

**UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

**CAROLINA RENNÓ CARVALHO**

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE FORMULAÇÕES DE  
ANESTÉSICOS LOCAIS ENCAPSULADOS EM NOVOS  
SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADOS**

Bragança Paulista  
2017

**CAROLINA RENNÓ CARVALHO – R.A. 001201502491**

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE FORMULAÇÕES DE  
ANESTÉSICOS LOCAIS ENCAPSULADOS EM NOVOS  
SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Área de Concentração:** Farmacologia

**Orientador:** Prof.(a) Dr.(a) Giovana Tofoli

Bragança Paulista  
2017

QV 40  
C322a

Carvalho, Carolina Rennó.

Avaliação pré-clínica de formulações de anestésicos locais encapsulados em novos sistemas de liberação modificados / Carolina Rennó Carvalho. -- Bragança Paulista, 2017.

58 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da saúde da Universidade São Francisco.

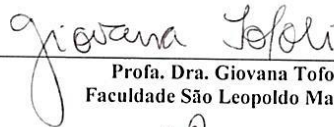
Orientação de: Giovana Tofoli.

1. Ropivacaína. 2. Anestésico local. 3. Lipossoma.  
6. Farmacodinâmica. I. Tofoli, Giovana. II. Título.


Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.



CARVALHO, R., Carolina, "Avaliação Pré-Clínica de Formulações de Anestésicos Locais Encapsulados em Novos Sistemas de Liberação Modificadas". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 22 de Fevereiro de 2017 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Giovana Tofoli  
Faculdade São Leopoldo Mandic

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Cintia Maria Saia Cereda  
Faculdade São Leopoldo Mandic

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero  
Universidade São Francisco

## **DEDICATÓRIA**

A minha linda filha que me ensina a cada dia o que é o amor incondicional, que essa conquista a motive no seu futuro.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus e a minha família, meus irmãos pelo apoio, minha princesa por sempre me receber com seu sorriso, ao Correggio pelo apoio, carinho e amizade, essa conquista também é sua. A minha mãe pela ajuda nos momentos que não me fiz presente para a Ana.

Ao Renato Torres pelo incentivo constante na minha evolução profissional.

Agradeço a Profa. Dra. Elizabeth Martinez e a Nadir Freitas da São Leopoldo, pela ajuda, carinho e capricho neste trabalho. Agradeço a Dra. Eneida de Paula, Dr. Pedrazoli e Dra Silvana pelo apoio técnico.

Minha amiga Verônica por me ajudar até nos domingos, muito obrigada! A minha querida amiga Juliana, que sempre esteve ao meu lado, meu muito obrigada. Aos amigos que construí nessa jornada no laboratório, em especial a Thais Pacheco pelo desprendimento e ajuda.

A professora Giovana pelos ensinamentos e por não ter desistido de nos orientar mesmo com tantos obstáculos, muito obrigada.

A Fapesp (proc. N. 2014/14457-5) e Capes pelo apoio financeiro.

## **EPÍGRAFE**

*“Nem tudo nessa vida é fácil, mas com certeza nada é impossível, ser forte não é ter a força de um leão, mas sim a paciência e humildade de um pássaro que mesmo na gaiola não perde a esperança de voar.”*

Jailson Galegão

## RESUMO

A ropivacaína (RVC) tem sido amplamente utilizada na prática clínica por possuir um perfil farmacológico mais seguro comparado aos anestésicos locais (AL) utilizados, sendo limitada por sua curta duração, devido à sua rápida transferência e redistribuição do local da injeção. Sistemas de liberação sustentada (“drug delivery systems”), como lipossomas multivesiculares (LMVV) e univesiculares (LUV) com gradiente iônico, têm sido estudados para diminuir sua redistribuição e aumentar a duração de ação de AL. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade e a toxicidade de duas novas formulações lipossomais com gradiente iônico comparadas com a ropivacaína (RVC) livre em solução aquosa. As formulações utilizadas foram F1 (LMVV pH 5.5 citrato + RVC 0,75%); F2 (LMVV pH 7,4 sulfato +LUV pH 5,5 + RVC 0,75%); F3 (LMVV pH 5.5 citrato + RVC 2%); F4 (LMVV pH 7,4 sulfato +LUV pH5,5 + RVC 2%); F5 (RVC 0,75%) e F6 (RVC 2%). Foram utilizados ratos Wistar machos (300-350g) divididos em 6 grupos (n = 6) que foram submetidos ao bloqueio do nervo ciático com as formulações descritas acima (0,4mL). Para verificar a efetividade do bloqueio do ciático foi utilizado o teste de Pressão na Pata, e a observação do bloqueio motor. Foram avaliadas a viabilidade celular em cultura de células de Schwann e a toxicidade local através de avaliação histopatológica do nervo ciático (48 horas e 7 dias após os tratamentos). Os dados obtidos foram analisados com ANOVA/Tuckey – Kramer com nível de significância de 5%. O teste de bloqueio sensorial mostrou que as formulações com lipossoma obtiveram maior atividade anestésica em relação à RVC livre (F5 e F6) ( $p < 0,001$ ). Em relação ao bloqueio motor as formulações apresentaram diferenças significativas no Tmax na comparação entre F4 e F6 ( $p < 0,01$ ). Na análise histopatológica as formulações lipossomais apresentaram uma toxicidade menor que o grupo controle positivo (Lidocaína 10%) ( $p < 0,05$ ).

**Descritores em Português:** Ropivacaína. Anestésico Local. Lipossoma.



## ABSTRACT

Ropivacaine (RVC) is a local anesthetic (LA) largely used in the clinical practice it is associated to less systemic toxicity, but RVC presents short duration of action, due to its rapid transfer and redistribution of the injection site. Pharmaceutical formulations prepared with different carriers ("drug delivery systems"), such as liposomes with ionic gradient, can prolong anesthetic effect and reduce redistribution. Thus, the aim of this study was to evaluate the effectiveness and toxicity of two new formulations of RVC encapsulated in liposomes with ionic gradient compared with RVC in aqueous solution. The formulations used in this study were: F1 (LMVV pH 5.5 citrate + RVC 0,75%); F2 (LMVV pH 7,4 sulfate +LUV pH 5.5 + RVC 0,75%); F3 (LMVV pH 5.5 citrate + RVC 2%); F4 (LMVV pH 7.4 sulfate +LUV pH5.5 + RVC 2%); F5 (RVC 0,75%) e F6 (RVC 2%). Wistar rats were divided into six groups (n=6) and received sciatic nerve blockade with the six formulations previously described (0.4 mL). To verify the anesthetics effects the animals were submitted to the pain pressure test and the motor blockade was also observed. Schwann cell viability and histopathology of sciatic nerve region were also assessed after 48 hours and 7 days after the treatments. Data were submitted to statistical analysis (ANOVA/Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ). Duration and intensity of the sensory blockade were higher with the liposomal formulations when compared to the plain RVC solution ( $p < 0.05$ ) and motor blockade presented higher Tmax for F4 compared to F6 ( $p < 0.01$ ). Histopathological evaluation showed higher toxicity for the positive control (lidocaine 10%) when compared to all formulations ( $p < 0.05$ ). Schwann cell viability was not affected by plain and liposomal formulations. This study showed that all new liposomal formulations enhanced the pharmacological efficacy of RVC (0.75% and 2%) after the sciatic nerve blockade model in rats and did not evoked significant toxic effects.

**Descritores em Inglês:** Ropivacaine. Local anesthetic. Liposome.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades farmacodinâmicas, físico-químicas e toxicidade RVC e BVC. ....	18
Tabela 2. Duração média ( $\pm$ Desvio Padrão) em minutos do bloqueio sensorial para as concentrações de RVC 0,75% e 2%.....	37
Tabela 3. LT, Tmax e Trec induzida pela RVC livre e encapsulada a lipossomas nas diferentes formulações utilizadas.....	38
Tabela 4. Medianas (limites mínimo – máximo) dos escores inflamatórios das formulações a 0,75% de RVC e controles nos tempos de 2 e 7 dias após o tratamento .....	38
Tabela 5. Medianas (limites mínimo – máximo) dos escores inflamatórios das formulações a 2% de RVC e controles nos tempos de 2 e 7 dias após o tratamento .....	39
Tabela 6. Viabilidade celular das células de Schwann após 2 e 4 horas do tratamento com as formulações lipossomais de RVC em diferentes concentrações e os grupos controles. ....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos anestésicos locais.....	14
Figura 2. Mecanismo de ação dos AL.....	16
Figura 3. Estrutura química da BVC (QUEIROZ, 2012) .....	17
Figura 4. Estrutura da ropivacaína com os enantiômeros R e S .....	19
Figura 5. Representação dos lipossomas.. .....	21
Figura 6. Representação da formação do gradiente iônico. ....	25
Figura 7. Imunomarcção para Vimentina .....	32
Figura 8. Curva efeito x tempo do teste PWTP com RVC a 0,75% .....	35
Figura 9. Curva efeito x tempo do teste PWTP com RVC a 2%. ....	36
Figura 10. Análise histológica da região do nervo ciático após 2 dias da injeção .....	40
Figura 11. Análise histológica da região do nervo ciático após 2 dias da injeção.....	40
Figura 12. Análise histológica da região do nervo ciático após 7 dias da injeção.....	41
Figura 13. Análise histológica da região do nervo ciático após 7 dias da injeção.....	41
Figura 14. Curva de viabilidade celular das células de Schwann após 2 horas.....	42
Figura 15. Curva de viabilidade celular das células de Schwann após 4 horas.....	43
Figura 16. Curva da porcentagem da viabilidade celular das células de Schwann após 2 horas do tratamento .....	44
Figura 17. Curva da porcentagem da viabilidade celular das células de Schwann após 4 horas do tratamento. ....	44

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Anestésico local	<b>AL</b>
Área sob a curva	<b>ASC</b>
Bupivacaína	<b>BVC</b>
Fosfatidilcolina de Ovo	<b>EPE</b>
Fosfatidilcolina de Soja	<b>SPC</b>
Fosfodilcolina de Soja Hidratada	<b>HSPC</b>
Limiar basal	<b>LB</b>
Lipossomas Univesiculares	<b>LUV</b>
Lipossomas Multivesiculares	<b>LMVV</b>
Tempo de recuperação	<b>Trec</b>
Tempo de latência	<b>LT</b>
Tempo para efeito máximo	<b>Tmáx</b>
Ropivacaína	<b>RVC</b>
Vesículas unilamelares pequenas	<b>SUV</b>
Vesículas multilamelares	<b>MVL</b>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Anestésicos locais (AL) .....	14
1.1.1. Ropivacaína (RVC).....	18
1.2. Formulações de liberação modificadas (“Drug Delivery Systems”) lipossomais .....	19
1.2.1. Lipossomas combinados com gradiente iônico.....	23
2. OBJETIVOS .....	27
2.1. Objetivo geral. ....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1. Material:.....	28
3.2. Métodos:.....	28
3.2.1. Preparo das formulações.....	28
3.2.2. Avaliação da efetividade.....	29
3.2.3. Toxicidade local.....	30
3.2.4. Avaliação da citotoxicidade em cultura de células de Schwann.....	31
3.2.5. Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.2. Bloqueio motor. ....	37
4.3. Avaliação da toxicidade local.....	38
4.4. Avaliação da citotoxicidade em cultura de células de Schwann.....	42
5. CONCLUSÃO .....	45
6. REFERÊNCIAS .....	46
7. ANEXOS.....	56

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a *Associação Internacional para o Estudo da Dor*, a dor é definida como uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou relacionada à lesão real ou potencial nos tecidos (CARPENTER e DICKENSON, 2002; SAPOLA et al., 2015). A dor é uma resposta adaptativa importante que tem como princípio a retirada e proteção do tecido danificado durante o processo de cicatrização (GRACE et al., 2015).

A sensação dolorosa envolve a transformação dos estímulos (mecânico, térmico ou químico) em atividade elétrica neuronal. A informação é então conduzida do local de origem periférico para o Sistema Nervoso Central (SNC) através de uma série de neurônios nociceptivos (neurônios aferentes de primeira ordem). O sinal nociceptivo é então transmitido para sinapses centrais que liberam neurotransmissores como glutamato e neuropeptídeos, como a substância P ou gene relacionado á calcitonina - CGRP. Estes neurotransmissores excitam o neurônio de segunda ordem no corno dorsal da medula ou no cerebelo. O neurônio de segunda ordem leva a informação para neurônios de terceira ordem que se projetam para áreas corticais e subcorticais gerando a percepção e a experiência multidimensional de dor. A sensação dolorosa resulta da ativação de várias estruturas centrais. O neurônio de terceira ordem que tem origem no tálamo pode se projetar para várias áreas corticais e subcorticais que codificam informações: sensoriais discriminativa (área S1 cortical, por exemplo), emocionais (córtex anterior cingulado, amígdala e córtex insular, por exemplo) e cognitivas da dor (córtex pré-frontal, por exemplo). Pode ainda ocorrer modulação descendente noradrenérgicos e serotonérgicos que influenciam a resposta e a percepção da dor (OSSIPOVI, 2010; GRACE et al., 2015).

A sensação dolorosa pode ter duração maior que a resolução da injúria inicial, e, neste caso a dor é resultado de processo fisiológico mal adaptado e/ou de funcionamento anormal do SNC e é considerada como um processo patológico. Além destes mecanismos neuronais patológicos, ocorre sinalização do sistema neuroimune. Sinalização bidirecional ocorre entre neurônios e células imunocompetentes do SNC como as células da glia (KRAYCHETE et al., 2016). De acordo com a *Associação Internacional para o Estudo da Dor* ([www.iasp-pain.org](http://www.iasp-pain.org), Acesso em: 16 out 2016), a dor afeta no mínimo 30% dos indivíduos ao longo da vida e em 10 a 40% deles, tem duração superior a um dia. A ocorrência da dor crônica no mundo está presente entre 7 a 40% da população mundial e cerca de 50 a 60% dos que sofrem dela ficam parcial ou totalmente incapacitados para o trabalho. Outro fator que tem impacto significativo na vida dos

pacientes é a dor pós – operatória que pode se manter por meses após a cirurgia, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo.

Apesar de inúmeras terapias de analgesia, com diferentes medicações (opióides, antiinflamatórios, barbitúricos e anestésicos locais), o controle da dor ainda é um desafio. A maior parte destas modalidades de analgesia apresentam limitações como curta duração, e necessidade de múltiplas administrações (MACINTYRE et al., 2011; KRAUSE et al., 2016).

### 1.1. Anestésicos locais (AL)

Os anestésicos locais podem ser definidos como substâncias químicas capazes de bloquear de forma reversível a transmissão do estímulo nervoso no local de aplicação, inibindo a percepção das sensações, especialmente a dor, e prevenindo o movimento, sem ocasionar alterações no nível da consciência (KATZUNG; 2007; MASCARENHAS et al., 2011; DE PAULA et al., 2012; VERLINDE et al.,2016).

A molécula de um AL (figura 1) é constituída por um anel aromático em uma de suas extremidades (hidrofóbica) e em outra, na maioria dos casos, um grupo amino (hidrofílica) (BECKER; REED, 2012).

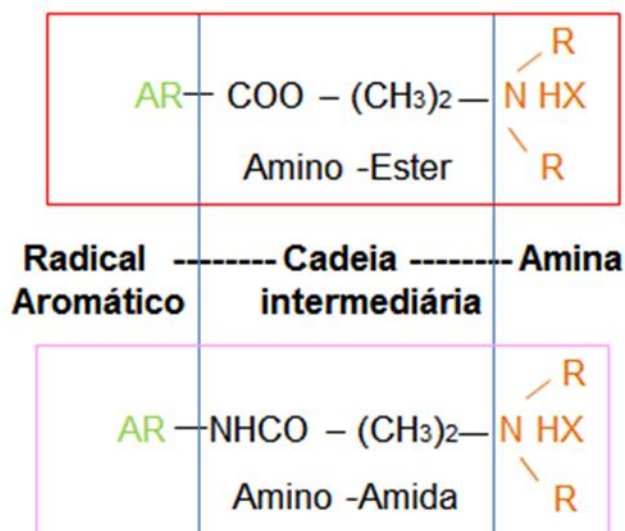


Figura 1. Estrutura química dos anestésicos locais. A figura mostra esquematicamente a estrutura química dos AL, com a descrição das duas cadeias intermediárias responsáveis pela classificação do composto (adaptado de SHIPTON, 2012).

A segunda porção corresponde à parte ionizável da molécula e o grupo lipossolúvel que influencia na sua capacidade de difusão na membrana. Estas extremidades são ligadas por uma cadeia intermediária que determina a classificação do AL como amino-éster ou amino-amida (SHIPTON, 2012).

O tipo de ligação da cadeia intermediária também determina a biotransformação dos AL. As moléculas do tipo éster sofrem rápida hidrólise no plasma por esterases não específicas, já as amino-amidas são metabolizadas no fígado por enzimas do citocromo P450 e são mais estáveis no sangue, possuindo uma duração e meia vida maior (SHIPTON,2012).

