



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

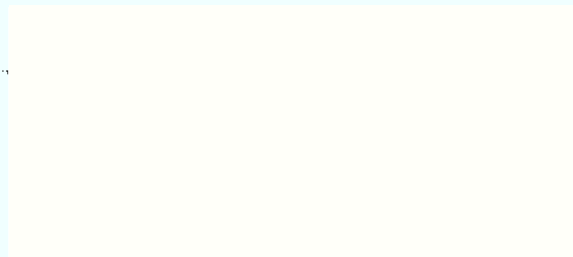
Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Pedro Augusto Thiene Leme

Orientador(a): Francisco Carlos Groppo

Ano de Conclusão do Curso: 2009

Handwritten signature



Handwritten text on the left margin

Pedro Augusto Thiene Leme



TCC/UNICAMP
L542e
FOP

Efeito da lidocaína lipossomal sobre o ligamento
periodontal (técnica intraligamentar) de incisivos de ratos.

Monografia apresentada ao
Curso de Odontologia da
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba - Unicamp, para
obtenção do Diploma de
Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Piracicaba, 2009

Unidade: FOCUS CAMP
TCC / UNICAMP
L542e
Vol. Ex.
Tombo: 4988
Prec. 16P-134/10
Proj. R\$ 11,00
D. 13/08/10
Registro: 772856

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

L542e Leme, Pedro Augusto Thiene.
Efeito da lidocaína lipossomal sobre o ligamento periodontal (técnica intraligamentar) de incisivos de ratos. / Pedro Augusto Thiene Leme. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009. 27f. : il.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Anestésicos. 2. Toxicologia 3. Fosfolipídeos. I. Groppo, Francisco Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
(mg/fop)

Dedico este trabalho aos meus pais, Cid de Abreu Leme Jr e Ana Maria Abdo Thiene Leme que de forma heróica e exemplar batalharam para propiciar-me tudo o que foi necessário para minha educação, humanização e formação, não só na faculdade, mas durante toda minha existência.

Agradeço à todos meus familiares, em especial à minha avó Nabia Abdo Thiene, à tia-madrinha Maiba, às tias Salime Abdo e Helena Abdo Strongov, que além de me ensinar a aprender ao longo de minha vida, foram de inestimável importância durante todos os momentos da graduação acadêmica.

Ao meu avô Paulo Nivaldo Thiene e ao meu tio e padrinho Paulo Nivaldo Thiene Jr, que além de “tutores” da área odontológica nos quais me inspirei e me inspiro, são pessoas de inestimável valor sentimental.

Aos professores com quem tive oportunidade de aprender, principalmente àqueles que nos empoderaram com a dádiva da busca pelo conhecimento e do “saber mais”, em especial ao Prof.Dr Francisco Carlos Groppo, que acreditou em meu potencial para a realização deste trabalho, à Profa. Maria Cristina Volpato, ao prof. Pedro Duarte que me auxiliou muito neste estudo. Ao prof. Jaime Cury e profa. Altair A.Delbel Cury, que além de nos contemplar com sua “sabedoria acadêmica” são exemplos de seres humanos. Aos professores Fábio Mialhe, Rosana Possobon e Marcelo Meneghim, que foram fundamentais para que eu pudesse “espiar” e perceber a saúde além da dicotomia com a doença, de forma holística e humanizante, situando a odontologia em seu contexto mais nobre.

Àqueles que contribuíram diretamente para a realização desse trabalho, sem a paciência e esforço dos quais seria completamente inviável, Daniela Baroni, Luciana Berto, Michelle Franz-Montan, Patrícia, Cidinha e Ivani do Laboratório de Histologia.

Aos meus colegas e amigos de turma, companheiros de dificuldades e alegrias durante esses anos, que me permitiram aprender muita coisa e sem os quais seria impossível superar a ausência do lar.

À minha namorada e companheira Ana Carolina Serra Carrenho, por ter me ajudado à superar inúmeros e incontáveis desafios antes e durante a faculdade, por sempre ter me estimulado à batalhar pelos meus sonhos, por estar sempre ao meu lado mesmo quando a distância é inevitável, por ter me apoiado muitas vezes das quais também passava por dificuldades, enfim, por ser a pessoa que é, indescritível.

SUMÁRIO

Lista de ilustrações	5
Lista de palavras e abreviaturas em latim.....	6
Resumo.....	7
Introdução.....	8
Objetivos	12
Materiais e Métodos	13
Resultados	20
Discussão	21
Conclusão	23
Referências bibliográficas	23
Anexo	26

Lista de Ilustrações

Figura 1. – Exemplo de Score 0, Coloração TG.....	16
Figura 2. – Exemplo de Score 1, Coloração TG.....	16
Figura 3. – Exemplo de Score 2, Coloração TG.....	17
Figura 4. – Exemplo de Score 3, Coloração TG.....	17
Figura 5. – Exemplo de contagem de células inflam. em coloração de HE	18
Figura 6. – Ilustração do local das punções	18

