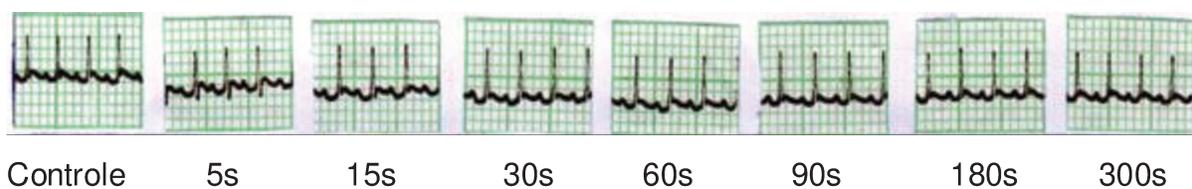
(A)



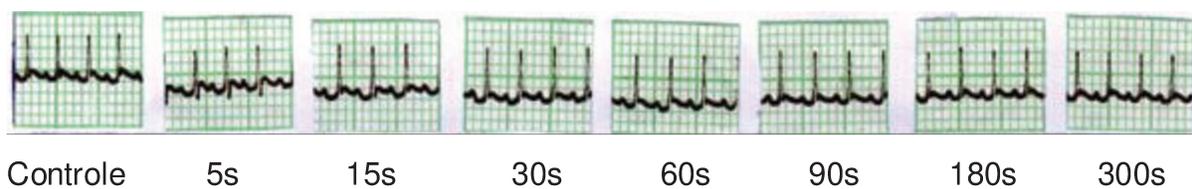
(B)



(C)



(D)



(E)

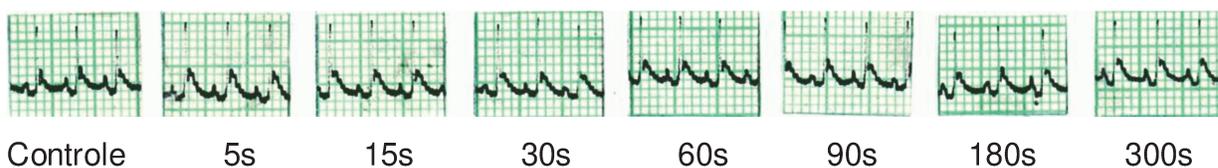


Figura 26 - Traçados eletrocardiográficos do controle (tempo 0) e após aplicação de: tampão HEPES (A), lipossomas vazios (B), lidocaína livre (4 mg/kg, i.v.) (C), lidocaína lipossomal (4 mg/kg, i.v.) (D), lidocaína com epinefrina (4 mg/kg, i.v.) (E).

Estes resultados concordam com os de Kashimoto *et al.* (1997) que, em experimentos semelhantes, com ratos anestesiados com halotano e ventilados com oxigênio, não encontrou arritmias cardíacas, tais como bloqueio átrio-ventricular, ou alargamento de QRS após administração de doses intravenosas de LDC (2 e 8 mg/kg).

De acordo com de Jong *et al.* (1982), o ECG de gatos anestesiados com halotano/óxido nítrico e ventilados com oxigênio durante a infusão de metade da dose convulsionante de LDC (4 mg/kg), permaneceu inalterado em relação ao traçado controle (exceto pela desaceleração dos batimentos cardíacos). Do mesmo modo, porcos anestesiados com pentobarbital e ventilados com oxigênio, após administração intracoronária (*in bolus*) de LDC, não apresentaram nenhum prolongamento dos intervalos PR, QT, ou QRS até a dose de 16mg (Nath *et al.*, 1986).

Como discutido anteriormente, a LDC tem uma ação vasodilatadora resultante do relaxamento direto do músculo liso vascular, induzindo hipotensão (Covino e Giddon, 1981; Blinder *et al.*, 1998). Os efeitos da LDC no coração incluem o bloqueio dos canais de cálcio e sódio (Furukawa *et al.*, 1995; McCaughey, 1992; Range *et al.*, 2001) resultando na redução da força de contração cardíaca e conseqüente queda da pressão arterial (Altura *et al.*, 1965; Tortamano *et al.*, 1980).

Os efeitos da LDC_{LIVRE}; LDC_{LUV} 2% e LDC_{VASO} 2% sobre a pressão arterial média dos ratos em função do tempo são mostrados na Figura 27. Os controles (grupo tampão e LUV) não causaram qualquer alteração na PAM (dados não mostrados). As injeções de LDC_{LIVRE} e de LDC_{LUV} causaram uma rápida queda na pressão arterial média (PAM) com um nadir em 30 segundos pós-injeção, seguido por um retorno gradual ao nível basal (Figura 27).

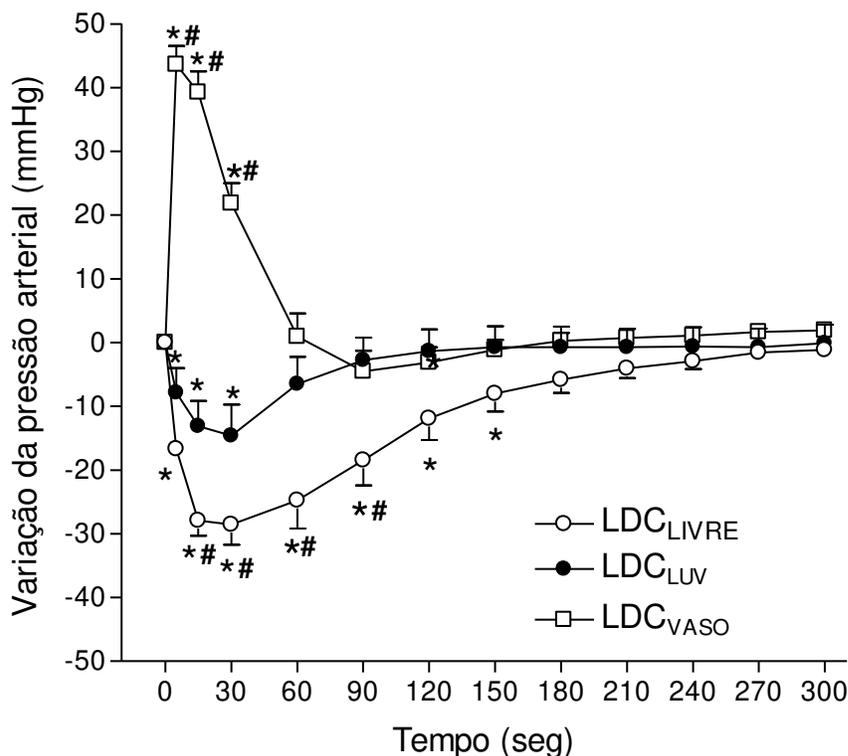


Figura 27 - Efeito da injeção de (4 mg/kg, i.v.) de lidocaína livre, lipossomal e com vasoconstritor na PAM, imediatamente antes (tempo 0) e após aplicação. Dados expressos em média \pm EP (n= 10/grupo). *p < 0,05 comparação entre os tempos do mesmo grupo ANOVA one - way (teste Dunnett); # p < 0,05 comparação entre os grupos ANOVA one - way (teste Tukey).

Nossos resultados são consistentes com os obtidos por Araújo *et al.* (2002), em ratos anestesiados que receberam 600 μ g de lidocaína 2% sem vasoconstritor, resultando em uma redução significativa da PAM durante todo o experimento. Similarmente, Kashimoto *et al.* (1997) avaliaram mudanças hemodinâmicas induzidas por doses subconvulsivas de LDC em ratos anestesiados com halotano. A LDC (2 mg/kg) promoveu mudanças hemodinâmicas mínimas, entretanto doses maiores (8 mg/kg) reduziram a FC e a PAM. Outras investigações com animais intactos, gatos (de Jong *et al.*, 1982) ou porcos (Nath *et al.*, 1986) anestesiados e ventilados com oxigênio

demonstraram uma diminuição da PA após injeção de LDC. Além disso, Mashimo e col. (1992) relataram queda na pressão sanguínea nos 10 minutos que se seguiram à administração epidural de LDC lipossomal 2% (fosfatidilcolina de ovo e colesterol) e de lidocaína 2% em cães, em comparação com o valor do controle.