Os AL encontram-se na forma protonada e neutra em pH fisiológico (pH 7,4). A forma neutra tem maior coeficiente de partição nas membranas biológicas e a forma ionizada tem maior difusão em meio aquoso. Essa característica é determinante no mecanismo de ação do fármaco (TSUCKIYA; MIZOGAMI, 2013). Assim, os AL encontram-se na forma protonada e neutra e isso ocorre, pois estas moléculas possuem em sua maioria um pKa (pH no qual metade do fármaco encontra-se ionizado) entre 7,6 – 8,9 (DE ARAUJO et al., 2008<sup>a</sup>). No pH 7,4 a maior porção do grupo amina está protonada,e, uma pequena porém significativa parte encontra-se na forma neutra ou desprotonada.

Após um estímulo doloroso, ocorre a abertura rápida dos canais de sódio regulados por voltagem e aumento da condutância do íon Na<sup>+</sup> através destes canais (figura 2), despolarizando a membrana neuronal (BEIRANVAND et al., 2016). Estes canais possuem em sua estrutura uma subunidade  $\alpha$  grande com quatro domínios e subunidades  $\beta$  auxiliares. O AL na forma neutra difunde pela membrana biológica e liga-se na subunidade  $\alpha$  do canal, estabilizando-o ou inativando, já a forma protonada liga-se de maneira específica ao canal de sódio aberto, de maneira mais forte e pelo lado citoplasmático. Estas ligações com o canal de Na<sup>+</sup> impedem a despolarização da membrana neuronal e a propagação do potencial de ação excitatório, o que tem como consequência a paralização da transmissão do estímulo (GRILLO et al., 2010; PAYADEL et al., 2012; ISIDORO et al., 2014; CATTERALL; SWANSON, 2015).



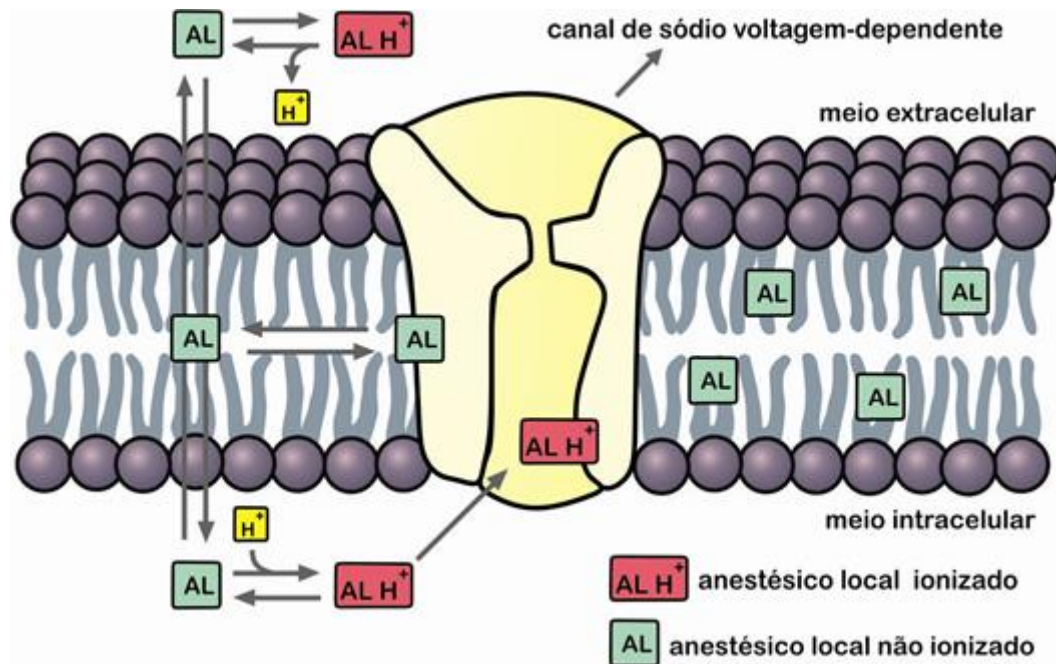


Figura 2. Mecanismo de ação dos AL. Primeiramente o AL difunde-se na membrana na forma neutra, sofre protonação no citoplasma onde se liga ao canal de sódio voltagem – dependente (QUEIROZ, 2012)

A maioria dos AL tem ação vasodilatadora, o que aumenta a taxa de absorção sistêmica. Esta característica diminui sua ação e aumenta sua toxicidade, pois uma vez na circulação, o fármaco se liga aos canais de sódio voltagem dependentes impedindo a despolarização do músculo cardíaco e do tecido nervoso (DRAGOO et al., 2011; WOLFE; BUTTERWORTH, 2011; KHOSRAVI et al., 2011; SCARPARO et al., 2016). As características estruturais e físico-químicas dos AL determinam o potencial e a duração de sua ação farmacológica. A potência dos ALs está atrelada a sua toxicidade, ou seja, quanto mais potente mais tóxico (DE PAULA et al., 2012)

O principal efeito encontrado no Sistema Nervoso Central é uma junção de depressores e estimulantes. Os primeiros sintomas de toxicidade são: espasmos musculares, tontura, confusão mental e convulsões. Com altas concentrações plasmáticas ocorre depressão do SNC e parada respiratória, sendo esta a principal causa de óbitos decorrente da superdosagem anestésica (BECKER; REED, 2012). No sistema cardiovascular é observada uma maior resistência aos efeitos adversos dos AL quando comparados ao sistema Nervoso Central (MERCADO; WEINBERG, 2011; VASQUES et al., 2016).

A toxicidade encontrada nos sistemas cardiovascular e nervoso tem relação direta com o tipo de AL, sendo que os mais hidrofóbicos possuem uma maior afinidade pelas proteínas dos

canais de sódio, tendo uma maior potência e toxicidade. (WOLFE; BUTTERWORD, 2011; SELLBRANT et al., 2016, MATHER et al., 2005; DICKERSON; APFELBAUM, 2014; VERLINDE et al., 2016)

Em 1957 foi sintetizada a molécula de bupivacaína (BVC), sendo um AL da classe das amino - amida, caracterizada pela sua alta lipossolubilidade e por possuir um carbono quiral (assimétrico) no grupamento amina que lhe confere a propriedade de isômeros ópticos (sob a forma dextrógira R(+) ou levógira S(-)), sendo uma mistura racêmica de 50% de cada.

É um dos AL mais utilizado em procedimentos cirúrgicos de longa e média duração e há relatos de toxicidade cardíaca e neurológica, principalmente quando são acidentalmente administrados na via intravenosa (LAGAN; MCLURE, 2004; DE PAULA et al., 2010; HAMAJI et al., 2013; ILHAM et al., 2014).

Quanto à toxicidade da BVC (figura 3) estudos verificaram que o isômero levógira S(-) possuía uma menor toxicidade no sistema cardiovascular, devido à menor afinidade ao canal de potássio dependente de ATP nas fibras do miocárdio (LEONE et al., 2008; ZHANG et al., 2016). Em virtude desta descoberta, novos AL foram pesquisados, para obter formas mais potentes e menos tóxicas, o que em 1983, levou ao registro da ropivacaína (RVC) (CEDERHOLM, 1997).

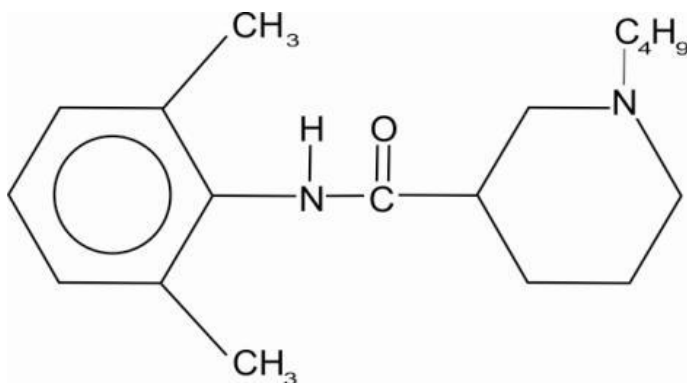


Figura 3. Estrutura química da BVC (QUEIROZ, 2012)

Em 1997, Kenudsen e coautores realizaram um estudo com doze voluntários que receberam infusão contínua de RVC e BVC na mesma dose ( $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) e foram observados em relação aos efeitos destas drogas no SNC (distúrbios visuais, auditivos e rigidez muscular) e SCV (diminuição das contrações do músculo cardíaco). Os resultados obtidos demonstraram uma tolerância maior da RVC no SNC, com recuperação mais rápida e ausência significativa de

cardiotoxicidade em nove voluntários, já a BVC apresentou cardiotoxicidade e tempo de recuperação maior, com o aumento da dose.

### 1.1.1. Ropivacaína (RVC)

A RVC é um AL de longa duração da classe das amino-amidas com propriedades farmacodinâmicas semelhantes à BVC (tabela 01), porém, possui um perfil farmacológico mais seguro no SNC e cardiovascular, devido à sua menor partição em membrana (KUTHIALA; CHAUDHARI, 2011; GUO et al., 2014). Outra característica que tem estimulado a crescente utilização da RVC é o bloqueio motor diferenciado, pois este fármaco tem preferência por fibras sensoriais a motoras, o que lhe traz uma recuperação do bloqueio motor mais rápido (KUTHIALA; CHAUDHARI, 2011; GUO et al., 2014).

Tabela 1. Propriedades farmacodinâmicas, físico-químicas e toxicidade RVC e BVC.

AL	Tempo anestesia (h) <sup>a</sup>	Cardiotoxicidade <sup>b</sup>	Afinidade pelas fibras musculares <sup>c</sup>	pKa <sup>a</sup>	% estado ionizado (pH7,4) <sup>d</sup>	Solubilidade lipídica (octanol) <sup>d</sup>
BVC	4-6	Maior	Maior	8.2	83	3420
RVC	2-4	Menor	Menor	8.1	83	775

<sup>a</sup> DE JONG, 1994; <sup>b</sup> LEONE et al., 2008, <sup>c</sup> GUO et al., 2014, <sup>d</sup> DE ARAUJO et al., 2008,

Estudos com coelhos demonstraram que a dose cumulativa da RVC para provocar parada cardíaca comparado com a BVC é 3 vezes maior. Além disso, RVC não promove acidentes vasculares e alteração da frequência cardíaca em doses habituais (LEONE et al., 2008).

Ao contrário da BVC, a RVC é um isômero levógiro puro S-RVC (figura 4) (MELO et al., 2009; RANASINGHE; BIRNBACH, 2010). A solubilidade da RVC em lipídio é 4 vezes menor quando comparada com a BVC e sua biotransformação ocorre de maneira mais rápida pelo fígado por hidroxilação aromática mediada pelo Citocromo P-450 gerando principalmente o metabólito 3'hidroxi-ropivacaína, que possui menor atividade farmacológica. Sua concentração plasmática dependente da dose e sítio de injeção e sua eliminação é renal (MATHIEU et al., 2006). A RVC é rapidamente absorvida e distribuída aos órgãos com alta perfusão como fígado,

pulmão, cérebro e coração, tendo sua depuração 30% maior que a BVC, o que confirma sua menor toxicidade acumulativa durante a administração contínua (ZHOU et al., 2016).

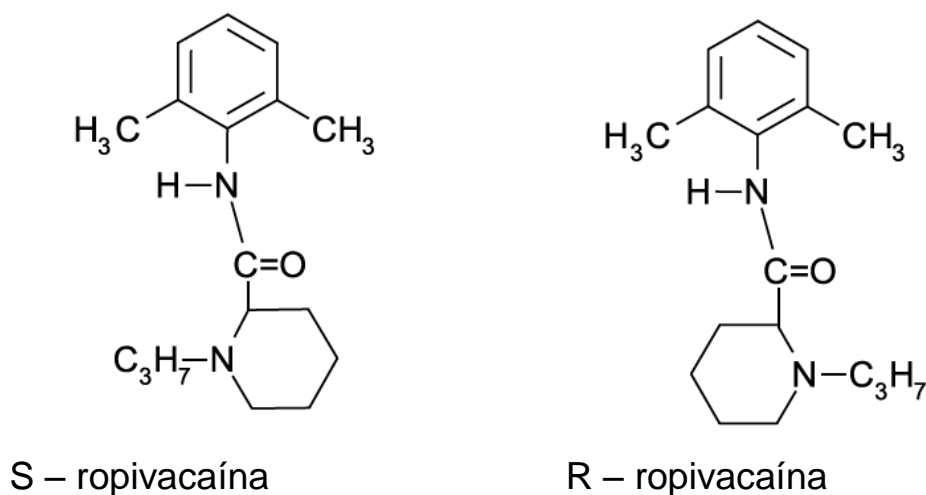


Figura 4. Estrutura da ropivacaína com os enantiômeros R e S. Adaptado de SHIPTON, 2012.

Apesar da eficácia conhecida, os anestésicos locais são moléculas pequenas e são rapidamente retiradas do sítio de injeção o que limita a duração da anestesia e aumenta a sua toxicidade. Assim, para diminuir estas limitações, podemos utilizar formulações de liberação modificada com diferentes tipos de carreadores, como lipossomas, ciclodextrinas, polímeros ou hidrogéis termorreversíveis (DE PAULA et al., 2012; CEREDA et al., 2013; AKKARI et al., 2016; CALAFATTI et al., 2016).

## 1.2. Formulações de liberação modificadas (“Drug Delivery Systems”) lipossomais

As formulações de liberação modificadas são classificadas em liberação retardada, repetida, sustentada e controlada (FREITAS et al., 2006; AULTON, 2005; AULTON; TAYLOR, 2013).

Nas liberações retardadas, os fármacos não são liberados imediatamente após a administração tendo como exemplo as formulações gastro resistentes. As formulações de liberação prolongada tem sua concentração plasmática eficaz mantida por um período maior que as formas convencionais. Na liberação sustentada a droga é liberada inicialmente obtendo

a ação terapêutica necessária e à manutenção da concentração constante durante um período maior de tempo representando uma situação ideal. Formulações com liberação repetida apresentam uma dose individual, que é liberada regularmente logo após a administração, e uma segunda ou até terceira doses que são subsequentemente liberadas, obtendo-se uma curva de concentração plasmática semelhante às resultantes de doses consecutivas de medicamentos convencionais (AUTON, 2005; LANCHMAN et al., 2001; ANSEL et al., 2000).

As formulações de liberação controlada podem reduzir a taxa de absorção sistêmica do fármaco e permitir sua permanência por mais tempo no sítio de injeção, reduzindo a dose e picos de concentração plasmáticos (CAI et al., 2014). Essas formulações formam um complexo (fármaco/molécula carreadora), que gera a liberação gradual do AL e, portanto, uma menor toxicidade (DE PAULA et al., 2010 ; 2012). No caso dos AL, a liberação lenta do fármaco evita a ocorrência de elevada concentração plasmática, o que permite administrar doses maiores de maneira mais segura (VAHABI et al., 2014). Além disso, a lenta liberação pode estar associada a maior atividade anestésica (AKKARI et al., 2016).

Dentre a possibilidade de carreadores, podemos citar os lipossomas, que permanecem no sítio de injeção por mais tempo, liberando o AL gradualmente (WEINIGER et al., 2010; DE PAULA et al., 2012; PINTO et al., 2000; CEREDA et al., 2004, 2006, 2008, 2013; DE ARAÚJO et al., 2004, 2008a, 2008b; FRANZ-MONTAN et al., 2007, 2010a,b, 2012a,b, 2013, 2015; ALMEIDA 2008; TOFOLI et al., 2011, 2012; SOBRAL 2012; VIEIRA 2012).

Os lipossomas foram descobertos em 1963, quando foi observada a formação de vesículas fosfolipídicas fechadas em presença de água após agitação vigorosa (SHARATA;KATZ 1996). Na década de 70, começaram a ser utilizados e bem aceitos como carreadores de fármacos por possuírem uma boa biocompatibilidade, (não ativando o sistema imune) e serem biodegradáveis (TORCHILIN, 2012; ALLEN; CULLIS, 2013).

Atualmente, devido a grande possibilidade de utilização e característica de incorporação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, sua baixa toxicidade, os lipossomas tem sido fonte de pesquisas constantes para utilização como carreadores de componentes terapeuticamente ativos (MELO et al., 2014).