Lista de Palavras e abreviaturas em Latim

AL = anestésico local

et. al.= e outros

HE = Hematoxilina e eosina

ICS = Incisivo central superior

T.G = Tricrômico de Gomori

Resumo

A eficácia da lidocaína em preparação lipossomal já foi demonstrada em bloqueio sensorial e motor em ratos. O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações causadas pela administração de preparação lipossomal de lidocaína 2% em anestesia intraligamentar em ratos, comparando com administração de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000. Vinte e quatro ratos, divididos em 2 grupos (1 para cada solução em estudo) receberam 0,05ml em injeção intraligamentar na face distal do incisivo superior direito. As injeções foram realizadas com dispositivo de injeção com velocidade controlada em 0,1ml/min. O incisivo superior esquerdo recebeu, pela mesma técnica, 0,05ml de solução de NaCl 0,9%. Nos tempos 6h e 24h após as injeções, 6 animais de cada grupo foram sacrificados e a maxila removida e fixada em formol 10%. Após fixação e preparo histológico, foram obtidos cortes no sentido transversal (inciso-cervical) dos dentes, de 5µm de espessura. As lâminas foram coradas com picrossírius/tricrômico de Gomori para analisar qualitativamente as fibras colágenas/elásticas e com Hematoxilina/Eosina para análise quantitativa do infiltrado inflamatório decorrente da administração. Os resultados foram avaliados pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% e revelaram que não houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos em relação ao infiltrado inflamatório e nem em relação às fibras colágenas/elásticas. Concluímos que a aplicação de ambas as formulações (lipossomal de lidocaína a 2% e a lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000) não afetou os tecidos avaliados.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de pesquisas voltadas aos anestésicos locais (AL) é fundamental, uma vez que sua utilização, em âmbito clínico odontológico, é o método mais utilizado para o controle da dor. Desde o seu surgimento, baseado no estudo das propriedades psicotrópicas da *Erythroxylon coca*, utilizada pelos peruanos -para, dentre outras razões, aliviar a fadiga- existe uma constante busca em se aprimorar as drogas, tornando-as cada vez mais seguras e eficazes.

Todos os anestésicos locais injetáveis com eficácia clínica possuem certo grau de atividade vasodilatadora (Malamed, 1997). Os vasoconstritores são importantes, portanto, para controlar a perfusão tecidual, o que retarda a absorção do anestésico local para o sistema cardiovascular, diminuindo o risco de toxicidade, aumentando a duração da anestesia, além de reduzir o sangramento no local de administração.

A lidocaína, há mais de 60 anos é o AL mais utilizado no mundo, sendo, portanto a droga padrão de comparação de sua categoria. Foi o primeiro anestésico da família das amidas. Possui um tempo de latência curto, por volta de 2 a 3 minutos. É metabolizada no fígado e excretada pelos rins. Possui uma grande atividade vasodilatadora. A sobredosagem promove estimulação inicial do Sistema Nervoso Central, seguida de depressão (Andrade, 1998).

Apesar da segurança do uso de soluções anestésicas quando bem indicadas, têm se estudado alternativas à utilização dos vasoconstritores, a fim de diminuir o risco de ocorrência de situações clínicas adversas. Nenhuma droga é atualmente isenta de toxicidade potencialmente grave, portanto a

pesquisa de novas e melhores formulações anestésicas deve continuar (Yagiela et al., 1998). A gama de pacientes que têm contraindicação absoluta ou relativa do uso de soluções vasoconstritoras é restrita, no entanto, alternativas mais seguras devem sempre ser avaliadas, visando desenvolver soluções anestésicas com potenciais tóxicos menores.

As aminas simpatomiméticas (epinefrina, norepinefrina, fenilefrina e levonordefrina), mesmo nas baixas concentrações utilizadas nos AL, podem gerar alterações significativas na pressão arterial quando administradas em elevadas doses ou injetadas intravascularmente, principalmente em pacientes com alterações cardiovasculares, usuários de antidepressivos tricíclicos, de beta-bloqueadores não seletivos e compostos fenotiazínicos (Malamed, 2005). Segundo Yagiela et al. (1998), o uso de dose não criteriosa, a injeção intravascular acidental ou as interações farmacológicas adversas podem promover efeitos clinicamente observáveis sobre o SNC e o sistema nervoso simpático. A frequência cardíaca e a pressão sistólica podem aumentar em decorrência da adrenalina, causando palpitações desconfortáveis e dor torácica. Além disso, podem ocorrer inquietação e apreensão semelhantes às produzidas por anestésicos locais. Se aliados, a depressão do SNC, a acidose respiratória, e a realização de procedimentos dentários em múltiplos quadrantes aumenta o risco de toxicidade sistêmica em adultos e crianças que recebem sedação ou anestesia. Quando uma dose de anestésico local excessiva é administrada, podem-se esperar resultados fatais (Andrade, 2006; Yagiela, 1998).

Um tipo de veículo relativamente novo vem sendo estudado. São os sistemas de liberação controlada, os lipossomas e polímeros. Antifúngicos,

antineoplásicos, antibióticos e anestésicos locais são exemplos de drogas que são encapsuladas em lipossomas ou outros veículos como ciclodextrina e polímeros sintéticos. Esses sistemas permitem um aumento na duração do efeito e diminuição da toxicidade da droga (Kuzma et al., 1997).

Lipossomas são vesículas formadas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas concêntricas, sendo assim classificadas em uni ou multilamelares e separadas por meio aquoso. São muito versáteis para terapêutica, pesquisa e aplicações analíticas, pois são biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos, e podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas. (Edwards & Baeumner, 2006; New, 1990; Puisieux *et al.*, 1995)

A biodistribuição é afetada pelo tamanho do lipossoma, sendo que os maiores tendem a permanecer no local da injeção, e as menores tendem a atravessar os capilares e difundirem-se (Grant & Bansinath, 2001).

A localização de drogas hidrofílicas ou lipofílicas obedece à estrutura, sendo que tendem a permanecer no centro da vesícula e na bicamada fosfolipídica, respectivamente. Desta forma, o princípio ativo é protegido da metabolização até atingir o seu sítio de ação (Sharata & Katz, 1996).