Os dados mostram uma queda na PAM para o grupo da LDC_{LIVRE} ($p < 0,05$) que persistiu até 150 segundos pós-injeção. Para o grupo da LDC_{LUV} esta queda foi 52% menor e durou até 30 segundos pós-injeção, depois disso, a PAM retornou aos valores basais (Figura 27). Observando a variação provocada nos valores de PAM, verifica-se que houve diferença significativa entre os grupos da LDC_{LIVRE} e LDC_{LUV} entre 15 a 90 segundos pós-injeção, sugerindo que a formulação de lidocaína lipossomal foi menos cardiodepressora quando comparada com a LDC_{LIVRE} (Figura 27).

A injeção de LDC_{VASO} causou uma elevação na PAM, com pico logo após a injeção e retorno aos valores basais aos 60 segundos, caracterizando o efeito promovido pelo vasoconstritor simpatomimético. Substâncias vasoconstritoras, como norepinefrina e epinefrina são comumente associadas aos AL para diminuir seus efeitos tóxicos e para prolongar a profundidade da anestesia. Entretanto, estas catecolaminas aumentam a força de contração cardíaca e a resistência periférica dos vasos, produzindo hipertensão arterial, bem como elevação do débito cardíaco e da FC (Malamed, 2001; Araújo *et al.*, 2002).

A Figura 28 mostra alterações na frequência cardíaca induzidas pelas formulações de LDC (livre, lipossomal e com vasoconstritor). Os grupos tampão e LUV não apresentaram alteração da FC em relação ao controle (dados não mostrados), mostrando que a injeção do tampão e dos lipossomas vazios não afetou a frequência cardíaca dos ratos. Por outro lado, em ambos os grupos LDC_{LIVRE} e LDC_{LUV} houve uma

redução acentuada na freqüência cardíaca após a injeção, que permaneceu abaixo dos valores basais por todo experimento. No grupo da LDC_{LIVRE} a redução da FC atingiu depressão máxima em 15 segundos e permaneceu significativamente alterada por todo experimento. Para o grupo da LDC_{LUV} a redução da FC foi significativa até 150 segundos, retornando gradativamente aos valores basais (Figura 28).

Extensivas pesquisas em animais têm confirmado uma redução na FC após injeção de LDC (de Jong *et al.*, 1982; Nath *et al.*, 1986; Kashimoto *et al.*, 1997).

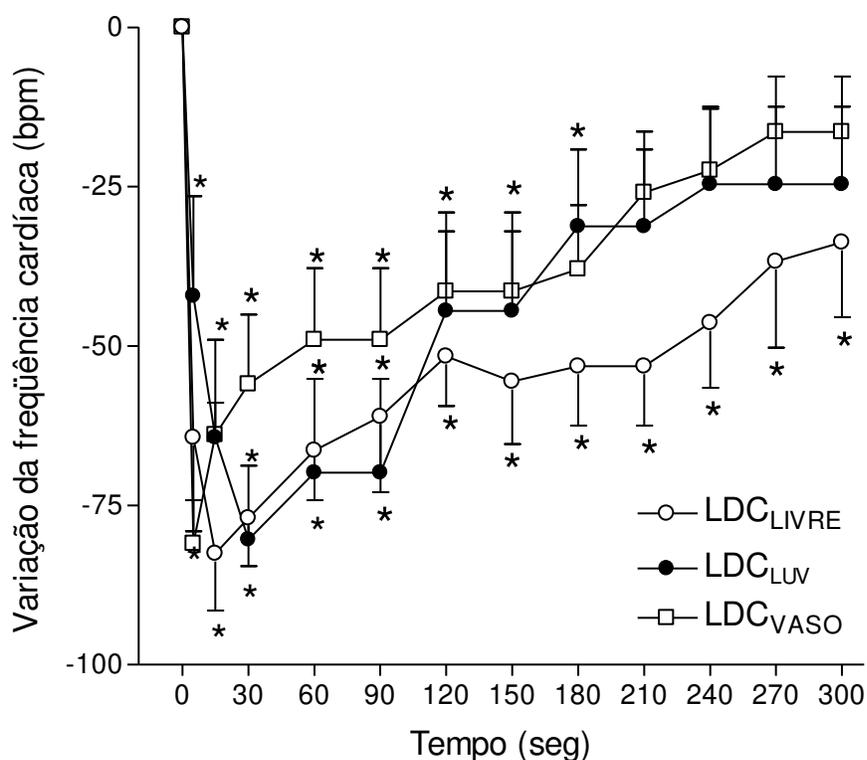


Figura 28 - Frequência cardíaca imediatamente antes (tempo 0) e após aplicação de (4 mg/kg, i.v.) lidocaína livre, lipossomal e com vasoconstritor. Dados expressos em média \pm EP (n= 10 animais/grupo). *p < 0,05 comparação entre os tempos do mesmo grupo ANOVA one - way (teste Dunnet), # p < 0,05 comparação entre os grupos ANOVA one - way (teste Tukey).