Os lipossomas são constituídos por um único tipo de lipídio ou por uma combinação de vários e podem ser vesículas nanométricas ou micrométricas, com uma ou mais bicamadas lipídicas e compartimentos aquosos no seu interior. Os lipídios usados nos lipossomas se agrupam em bicamadas com suas caudas hidrofóbicas voltadas para o interior das vesículas e

as cabeças hidrofílicas voltadas para o ambiente externo, em contato com o meio aquoso. Esta organização em bicamada lipídica e core aquoso permite a encapsulação de fármacos hidrofóbicos, hidrofílicos e anfipáticos. Esta característica facilita a encapsulação de moléculas anfipáticas como os AL, pois a sua porção ionizada tem tendência a permanecer nos compartimentos aquosos e a parte hidrofóbica permanece na bicamada lipídica (ALLEN;CULLIS, 2013; BOOGAERTS et al., 1993; DE PAULA; SCHREIER, 1996; MOWAT et al., 1996; BUCALO et al., 1998; ARAÚJO et al., 2003; FELNEROVA et al., 2004; ROSE et al., 2005; TORCHILIN, 2005; HUNG, 2006; DE PAULA et al., 2010; DE PAULA et al., 2012; TOFOLI et al., 2012; OZBAKIR et al., 2014; SERCOMBE et al., 2015).

Os lipossomas podem ser preparados por inúmeros processos como: agitação, extrusão, liofilização, congelamento e outros. Fosfolipídios expostos a um ambiente aquoso levam à formação espontânea de bicamadas fechadas envolvidas em um determinado volume de solvente, sendo obtidas vesículas lipídicas com várias membranas concêntricas de diâmetros e formato variados. Os lipossomas de preparação mais rápida são as vesículas multilamelares (MVL) que tem estrutura semelhante à cebola, possuindo várias bicamadas lipídicas. A partir destas, são obtidos os demais tipos de lipossomas: vesículas unilamelares pequenas (SUV com diâmetro: 45 a 80 nm); vesículas unilamelares grandes com uma única bicamada envolvendo a solução aquosa (LUV com diâmetro superior a 100 nm) e os lipossomas com várias lamelas não concêntricas com diversos compartimentos aquosos (LMVV) (JESORKA; ORWAR, 2008; WILES; NATHANSON, 2010; NOGUEIRA et al., 2015). (figura 5)



Figura 5. Representação dos lipossomas. MLV vesículas multilamelares grandes, LUV, vesículas unilamelares grandes, LMVV, vesículas multivesiculares grandes. Adaptado de MUNIZ, 2015.

Os lipossomas podem sofrer alterações químicas e físicas, o que diminui a sua vida útil.

A estabilidade destes carreadores é determinada não somente pelo ambiente biológico com o qual os lipossomas entram em contato e com o princípio ativo à qual está veiculado, mas também pelas características estruturais dos fosfolipídios. Assim, fosfolipídios que contêm duplas ligações são mais sensíveis a peroxidação e, portanto, são mais instáveis. A decomposição química dos lipídeos (hidrólise ou oxidação) causa instabilidade física nas formulações. A fim de minimizar essas questões a associação de um lipídio saturado que é estruturalmente mais organizado e compactado, com um de cadeia insaturada, é utilizada em formulações lipossomais (WARREN, 1987; SILVA et al., 2015).

Os lipídios mais usados em lipossomas são compostos por associações de fosfatidilcolina (lecitina) de soja ou ovo com colesterol. A lecitina tem como característica ser o fosfolipídio mais abundante das membranas biológicas. Os dois tipos de lecitina diferem em relação ao número de ácidos graxos esterificantes. A de soja possui um número superior destes ácidos graxos, o que vai determinar um número maior de insaturações em suas cadeias carbônicas e uma menor degradação por oxidação em comparação com a de ovo (FRÉZARD et al., 2005; SAMAD et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2015).

O colesterol é encontrado nas membranas dos animais, e é utilizado na composição dos lipossomas melhorando as características da bicamada, modulando sua fluidez, reduzindo a permeabilidade e a tornando mais estável em fluidos biológicos como o sangue/plasma, evitando a interação e desestabilização das formulações por proteínas do sangue, tais como albumina, m-transferrina e macroglobulina. (DE ARAUJO et al., 2008; CHORILLI et al., 2007; GUBERTOR, 2011; NAGAYASU et al., 1999; LATIN BRISAERT et al., 2007).

O uso de lipossomas para carreamento dos AL teve seu início em 1988, com aplicação tópica da tetracaína a 1% isolada, comparada a tetracaína a 0,5% encapsulada a lipossoma multilamelar em humanos saudáveis, obtendo um prolongamento da anestesia de 4 horas. Vários trabalhos foram descritos na literatura com formulações lipossomais associadas a ALs como mepivacaína (DE ARAUJO et al., 2004; TOFOLI et al., 2010 e 2012), prilocaína (CEREDA et al., 2004 e 2006), lidocaína (CEREDA et al., 2006; FRANZ-MONTAN et al., 2015), benzocaína (FRANZ-MONTAN et al., 2013; SILVA, 2007), ropivacaína (DE ARAUJO et al., 2008b; VIEIRA, 2012, FRANZ-MONTAN et al., 2007; AKKARI et al., 2016) e bupivacaína (BARENHOLZ; GARBUZENCO, 2007) em concentrações clínicas, obtendo resultados promissores.

No entanto, AL mais hidrofóbico tem um benefício menor quando associados a lipossomas convencionais (DE PAULA et al., 2010, 2012), isso pode ser explicado pela

limitação da encapsulação de grandes quantidades de anestésicos devido a sua baixa solubilidade aquosa. A fim de diminuir estas limitações uma estratégia é o uso de lipossomas com gradiente iônico e/ou de pH, além do uso de associações de lipossomas aceptores e doadores (sistemas combinados) (SILVA et al., 2015).

### **1.2.1. Lipossomas combinados com gradiente iônico.**

A criação de gradiente de pH e íons é muito eficaz e utilizada para encapsular fármacos em lipossomas (FENSKE; CULLIS, 2007). O primeiro medicamento lipossomal com gradiente iônico feito com sulfato de amônio, aprovado nos EUA foi a doxorubicina (Doxil®) em 1999. Este medicamento é indicado no tratamento de diversos tumores, tais como leucemias, sarcomas, neuroblastomas, carcinomas e linfomas e apresenta em sua formulação sal de sódio de N-(carbonil-metoxipolietilenoglicol 2000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (MPEG-DSPE), HSPC e colesterol. A droga lipossomal é estável no sangue e a medição direta da doxorubicina associada a lipossomas mostra que pelo menos 90% da droga permanece encapsulada durante a circulação (BARENHOLZ; PEER, 2012; JONES et al., 1983).

A propriedade físico-química do fármaco influencia a sua porcentagem de encapsulação. Os AL por serem anfipáticos se ionizam próximos ao pH fisiológico, o que lhe confere uma dificuldade de se manter no, lipossoma e rapidamente passam pela camada lipídica (BARENHOZ; HARAN, 1994). O gradiente influencia a distribuição dos ácidos e bases fracas na membrana e apresentam porcentagem de encapsulação superior para ativos que encontram –se ionizados fracamente (GRANT et al., 2004).

A ropivacaína pelas suas características de base fraca e ionização em pH fisiológico é ideal para o uso desta ferramenta. Essa encapsulação ocorre, quando o fármaco é adicionado ao meio externo da suspensão lipossomal, difundindo a forma neutra em resposta ao gradiente de concentração e pH para o interior dos lipossomas. O fármaco se protona (AL-H<sup>+</sup>) e fica “aprisionado” dentro da vesícula, já que a forma protonada tem baixo coeficiente de difusão através da membrana. (FENSKE; CULLIS, 2007; COHEN et al., 2013).

Os íons frequentemente utilizados para a formação do gradiente iônico são os da série de Hofmeister. Conhecidos por alterarem a estrutura da água, modulando sua propriedade (tensão superficial, viscosidade, condutividade), sendo classificados em cosmotrópicos que



diminuem a solubilidade aquosa em soluto, e caotropico que aumentam a solubilidade da água em soluto (citrato, sulfato, fosfato) (SALY; SCHEIR, 2004).

Os ânions sulfato e citrato utilizados nas composições das formulações lipossomais em estudo foram escolhidos por possuírem uma forte interação com a água, organizando sua molécula e por consequência dificultando a liberação dos AL. Essa característica faz com que o fármaco permaneça por mais tempo no local de ação, portanto, diminuindo sua presença na circulação sistêmica e em paralelo abrandando a toxicidade dos AL (GRANT et al., 2004; COHEN et al., 2012; SILVA et al., 2015).

Em 1996, foi preparado o primeiro lipossoma com gradiente iônico associado a um AL (bupivacaína). Estes lipossomas eram LUV e apresentavam o citrato para formação do gradiente iônico. Ao ser comparado com lipossoma sem gradiente foi constatado a sua maior eficiência como carreador e um maior prolongamento da anestesia (MOWAT et al., 1996). Isto foi explicado pelo fato dos AL serem compostos, em sua maioria, por bases fracas, o que facilita sua incorporação no interior mais ácido, ionizando e não atravessando a barreira lipídica, aumentando assim seu tempo de liberação (HARAN et al., 1993).

No decorrer dos estudos com novas formulações com gradiente iônico em 2004, Grant e colaboradores incorporaram a BVC, em LMVV preparado com grande concentração de sulfato de amônio no meio aquoso interno. Após a saída da amônia para o meio externo ocorreu a formação do gradiente iônico, e por consequência ocorreu a diminuição do pH interno e a predominância do anestésico na forma protonada, o que caracterizou a dificuldade ainda mais acentuada do AL atravessar a bicamada lipídica (figura 6), permanecendo por mais tempo no sítio de ação e diminuindo os efeitos colaterais (GRANT et al., 2004).

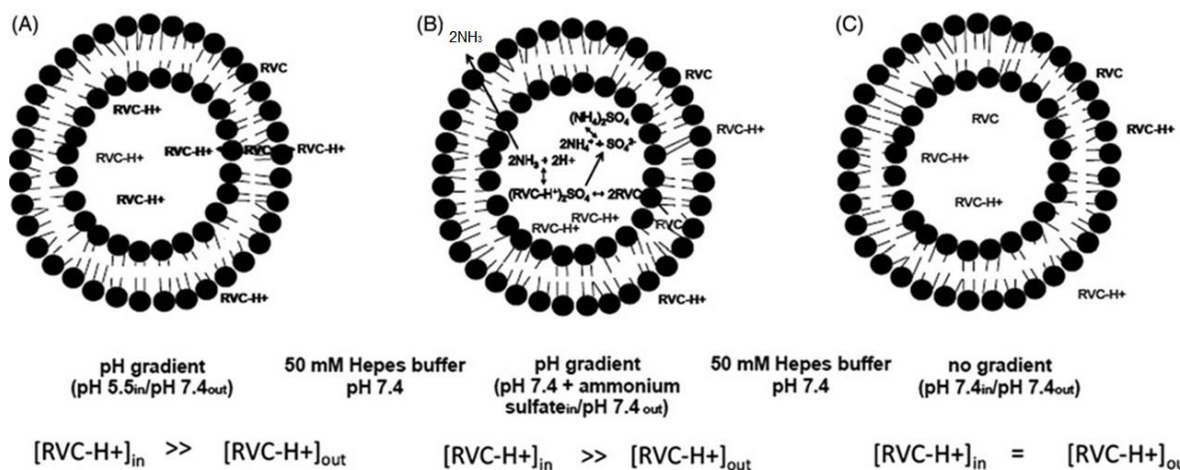


Figura 6. Representação da formação do gradiente iônico. (A, B) com gradiente iônico e (C) sem o gradiente iônico transmembranar. Os gradientes foram criados preparando os lipossomas com um pH interno ácido (A) ou com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250 mM no interior aquoso (B), enquanto que o meio de vesícula externa foi mantida a pH 7,4. Retirado de SILVA et al., 2015.

Recentemente vários estudos utilizaram lipossomas do tipo LMVV associado ao LUV com gradiente iônico, visualizando uma forte possibilidade para o uso clínico, por serem formulações simples e estáveis, possuindo uma maior ação carreadora (FRANZ et al., 2013; SILVA et al., 2015). Estas formulações que tem a combinação de dois lipossomas possuem um acceptor e um doador. O ativo é encapsulado no lipossoma doador e o lipossoma acceptor recebe parte do ativo que é liberado pelo doador (SILVA et al., 2015).

O primeiro estudo com AL nesta nova combinação foi com a BVC em 2007 por Barenholz e Garbuzenco em camundongos, quando foi utilizado dois lipossomas LMVV com gradiente iônico. O lipossoma doador foi composto por um lipídio saturado, com gradiente iônico de sulfato, e a característica do lipídio conferiu uma fluidez menor a este lipossoma. Já o lipossoma acceptor foi composto por colesterol com gradiente iônico de sulfato, com uma fluidez superior. A mistura dos lipossomas foi feita minutos antes de sua administração. Os resultados obtidos foram significativos, com redução da toxicidade e aumento de 8 vezes na dose letal quando injetado nos camundongos (BARENHOLZ; GARBUZENCO, 2007). Em virtude desses resultados com BVC, novas formulações tem sido pesquisadas utilizando combinações lipossomais com gradiente iônico, para aumentar a encapsulação da RVC (SILVA et al., 2015).

Silva (2015) avaliou aspectos físico-químicos, perfis de dissolução-liberação, citotoxicidade *in vitro* e desempenho farmacológico *in vivo* destas formulações lipossomais compostas por associações de três tipos diferentes de lipídios (fosfatidilcolina de soja (SPC)/colesterol/ $\alpha$ -tocoferol; fosfatidilcolina de ovo (EPC)/colesterol/ $\alpha$ -tocoferol e fosfatidilcolina

de soja hidrogenada (HSPC)/colesterol), com tamanho e características distintas dos lipossomas (LMVV, LUV e LMVs) e com gradientes iônicos e de pH (pH 7,4+sulfato de amônio; pH 5,5; pH 5,5+sulfato de amônio ou pH 5,5+citrato de sódio). As formulações que obtiveram melhor desempenho foram: LMVV com pH 5.5 e íon citrato de sódio contendo os lipídios HSC e colesterol (2:1) com RVC (0,75% e a 2%), e, lipossoma doador (LMVV) com pH 7,4 e íon sulfato de amônio para a geração do gradiente iônico e vesícula aceptora composta por lipossoma LUV pH 5,5 ambas com os lipídios HSC e colesterol (2:1). A RVC (0,75% e a 2%) foi encapsulada na formulação doadora.

Os dados obtidos por Silva (2015) demonstraram as vantagens da associação de lipossomas com gradiente iônico para o encapsulamento da RVC. Dentre as formulações testadas, as mais promissoras em relação aos aspectos físico-químicos, citotoxicidade e efeito farmacológico *in vivo* foram selecionadas para uma avaliação pré-clínica realizada no presente estudo. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar os ensaios pré-clínicos *in vivo* e *in vitro* para apoiar seu uso clínico futuro.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo o estudo pré clínico de novas formulações lipossomais comparadas com o fármaco livre (RVC) avaliando seu perfil farmacodinâmico e sua toxicidade local.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Determinar o perfil farmacodinâmico em ratos *Wistar* após o bloqueio do nervo ciático (ensaio *in vivo*).
2. Determinar a toxicidade local em ratos *Wistar* após o bloqueio do nervo ciático (ensaio *in vivo*).
3. Determinar a toxicidade em cultura em células de Schwann (ensaio *in vitro*).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material

Para o preparo das formulações foram utilizados Citrato de sódio (Merck®), cloridrato de ropivacaína (Cristália Ind. Química e Farmacêutica Ltda.), Colesterol (Sigma Chem. Co.), Fosfatidilcolina de soja hidrogenada- HSPC (pureza > 99%, Avanti Lipids, Inc.), sulfato de amônio (Merck®), Clorofórmio (Labsynth Ltda.), tampão acetato 50 mM pH 5,5 e tampão Hepes 50 mM pH 7,4 (Sigma Chem. Co.). Todos os outros reagentes foram de grau farmacêutico.

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Preparo das formulações

Para o preparo das vesículas de HSPC e colesterol foram dissolvidos os lipídios HSPC e o colesterol em clorofórmio na razão de 2:1, e evaporados, em seguida, sob fluxo de nitrogênio, para retirada do resíduo de solvente. O filme lipídico foi mantido no vácuo (350 mmHg) por 2 horas, à temperatura ambiente. A massa lipídica foi hidratada com 5 mL de solução contendo 250 mM de sulfato de amônio ou 300 mM de citrato de sódio em pH 5,5 ou 7,4 (MOWAT et al., 1996; GRANT et al., 2004), ou apenas com tampão Hepes pH 7,4 (lipossoma convencional) ou acetato pH 5,5. A concentração final de lipídios foi de 15 mM do tipo LMV.

Os lipossomas hidratados permaneceram em repouso (2-8°C) por duas horas. Os lipossomas LMV foram extrudados com uma Extrusora Lipex (Biomembranes Inc – Canadá) para obtenção dos lipossomas LUV e LMVV por 12 vezes em membranas de policarbonato com poros de 400 e 100 nm, respectivamente, sob pressão de nitrogênio 3,0 kgf/cm<sup>2</sup> ou 40 psi (CEREDA et al., 2004; SILVA et al., 2015). A extrusão ocorreu em temperatura superior à temperatura de transição de fases de cada lipídio utilizado. As vesículas LUV obtidas pela extrusão em membrana com poros de 100 nm foram submetidas a 10 ciclos de resfriamento e descongelamento/agitação de 300 rpm (freeze-tawing) em nitrogênio líquido e água a 37°C, para obter as vesículas LMVV. Sendo mantidas novamente em repouso.