A forma lipossomal de soluções anestésicas tem como vantagem o prolongamento da duração da anestesia e redução da toxicidade para o sistema cardiovascular e sistema nervoso central, não só pela eliminação do uso do vasoconstritor (embora outras propriedades exclusivas deste sejam interessantes), mas por controlar a liberação do sal anestésico. Um estudo utilizando prilocaína na forma lipossomal sugeriu que o encapsulamento facilitaria o controle da distribuição da droga, aumentando o tempo de duração do bloqueio dos nervos sensitivos (Cereda et al., 2004). As formulações

lipossomais de prilocaína, lidocaína e mepivacaína foram testadas em outro estudo, sendo que os lipossomas foram eficazes como veículos para AL, prolongando a ação analgésica dessas drogas (Cereda et al., 2006). Avaliando-se ainda o tempo de duração, outro estudo demonstrou que a forma lipossomal da mepivacaína promoveu efeito anestésico semelhante ao da bupivacaína (Araújo et al., 2004). Quanto à toxicidade, um estudo demonstrou que a associação da bupivacaína com lipossomas multilamelares induziu uma importante redução nos efeitos tóxicos da droga sobre os sistemas nervoso central e cardiovascular em comparação à droga não-encapsulada (Jean Boogaerts, 1993).

As formulações lipossomais dispensam em sua composição o bissulfito de sódio, usado como conservante em soluções que contenham vasoconstritor. O bissulfito em contato com o oxigênio gera o bissulfato de sódio, que é responsável por reduzir o pH da solução, o que promove a sensação de ardência ou queimação durante os primeiros segundos da injeção (Andrade, 1998). Além disso, o bissulfito é o principal componente relacionado aos casos de alergia, ainda que relativamente raros. Segundo Malamed (2005) o pH de uma solução com vasoconstritor varia de 3,3 a 5,5.

Como desvantagem, diferentemente dos vasoconstritores a forma lipossomal das soluções anestésicas não permite por si só o controle da hemostasia, fator importante em alguns procedimentos cirúrgicos.

A resposta inflamatória de suspensão lipossomal de prilocaína foi avaliada em estudo prévio, oportunidade na qual demonstrou-se uma menor inflamação em comparação à formulação comercial, com o vasoconstritor felipressina (Cereda et al., 2008). Desta forma, o objetivo deste estudo foi

comparar o efeito sobre a reação inflamatória no ligamento periodontal de uma suspensão lipossomal de lidocaína 2% e da apresentação comercial com vasoconstritor.

Objetivos:

Este estudo teve como objetivo avaliar qualitativamente as alterações causadas pela administração de preparação lipossomal de lidocaína 2% em anestesia intraligamentar, em ratos Wistar saudáveis, comparando com administração de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000.

Material e métodos

1-ANIMAIS

Este estudo foi aprovado pela comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. (protocolo 1456-1, ANEXO 1)

Foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos, provenientes do CEMIB-UNICAMP. O biotério onde permaneceram possui temperatura controlada, ciclo claro-escuro estabelecido e com água e comida *ad libitum*.

2-MATERIAIS

Foram utilizadas duas formulações distintas:

- Solução de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000, disponível comercialmente.
- Suspensão lipossomal de epinefrina 2% sem vasoconstritor.

A preparação lipossomal de epinefrina 2% foi preparada no laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da Unicamp, em parceria com a Profa. Dra. Eneida de Paula que é co-orientadora deste estudo.

Para o controle foi utilizada solução de cloreto de sódio 0,9%.

As infiltrações foram realizadas com agulha descartáveis (Septoject®) 25x7 - 30G acopladas ao dispositivo Morpheus de injeção controlada, que injetou 0,05 mL em velocidade controlada de 1mL/min.

Para a sedação dos animais, foi utilizado tiopental sódico (Thiopentax® Cristália Ind. Quím. Farm.) injetado via intramuscular.

Após a confecção das lâminas histológicas, os cortes foram avaliados através do microscópio óptico.

3-PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO LIPOSSOMAL

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%.

4-PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS E PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

Inicialmente todos os ratos foram pesados e sedados com tiopental na dose de 30 a 40 mg/kg. Os animais foram divididos em quatro grupos:

G1- Lidocaína 2% com Epinefrina 1:100.000 – Eutanasia após 6 horas

G2- Lidocaína 2% com Epinefrina 1:100.000 – Eutanasia após 24 horas

G3- Lidocaína Lipossomal à 2% - Eutanasia após 6 horas

G4- Lidocaína Lipossomal à 2% - Eutanasia após 24 horas

A face distal do incisivo central superior direito (ICSD) dos ratos dos grupos 1 e 2 recebeu 0,05 mL, por via intraligamentar, preparação lipossomal de lidocaína 2%. A face distal do incisivo central superior esquerdo (ICSE) recebeu, pela mesma técnica, 0,05 mL de solução de NaCl 0,9%

Nos ratos do grupo 2, foi administrada na face distal do ICSD 0,05 ml de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000, e, da mesma forma, no ICSE 0,05 mL de solução de NaCl 0,9%.

Todas as injeções foram aplicadas por um só operador. Os animais foram mortos por asfixia em CO₂ em câmara fechada. As maxilas foram removidas, identificadas segundo o grupo e condicionadas em solução de formaldeído a 10% em temperatura ambiente durante 3 dias. Após este período, iniciou-se a descalcificação através do agente quelante EDTA a 4% e 4,4 g/L de NaOH, com trocas diárias, por cerca de 45 dias, quando se constatou um ideal grau de desmineralização. As peças foram então lavadas e acondicionadas em álcool 50° para a preservação de sua integridade. A desidratação foi feita através da

troca do álcool de 50º para 70º, seguida por álcool absoluto. As peças foram então embebidas em xilol até sua diafanização, e, em seguida, incluídas em parafina. Cortes de 5 micrômetros no sentido longitudinal do dente foram obtidos através de um micrótomo manual. Junto à área de histologia da FOP, optou-se por padronizar, visualmente, uma região do dente à ser analisada, representada pela visualização do osso alveolar ao atingir metade do diâmetro dos incisivos.