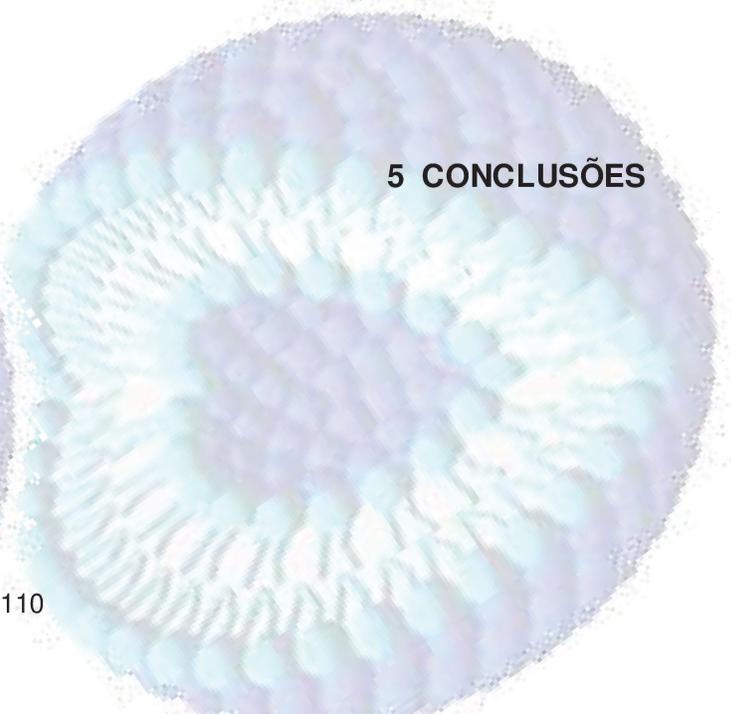
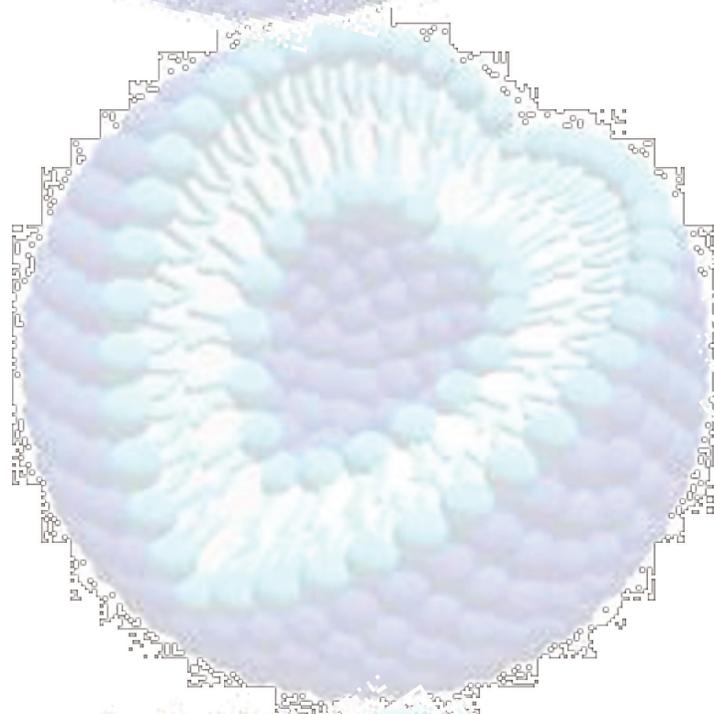
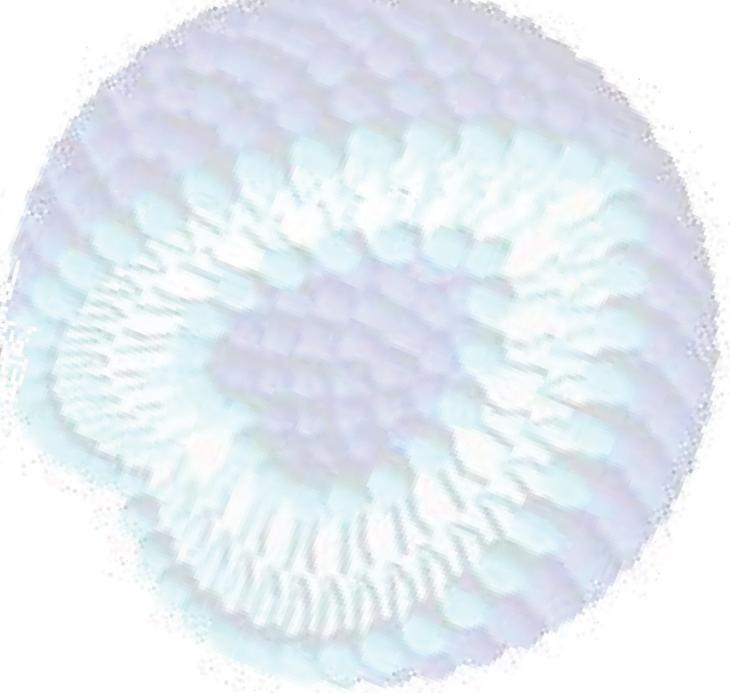
As injeções das três amostras promoveram queda na FC logo após a injeção, provavelmente devido ao aumento de LDC no plasma atuando sobre o coração (diminuição do débito cardíaco e da contratilidade cardíaca). Os valores de frequência cardíaca mostram que a redução na FC do grupo LDC_{LIVRE} permaneceu por mais tempo do que para o grupo LDC_{LUV} (Figura 28). Provavelmente o grupo LDC_{LUV} provocou menor concentração plasmática de LDC disponível, devido à liberação mais lenta (prolongada) do fármaco pelos lipossomas quando comparada ao grupo da LDC_{LIVRE}, conforme evidenciado pelos ensaios de cinética de liberação (Figura 14).

Após a aplicação de LDC_{VASO} a queda na FC ocorreu devido à ação da LDC sobre o miocárdio e ao aumento súbito na PAM que evoca uma alteração inversa na FC através do reflexo barorreceptor (Berne *et al.*, 2004). Em seguida observou-se um retorno mais rápido da FC em comparação com LDC_{LIVRE} e LDC_{LUV}, sugerindo o efeito da epinefrina nos receptores β_1 (aumento do débito e da frequência cardíaca) (Malamed, 2001; Araújo *et al.*, 2002; Haas, 2002; Neal, 2003).

Os vasoconstritores simpatomiméticos podem ser utilizados seguramente em odontologia na maioria dos pacientes comprometidos medicamente, mas a possibilidade de uma injeção intravascular deixa o risco muito maior do que o benefício da anestesia profunda em pacientes com hipertireoidismo não controlado, diabetes não controlado, asma dependente de esteróides, alergia a sulfitos, feocromocitoma (Perusse *et al.*, 1992b) e com comprometimento cardiovascular severo (Perusse *et al.*, 1992a). Além disso, os vasopressores podem interagir com diferentes medicamentos que são capazes de potencializar as ações cardiovasculares dos vasopressores administrados exogenamente (Malamed, 2001). Portanto, o aumento na PAM provocado pela injeção de LDC_{VASO} vem ressaltar a responsabilidade do dentista em

prevenir a exposição destes pacientes ou de usuários de drogas ilícitas, tais como a cocaína, a este fator de risco adicional (Perusse *et al.*, 1992a,b,c; Malamed, 2001).

A lidocaína é usada sistemicamente para alívio da dor aguda ou crônica (Mao e Chen, 2002) e também como instrumento diagnóstico e terapêutico para dor neuropática intratável (Mao e Chen, 2002; Koppert *et al.*, 2004; Carroll, 2007). Entretanto, em altas doses a LDC pode causar hipotensão e bradicardia (Katzung, 1998). As alterações de PAM e FC observadas vêm ressaltar que a LDC_{VASO} pode proporcionar um risco maior, principalmente no caso de injeção intravascular, e que a LDC_{LUV} diminuiu a toxicidade cardíaca da LDC_{LIVRE}. Assim, a encapsulação da LDC nos lipossomas mostrou-se bastante vantajosa já que resultou na diminuição de sua ação sobre o sistema cardiovascular e prolongou seu efeito anestésico tornando a formulação lipossomal uma boa opção.



5 CONCLUSÕES

A constituição lipídica dos lipossomas apresentados nesta dissertação mostrou-se adequada para encapsulação do anestésico local lidocaína. A secagem por atomização (*spray-drying*) tornou o processo rápido e com bom rendimento, adequado à produção em escala piloto ou semi-industrial de formulações anestésicas lipossomais.

Os testes de estabilidade química indicaram aumento dos níveis de endoperóxidos na formulação lipossomal devido ao processo de esterilização por calor, a partir de 2 meses de estocagem, entretando, os níveis de endoperóxido mensurados para lidocaína lipossomal durante 10 meses de armazenamento não ultrapassaram o limite considerado como máximo tolerável (2nM), de acordo com a literatura.

Análises de espalhamento de luz indicaram que tanto a lidocaína lipossomal não esterilizada quanto a esterilizada permaneceram estáveis quanto ao tamanho das populações principais dos lipossomas, até 8 meses de armazenamento. Juntos, os ensaios de estabilidade química e física indicam que as formulações lipossomais são potencialmente adequadas ao preparo em larga escala, com tempo de prateleira suficiente para sua comercialização.

Os ensaios *in vitro* em cultura de fibroblastos 3T3, demonstraram que a encapsulação em lipossomas não alterou de forma significativa a toxicidade da lidocaína em relação à lidocaína livre, mas apresentou menor citotoxicidade que a lidocaína associada ao vasoconstritor.

A encapsulação nos lipossomas reduziu a velocidade de liberação da lidocaína em relação à lidocaína livre *in vitro* o que pode levar a um prolongamento do efeito anestésico *in vivo*.