Para gerar o gradiente de íons, após a hidratação/extrusão, o excesso de sal do meio aquoso externo dos lipossomas foi removido por ultracentrifugação (Ultracentrífuga Optima L 90K Coulter Beckman®) com tampão Hepes 50 mM pH 7,4 a 4°C, durante 2 horas, sob 120.000

g (processo repetido, através da ressuspensão do precipitado com o mesmo tampão) (CELANO et al., 2004; BARENHOLZ; GARBUZENCO, 2007; TU et al., 2015; SILVA et al., 2015).

Os lipossomas foram incubados com RVC a 0,75% e a 2% a temperaturas superiores à temperatura de transição de fases dos lipídios usados por 45 minutos (GRANT et al., 2004). O material foi então submetido à agitação prolongada (overnight a temperatura ambiente), e posteriormente foi armazenado em geladeira (2-8°C).

A formulação combinada foi obtida pela mistura dos lipossomas doadores (HSPC LMVV (7,4+sulfato)i) contendo RVC com os lipossomas aceptores (HSPC LUV (5,5)i) minutos antes da aplicação no presente estudo.

### **3.2.2. Avaliação da efetividade**

O perfil farmacodinâmico foi avaliado com o teste de Pressão na Pata (PWTP) em ratos Wistar com o Analgesímetro (Ugo Basile-Itália). O protocolo experimental foi submetido ao CEUA/UNICAMP e aprovado sob o número de protocolo 11/2015-04/2016(Anexo I).

Foram utilizados 48 (n=6) ratos Wistar adultos, machos e com peso variando entre 300 e 350 g, submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação ad libitum, temperatura ambiente monitorada a  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , alojados e aclimatados coletivamente no local de experimentação por 7 dias.

As formulações foram infiltradas (0,4 mL) nos animais na região de trocanter maior do fêmur com uma agulha hipodérmica de 21 G, na região próxima ao nervo ciático (ARAÚJO et al., 2008; TOBE et al., 2010) de acordo com descrito por LESZCZYNSKA e KAU (1992).

Para a realização dos testes pré-clínicos de efetividade foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais (n=6/grupo):

- F1: LMVV pH 5.5 + RVC citrato 0,75%
- F2: LMVV pH 7,4 sulfato +LUV 5,5 com RVC 0,75%
- F3: LMVV pH 5.5 + RVC citrato 2%
- F4: LMVV pH 7,4 sulfato +LUV 5,5 com RVC 2%
- F5: RVC 0,75% em solução aquosa
- F6: RVC 2% em solução aquosa

- C1: LMVV pH 5.5 citrato
- C2: LMVV pH 7,4 sulfato +LUV 5,5

Após o bloqueio do nervo ciático foi verificada a presença de bloqueio motor pela perda do controle motor do membro posterior direito (lado anestesiado) (FELDMAN; COVINO, 1988). A intensidade deste bloqueio motor foi verificada atribuindo-se valores de escore: 0 (uso normal dos membros posteriores), 1 (incapacidade de flexionar completamente os membros posteriores) e 2 (impossibilidade do uso dos membros posteriores) (GANTENBEIN et al., 1996, 1997; TOBE et al., 2010; ICKOWICZ et al., 2014). Essa avaliação foi realizada nos 5 primeiros minutos a cada minuto após a administração e, posteriormente, em intervalos de 5 a 10 minutos até que fosse verificada a recuperação total dos movimentos do membro anestesiado do animal (pelo menos 1 hora de observação). O efeito total foi estimado, para cada animal, utilizando-se a área sob a curva efeito (ASC). Foram avaliados latência (LT), tempo para o efeito máximo (Tmax) e tempo de recuperação (Trec).

O bloqueio sensorial foi avaliado pelo limiar de remoção da pata dos animais frente a um estímulo mecânico. Para a execução dos testes utilizou-se um analgesímetro (Ugo Basile-Itália), que gera um aumento linear da força (em gramas) exercida por uma extremidade plástica sobre a pata do animal (FLETCHER et al., 1997). Quinze minutos após a injeção das formulações, a pata do animal foi colocada sob a extremidade plástica do aparelho analgesímetro, onde a pressão foi aplicada e aumentada em ritmo constante até que o animal retirasse a pata como sinal indicativo da nocicepção (Pain Withdrawal Theshold to Pressure - PWTP). A analgesia foi definida como um aumento na constante da pressão suportada pelos animais, pelo menos 50 % maior que aquele observado nos grupos controle. O ponto final da analgesia foi estabelecido quando não houvesse diferença estatística entre os grupos testes e controle. Foi estabelecido um valor máximo (cut off) de 350 gramas, para evitar lesões nas patas e estimulação excessiva dos nociceptores (ARAÚJO et al., 2006).

### **3.2.3. Toxicidade local**

Para verificar a segurança local das formulações testadas foi realizada a análise histopatológica da região onde o nervo ciático foi bloqueado nos ratos submetido ao teste de PWTP. O protocolo experimental foi submetido ao CEUA/São Leopoldo Mandic e aprovado sob o número de protocolo 2016/012 (Anexo I).

Dois dias após o teste de PWTP, três animais de cada grupo (F1 a F6, C1 e C2) foram

sacrificados e as amostras coletadas foram fixadas com solução Bowin durante 24h e com solução de formalina a 10% durante 48h. O mesmo procedimento foi repetido após 7 dias para o restante dos animais de cada grupo. Após a fixação, as amostras foram desidratadas e incluídas em parafina. Cinco secções de cortes transversais (5µm) foram obtidos em cinco profundidades distintas (micrótomo Leica RM2145 - Leica Microsystems) e corados com hematoxilina e eosina e posteriormente foram fotografadas por um fotomicroscópio (Zeiss-AXIOSKOP2-PLUS).

As secções transversais foram analisadas qualitativamente, verificando a intensidade da infiltração leucocitária e/ou qualquer área de necrose por um indivíduo cego para os tratamentos.

As lâminas foram classificadas de acordo um escore de injúria: 1= injúria ausente ou em menos de 25%; 2= injúria presente em 25 a 50%; 3= injúria presente em mais de 50% da área observada.

#### **3.2.4. Avaliação da citotoxicidade em cultura de células de Schwann**

A linhagem de células neuronais de Schwann foram obtidas de amostras de nervo ciático de ratos Wistar UNIB com aproximadamente 6 semanas de vida. O explant de nervos foi removido em condições assépticas e dissecados do epineuro e tecidos neuronais adjacentes. As células foram cultivadas em meio Essencial Mínimo, modificação de Dulbecco (DMEM) suplementados com 10% de soro fetal Bovino (Cultilab®, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA). Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular.

As células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura, foi avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poliestireno, que foi o controle. Após as células atingirem 80% de confluência a partir do explant, foi realizada a subcultura e a caracterização das células para certificação da origem neuronal por meio de epifluorescência. Foram utilizados anticorpos primários anti-vimentina (1:300; Dako, Glostrup, DN), anti-S100 (1:300; Dako, Glostrup, DN) e anti-AE1/AE3 (1:75; Dako, Glostrup, DN) para marcação do citoesqueleto celular, célula de origem neuronal e epitelial, respectivamente. Os resultados evidenciaram imunomarcação positiva para vimentina e S100 confirmando a origem neuronal das células (Figura 7).



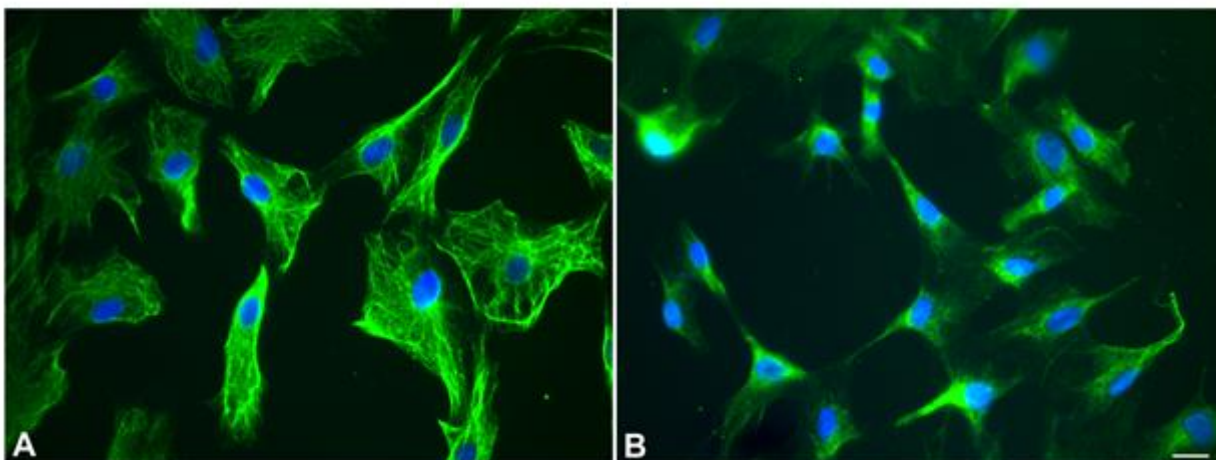


Figura 7 Imunomarcação para Vimentina: (A, verde, AlexaFluor 488) e S-100 (B, verde, AlexaFluor 488) nas células de Schwann. Marcação DNA (DAPI, azul). Barra= 50 $\mu$ m.

Após 24 horas do plaqueamento celular no meio basal, as células foram suplementadas com as diferentes concentrações das formulações. Foram avaliadas as seguintes concentrações de RVC 0,8; 3,2; 6,4; 8,0; 12,0 e 16,0 mM em dois veículos: 1. LMVV com citrato de sódio e pH interno 5,5 e; 2. LUV com pH interno 5,5 associados a LMVV contendo gradiente iônico com sulfato de amônio (pH externo 7,4).

As culturas celulares foram testadas quanto à viabilidade celular utilizando o ensaio MTT. Este ensaio avaliou a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzirem o MTT, convertendo os sais amarelos de tetrazolium (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) a cristais de formazan, de cor púrpura e, portanto, na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana.

Após 2 e 4 horas do plaqueamento celular, 10  $\mu$ L da solução de MTT (5 mg/mL - Sigma, EUA) diluídos em meio de cultura DMEM sem soro, foram acrescentados às culturas tratadas, e estas incubadas por um período de 3 horas, a 37 °C. Após o período total de incubação, foram adicionados 100  $\mu$ L de solução 10% de DMSO (dimetilsulfóxido). Após a solubilização dos cristais, a quantificação foi realizada em leitor de microplacas ELX800 (Epoch Biotek Instruments, Inc.) a 590 nm, obtendo-se medidas de densidade óptica (DO).

### **3.2.5. Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados para determinar diferenças estatísticas pela análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), com teste posterior de Tukey-Kramer, de acordo com a distribuição dos mesmos ( $\alpha=0.05$ ). Foram utilizados os programas GraphPad InStat 3.0 e GraphPad Prism 6.0 (Graph Pad Software Inc., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Formulações de AL com gradiente iônico foram testadas *in vivo* e *in vitro* (SILVA et al., 2015) e o perfil farmacológico destes fármacos, em relação a efetividade e segurança foi aprimorado de maneira significativa. O trabalho de Silva e colaboradores (2015) demonstrou que o uso de lipossomas com gradiente iônico com RVC altera a cinética de liberação do fármaco, promovendo uma liberação lenta da RVC. Além disso, estas novas formulações apresentaram estabilidade físico-química adequadas e alta eficiência de encapsulação (SILVA., et al 2015). Diante destes resultados promissores, o presente estudo teve como objetivo realizar uma avaliação pré-clínica da efetividade e toxicidade destas novas formulações, visando o futuro uso clínico das mesmas.

### 4.1. Teste de Pressão na Pata (PWTP) – Bloqueio sensorial

As formulações com RVC á 0,75% apresentaram diferenças significativas em relação à duração do bloqueio sensorial. A formulação livre (F5) apresentou duração de bloqueio cerca de 100 minutos menor que as duas formulações lipossomais ( $p < 0,01$ ). O mesmo comportamento foi observado com as formulações de RVC à 2% ( $p < 0,01$ ). Todas as formulações lipossomais não apresentaram diferenças significativas em relação à duração do bloqueio sensorial quando avaliadas de acordo com as duas concentrações de RVC utilizadas e com os dois sistemas lipossomais utilizados ( $p > 0,05$ ) (Figura 8 e 9).

A infiltração dos veículos (C1 e C2) na região do nervo ciático não modificou os valores de linha basal para o limiar de dor dos animais ( $p > 0,05$ ). As formulações de RVC também apresentaram diferenças significativas em relação aos controles C1 e C2 em todos os tempos avaliados ( $p < 0,001$ ). A formulação F5 com RVC livre à 0,75% apresentou diferenças significativas de C1 e C2 até os 190 min.

Já a infiltração das formulações lipossomais com RVC promoveram aumento do limiar de dor em todos os animais tratados ( $p < 0,05$ ). Além disso, a formulação F2 aumentou a intensidade do bloqueio sensorial, quando comparadas com o fármaco livre (F5) dos 60 aos 250 minutos após a aplicação das mesmas e, o mesmo ocorreu dos 90 aos 250 minutos com as formulações F1 e F5 ( $p < 0,05$ ).

Com as formulações de RVC a 2% as diferenças significativas na intensidade do bloqueio só ocorreram após 120 minutos entre F4 e F6 e após 150 min entre F3 e F6, nos dois

casos, as diferenças foram significativas até os 250 minutos ( $p < 0,05$ ). Após 310 minutos F3 apresentava maior intensidade de bloqueio sensorial que F4 ( $p < 0,05$ ). (figura 9) A formulação F6 com RVC livre á 2% também apresentou diferenças significativas de C1 e C2 até os 190 minutos.

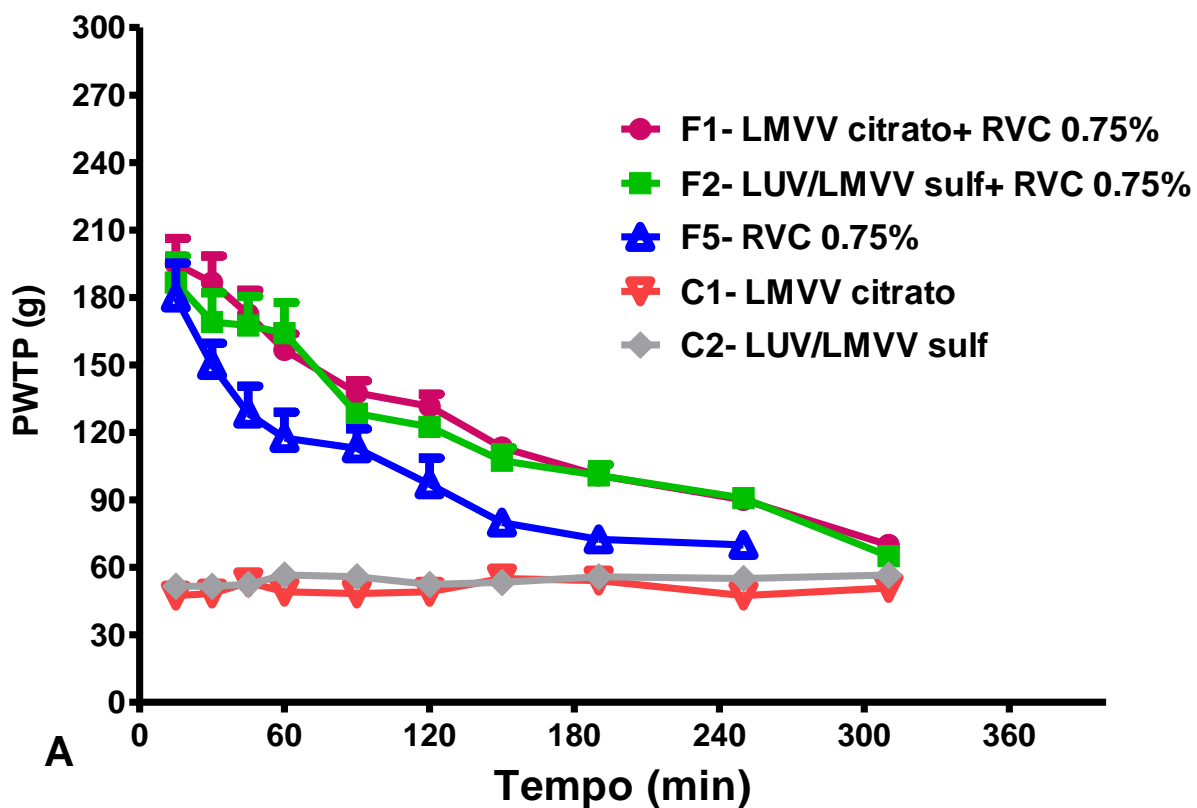


Figura 8. Curva efeito x tempo do teste PWTP com RVC a 0,75% Valores expressos em Média  $\pm$  EPM (n=6). F1 > F5 dos 90 aos 250 min (A); F2 > F5 dos 60 aos 250 min (ANOVA/Tuckey-Kramer)