Os cortes foram analisados em microscópio óptico com 100 para Tricrômico de Gomori e 400 vezes de aumento (para HE). Após obtenção de fotografias digitais do aumento proporcionado pelo microscópio, as imagens foram analisadas através do software Image Tool 3.0 e descritas em termos qualitativos. Para a coloração de HE, foi definida uma rotina de análise das lâminas, sendo que foram contadas células inflamatórias inseridas na intersecção das linhas de uma grade de tamanho padrão para todas as imagens. Para as lâminas coradas com Tricrômico de Gomori, diferentes intensidades de destruição tecidual foram observadas nas lâminas, como demonstram as figuras 1, 2, 3 e 4. As lâminas coradas com picrossírius demonstraram-se inconclusivas, portanto foram desconsideradas para análise.

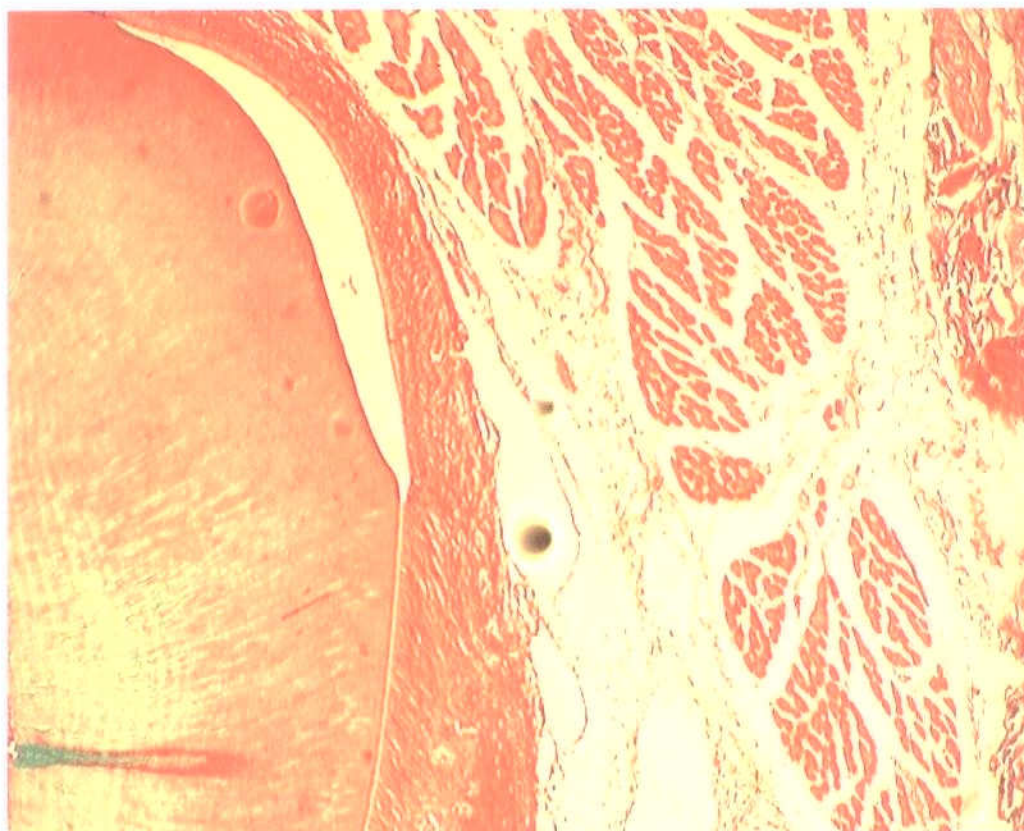


Fig. 1 – Exemplo de escore 0, coloração de T.G.

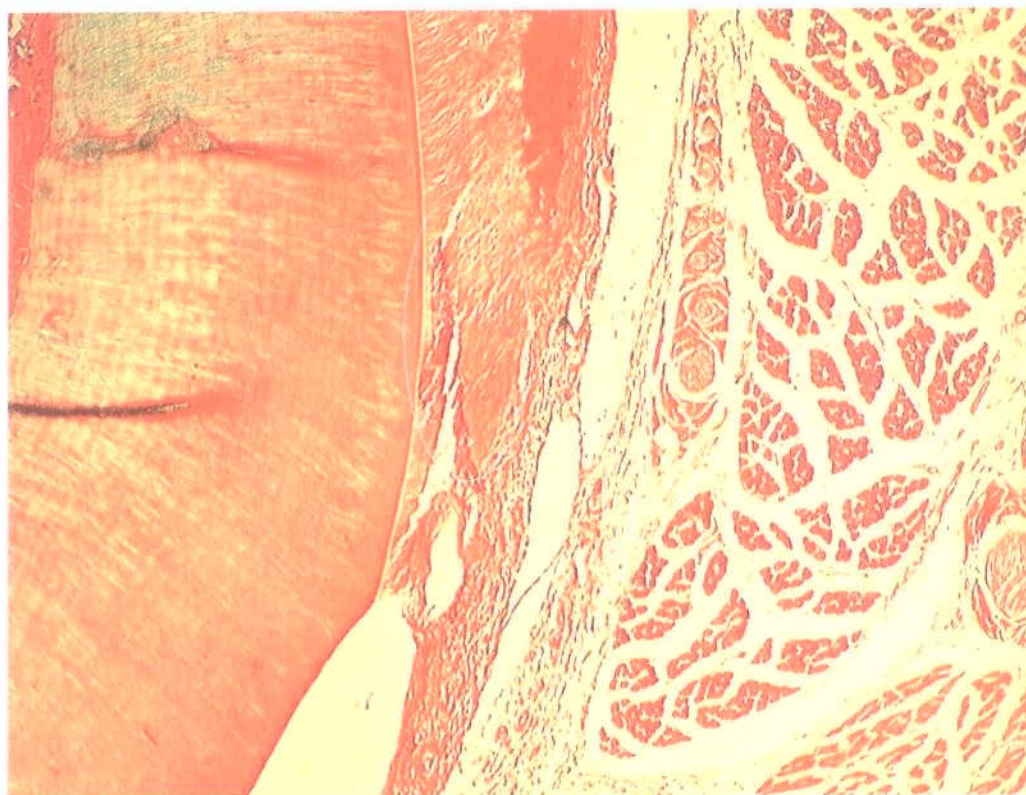


Figura 2 – Exemplo de escore 1, coloração de T.G.