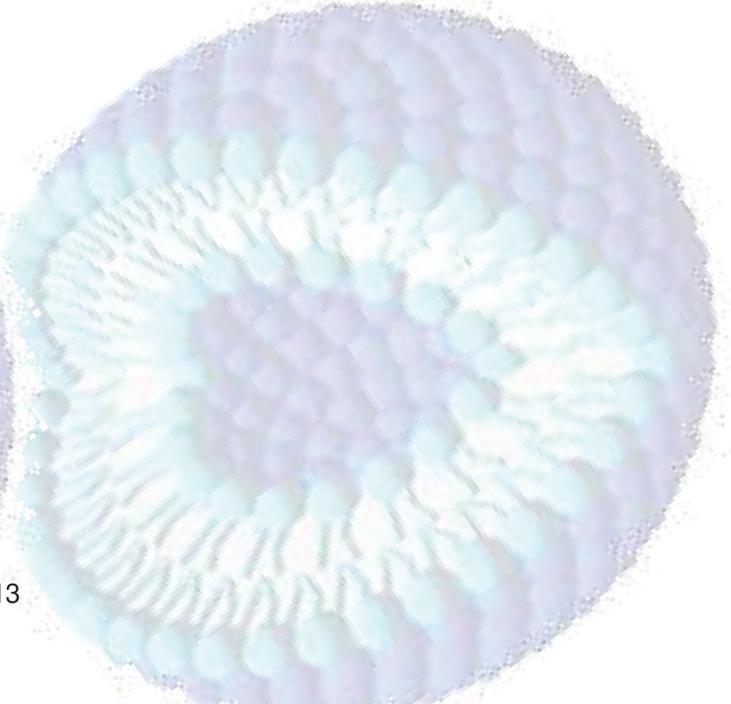
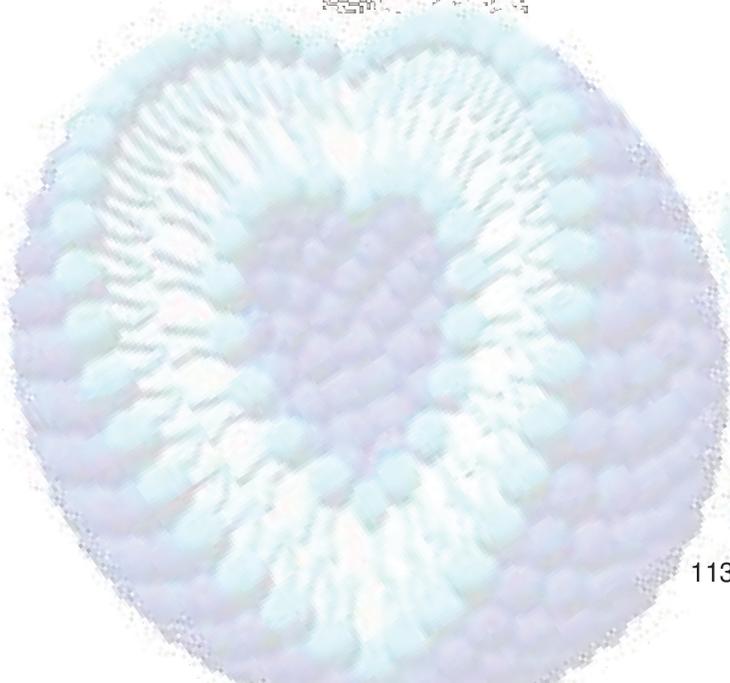
Nos ensaios *in vivo*, apesar do efeito anestésico da lidocaína lipossomal 2% não ser tão prolongado quanto o da lidocaína comercial associada à epinefrina, a LDC_{LUV}

2% se mostrou vantajosa, pois aumentou em 67% o efeito anestésico total obtido (em relação à lidocaína livre 2%), sugerindo que poderia tornar-se uma opção alternativa ao uso da lidocaína no bloqueio nervoso sensorial. Além disso, a LDC_{LUV} 2%, quando comparada à LDC_{LIVRE} 3%, promoveu um tempo de duração do bloqueio do nervo infraorbital equivalente, isto é, proporcionou o mesmo efeito anestésico com uma concentração menor de LDC.

Por fim, testes de cardiotoxicidade mostraram que a encapsulação nos lipossomas resultou em uma menor cardiotoxicidade para a lidocaína, tanto em relação ao fármaco livre, quanto ao associado com vasoconstritor. Desta maneira concluímos que a lidocaína lipossomal poderá promover benefícios clínicos com uma margem de segurança maior, tornando-se uma formulação promissora na busca de anestésicos mais seguros e potentes.



6 REFERÊNCIAS



ABELL, L.L.; LEVY B.B.; BRODIE B.B.; KENDALL F.E. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. **J. Biol. Chem.**, n.195, v.1, p.357-366, 1952.

ABERG, G.; WAHLSTRÖM B. Myogenic action of local anaesthetic on smooth; role of Ca^{++} and cyclic AMP. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, n.31, suppl. I, p. 46, 1972.

ALTURA, B.M., HERSHEY, S.G.; ZWEFACH, B.W. Effects of synthetic analogue of vasopressin on vascular smooth muscle. **Proc Soc. Exp. Biol. Med.**, n.119, p.258-261, 1965.

ALVES, T.C.A; GUANAIS, O. Anestésicos locais. In: SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.434-451.

ARAÚJO, D.R. **Formulações anestésicas locais de longa duração: testes biológicos**. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Bioquímica. Instituto de Biologia. Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas. 2002.

_____; **Desenvolvimento e avaliação farmacológica de formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-amidas cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína**. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Bioquímica. Instituto de Biologia. Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas. 2005.

_____; CEREDA, C.M.S.; BRUNETTO, G. B.; PINTO, L.M.A., SANTANA, M.H.A; DE PAULA, E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provide by sciatic nerve blockade in mice. **Can. J. Anaesth.**, v.51, n.6, p.566-572, 2004.

_____; PINTO, L.M.A.; BRAGA, A.F.A.; DE PAULA, E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas, **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v.53, n.5, p.653-661, 2003.

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

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

BENNETT, R.C. **Monheim. Anestesiologia local e controle da dor na prática dentária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7.ed., 1986.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 5.ed., 2004.

BISINOTTO, F.M.B.; BRAZ, J.R.C. Efeitos do halotano, isoflurano e sevoflurano nas respostas cardiovasculares ao pinçamento aórtico infra-renal. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, n.4, p. 467-480, 2003.

BLAIR, M.R. Cardiovascular pharmacology of local anaesthetics. **Br. J. Anaesth.**, suppl 47, p.247-252, 1975.

BLINDER, D.; MANOR, Y.; SHEMESH, J.; TAICHER S. Eletrocardiographic changes in cardiac patients having dental extractions under a local anesthetic containing a vasopressor. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, n.56, p.1399-1402, 1998.

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

_____; _____; CARLINO, S; NOEL, E; RAYNAL, P; GOFFINET, G. Biodistribution of liposome-associated bupivacaine after extradural administration to rabbits. **Brit. J. Anaesth.**, n.75, p.319-325, 1995.

_____; _____; LUO, H.; LEGROS, F.J. Plasma concentrations of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome-associated and pain solutions to rabbits. **Can. J. Anaesth.**, v.40, p.1201-1204, 1993.

BRITO, M.A.; SILVA, R.M.; MATOS, D.C.; SILVA, A.T.; BRITES, D.T. Alterations of erythrocyte morphology and lipid composition by hyperbilirubinemia. **Clin. Chim. Acta**, n.249, p.149-165, 1996.

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

BUTTERWORTH, J.F; STRICHARTZ, G.R. Molecular mechanisms of local-anesthesia-a review. **Anesthesiology**, n.72, p.711-734, 1990.

CABRAL, E.C.M.; ZOLLNER, R.L.; SANTANA, M.H.A.; Preparation and characterization of liposomes entrapping allergenic proteins. **Braz. J. Chem. Eng.**, v.21, n.2, p.137-146, 2003.

CANTOR, R.S. Breaking the Meyer-Overton rule: predicted effects of varying stiffness and interfacial activity on the intrinsic potency of anesthetics. **Biophys. J.** v.80, n.5, p.2284 – 2297, 2001.

CARBAJAL, D.; CASACO, A.; ARRUZABABALA, L.; GONZALEZ. R.; TOLON, T. Pharmacological study of *cymbopogon citratus* leaves. **J. Ethnopharmacol.**, n.25, p.103-107, 1989.

CARVALHO, F.D.G. **Avaliação biológica de uma pré-formulação de ropivacaína em hidroxipropil-beta-ciclodextrina produzida em processo escalonável.** Tese (Mestrado). Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Bioquímica. Instituto de Biologia. Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas. 2007.