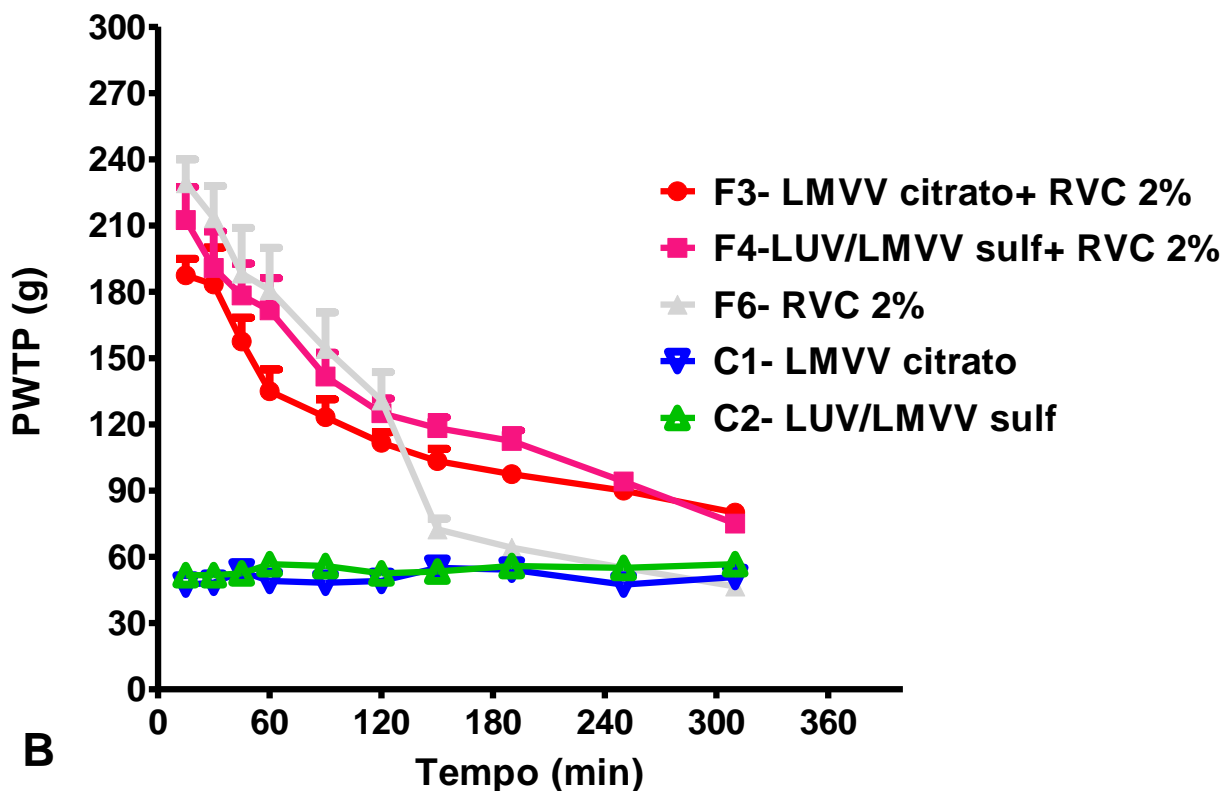


Figura 9. Curva efeito x tempo do teste PWTP com RVC a 2% Valores expressos em Média  $\pm$  EPM (n=6). F4 > F6 dos 120 aos 250 min (B); F3 > F6 dos 150 aos 250 min (B); F3>F4 aos 310 min (B) (ANOVA/Tuckey-Kramer).

Com os resultados obtidos podemos observar que houve aumento da duração e intensidade dos efeitos para todos os anestésicos com os diferentes sistemas lipossomais utilizados. O aumento de intensidade ocorreu somente depois de 60 a 150 minutos após a aplicação das formulações o que demonstra liberação lenta do anestésico das mesmas. O mesmo efeito foi observado *in vitro* por Silva (2015) que verificou prolongamento da liberação da RVC em até 50 horas com uso de lipossomas com gradiente iônico. Além do tempo de liberação com estes lipossomas ser superior às formulações com lipossomas convencionais, padrões semelhantes foram encontrados em pesquisas com Bupivacaína em gradiente iônico (GRANT et al., 2004; COHEN et al.,2012).

Além disso, independentemente da concentração de RVC, todas as formulações lipossomais promoveram bloqueio sensorial por cerca de 260 minutos enquanto as formulações livres apresentaram efeitos antinociceptivos por cerca de 150 minutos (tabela 2).

Tabela 2. Duração média ( $\pm$  Desvio Padrão) em minutos do bloqueio sensorial para as concentrações de RVC 0,75% e 2%.

	Grupos	Duração média (min)
RVC 0,75%	F1	250,0 $\pm$ 0,0 <sup>a***</sup>
	F2	250,0 $\pm$ 0,0 <sup>b***</sup>
	F5	175,0 $\pm$ 45,5
RVC 2,0%	F3	250,0 $\pm$ 0,0 <sup>c***</sup>
	F4	250,0 $\pm$ 0,0 <sup>d***</sup>
	F6	136,7 $\pm$ 28,7

Dados expressos em Média  $\pm$  DP (n = 6) (ANOVA/Tukey-Kramer): p < 0,001 (\*\*\*) , p < 0,01 (\*\*), p > 0,05 (não significativo). a: F1 vs. F5, b: F2 vs. F5 , c: F3 vs. F6, d: F4 vs. F6.

O aumento da duração também demonstra a liberação lenta e prolongada de RVC nos sistemas lipossomais utilizados, este resultado confirma os dados obtidos por Silva (2015), que demonstraram a eficiência de encapsulação para as formulações lipossomais com gradiente iônico com RVC á 0,75% apresentando valores entre 45 e 62%, aproximadamente. As formulações com RVC a 2% não foram analisadas quanto á eficiência de encapsulação devido à limitação da solubilidade de RVC neste meio.

#### 4.2. Bloqueio motor

A injeção das diversas formulações testadas promoveu perda reversível dos reflexos motores em todos os animais tratados. A administração dos grupos controle (C1 e C2) não promoveu bloqueio motor. Os dados obtidos com as formulações de RVC a 0,75% foram comparados entre si e o mesmo foi feito com as formulações a 2%. De maneira geral, observamos que o tratamento dos animais com as formulações livres e lipossomais não alterou os parâmetros avaliados no bloqueio motor (Tabela 3). Esse resultado sustenta a característica da RVC de possuir preferência por fibras sensoriais a motoras, trazendo uma recuperação mais rápida do bloqueio motor (KUTHIALA e CHAUDHARI, 2011; GUO et al., 2014). Ocorreu uma diferença significativa do Tmax observado com F4 quando comparada com F6 (p<0,01), isso pode ser explicado também pela liberação lenta de RVC destes sistemas lipossomais, conforme as observações de Silva (2015).

Quanto ao efeito anestésico motor total (ASC) apenas o grupo F1 apresentou diferença significativa do grupo F2 (p<0,05) (Tabela 3), este resultado pode ser explicado pela maior eficiência de encapsulação encontrada por Silva (2015) nas formulações contendo lipossomas doadores e receptores, prolongando o efeito analgésico e diminuindo sua liberação.

Tabela 3. LT, Tmax e Trec induzida pela RVC livre e encapsulada a lipossomas nas diferentes formulações utilizadas.

Concentração (%)	Grupos	LT (s)	T máx (s)	Trec (min)	ASC (escore.min <sup>-1</sup> )
RVC 0,75%	F1	90 (60-120)	120 (60-180)	65 (65- 65)	122,3 (121,0-128,0) <sup>b</sup>
	F2	90 (60-120)	150 (60- 180)	55 (45-65)	102,0 (81,0-121,0)
	F5	60 (60-120)	60 (60-120)	60 (45-75)	112,0 (83,0-143,0)
RVC 2%	F3	120 (60-120)	120 (60-120)	85 (45-95)	157,5 ( 87,5-182,0)
	F4	90 (60-120)	120 (120-180) <sup>a**</sup>	80 (55-85)	154,0 (101,0-168,0)
	F6	60 (60-120)	60 (60-120)	85 (75-95)	162,8(143,0-183,0)

Dados expressos em Mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 6) a: F4 vs. F6, b: F1 vs. F2 (ANOVA/Tukey-Kramer).

Este resultado pode ser explicado pelo maior tempo de liberação encontrado por Silva, 2015 nas formulações combinadas de doador e receptor (72 horas para liberação de 100% de RVC), o que confere uma liberação mais lenta do AL e uma maior permanência da RVC no sítio de injeção.

### 4.3. Avaliação da toxicidade local

As formulações lipossomais não apresentaram resposta tecidual distinta quando comparadas entre si, porém todas elas apresentaram menor injúria tecidual quando comparadas com o controle positivo (lidocaína 10%) (CEREDA et al., 2012). As tabelas abaixo (tabela 4 e 5) mostram os escores obtidos pela avaliação da inflamação após a injeção das formulações com RVC a 0,75% e 2%.

Tabela 4. Medianas (limites mínimo – máximo) dos escores inflamatórios das formulações a 0,75% de RVC e controles nos tempos de 2 e 7 dias após o tratamento

Formulações	Tempo após o tratamento	
	2 dias	7 dias
F1 – LMVV citrato + RVC 0,75%	3(2 – 3) <sup>a,b,c**</sup>	1 (1 – 1) <sup>i**</sup>
F2-LUV/LMVV sulfato + RVC 0,75%	2 (2 – 3) <sup>d,e,f**</sup>	1 (1 – 2) <sup>m**</sup>
F5- RVC 0,75%	2 (1 - 2) <sup>g**</sup>	1 (1 – 2) <sup>n**</sup>
C1- LMVV citrato	1 (1 – 1) <sup>h***</sup>	1 (1 – 1) <sup>o**</sup>
C2- LUV/LMVV sulfato	1 (1 – 1) <sup>j***</sup>	1 (1 – 1) <sup>p**</sup>
C+ Lidocaína 10%	3 (3 – 3) <sup>k***</sup>	3 (2 – 3) <sup>q**</sup>
C- Salina	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)

Análise Estatística (ANOVA/Tukey-Kramer): p < 0,001 (\*\*\*) , p < 0,01 (\*\*), p > 0,05(não significativo). a F1 vs C1; b F1 vs C2; c F1 vs C-; d F2 vs C1; e F2 vs C2; f F2 vs C-; g F5 vs C+; h C1vs C+; i C2 vs C+; j C- vs C+; l F1 vs C+; F2 vs C+, m F2 vs C+, n F5 vs C+, o C1 vs C+, p C2 vs C+, q C- vs C+.

Tabela 5. Medianas (limites mínimo – máximo) dos escores inflamatórios das formulações a 2% de RVC e controles nos tempos de 2 e 7 dias após o tratamento

Formulações	Tempo após o tratamento	
	2 dias	7 dias
F3 – LMVV citrato + RVC	2 (2 – 3) <sup>a,b, c, d***</sup>	1 (1 – 1) <sup>p*</sup>
F4-LUV/LMVV sulf + RVC	2 (2 – 3) <sup>e, f, g, h***</sup>	2 (1 – 3)
F6- RVC 2%	3 (3 – 3) <sup>i, j, l***</sup>	2 (2 – 2)
C1- LMVV citrato	1 (1 – 1) <sup>m*</sup>	1 (1 – 1) <sup>q*</sup>
C2- LUV/LMVV sulfato	1 (1 – 1) <sup>n*</sup>	1 (1 – 1) <sup>r*</sup>
C+ Lidocaína 10%	3 (3 – 3) <sup>o*</sup>	3 (2 – 3) <sup>s*</sup>
C- Salina	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)

Análise Estatística (ANOVA/Tukey-Kramer):  $p < 0,001$  (\*\*\*) ,  $p < 0,01$  (\*\*),  $p > 0,05$  (não significativo); a F3 vs C+, b F3 vs C1, c F3 vs C2 d F3 vs C-, e F4 vs C+, f F4 vs C1, g F4 vs C2, h, F4 vs C-, i F6 vs C1, j F6 vs C2, l F6 vs C-, m C1 vs C+, n C2 vs C+, o C- vs C+, p F3 vs C+, q C1 vs C+, r C2 vs C+, s C- vs C+.

As figuras abaixo mostram a reação tecidual que pode ocorrer depois da injeção das formulações após 2 e 7 dias da aplicação. A figura 10 (A) e 12 (A) mostra a reação inflamatória com infiltrado linfo- plasmocitário que ocorreu dois e sete dias após a aplicação da formulação do grupo controle C+ (lidocaína 10%). Esta solução promoveu uma inflamação intensa e o mesmo não ocorreu com os outros controles utilizados (Figura 10 e 12 B, C e D).

As formulações lipossomais sem a presença da RVC apresentaram o mesmo baixo nível de inflamação que o controle negativo (Figura 10 e 12 B, C e D) isso pode ser explicado devido aos lipossomas apresentaram baixa toxicidade, pois são compostos de fosfolipídios biodegradáveis e biocompatíveis similares aos presentes nas membranas celulares (DE ARAÚJO et al., 2008, TOFOLI et al., 2010, CEREDA et al., 2008).

As formulações lipossomais com o ativo a 0,75% e 2% apresentaram um nível de inflamação tecidual menor que o grupo controle positivo (Lidocaína 10%) (figura 11, 13 A, B, C).

Foi observado que nas formulações com o ativo livre (figura 10, 11, 13 C) possuem nível de inflamação maior do que a dos grupos controle (C-, C1 e C2).



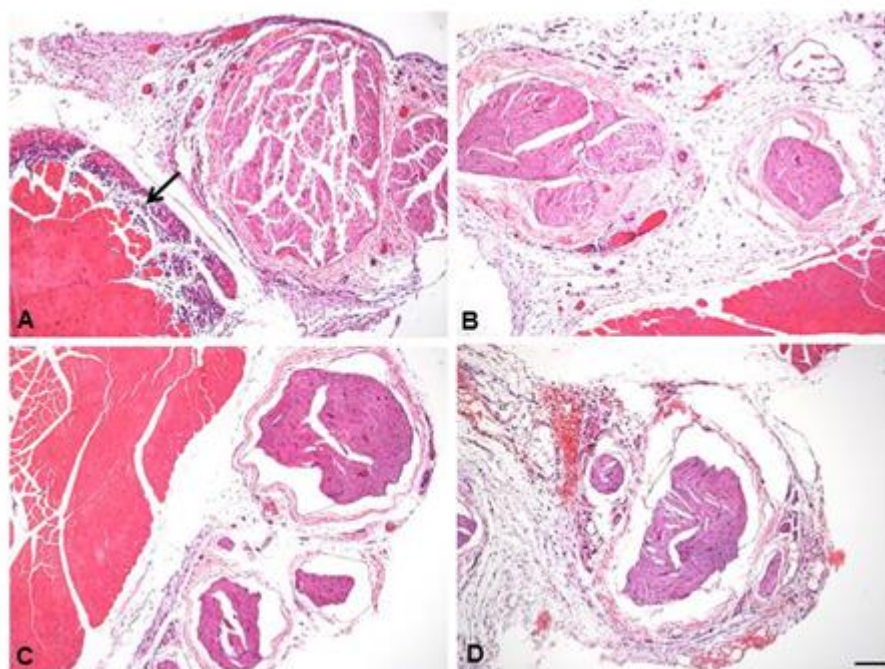


Figura 10. Análise histológica da região do nervo ciático após 2 dias da injeção dos grupos controles (A) Controle +- Lidocaína 10%; (B) Controle negativo- Salina; (C) C1 e (D) C2. A seta demonstra inflamação tecidual intensa após a administração de lidocaína 10%. Barra com escala: 100 $\mu$ m. Aumento 100x