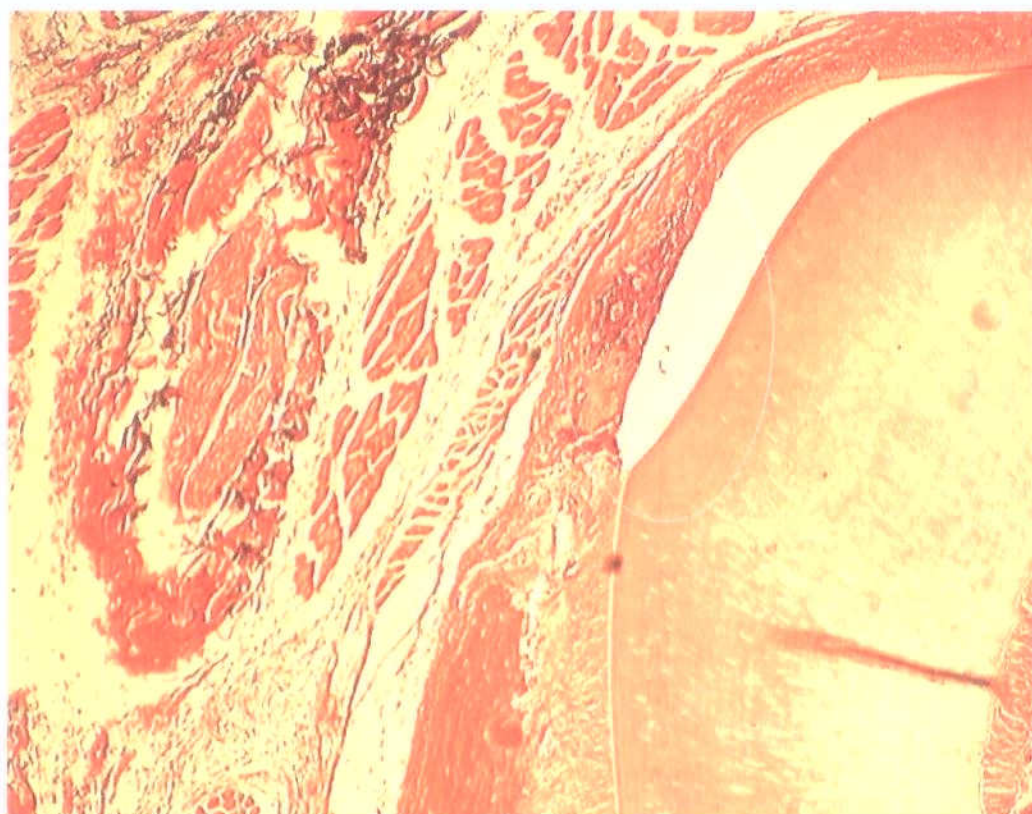


Figura 3 – Exemplo de escore 2, coloração de T.G.

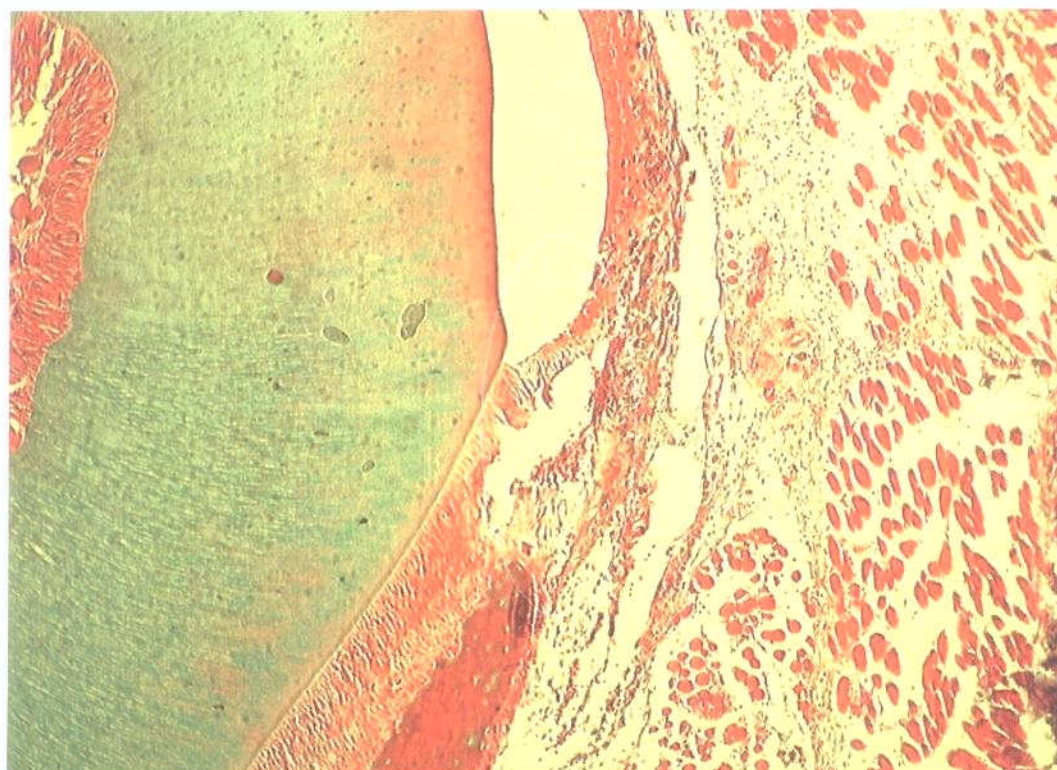


Figura 4 – Exemplo de escore 3, coloração de T.G.