CARROLL, I. Intravenous lidocaine for neuropathic pain: diagnostic and therapeutic efficacy. **Curr. Pain Headache Rep.**, v.11, n.1, p.20-24, 2007.

CEREDA, C.M.S. **Sistema de liberação prolongada com o anestésico local prilocaína em lipossomas:** preparo, caracterização e testes biológicos. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Bioquímica. Instituto de Biologia. Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas. 2007.

_____; ARAÚJO, D.R.; BRUNETTO, G.B.; DE PAULA, E., Liposomal prilocaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, n.7, p.235-240, 2004.

_____; BRUNETTO, G.B.; ARAÚJO, D.R.; DE PAULA, E., Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. **Can. J. Anesth.**, n.53, p.1092-1097, 2006.

CHUNLEI, L.; YINGJIE, D. A novel method for the preparation of liposomes: freeze drying of monophasic solutions. **J. Pharm. Sci.**, v.93, n.6, p.1403-1414, 2004.

CLARKSON, C.W; HONDEGHEM, L.M. Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. **Anesthesiology**, n.62, p.396-405, 1985.

COLLINS, V.J. **Principles of anesthesiology general and regional**. 3 rd. USA: Lea & Febier, 1993. v.2.

COSTA, C.G., TORTAMANO, I.P.; ROCHA, R.G.; FRANCISCHONE, C.E.; TORTAMANO, N. (2005). Onset and duration periods of articaine and lidocaine on maxillary infiltration, *Quintessence Int*, 36(3): 197-201.

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

_____; GIDDON, D.P. Pharmacology of local anaesthetic agents. **J. Dent. Res.**, n.60, p.1454-1459, 1981.

_____; VASSALO, H.G. (eds). **Local anesthetics: mechanisms of action and clinical use**. New York: Grune and Statton, 1976. p.125-134.

COX, B; DURIEUX, M.E; MARCUS, M.A.E. Toxicity of local anaesthetics. **Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v.17, n.1, p.111-136, 2003.

CROMMELIN, D.J.A.; SINDELAR, R.D. **Pharmaceutical Biotechnology: an introduction for pharmacists and pharmaceutical scientists**. London: Routledge, Taylor & Francis Group, 2002. p.96-99.

DARWIS, Y.; KELLAWAY, I.W. Nebulisation of rehydrated freeze-dried beclomethasone dipropionate liposomes. **Int. J. Pharm.**, v.215, p.113-121, 2001.

DECCACHE, W; CRASTO, M.C.V. **Eletrocardiograma: semiótica e clínica**: ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda. 1993.

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

_____; RONFIELD, R.A.; DE ROSA, R.A. Cardiovascular effects of convulsant and supraconvulsant doses of amide local anesthetics. **Anesth. Analg.**, n. 61, p.3-9, 1982.

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

_____; _____. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p.877-894, 1996.

DHUNÉR, K.G; LEWIS, D. Effect of local anaesthetics and vasoconstrictors upon regional blood flow. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, suppl 23, p.347-352, 1966.

DONOHUE, D.; GARCIA-GODOY, F.; KING, D.L.; BARNWELL, G.M. Evaluation of mandibular infiltration versus block anesthesia in pediatric dentistry. **ASDC J. Dent. Child.**, v.60, n.2, p.104-106, 1993.

DYHRE, H.; WALLIN, S.; ENGSTRÖM, S.; RENCK, H. Inclusion of lignocaine base into a polar lipid formulation - in vivo release, duration of peripheral nerve block and arterial blood concentrations in the rat. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, v.45, p.583-589, 2001.

EIDELMAN, A.; WEISS, J.M.; LAU, J.; CARR, D.B. Topical anesthetics for dermal instrumentation: a systematic review of randomized, controlled trials. **Ann. Emerg. Med.**, v.46, p.343-51, 2005.

ENLUND, M.; MENTELL, O.; KREKMANOV, L. Unintentional hypotension from lidocaine infiltration during orthognathic surgery and general anaesthesia. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, v.45, n.3, p.294-297, 2001.

FARACO, F.N.; KAWAKAMI, P.Y.; MESTNIK, M.J.; FERRARI, D.S.; SHIBLI, J.A. Effect of anesthetics containing lidocaine and epinephrine on cardiovascular changes during dental implant surgery. **J. Oral implantol.**, v.33, n.2, p.84-88, 2007.

FINK, B.R.; AASHEIM, G.; KISH, S.J.; CROLEY, T.S. Neurokinetics of lidocaína in the infraorbital nerve of the rat in vivo: relation to sensory block. **Anesthesiology**, v.42, n.6. p.731-736, 1975.

FOSTER, A.H.; CARLSON, B.M. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. **Anesth. Analg.** v.59, p.727-736, 1980.

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

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

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

FRANZ-MONTAN, M.; SILVA, A.L.R.; COGO, K.; BERGAMASCHI, C. C.; VOLPATO, M. C.; RANALI, J.; DE PAULA, E.; GROppo, F.C. Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. **Anesth. Analg.**, v.104, n.6, p.1528-1531, 2007.

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

FRISKOPP, J.; HULEDAL, G. Plasma levels of lidocaine and prilocaine after application of Oraqix ®, a new intrapocket anesthetic, in patients with advanced periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.28, n.5, p.425, 2001.

FURUKAWA, T.; KOUMI, S.; SAKAKIBARA, Y.; SINGER, D.H.; JIA, H.; ARENTZEN, C.E.; BACKER, C.L.; WASSERSTRM, J.A. An analysis of lidocaine block of sodium currente in isolated human atrial and ventricular myocytes. **J. Mol. Cell Cardiol.**, n.27, p.831-846, 1995.

GESZTES, A.; MEZEI, M. Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine. **Anesth. Analg.**, n.67, p.1070-1081, 1988.

GIDRON, Y.; MCGRATH, P.J.; GOODDAY, R. The physical and psychosocial predictors of adolescent's recovery from oral surgery, **J. Beh. Med.**, v.18, n.4, p.385-399, 1995.

GISSEN, A.J.; COVINO, B.G.; GREGUS, J. Differential sensitivity of mammalian nerves to local anaesthetic drugs. **Anesthesiology**, v. 53, p. 467-474, 1980.

_____; _____. Differential sensitivity of fast and slow fibers in a mammalian nerve. III. Effect of etidocaine and bupivacaine on fast/slow fibers. **Anesth. Analg.** v. 61, p.570-575, 1982.

GLAVAS-DODOV, M.; GORACINOVA, K.; MLADENOVSKA, K.; FREDOKUMBARADZI, E. Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. **Int. J. Pharm.**, n.242, p.381-384, 2002.

GOLBACH, P.; BROCHART, H.; STAMM, A. Spray-drying of liposome for pulmonary administration. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v.19, n.19, p.2611-2622, 1993.

GOODMAN, A.; GILMAN, L.S. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

GRANT, G.J.; BANSINATH, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Reg. Anesth. Pain Med.**, n.26, p.61-63, 2001.

_____; BARENHOLZ, Y.; BOLOTIN, E.; BANSINATH, M.; TURNDORF, H.; PISKOUN, B.; DAVIDSON, E.M. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. **Anesthesiology**, n.101, p.133-137, 2004.

_____; DAVIDSON, E.M.; BARENHOLZ, Y. Liposomal bupivacaine produces prolonged analgesia in humans. **Anesthesiology**, n.95, p.A926, 2001.

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

_____; PISKOUN, B.; LIN, A.; BANSINATH, M. An in vivo method for the quantitative evaluation of local anesthetics. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.43, p.69-72, 2000.

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

_____; DEAL, D.D.; VERNON, J.C.; JAMES, L.R.; BUTTERWORTH, J. Ventricular arrhythmias with or without programmed electrical stimulation after incremental overdose with lidocaine, bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine. **Anesth. Analg.**, n.9, p.1103-1111, 2000.

_____; DOLINSKI, S.Y. Differences in cardiac toxicity among ropivacaine, levobupivacaine, bupivacaína, and lidocaine. **Tech. Reg. Anesth. Pain Manag.**, v.5, n.2, p.48-55, 2001.