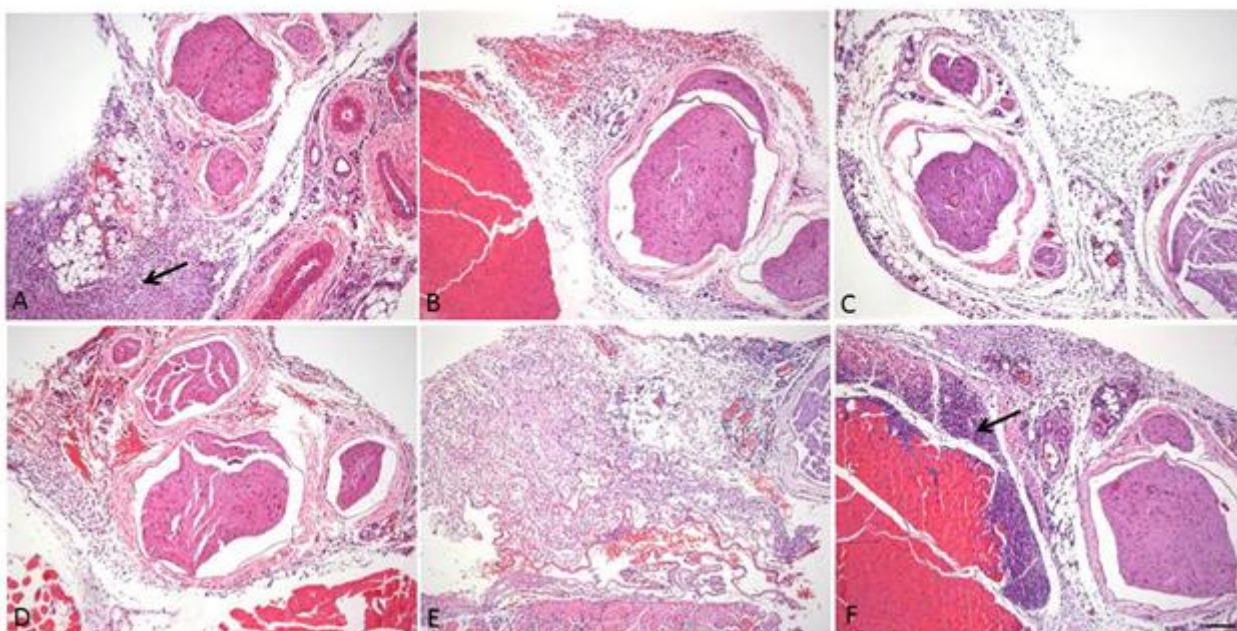


Figura 11 Análise histológica da região do nervo ciático após 2 dias da injeção dos grupos das formulações com o ativo (A) F1; (B) F2; (C) F5; (D) F3; (E) F4 e (F) F6. A seta demonstra inflamação tecidual. Barra com escala: 100 $\mu$ m. Aumento 100x



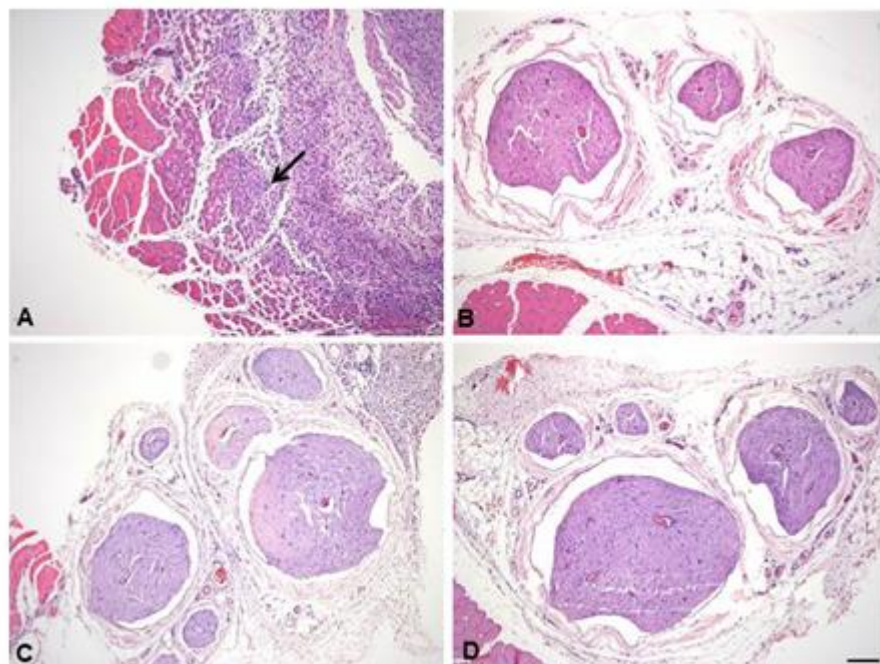


Figura 12 Análise histológica da região do nervo ciático após 7 dias da injeção dos grupos controles (A) Controle +- Lidocaína 10%; (B) Controle negativo- Salina; (C) C1 e (D) C2. A seta demonstra inflamação tecidual intensa após a administração de lidocaína 10%. Barra com escala: 100µm. Aumento 100x

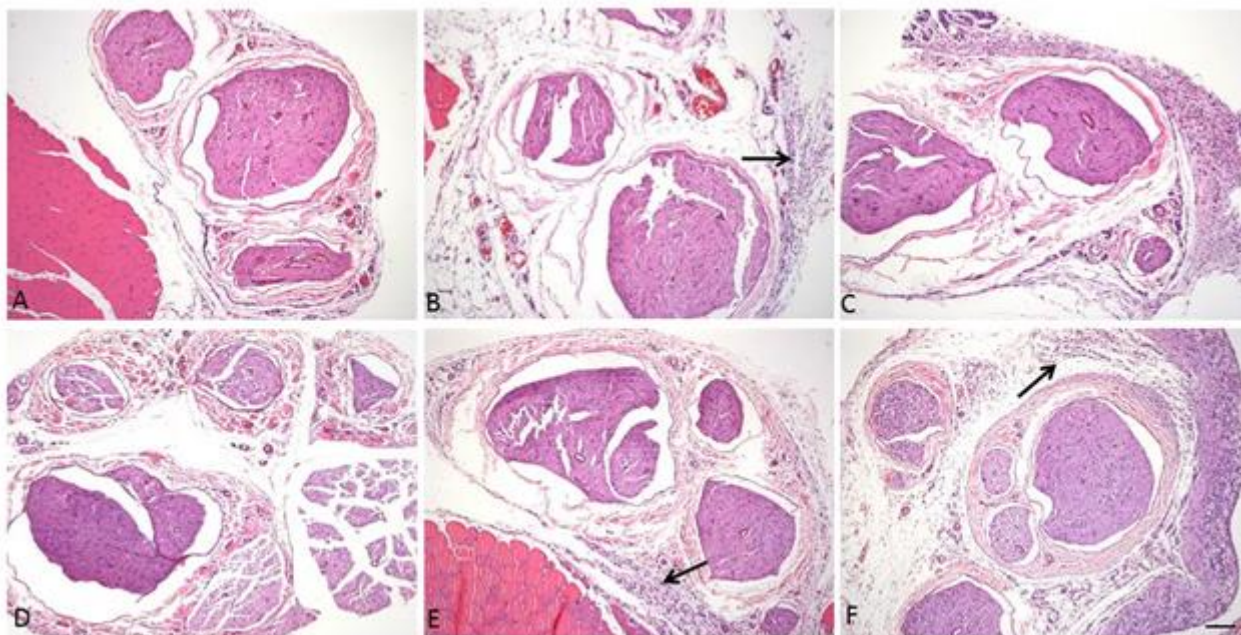


Figura 13: Análise histológica da região do nervo ciático após 7 dias da injeção das formulações com o ativo (A) F1; (B) F2; (C) F5; (D) F3; (E) F4 e (F) F6. A seta demonstra inflamação tecidual. Barra com escala: 100µm. Aumento 100x.

#### 4.4. Avaliação da citotoxicidade em cultura de células de Schwann

Os dados representativos da viabilidade celular nos diferentes tempos e condições estão representados na tabela 6 e na figura 13. Após 2 e 4 horas observa-se que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nas diferentes concentrações de RVC independentemente do veículo utilizado (LMVV ou LMVV+LUV), bem como comparado aos controles utilizados.

Tabela 6. Viabilidade celular das células de Schwann após 2 e 4 horas do tratamento com as formulações lipossomais de RVC em diferentes concentrações e os grupos controles (Média  $\pm$  DP) (ANOVA/Dunn).

	2 horas			4 horas		
	RVC	RVC+ LMVV	RVC+ LMVV/LUV	RVC	RVC+ LMVV	RVC+ LMVV/LUV
0,8 mM	1,09 $\pm$ 0,32	1,27 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,19	0,99 $\pm$ 0,16	1,51 $\pm$ 0,50	1,08 $\pm$ 0,19
3,2 mM	0,96 $\pm$ 0,09	1,45 $\pm$ 0,37	1,55 $\pm$ 0,15	1,10 $\pm$ 0,13	1,83 $\pm$ 0,63	1,37 $\pm$ 0,28
6,4 mM	0,85 $\pm$ 0,03	1,67 $\pm$ 0,16	1,49 $\pm$ 0,13	1,19 $\pm$ 0,14	1,70 $\pm$ 0,57	2,26 $\pm$ 0,22
8 mM	0,98 $\pm$ 0,24	1,78 $\pm$ 0,58	1,49 $\pm$ 0,15	0,98 $\pm$ 0,24	1,78 $\pm$ 0,58	1,48 $\pm$ 0,14
12 mM	1,12 $\pm$ 0,22	1,33 $\pm$ 0,11	1,22 $\pm$ 0,41	1,28 $\pm$ 0,22	1,33 $\pm$ 0,11	1,22 $\pm$ 0,40
16 mM	1,14 $\pm$ 0,23	1,41 $\pm$ 0,19	1,26 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,23	1,41 $\pm$ 0,19	1,26 $\pm$ 0,07
Controle LMVV	-----	1,59 $\pm$ 0,17	-----	-----	1,92 $\pm$ 0,48	-----
Controle LMVV/LUV	-----	-----	1,48 $\pm$ 0,16	-----	-----	1,08 $\pm$ 0,20
Controle negativo	1,21 $\pm$ 0,38	-----	-----	1,35 $\pm$ 0,38	-----	-----

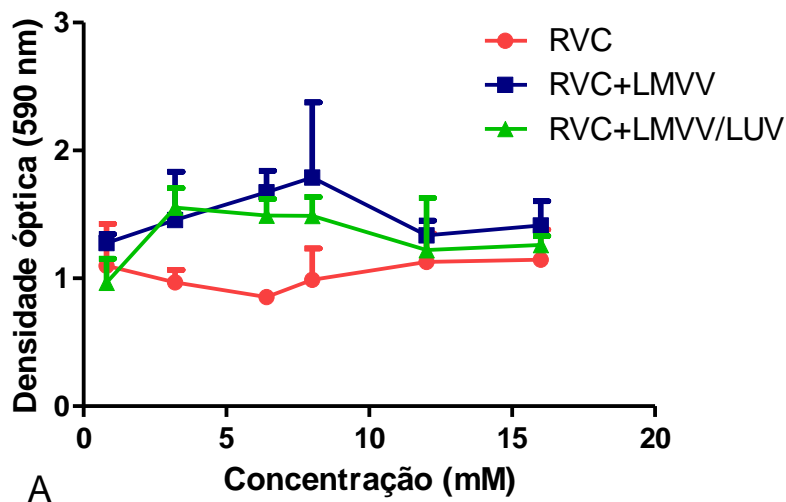


Figura 14. Curva de viabilidade celular das células de Schwann após 2 horas do tratamento com as formulações lipossomais de RVC em diferentes concentrações e os grupos controles (Média  $\pm$  DP).

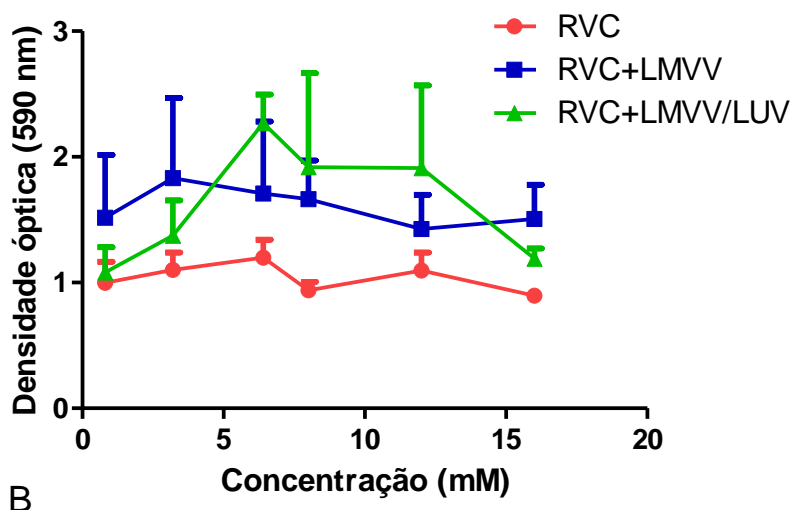


Figura 15. Curva de viabilidade celular das células de Schwann após 4 horas do tratamento com as formulações lipossomais de RVC em diferentes concentrações e os grupos controles (Média  $\pm$  DP).

A ausência de diferenças estatísticas, nos mostra que as formulações lipossomais não reduzem a viabilidade celular das células de Schwann. Testes realizados com a BVC combinada com lipossomas em gradiente iônico aumentou o  $LD_{50}$  em oito vezes quando injetada em camundongos intraperitonealmente (BARENHOLZ; GARBUZENCO, 2003), ao analisar a porcentagem da viabilidade celular, obtivemos o menor valor para a formulação livre na concentração de 8mM para os dois tempos sendo elas: 65,32 (2h) e 65,19 (4h), para as formulações lipossomais (figura 16 e 17).

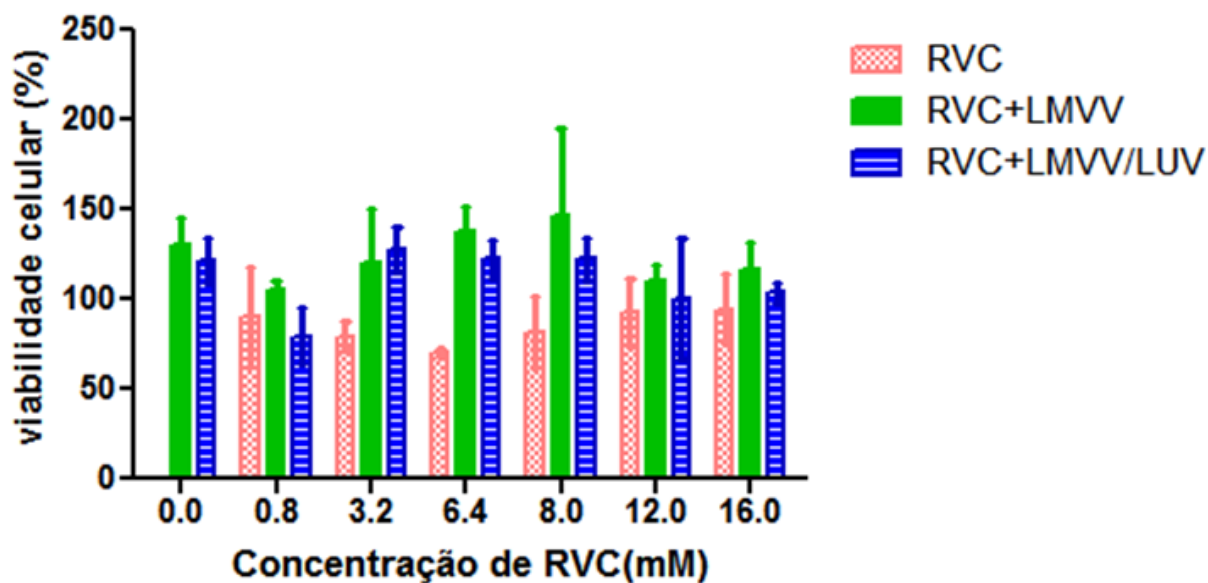


Figura 16. Curva da porcentagem da viabilidade celular das células de Schwann após 2 horas do tratamento com as formulações lipossomais de RVC em diferentes concentrações e os grupos controles (Média  $\pm$  DP).