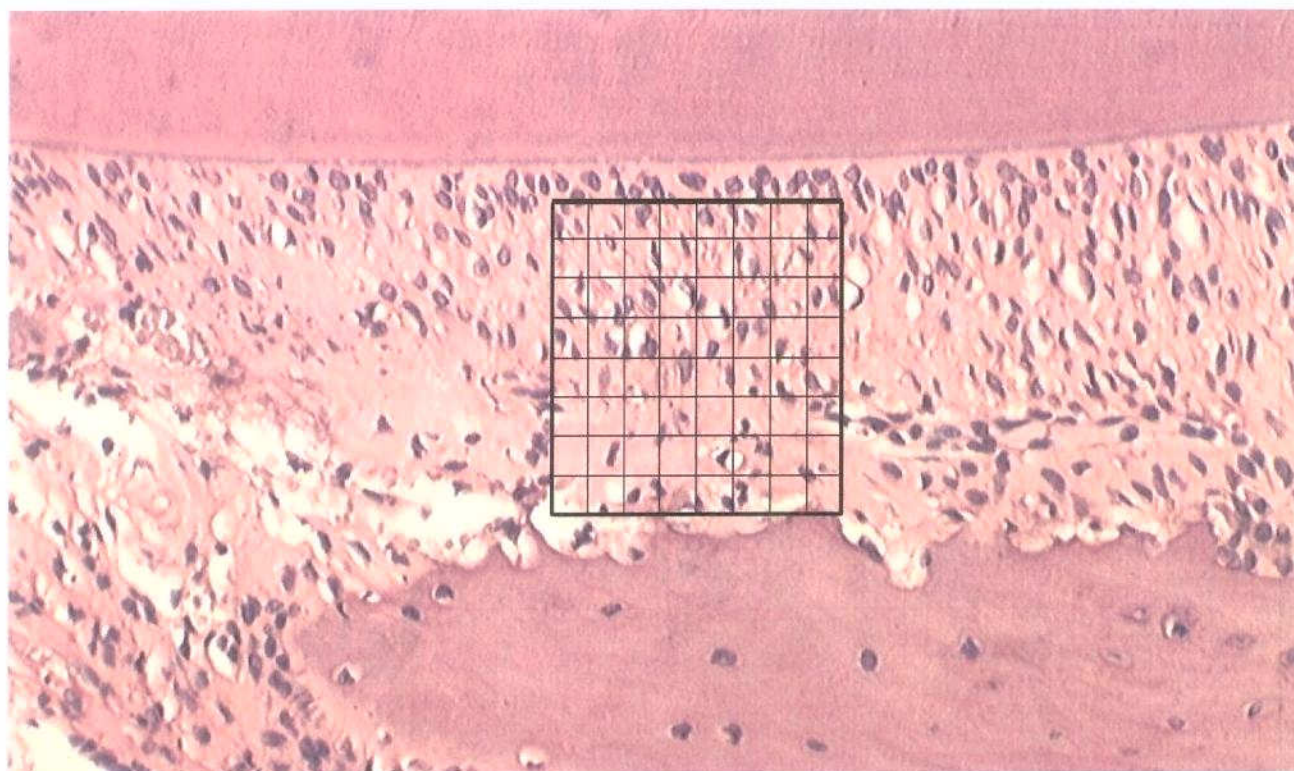


Figura 5 – Exemplo de contagem de células inflamatórias em coloração de HE

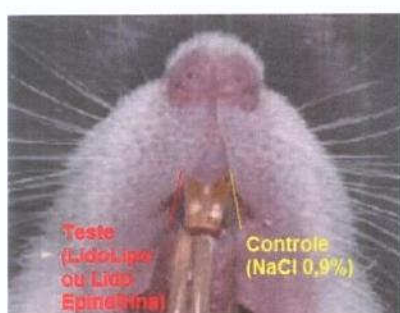


Figura 6 – Localização das injeções

Análise Estatística

Os resultados foram avaliados pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5%, utilizando o pacote estatístico BioEstat 5.0 (Fundação Mamiramuá, Belém, PA).

Resultados

A análise estatística dos dados obtidos nas lâminas coradas com HE (contagem de células inflamatórias) não apontou diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$) entre os grupos, entre os tempos e teste/controle dentro do mesmo grupo (Gráfico 1).