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

HAAS D.A. An update on local anesthetics in dentistry. **J. Can. Dent. Assoc.**, v.68, n.9, p.546-551, 2002.

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

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

HEAVNER, J.E. Cardiac toxicity of local anesthetics in the intact isolated heart model: a review. **Reg. Anesth. Pain Med.**, n.276, p.545-555, 2002.

HOLROYD, S.V.; WATTS, D.T. Production of edema in rats by local anesthetics. **J. Dent. Res.**, n.422, p.686-692, 1963.

HOMMA, Y.; ICHINOCHÉ, T.; KANEKO, Y. Oral mucosal blood flow, plasma epinephrine and haemodynamic responses after injection of lidocaine with epinephrine during midazolam sedation and isoflurane anaesthesia. **Brit. J Anaesth.**, n.824, p. 570-574, 1999.

HORLOCKER, T.T.; WEDEL, D.J. Local anesthetic toxicity-does product labeling reflect actual risk? **Reg. Anesth. Pain Med.**, v.27, n.6, p.562-567, 2002.

ISRAELACHVILI, J.N.; MITCHELL, D.J.; NINHAM, B.W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. **J. Chem. Soc. Farad. Trans.**, v.II, n.72, p.1525-1568, 1976.

JOHNS, R.A.; SEYDE, W.C.; DI FAZIO, C.A.; LONGNECKER, D.E. Dose-dependent effects of bupivacaine on rat muscle arterioles. **Anesthesiology**, n.65, p.186-191, 1986.

KABA, A.; LAURENT, S.R.; DETROZ, B.J.; SESSLER, D.I.; DURIEUX, M.E.; LAMY, M.L.; JORIS, J.L. Intravenous lidocaine infusion facilitates acute rehabilitation after laparoscopic colectomy. **Anesthesiology**, n.1061, p.11-18, 2007.

KALOW, W. Hydrolysis of local anesthetics by human serum cholinesterase, **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n.104, p.122-134, 1952.

KASABA, T.; ONIZUKA, S.; TAKASAKI, M., Procaine and mepivacaine have less toxicity *in vitro* than other clinically used local anesthetics. **Anesth. Analg.**, n.97, p.85-90, 2003.

KASHIMOTO, S.; DOURSOUT, M.F.; WOUTERS, P.; OGUCHI, T. Effects of bupivacaine and lidocaine on cardiac function in awake and pentobarbital-anesthetized rats. **J. Anesth.**, n.111, p.38-43, 1997.

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

KAYA, K.; ROTA, S.; DOGAN, B.; KÖKTEN, G.; GÜNAYDIN, B.; BOZDAYL, G. Comparison of the antibacterial effects of two local anesthetics: lidocaine and articaine. **Turk. J. Med. Sci.**, n.371, p.7-10, 2007.

KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydration - rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment. In: _____; _____. **Liposomes. Biotechnology**, 1984. p.979-984.

KLINGESTRÖEM, P.; WESTERMARK, L. Local tissue oxygen tension after adrenaline, noradrenaline, noradrenaline and octapressin in local anesthesia. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, n.873, p.261-266, 1964.

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

KOPPERT, W.; WEIGAND, M.; NEUMANN, F.; SITTL, R.; SCHUETTLER, J.; SCHMELZ, M.; HERING, W. Perioperative intravenous lidocaine has preventive effects on postoperative pain and morphine consumption after major abdominal surgery. **Anesth. Analg.**, n.98, p.1050-1055, 2004.

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

LAFONT, N.D.; BOOGAERTS, J.G. Use of liposome-associated bupivacaine for the management of chronic pain syndrome. **Anesth. Analg.**, n.79, p.808-818, 1994.

_____; LEGROS, F.J.; BOOGAERTS, J.G. Use of liposome-associated bupivacaine in a cancer pain syndrome. **Anaesthesia**, n.51, p.578-579, 1996.

LIST, T.; LEIJON, G.; HELKIMO, M.; OSTER, A.; SVENSSON, P. Effect of local anesthesia on atypical odontalgia- a randomized controlled trial. **Pain**, n.1223, p.306-314, 2006.

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

_____; GAGNON, S.; LEBLANC, D. Articaine hydrochloride: a study of the safety of a new amide local anesthetic. **J. Am. Dent. Assoc.**, n.1322, p.177-185, 2001.

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

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

MAO, J.; CHEN, L.L. Systemic lidocaine for neuropathic pain relief. **Pain**, n.871, p.7-17, 2002.

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

MATHER, L.; COPELAND, S.; IADD, L. Acute toxicity of local anesthetics: underlying pharmacokinetic and pharmacodynamic concepts. **Reg. Anesth. Pain Med.**, n.306, p. 553-56, 2005.

MCCAUGHEY, W. Adverse effects of local anesthetics. **Drug Safety**, n.7, p.178-89, 1992.

MCLEAN, C.; READER, A.L.; BECK, M.; MEYERS, W.J. An evaluation of 4% prilocaine and 3% mepivacaine compared with 2% lidocaine 1:100,000 epinephrine) for inferior alveolar nerve block. **J. Endod.**, v.19, p.146-150, 1993.

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

MCMILLAN, A.S.; WALASHAW, D.; MEECHAN, J.G. The efficacy of Emla and 5% lignocain gel for anaesthesia of human gingival mucosa. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, n.381, p.58-61, 2000.

MEECHAN, J.G.; PARRY, G.; RATTRAY, D.T.; THOMASON, J.M. Effects of dental local anaesthetics in cardiac transplant recipients. **Br. Dent. J.**, v.192, n.3, p. 161-163, 2002.

MOLLER, R.A.; COVINO, B.G. Toxic cardiac electrophysiologic effects of bupivacaine and lidocaine at high concentration. **Anesthesiology**, n.63, p.A223, 1985.

MORRISON, S.G.; DOMINGUEZ, J.J.; FRASCAROLO, P.; REIZ, S. A comparison of the eletrocardiographic cardiotoxic effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized swine. **Anesth. Analg.**, n.90, p.1308-1314, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, n.65, p.55-63, 1983.

MOWAT, J.J.; MOK, MJ; MACLEOD BA; MADDEN, T.D. Liposomal bupivacaine. **Anesthesiology**, n.85, p. 635-643, 1996.

MÜLLER, M.; MACKEBEN, S.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of liposomes with encapsulated local anaesthetics. **Int. J. Pharm.**, n.274, p.139-148, 2004.

MULROY, M.F. Systemic toxicity and cardiotoxicity from local anesthetics: incidence and preventive measures. **Reg. Anesth. Pain Med.**, n.276, p.556-561, 2002.

MUNSHI, A.K.; HAGDE, A.M.; LATHA, R. Use of EMLA: is it an injection free alternative? **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v.25, n.3, p.215-219, 2001.

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

NATH, S.; HAGGMARK, S.; JOHANSSON, G.; REIZ, S. Differential depressant and electrophysiologic cardiotoxicity of local anesthetics: an experimental study with special reference to lidocaine and bupivacaine. **Anesth. Analg.**, n.65, p.1263-1270, 1986.

NAYAK, R.; SUDHA, P. Evaluation of three topical anaesthetic agents against pain: A clinical study. **Indian J. Dent. Res.**, n.174, p.155-160, 2006.

NEAL, J.M. Effects of epinephrine in local anesthetics on the central and peripheral nervous systems: neurotoxicity and neural blood flow. **Reg. Anesth. Pain Med.**, v.28, n.2, p.124-134, 2003.

NEW, R.R.C. Characterization of liposomes. In: _____. **Liposomes: a practical approach**. Oxford: IRL, 1990. p.105-162.

NEWTON, D.J.; MCLEOD, G.A.; KHAN, F.; BELCH, J.J. Mechanisms influencing the vasoactive effects of lidocaine in human skin. **Anaesthesia**, n.622, p.146-50, 2007.

OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R., ALVES REZENDE, M.C.; GABRIELLI, M.F. Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction: histomorphological study in rats. **Braz. Dent. J.**, v.5, n. 2, p. 85-92, 1994.

OLIVEIRA, N.S.; GAZOLA, R.; SINGI, G. Effects of vasoconstrictors used in local anesthesia upon isolated rat heart. **Pharm. Res.**, v.46, n.1, p.15-18, 2002.

OSTAD, A.; KAGEYAMA, N.; MOY, R.L. Tumescant anesthesia with a lidocaine dose of 55 mg/Kg is safe for liposuction. **Dermatol. Surg.**, v.22, n.11, p. 921-927, 1996.

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

PARDO, L.; BLANCK, T.J.J.; RECIO-PINTO, E. The neuronal membrane permeability was markedly increased by bupivacaine and mildly affected by lidocaine and ropivacaine. **Eur. J. Pharmacol.**, n.455, 81-90, 2002.

PASCHOS, E.; HULTH, K.; BENZ, C.; REEKA-BARDSCKMIDT, A.; HICKEL, R. Efficacy of intraoral topical anesthetics in children. **J. Dentistry**, v.34, n.6, p.398-404, 2006.

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

_____;_____;_____.Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: Part II. Hyperthyroidism, diabetes, sulfite sensitivity, cortico-dependent asthma, and pheochromocytoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.74, p.648-691, 1992b.

_____;_____;_____.Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: Part III. Pharmacologic interactions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.74, p.692-697, 1992c.

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

PRIMOSCH, R.E.; ROLLAND-ASENSI, G. Comparison of topical EMLA 5% oaral adhesive to benzocaine 20% on the pain experienced during palatal anesthetic infiltration in children. **Pediatr. Dent.**, v.23, n.1, p.11-14, 2001.

RADWAN, I.A.M.; SAITO, S.; GOTO, F. Growth cone collapsing effect of lidocaine on DRG neurons is partially reversed by several neurotrophic factors. **Anesthesiology**, v.97, n.3, p. 630-635, 2002.

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

_____; _____. Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. **Sci.**, v.265, p.1724-1728, 1994.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. (eds). Anestésicos locais e outros fármacos que afetam os canais iônicos. In: _____. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. p.532-541.

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

REIZ, S.; NATH, S. Cardiotoxicity of local anaesthetic agents. **Br. J. Anaesth.** n.58, p.736-746, 1986.

RICHARDSON, E.C.; BANERJI, B.; SEID, R.C.; LEVIN, J.; ALVING C.R. Interactions of lipid A and liposome-associated lipid A with *Limulus polyphemus* amoebocytes. **Infect. Immun.** v.39, n.3, p.1385-1391, 1983.

RITCHIE, J.M.; RITCHIE, B.R.; GREENGARD, P. Active structure of local anesthetics. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, n.150, p.152-159, 1965.

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

ROUSER, G.; FLEISCHER, S.; YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. **Lipids**, n.5, p.494-496, 1970.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLI, M.A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. **Eur. J. Pharm. Sci.**, n.25, p.81-89, 2005.

SABIN, J.; PRIETO, G.; BLANCO, E.; RUSO, J.M.; ANGELINI, R.; BORDI, F.; SARMIENTO, F. Interaction of gadolinium with phospholipids bilayer membranes. **J. Therm. Anal. Cal.**, v.87, n.1, p.199-203, 2007.

SAKURA, S.; KIRIHARA, Y.; MUGURUMA, T.; KISHIMOTO, T.; SAITO, Y. The comparative neurotoxicity of intrathecal lidocaine and bupivacaína in rats. **Anesth. Analg.**, n. 101, p.541-547, 2005.

SCHÜTZE, W.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Phase transformation of a liposomal dispersion into a micellar solution induced by drug-loading. **Pharm. Res.**, n.15, p.538-543, 1998.

SHARATA, H.H., KATZ, K.H. Liposomes. **Intl. J. Dermatol.**, n.35, p. 761-769, 1996.

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

SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. The fluid Mosaic Model of the Structure of Cell membranes, **Sci.** n.175,p.720-731, 1972.

SINGI, G. **Fisiologia Dinâmica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

_____; DAMASCENO, D.D; ANDRÉA, E.D.D.; ALEXANDRE, G.M.B.; SINGI, M.B.; ALVES, L.C.; SIMÕES, T.I. Efeitos agudos da aplicação endovenosa do cogumelo-do-sol (*Agaricus blazei murill*) sobre a pressão arterial média e a FC de ratos anestesiados. **Braz. J. Pharmacogn.**, v.16, n.4, p.480-484, 2006.

SINNHUBER, R.O; YU, T.C; YU, TE.C. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. **Food Res.**, n.23, p.626-634, 1958.

SISK, A.L. Vasoconstrictors in local anesthesia for dentistry. **Anesth. Prog.**, Lawrence, v.39, n.6, p.187, 1992.

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

STRICHARTZ, G.; COVINO, B. Anestésicos Locais. In: MILLER, R.D. **Anestesia**. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1993.

STRICHARTZ, G.R., RITCHIE, J.M. Local anesthetics. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer-Verlag, 1987.

TADDIO, A.; OHLSSON, A.; EINARSON, T.R.; STEVENS, B.; KOREN, G. A systematic review of lidocaine-prilocaine cream (EMLA) in the treatment of acute pain in neonates. **Pediatrics**, v.101, n.2, p.e1, 1998.

_____; SOIN, H.K.; SCHUH, S.; KOREN, G.; SCOLNIK, D. Liposomal lidocaine to improve procedural success rates and reduce procedural pain among children: a randomized controlled trial. **Can. Med. Assoc. J.**, n.172, p.1691-1695, 2005.

TAKAHASHI, Y.; NAKANO, M.; SANO, K.; KANRI, T. The effects of epinephrine in local anesthetics on plasma catecholamine and hemodynamic responses. **Odontology**, v.93, n.1, p.72-79, 2005.

TEIXEIRA, L.S.; DEMARCO, F.F.; COPPOLA, M.C.; BONOW, M.L.M. Clinical and radiographic evaluation of pulpotomies performed under intrapulpal injection of anaesthetic solution. **Intl Endod. J.**, v.34, n.6, p.440-446, 2001.

THOMAS, R.D.; BEHBEHANI, M.M.; COYLE, D.E.; DENSON, D.D. Cardiovascular toxicity of local anesthetics: an alternative hypothesis. **Anesth. Analg.**, New York, v.65, n.5, p.444-450, 1986.

TOLAS, A.G.; PFLUG, A.E.; HALTER, J.B. Arterial plasma epinephrine concentrations and hemodynamic response after injection of local anesthetic with epinephrine. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.104, n.1, p.41-43, 1982.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Rev.**, n.4, p.145-160, 2005.

TORTAMANO, N.; SOARES, M.S.; MIGLIORI, C.A. Anestésicos locais. In: _____; MOREIRA A. JR. (eds). **Terapêutica medicamentosa em odontologia**. São Paulo: Médica, 1980. p.245-256.

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

UEDA, M.; TOHNAI, I.; NAKAI H. Tissue engineering research in oral implant surgery. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.127, n.11, p.1626-1634, 2001.

VAHATALO, K.; ANITA, H.; LEHTINEN, R. Articaine and lidocaine for maxillary infiltration anesthesia. **Anesth. Prog.** v.40, n.4, p.114-116, 1993.

VASCONCELOS, B.C.E.; PORTO, G.G.; NOGUEIRA, R.V.B. Pain control after dental extractions using bupivacaine or lidocaine: pilot study. **Cienc. Odontol. Bras.**, v.8, n.1, p.28-38, 2005.

WU, F.L.; RAZZAGHI, A.; SOUNEY, P.F. Seizure after lidocaine for bronchoscopy: case report and review if the use of lidocaine in airway anesthesia. **Pharmacotherapy**, v.13, n.1, p.72-78, 1993.