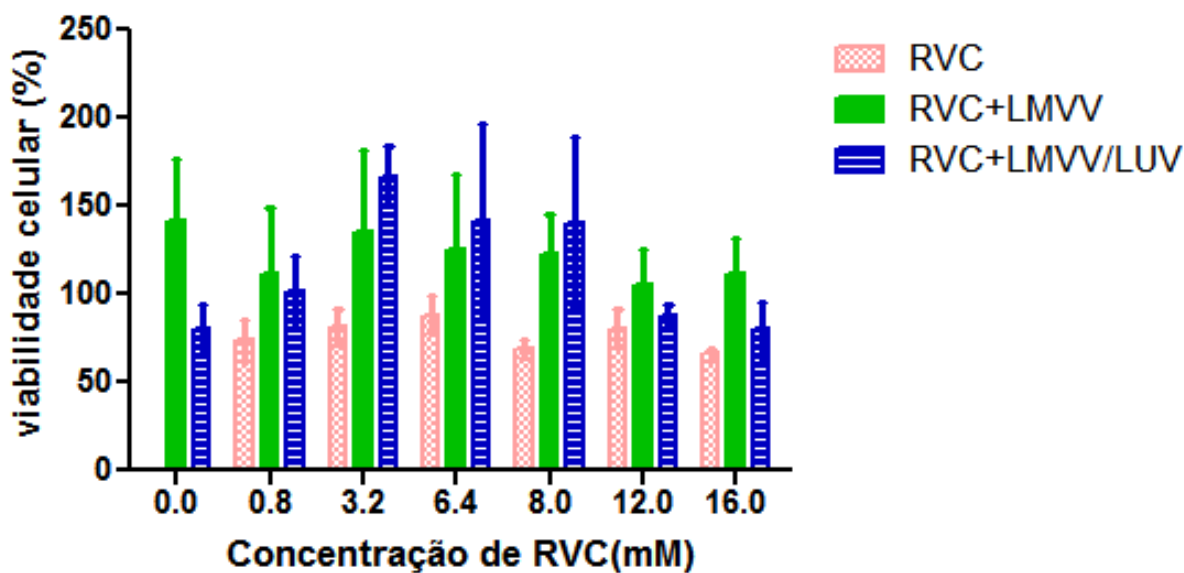


Figura 17. Curva da porcentagem da viabilidade celular das células de Schwann após 4 horas do tratamento com as formulações lipossomais de RVC em diferentes concentrações e os grupos controles (Média  $\pm$  DP).

A avaliação foi realizada em células neuronais, e esta avaliação é fundamental, pois um AL é sempre aplicado muito próximo ou diretamente nos nervos. Silva (2015) também observou resultados similares, com fibroblastos 3T3. Assim, podemos observar que as formulações lipossomais foram mais efetivas e aumentaram a duração do bloqueio sensorial e ao mesmo tempo não promoveram reações tóxicas locais e nem diminuíram a viabilidade de células neuronais.

Os resultados obtidos no presente estudo apontam vantagens destas formulações lipossomais, que podem ser consideradas como possíveis ferramentas para o controle da dor em pacientes no futuro.

## **5. CONCLUSÃO**

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- As formulações lipossomais demonstraram melhor perfil farmacodinâmico em ratos Wistar após o bloqueio do nervo ciático, pois o tempo de bloqueio sensorial foi superior com estas formulações. Além disto, as mesmas não alteraram o tempo de bloqueio motor.

- Todas as formulações não apresentaram toxicidade local significativa na região do ciático de ratos Wistar.

- Todas as formulações não promoveram efeitos tóxicos em cultura de células de Schwann.

## 6. REFERÊNCIAS

- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. 568p.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677p.
- ALLEN, T.M.; CULLIS, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 65, p. 36-48, 2013.
- ALMEIDA, A.C.P. **Lidocaína Lipossomal Produzida em Processo Escalonável: Formulação, Caracterização e Testes Biológicos**. 2008. Tese de Doutorado em Bioquímica - Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- ARAUJO, D. R.; 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.
- ARAUJO, D.R.; BRAGA, A.F.A.; MORAES, C.M.; FRACETO, L.F.; DE PAULA, E.; Mistura com Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) de Bupivacaína Complexada com Ciclodextrinas e Anestesia por Via Subaracnóidea em Ratos. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v. 56, n. 5, p. 495-506, 2008.
- ARAUJO, D.R.; TSUNEDA, S.S.; CEREDA C.M., DEL G. F.; CARVALHO F.; PRETÉ P.S.; FERNANDES, S.A.; YOKAICHIYA, F., FRANCO, M.K., MAZZARO, I.; FRACETO, L.F; DE PAULA E. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. **Eur. J. Pharm.** v. 33, n. 1, p. 60-71, 2006.
- AKKARI, A.C.S.; PAPINI, J.Z.B.; GARCIA, K.G.; FRANCO, M.K.K.D.; CAVALCANTI L.P.; GASPERINI A.; ALKSCHBIRS, M.I.; YOKAICHYIA, F. F.; DE PAULA, E.; TÓFOLI, G.R.; DE ARAUJO, D.R.; Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation, **Materials Science and Engineering** v. 68, p. 299–307, 2016
- AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G.; **Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines, Churchill Livingstone**. Churchill Livingstone/Elsevier, 4<sup>o</sup> ed. 2013.
- AUSTIN, P.J.; W.U, A.; MOALEM-TAYLOR, G. Chronic Constriction of the Sciatic Nerve and Pain Hypersensitivity Testing in Rats. **J. Vis. Exp.**, v. 61, p. 185-192, 2012.
- BARENHOLZ, A.; FISHEL F.; YAKIR, E.; GATT, S.; BARENHOLZ, Y.; BERCOVIER.; H.J., Liposomes enhance bioremediation of oil-contaminated soil. **J Liposome Res.**, v. 2, n. 13, p. 173-86, 2003.
- BARENHOLZ, I. Y.; HARAN, G., United States Patent Number: Method of amphiphatic drug loading in liposomes by ammonium ion gradient., **J Liposome Res.**, v. 5, p. 316 – 27, 1994.
- BARENHOLZ, Y.; PEER, D., Liposomes and other assemblies as drugs and nano-drugs: From basic and translational research to the clinics. **J. Controlled Release**, v. 160, p. 115–116, 2008.

BARENHOLZ, Y.; GARBUZENCO, O. WO: 2007/049279 A2, Date of Patent: May, 3, 2007.

BECKER, D.E.; REED, K.L. Local anesthetics: review of pharmacological considerations. **Anesth. Prog.** v. 59, p. 90–102, 2012.

BEIRANVAND S.; EATEMADI A.; KARIMI A., New Updates Pertaining to Drug Delivery of Local Anesthetics in Particular Bupivacaine Using Lipid Nanoparticles. **Nanoscale Research Letters** v. 11, n. 307, 2016.

BOOGAERTS, J. G.; LAFONT, N. D.; DECLERCQ, A. G.; LUO, H. C.; 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, n. 4, p. 315-20, 1994.

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

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

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.

CAI, D., CHEN, S.C., PRASAD, M., HE, L., WANG, X., CHOESMEL-CADAMURO, V., SAWYER, J.K., DANUSER, G., MONTELL, D.J. (2014). Mechanical Feedback through E-Cadherin Promotes Direction Sensing during Collective Cell Migration. **J. Cell.**, v. 157, n. 5, p. 1146-1159.

CALAFATTI, S. A., MACEDO, M., PAPINI, J.Z.B., COELHO, E., CEREDA, C.M.S., JUNIOR, J.P.J., DE PAULA, E., DE ARAUJO, D.R., TOFOLI, G.R., .Pre-Clinical Pharmacokinetics of Sufentanil-2-Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin Inclusion Complex., **Int J Anesthetic Anesthesiol.** v. 3, p 1-4, 2016.

CARPENTER, K. J.; DICKENSON, A. H. Molecular aspects of pain research. **The Pharmacogenomics**, J. v. 2, p. 87-95, 2002.

CATTERALL W.A., SWANSON, T.M. Structural basis for pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels, **Mol Pharmacol** , v. 88 p. 141–150, 2015.

CEDERHOLM, I. Preliminary risk-benefit analysis of ropivacaine in labour and following surgery. **Drug Saf.**, v. 16, p. 391-402, 1997.

CELANO, M.; CALVAGNO, M.G.; BULLOTA, S.; PAOLINO, D.; ARTURI, F.; ROTIROTI, D.; FILETTI, S.; FRESTA, M.; RUSSO, D. Cytotoxic effects of Gemcitabine-loaded liposomes in human anaplastic thyroid carcinoma cells. **BMC Cancer**, v. 4, p.1-5, 2004.

CEREDA, C.M.; GUILHERME, V.A.; ALKSCHBIRS, M.I.; DE BRITO, J. R.B.; TOFOLI, G.R.; FRANZ-MONTAN, M.; DE ARAUJO, D.R.; DE PAULA, E.; Liposomal butamben gel



formulations: toxicity assays and topical anesthesia in an animal model. **J Liposome Res.** v. 28, p.1-9, 2016.

CEREDA, C. M. S.; ARAÚJO, D. R.; BRUNETTO, G. B.; DE PAULA, E. "Liposomal prilocaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation" **J. Pharm. Pharmac. Sci.**, v. 7, p. 235-257, 2004.

CEREDA, C. M. S.; ARAÚJO, D. R.; BRUNETTO, G. B.; DE PAULA, E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesis duration. **Can. J. Anesthesiol.**, v. 53, n. 11, p. 1092-1097, 2006.

CEREDA, C. M. S.; TOFOLI, G. R.; BRITO, R. B. JR.; DE JESUS, M. B.; FRACETO, L. F.; ARAÚJO, D. R.; DE PAULA, E. Stability and local toxicity evaluation of a liposomal prilocaine formulation. **Journal of Liposome Research**, v. 18, p. 329–339, 2008.

CEREDA, C.M.S.; FRANZ-MONTAN, M.; SILVA, C.M.G.; CASADEI, B.R.; DOMINGUES, C.C.; TOFOLI G.R.; DE ARAÚJO, D.R.; DE PAULA, E. Transdermal delivery of butamben using elastic and conventional liposomes. **J. Liposome Res.**, v. 23, p. 228-234, 2013.

CEREDA, C.M.S; TOFOLI, G.R.; MATURANA, L.G.; PIERUCCI, A.; NUNES, L.A.; FRANZ-MONTAN, M.; DE OLIVEIRA, A.L.; ARANA, S.; DE ARAÚJO, D.R.; DE PAULA, E. Local neurotoxicity and myotoxicity evaluation of cyclodextrin complexes of bupivacaine and ropivacaine. **Anesth. Analg.**, v. 115, p. 1234-1241, 2012.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A.C.; RODRIGUES, C.A.; SALGADO, H.R.N.; Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev Bras Farm.**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

CHORILLI, M.; RIMÉRIO, T.C.; DE OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. Estudo da Estabilidade de Lipossomas Compostos de Fosfatidilcolina de Soja e Fosfatidilcolina de Soja Hidrogenada Adicionados ou Não de Colesterol por Método Turbidimétrico. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 26, n. 1, p. 31-7,2007.

COHEN, R.; STEINER, A.; KANAAN, H.; BARENHOLZ, Y., Chemical and physical characterization of remotely loaded bupivacaine liposomes: comparison between large multivesicular vesicles and small unilamellar vesicles. **J. Mater. Chem.** v. 1, p. 4619-4627,2013.

COHEN, R.; KANAAN, H.; GRANT, G.J.; BARENHOLZ, Y. Prolonged analgesia from Bupisome and Bupigel formulations: From design and fabrication to improved stability. **J. Control. Release**, v. 160,p. 346-352, 2012.

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

DE ARAÚJO, D.R.; CEREDA, C.M.S.; BRUNETTO, G.B.; VOMERO, V.U.; PIERUCCI, A.; NETO, H.S.; OLIVEIRA, A.L.R.; FRACETO, L.F.; BRAGA, A.F.A.B.; DE PAULA, E. Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 60, p. 1449-1957, 2008a.

DE ARAÚJO, D.R.; TSUNEDA, S.S.; CEREDA, C.M.S.; CARVALHO, F.D.G.F.; PRETÉ, P.S.C.; FERNANDES, S.A.; YOKAICHIYA, F.; FRANCO, M.K.K.D.; MAZZARO, I.; FRACETO, L.F.;

BRAGA, A.F.A.; DE PAULA, E. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-cyclodextrin inclusion complex. **Eur. J. Pharm.Sci.**, v. 33, p. 60-71, 2008b.

DE PAULA, E.; CEREDA, C. M. S.; TOFOLI, G. R.; FRANZ-MONTAN, M.; FRACETO, L. F.; ARAUJO, D. R. Drug Delivery Systems for Local Anesthetics. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation.**, v. 4, n. 1, p. 23-34, 2010.

DE PAULA, E.; CEREDA, C.M.S.; FRACETO, L.F.; FRANZ-MONTAN M.; TOFOLI, G.R.; RANALI, J.; VOLPATO, M.C.; GROPPPO, F.C. Micro and nanosystems for delivering local anesthetics. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 9, p.1505-1524, 2012.

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

DICKERSON, D.M.; APFELBAUM, J.L. Local anesthetic systemic toxicity. **Aesthet. Surg. J.**, p.1-9, 2014.

Dragoo J.L, Braun J.H, Kim H.J, Phan D.H, Golish R.S The In Vitro Chondrotoxicity of Single-Dose Local Anesthetics **Am.J. Sports Med.**v. 40, p. 794-799,2011,

FELDMAN, H. S.; COVINO, B. G. Comparative motor-blocking effects of bupivacaine and ropivacaine, a new amino amide local anesthetic, in the rat and dog. **Anesth. Analg.** v. 67, p.1047-1052, 1988.

FELNEROVA, D.; VIRET, J. F.; GLÜCK, R.; MOSER, C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 15, p. 518-29, 2004.

FENSKE, D.B.; CULLIS, P.R. Liposome Technology: Entrapment of drugs and other materials into liposomes In: Gregory Gregoriadis. **Informa HealthCare**, 2007.

FLETCHER, D.; LE CORRE, P.; GUILBAUD, G.; LE VERGE R. Antinociceptive effect of bupivacaine encapsulated in poly(D,L)-lactide-co-glycolide microspheres in the acute inflammatory pain model of carrageenin-injected rats. **Anesth. Analg.** v. 84, p. 90-94, 1997.

FRANZ-MONTAN M.; DE PAULA E.; GROPPPO F.C.; SILVA A.L.; RANALI J.; VOLPATO M.C. Liposomal delivery system for topical anaesthesia in the palatal mucosa. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 50, p. 60-64, 2012a.

FRANZ-MONTAN, M.; BARONI, D.B.; BRUNETTO, G.; SOBRAL, V.R.; DA SILVA, C.M.; VENÂNCIO, P.; ZAGO, P.M.W.; CEREDA, C.M.S.; VOLPATO, M.C.; DE ARAÚJO, D.R.; DE PAULA, E.; GROPPPO, F.C. Liposomal lidocaine gel for topical use at the oral mucosa: characterization, in vitro assays and in vivo anesthetic efficacy in humans. **J. Liposome Res.**, v. 25, p.11-19, 2015.

FRANZ-MONTAN, M.; CEREDA, C.M.S.; GASPARI, A.; DA SILVA, C.M.; DE ARAÚJO, D.R.; PADULA, C.; SANTI, P.; NARVAES, E.; NOVAES, P.D.; GROPPPO, F.C.; DE PAULA, E. Liposomal-benzocaine gel formulation: correlation between in vitro assays and in vivo topical anesthesia in volunteers. **J. Liposome Res.**, v. 23, p. 54-60, 2013.

FRANZ-MONTAN, M.; DE PAULA, E.; GROPPPO, F. C.; RANALI, J.; VOLPATO, M. C. Efficacy of liposome-encapsulated 0.5% ropivacaine in maxillary dental anaesthesia. **Brit. J Oral. & Maxillofac. Surg.**, v. 50, p. 454-458, 2012.

FRANZ-MONTAN, M.; DE PAULA, E.; GROPPPO, F. C.; SILVA, A.R.; RANALI, J.; VOLPATO, M.C. Efficacy of liposome-encapsulated 0.5% ropivacaine in maxillary dental anaesthesia. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 50, p. 454-458, 2012b.

FRANZ-MONTAN, M.; DE PAULA, E.; GROPPPO, F.C.; SILVA, A.L.; RANALI, J.; VOLPATO, M.C. Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia. **Oral Surg.** v. 110, p. 800-804, 2010b.

FRANZ-MONTAN, M.; SILVA, A. L.; COGO, K.; BERGAMASCHI, C.; VOLPATO, M. C.; RANALI, J.; DE PAULA, E.; GROPPPO, F. C. Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. **Anesth Analg.**, v. 104, p. 1528-31, 2007.

FREZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELLI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GANTENBEIN, M.; ATTOLINI, L.; BRUGUEROLLE, B. Potassium channel agonists modify the local anesthetic activity of bupivacaine in mice. **Can. J. Anaesth.** v.43, n.871-876, 1996.

GANTENBEIN, M.; ABAT, C.; ATTOLINI, L.; PISANO, P.; EMPERAIRE, N.; BRUGUEROLLE, B. Ketamine effects on bupivacaine local anaesthetic activity and pharmacokinetics of bupivacaine. **Life Sci.** v. 61, p. 2027-2033, 1997.

GRACE, P.M.; HUTCHINSON, M.R.; STEVEN, F.; MAIHER, S.F.; WATKINS, L.R. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Macmillan Publishers Limited.** v. 14, p. 217-231, 2014,

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

GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; ARAUJO, D. R.; DE PAULA, E.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 9, p. 688-99, 2010.

GUBERNATOR, J. Active methods of drug loading into liposomes: recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 8, p. 565-580, 2011.