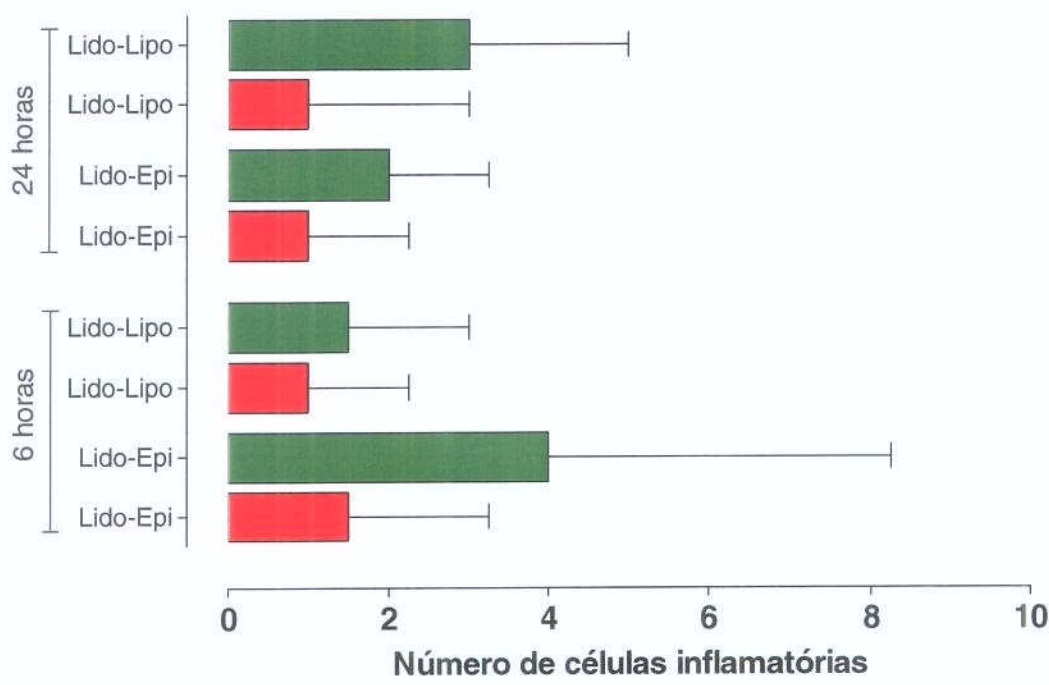


Gráfico 1 – Contagem de células HE. As barras representam a mediana e o desvio interquartílico. Barras vermelhas representam o lado teste e as verdes representam o controle.

Para a análise das lâminas coradas com Tricrômico de Gomori, foram definidos escores – 0 para “ausência de alteração tecidual”; 1 para “alteração tecidual leve”; 2 para “alteração tecidual moderada”; e 3 para “alteração tecidual intensa”. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tempos e lados teste/controle ($p>0,05$). O Gráfico 2 mostra os resultados obtidos.

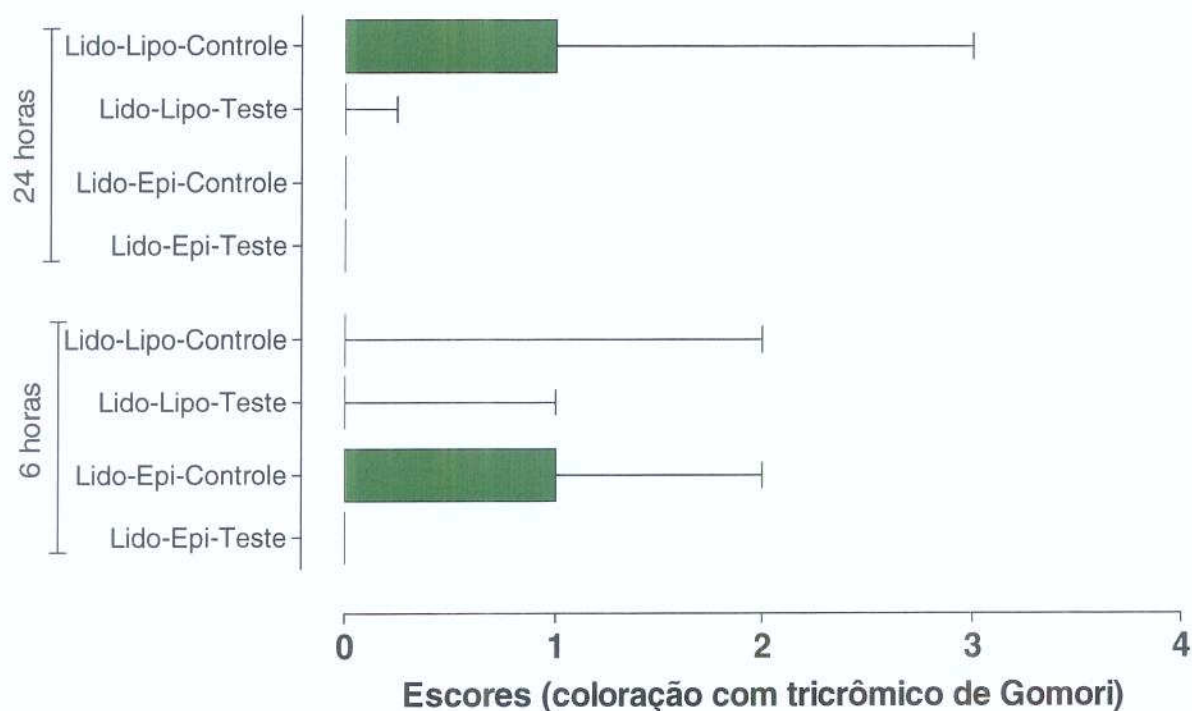


Gráfico 2 – Escores obtidos com a coloração de Tricrômico de Gomori. As barras representam a mediana e o desvio interquartilico.

Discussão

A eficácia da utilização de lipossomas como veículo para a lidocaína, em anestesia local já foi previamente observada, sendo que os lipossomas foram eficazes como veículos para AL, prolongando a ação analgésica (Cereda et al., 2006). A resposta inflamatória da suspensão lipossomal também foi avaliada, embora em relação à prilocaína (Cereda et al., 2008). Estes autores mostraram menor inflamação quando em comparação à formulação comercial (com felipressina como vasoconstritor). Este achado corrobora com o encontrado no presente estudo.

A anestesia intraligamentar é amplamente utilizada em procedimentos odontológicos ambulatoriais, por promover eficiente anestesia pulpar e da

região do ligamento periodontal/periósteo. Portanto, é importante avaliar a segurança dessa solução para posteriores testes em seres humanos, estudando a possibilidade de comercialização/aplicação clínica destes carreadores para anestésicos locais.