YAGIELA, J.A.; BENOIT P.W.; FORT N.F. Mechanism of epinephrine enhancement of lidocaine-induced skeletal muscle necrosis. **J. Dent. Res.**, v. 61, n.5, p.686-690, 1982.

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

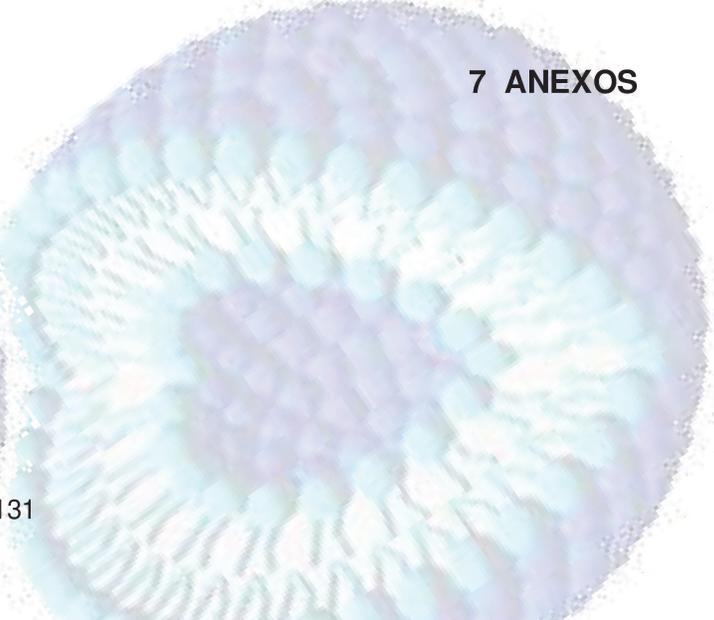
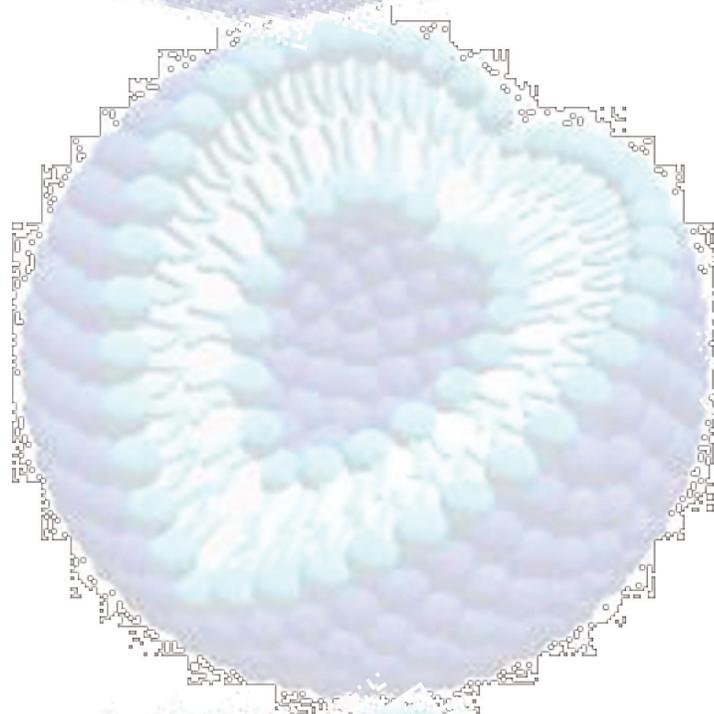
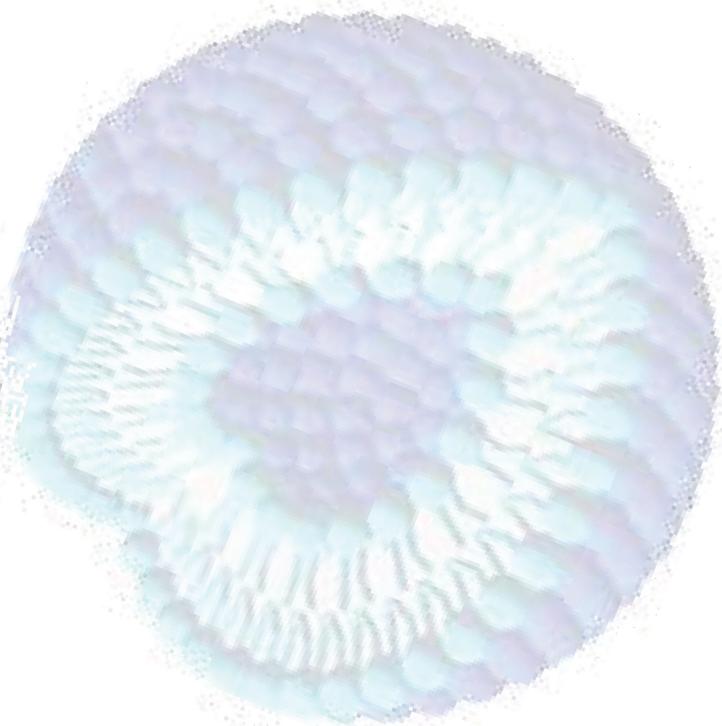
YEAGLE, P.L. **The structure of Biological Membranes**. 2.ed. CRC Press: Boca Raton, 2005.

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

ZINK, W.; BOHL, J.R.E.; HACKE, N.; SINNER, B.; MARTIN, E.; GRAF, B.M. The long term myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blocks. **Anesth. Analg.**, n.101, p.548-554, 2005.

_____; GRAF, B.M. Toxicology of local anesthetics. Clinical, therapeutic and pathological mechanisms. **Anesth. Analg.**, v.59, n.10, p.727-736, 1980.

_____; _____. Local anesthetic myotoxicity. **Reg. Anesth. Pain. Med.**, n.29, p. 333-340, 2004.



7 ANEXOS

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Artigos científicos submetidos

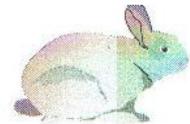
Almeida, A. C. P., Pinto, L.M.A., Alves, G.P., Santana, M.H.A., Carvalho, F.D.G., Cíntia M. S. Cereda, C.M.S., de Paula, E. LIPOSOMAL LIDOCAINE PROLONGS THE INFRAORBITAL NERVE BLOCKADE IN RATS. Submetido à publicação no **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** (2008).

Participação em eventos

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

Publicações em Anais de Eventos

- **Almeida, A.C.P.**, Carvalho, F.D.G., Cereda, C.M.S., de Paula, E. IN VIVO EVALUATION OF A NOVEL LIPOSOMAL LIDOCAINE FORMULATION. **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ**, Águas de Lindóia – SP, 2006.
- Carvalho, F.D.G., **Almeida, A.C.P.**, Cereda, C.M.S, de Paula, E. ROPIVACAINE HYDROXIPROPIL-CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEX: ANALGESIC PROPERTIES AS EVALUATED TROUGH THE INFRAORBITAL NERVE BLOCKADE TEST, IN RATS. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ**, Águas de Lindóia – SP, 2006.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

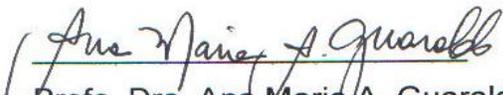
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1004-1, sobre "AVALIAÇÃO IN VIVO DE UMA NOVA FORMULAÇÃO DE LIDOCAÍNA LIPOSSOMAL" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula / Ana Cláudia Pedreira de Almeida está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de abril de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1004-1, entitled "IN VIVO EVALUATION OF A NOVEL LIPOSOMAL LIDOCAINE FORMULATION", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on April 17, 2006.

Campinas, 17 de abril de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA - UNIFAL-MG

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto, protocolo no. 109/2006: **Toxicidade cardiovascular de preparação de lidocaína lipossomal modificada em ratos**, sob responsabilidade do **Prof. Glenan Singi**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Unifal-MG em reunião de 16/02/2007.

Alfenas, 16 de fevereiro de 2007


Profª. Dra. Roseli Soncini
Presidente do CEEA - Unifal-MG