GUO, J.;SU, Y.; LIU, Y.; ZHANG,J.; YANG, D. Effects of intrathecal anesthesia with different concentrations and doses on spinal cord, nerve roots and cerebrospinal fluid in dogs. **Int J Clin Exp Med.**v. 7, n.12, p.5376–5384, 2014.

HAMAJI, A.; HAJJAR, L.; Marcelo CAIERO, M.; ALMEIDA, J.; NAKAMURA, R. E.; OSAWA, E.A.; FUKUSHIMA, J., R.; GALAS, F.R.; JUNIOR, J.O.C.A. Volume Replacement Therapy during Hip Arthroplasty using Hydroxyethyl Starch (130/0.4) Compared to Lactated Ringer Decreases Allogeneic Blood Transfusion and Postoperative Infection.**Rev Bras Anesthesiol.** v. 63, n. 1, p. 27-44, 2013

HARAN, G.; COHEN, R.; BAR, L.K.; BARENHOLZ, Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipatic weak bases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 151, p. 201-215, 1993.

HUNG, O. Drug transformation: Advances in drug delivery systems. **Can J Anaesth.**, v. 53, n. 11, p. 1074-1077, 2006.

IASP. **Capítulo Brasileiro da Internacional Association for the Study of Pain**. Disponível em: [http://www.sbed.org.br/materias.php?cd\\_secao=76](http://www.sbed.org.br/materias.php?cd_secao=76) Acesso em: 16 out 2016.

IASP. **Taxonomy Working Group Classification of chronic pain**. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy?navItemNumber=576#Neuropathicpain> Acesso em: 16 out 2016.

ICKOWICZ, D.E.; GOLOVANEVSKI, A. L.; DOMBA, A.J.; WEINIGER, C.F. Extended duration local anesthetic agent in a rat paw model. **Int. J. of Pharm.** v. 468, p.152–157, 2014

ILHAM,C.; BOMBACI,E.; YURTLU, S.; COLAKOGLU, S.; Eficiência de levobupivacaína e bupivacaína para bloqueio supraclavicular: estudo comparativo, duplo-cego e randomizado. **Rev Bras Anesthesiol.** v. 64, n. 3, p. 177 – 182, 2014,

ISIDORO, R.P.; VALDEZ, F.J. S.; SUAREZ, J.C. Anesthetic Diffusion Through Lipid Membranes Depends on the Protonation Rate. **Sci. Rep.** v. 4, n. 7534; 2014.

JESORKA, A.; ORWAR, O. Liposomes: Technologies and analytical applications. **Annu. Rev. Anal. Chem.**, v. 1, p. 801-832, 2008.

KATZUNG, B. B. **Farmacologia básica e clínica**. 10 ed. São Paulo: Guanabara, 2007. p. 369-375

KHOSRAVI, A.R.; POURMOGHADAS, M.; OSTOVAN, M.; MEHR, K.G.; GHARIPOUR, M.; The impact of generic form of Clopidogrel on cardiovascular events in patients with coronary artery stent: results of the OPCES study **J.Res. Med. Sci.** v. 5, n.16, p. 640-650, 2011

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.

KRAUSE, L.H.; SREDNI, S. Systemic drug therapy for neuropathic pain Farmacoterapia sistêmica da dor neuropática. **Rev. Dor.** v. 17, p. 91-91, 2016.

KRAYCHETE, D.C.; SAKATA, R.K; LANNES, C.O.L; BANDEIRA, D.I.; SADATSUN, J.E. Dor crônica persistente pós- operatória: o que sabemos sobre prevenção, fatores de risco e tratamento? **Rev. Bras. Anesthesiol.**,v. 66, n. 5, p. 505-512, 2016.

KUTHIALA, G.; CHAUDHARY, G. ROPIVACAINE: A review of its pharmacology and clinical use. **Indian J Anaesth.**, v. 55, n. 2, p.104-110, 2011.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANING, J.L., Teoria e prática na indústria farmacêutica. **Lisboa: Fundação Calouse Gulbenkian**, v. 2, p.803, 2001.

LAGAN, G.; MCLURE, H.A. Review of local anaesthetic agents. *Curr. Anaesth. Crit. Care*, v. 15, p. 247-254, 2004.

LEONE, S.; DI CIANNI, S.; CASATI, A.; FANELLI, G. Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. *Acta Biomed.*, v. 79, p. 92-105, 2008.

LESZCZYNSKA K, KAU ST. A sciatic blockade method to differentiate drug-induced local anesthesia from neuromuscular blockade in mice. *J. Pharmacol. Meth.* v.27, p. 85-93, 1992.

LIU,S.S., SALINAS, F.V. Continuous Plexus and Peripheral Nerve Blocks for Postoperative Analgesia. *Anesth Analg* v. 96, p.263–272,2003.

MACINTYRE, P. E.; LOADSMAN, J. A.; SCOTT, D. A. Opioids, ventilation and acute pain management. *Anaesth Intensive Care*, v.39, n.4. p.545-58, 2011.

MASCARENHAS, M. I, DA SILVA S. L, MENDES A., A. S. SANTOS, BARBOSA M.P. Alergia aos anestésicos locais. *Acta Med. Port.* v 24, p. 293-298,

MATHER, L.E.; COPELAND, S.E.; LADD, L.A. Acute toxicity of local anesthetics: underlying pharmacokinetic and pharmacodynamic concepts. *Reg. Anesth. Pain Med.*, v.30, p.553-566, 2005.

MATHIEU, O.; HILLAIRE-BUYS, D.; DADURE, C.; BARNAY, F.; MATHIEU-DAUDÉ, J. C.; BRESSOLLE, F. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of free and total concentrations of ropivacaine in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 831, p. 91-98, 2006

MELO, M. S.; SILVA, W. A.; MORAES, A. C.; Udelsmann, A. Comparação das alterações hemodinâmicas na intoxicação aguda com bupivacaína e ropivacaína por via venosa em suínos. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v.59, n.5, 2009.

MERCADO, P. WEINBERG,G. L. Local Anesthetic Systemic Toxicity: Prevention and Treatment. *Anesthesiol. Clin.* v. 29, p. 233-242, 2011.

MESTRE, C.; PÉLISSIER, T.; FIALIP, J.; WILCOX, G.; ESCHALIER, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharm. Toxic. Meth.* v. 32, p. 197-200, 1994.

MOWAT, J. J.; MOK, M. J.; MACLEOD, B. A.; MADDEN, T. D. Liposomal bupivacaine. Extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient. *Anesthesiol*, v.85 p.635-643, 1996.

MUNIZ, V.C. **Encapsulação da dibucaína em lipossomas com gradiente iônico transmembranar**, 2015, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia/Unicamp.

NAGAYASU, A.; UCHIYAMA, K.; KIWADA, H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 40, p. 75-87, 1999.

NOGUEIRA, E.; GOMESA, A.C.; PRETOA, A.; CAVACO-PAULOB, A. Design of liposomal formulations for cell targeting. **Biointerfaces** v. 136, p. 514–526, 2015.

OLIVEIRA, R.M.; TANAKA, P.P.; TENORIO, S.B., Avaliação do Uso de Microesferas de Bupivacaína em Excesso Enantiomérico de 50% após Bloqueio do Nervo Ciático de Ratos, **Rev Bras Anesthesiol**, v.61, n.6., p.736-747, 2011.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O; PORRECA, F. (2010). Central modulation of pain. **J. Clin. Invest.** v.120, n.11, p.3779-3787, 2010.

OZBAKIR, B.; CRIELAARD, B.J.; METSELAAR, J.M.; STORM, G.; LAMMERS, T.; Liposomal corticosteroids for the treatment of inflammatory disorders and cancer. **J Control Release.** v. 190, p. 624-36, 2014.

PAYANDEL, J.; EL-DIN, T.M.; SCHEUER, T.; ZHENG, N.; CATTERALL, W.A. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states, **Nature.** v. 486, p 135-139, 2012.

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

QUEIROZ, V.A. **Avaliação das atividades citotóxicas e anestésicas da farmacocinética da bupivacaína complexada com Hidroxipropil – Beta – Ciclodextrina, em associação com sufentanil**, 2012, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia/Unicamp.

RANASINGHE, J. S.; BIRNBACH, D. Progress in analgesia for labor: focus on neuraxial blocks. **Int J Womens Health**, v. 1, p. 31-43, 2010.

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

SALAY, L.C.; SCHREIER, S. Effect of a kosmotropic ion on doxorubicin self-assembly and interaction with biomimetic systems. **Progr. Coll. Pol. Sci.**, v.128, p.156-158, 2004.

SAMAD, A.; SULTANA, Y.; AQIL, M. Liposomal drug delivery systems: an update review. **Curr Drug Deliv.**, v.4, p. 297-305, 2007.

SAPOLA, J. L.; SMITH, C. E.; BRANDT, C. P. Postoperative Pain Control, **Surgical Clinics of North America**, v. 95, n. 2, p. 301 – 318, 2015.

SCARPARO, H.C., MAIA, R.N., FILHO, E.A.S., SOARES, E.C.S., COSTA, F.W.G., FONTELES, C.S.R., BEZERRA, T.P., RIBEIRO, T.R., ROMERO, N.R., Plasma mepivacaine concentrations in patients undergoing third molar surgery. **Australian Dental Journal.** v. 61, n. 4, p. 446 – 454, 2016.

SELBRANT, I.; BRATTWALL, M.; JILDENSTAL, P.; STOMBERG, W.M.; FORSBERG, S.; JAKOBSSON, F. Anaesthetics and analgesics; neurocognitive effects, organ protection and cancer reoccurrence an update. **Int. J. Surg.** v. 34, p. 41-46, 2016

SERCOMBE, L.; VEERATI, T.; MOHEIMANI, F.; WU, Y.S.; SOOD, A.K.; Advances and Challenges of Liposome Assisted, **Drug Delivery**, v.6 p.1-13, 2015.

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

SHIPTON, E. A. New formulations of local anaesthetics - Part I. **Anesthesiol Res Pract**, p. 546-409, 2012.

SILVA, C.M.G.; FRACETO, L.F.; FRANZ-MONTAN, M.; COUTO, M.V.; CASADEI, B. R.; CEREDA, C.M.S.; DE PAULA E. Development of egg PC/cholesterol/a-tocopherol liposomes with ionic gradients to deliver ropivacaína. **J. Liposome Res**, p.1–10, 2015.

SILVA, A. L.R., Preparação, caracterização e estudos de estabilidade em formulações de gel de benzocaína lipossomal e não lipossomal para uso tópico em odontologia. 2007, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia/Unicamp.

SILVA, C.M., **Encapsulação de ropivacaína em lipossomas por carregamento remoto em função de gradiente iônico**, 2015, Tese de doutorado- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas.

SOBRAL, V.R.V. **Formulações em gel para liberação sustentada de benzocaína: composição, estabilidade, citotoxicidade e permeação na pele**. 2012, Dissertação de Mestrado em Bioquímica - Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

TOBE, M.; OBATA, H.; SUTO, T.; YOKO, H.; NAKAZATO, Y.; TABATA, Y.; SAITO, S. Long-term Effect of Sciatic Nerve Block with Slow-release Lidocaine in a Rat Model of Postoperative Pain. **J. Anesthesiology**, v. 112, n. 6, p.1473-1481, 2010.

TOFOLI, G. R.; CEREDA, C. M.; DE ARAUJO, D. R.; DE PAULA, E.; BRITO, R. B. JR.; PEDRAZZOLI, J. JR.; MEURER, E.; BARROS, F. A.; GROppo, F. C.; VOLPATO, M. C.; Ranali, J. Pharmacokinetic and local toxicity studies of liposome-encapsulated and plain mepivacaine solutions in rats. **Drug Deliv**, v. 17, n. 2, p. 68-76, 2010.

TOFOLI, G. R.; CEREDA, C. M.; GROppo, F. C.; VOLPATO, M. C.; FRANZ-MONTAN, M.; RANALI, J.; DE ARAÚJO, D. R.; DE PAULA, E. Efficacy of liposome-encapsulated mepivacaine for infiltrative anesthesia in volunteers. **J Liposome Res.**, v. 21, n. 1, p. 88-94, 2011.

TOFOLI, G.R.; CEREDA, C.M.S.; ARAÚJO, D.R.; FRANZ-MONTAN, M.; GROppo, F.C.; QUAGLIO, D.; PEDRAZZOLI JUNIOR, J.; CALAFATTI, S.A.; BARROS, F.A.P.; DE PAULA, E. Pharmacokinetic study of liposome-encapsulated and plain mepivacaine formulations injected intra-orally in volunteers. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 64, p.397-403, 2012.

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

TORCHILIN, V.P. Liposomes in drug delivery. **Adv. Deliv. Sci. Technol.**, p. 289-328, 2012.

TU, S.; MCGINNIS, T.; KRUGNER-HIGBY, L.; HEATH, T.D. A mathematical relationship for hydromorphone loading into liposomes with trans-membrane ammonium sulfate gradients. **J. Pharm. Sci.**, v. 99, p. 2672-2680, 2011.

VASQUES, F.; BEHR, A.U.WEINBERG, G.; ORI, C.; DI GREGORIO, G. A Review of Local Anesthetic Systemic Toxicity Cases Since Publication of the American Society of Regional

Anesthesia Recommendations: To Whom It May Concern. **Reg. Anesthesia & Pain Medicine**, v. 40, n. 6, p. 698–705, 2016.

VERLINDE, M.; HOLLMANN, M.W.; STEVENS, M.F.; HERMANN, H.; WERDEHAUSEN, R.; LIRK, P. Local Anesthetic-Induced Neurotoxicity, **Int. J. Mol. Sci.** v. 17, p. 1-14.

VIEIRA, A.L.N. **Complexo de inclusão do anestésico local ropivacaína em ciclodextrina, encapsulado em lipossomas.2012**, Dissertação de Mestrado em Bioquímica - Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

WARREN, R.C. **Physics and architecture of cell membranes**. Bristol and Philadelphia, Adam-Hilger, 1987.

WEINIGER, C.F.; GOLOVANEVSKI, L.; DOMB, A.J.; ICKOWICZ, D. Extended release formulations for local anaesthetic agents. **Anaesthesia**. v.67, n.8, p.906-916,2012.

WEINIGER, C. F.; GOLOVANEVSKI, M.; SOKOLSKY-PAPKOV, M.; Domb, A. **Expert Opin. Drug Deliv**, v.7, n.6, p.737-752, 2010

WILES, M.D.; NATHANSON, M.H. Local anaesthetics and adjuvants-future developments. **Anaesthesia**, v.65, p.22-37, 2010.

WOLFE, J.W.; BUTTERWORTH, J.F.; Local anesthetic systemic toxicity: update on mechanisms and treatment. **Curr. Opin. Anaesthesiol.** 24, 561–566, 2011.

ZHANG, Y.; LIN, H.,YI, W.B. Evaluation of the effects of ketamine on spinal anesthesia with levobupivacaine or ropivacaína, **Experim. and Therap. Med.**, v. 12, p. 2290-2296, 2016.

ZHOU, Y.; HE, M.; ZOU, T.; YU, B. Morphological change in the sciatic nerve, skeletal muscle, heart and brain of rabbits receiving continuous sciatic nerve block with 0,2% ropivacaine. **Int.J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, p.13911-13920, 2016.



## 7. ANEXOS



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito do bloqueio do nervo ciático em ratos tratados com anestésico em lipossomas de gradiente", protocolo nº 4033-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula / Viviane Aparecida Guilherme Damasio, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 27 de outubro de 2015.

Vigência do projeto: 01/2016-06/2016

Espécie/Linhagem: Rato heterogênico / Wistar

No. de animais: 56

Idade/Peso: 05 semanas / 150g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 27 de outubro de 2015.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva



CEUA/UNICAMP

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação da atividade analgésica de formulações de anestésico em lipossomas de gradiente para aplicação intratecal em ratos**", protocolo nº **4003-1**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Eneida de Paula / Viviane Aparecida Guilherme Damasio**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **23 de setembro de 2015**.

**Vigência do projeto:** 11/2015-04/2016

**Espécie/Linhagem:** Rato heterogênico Wistar

**No. de animais:** 56

**Idade/Peso:** 05 semanas / 150g

**Sexo:** machos

**Origem:** CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 23 de setembro de 2015.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
CEUA SLMandic**

Campinas, 20 de junho de 2016.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "**Toxicidade local de novas formulações de ropivacaína encapsuladas em lipossomas com gradiente iônico.**", registrada com o n. 2016/012, sob a responsabilidade de **Prof. Dra. Giovana Tofoli**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA FACULDADE SÃO LEOPOLDO MANDIC (CEUA SLMandic), em reunião de: 06/06/2016.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	17/06/2016 à 17/06/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Rattus Norvegicus Wistar
N. de Animais	60
Peso/Idade	300g
Sexo	Macho
Origem	ANILAB- Animais de laboratório, criação e comércio LTDA

Cordialmente,

*Mara Célia Dambros*

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Célia Dambros**  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA SLMandic