O presente estudo não mostrou evidência de aumento do infiltrado inflamatório significativo após 6 e 24 horas da administração de lidocaína lipossomal em relação à forma convencional com epinefrina 1:100.000 nem em relação ao controle (NaCl 0,9%). A análise do grau de destruição tecidual, por microscopia óptica evidenciada pelo Tricrômico de Gomori, também não mostrou diferenças entre o lado que recebeu os fármacos e o lado que recebeu solução salina. Apesar de não ser possível comparar o estudo com o de Cereda et al. (2008) devido às diferentes soluções anestésicas e vasoconstritores, os estudos têm em comum a demonstração experimental da segurança da forma lipossomal em relação à reação inflamatória.

Embora alguns espécimes tenham apresentado evidências de hemorragia e intenso infiltrado inflamatório, este fato ocorreu também do lado controle, o que pode ser devido à penetração traumática da agulha.

O tamanho do lipossoma afeta sua biodistribuição, sendo que aqueles menores que 120nm atravessam rapidamente os capilares, enquanto que os maiores tendem a permanecer no sítio da injeção (Grant & Bansinath, 2001). No presente estudo, as vesículas lamelares utilizadas tinham 400 nm de diâmetro, fato que as caracteriza como vesículas grandes e, portanto, tendem a se manter no sítio de injeção e daí a necessidade de observar o efeito local da suspensão lipossomal utilizada.

Embora Grant (2002) tenha afirmado que a semelhança dos monômeros

constituintes dos lipossomas, particularmente a fosfatidilcolina e o colesterol, com os das membranas biológicas, eliminaria o risco de antigenicidade ou de lesões histológicas após a administração, ainda existem poucos estudos *in vivo* mostrando a biocompatibilidade da associação de lipossomas com anestésicos locais. Outros autores (Kuzma et al., 1997) também observaram que a biocompatibilidade das vesículas lipídicas seria devido a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade reduzida ou inexistente. Estes achados foram comprovados no presente estudo.

A literatura também relata que lipossomas com carga neutra, similares aos empregados no presente estudo, não promoveriam lise significativa de eritrócitos (Stensrud et al., 1999; Pinto, 2002) e nem efeito pró-agregante significativo. Este fato justificaria a ausência significativa de sangramento (em nível histológico) observado no presente estudo.

Nosso estudo comprova que, além das características já observadas da associação de anestésicos locais e lipossomas, tais como liberação lenta, duração da anestesia prolongada, redução da toxicidade para os sistemas cardiovascular e nervoso central (Bucalo et al., 1998), a toxicidade local, mesmo em tecidos muito densos como o ligamento periodontal é insignificante.

CONCLUSÃO

Com este estudo concluímos que não houve alteração inflamatória estatisticamente significativa tanto entre a formulação lipossomal e a convencional com epinefrina 1:100.000.

A formulação lipossomal não é capaz de provocar reação inflamatória significativa, sendo, sob este aspecto, eficaz veículo carreador. Novos estudos poderão corroborar com a avaliação da segurança do fármaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Banerjee R. Liposomes: applications in medicine. J Biomater appl. 2001; 16(1): 3-21.

Boogaerts JG et al. Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. J Clin anesth. 1994; 6(4): 315-20.

Boogaerts JG et al. Toxicity of bupivacaine encapsulated into lipossomes and injected intravenously: comparison of plain solutions. Anesth analg. 1993; 76: 553-555.

Bucalo BD et al. Comparision of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine and EMLA using 30-minute aplication time. Dermatol surg. 1998; 24: 537-541.

Cereda CM, de Araújo DR, Brunetto GB, de Paula E. Liposomal prilocaine: preparation, characterization and in vivo evaluation. J Pharm pharmaceut sci. 2004; 7: 235-40.

Cereda CM, de Araújo DR, Brunetto GB, de Paula E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. *Can J Anesth*. 2006; 53(11): 1092–1097.

Cereda CMS, Tófoli GR, de Brito Júnior RB, et al. Stability and local toxicity evaluation of a liposomal prilocaine formulation. *J Liposome Res*. 2008; 18(4): 329-339.

Araujo DR, Cereda CMS, Brunetto GB, Pinto LMA, Santana MHA, et al. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. *Can J Anesth*. 2004; 51(6): 566–572.

Grant SA. The Holy Grail: long-acting local anaesthetics and liposomes. *Best pract res clin anaesthesiol*. 2002; 16(2): 345-52.

Grant SA. Liposomal delivery systems for local anesthetics. *Reg aneth pain Med*. 2001; 26: 61-63.

Kuzma PJ, Kline MD, Calkins MD, Staats PS. Progressing the development of ultra-long-acting local anesthetics. *Reg aneth*. 1997; 22: 543–51.

Pinto LM. Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys chem*. 2002; 6: 99(3): 229-43.

Stensrud G. Toxicity of gamma irradiated liposomes. In vitro interactions with blood components. *Int J Pharm.* 1999; 178(1): 33-469.

Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry.* 4.ed. St Louis, Missouri, 1998, 206-220.

Yagiela JA. Recent developments in local anesthesia and oral sedation. *Compend contin educ dent.* 2004; 25(9): 697-706.



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

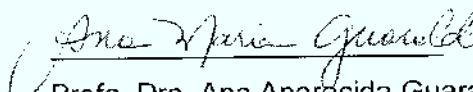
CERTIFICADO

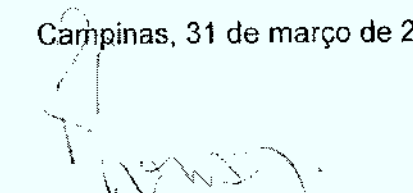
Certificamos que o Protocolo nº 1456-1, sobre "Efeito da lidocaína lipossomal sobre o ligamento periodontal (técnica intraligamentar) de incisivos de ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo / Pedro Augusto Thiene Leme, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 31 de março de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1456-1, entitled "Rhe effect of liposomal lidocaine in the periodontal ligament of rat incisors", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 31, 2008.

Campinas, 31 de março de 2008.


Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

