



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

ANA KARINA VIDAL PEREIRA

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO TETRACAÍNA

Vitória de Santo Antão

2012

ANA KARINA VIDAL PEREIRA

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO TETRACAÍNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. CHRISTINE LAMENHA LUNA FINKLER

Co-Orientador: Profa. Dra. NOEMIA PEREIRA DA SILVA SANTOS

Vitória de Santo Antão

2012

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV

P436p Pereira, Ana Karina Vidal
Preparação e caracterização de lipossomas contendo tetracaína / Ana Karina
Vidal Pereira. Vitória de Santo Antão: O autor, 2012.
xiii, 50 folhas: fig.

Orientador: Christine Lamenha Luna Finkler.
Co-orientador: Noemia Pereira da Silva Santos.
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade
Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2012.
Inclui anexos.

1. Lipossoma. 2. Tetracaína. 3. Anestésicos Locais. I. Finkler, Christine
Lamenha Luna. II. Santos, Noemia Pereira da Silva. III. Título.

615.781 CDD (21.ed.)

BIBCAV/UFPE-11/2012



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - MESTRADO ACADÊMICO



Dissertação de Mestrado apresentada por **Ana Karina Vidal Pereira** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO O ANESTÉSICO TETRACAÍNA", orientada pela Prof^a Christine Lamenha Luna Finkler e aprovada no dia 01 de março de 2012, pela Banca Examinadora composta pelos professores:

Emerson Peter da Silva Falcão
Núcleo de Nutrição – CAV/UFPE

Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

Mariane Cajubá de Britto Lira
Núcleo de Nutrição – CAV/UFPE

Autor

Ana Karina Vidal Pereira

Aos meus pais José Valdemar e Laudénice

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, me ajudando e dando forças em todos os dias de minha vida.

Aos meus pais Valdemar e Laudenice, que investiram para que herdasse o maior dos tesouros, o conhecimento. Dedico esta dissertação e esta vitória especialmente a vocês.

A querida orientadora, Profa. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler, uma pessoa especial, exemplo de sabedoria contemplada de modéstia, que tão bem soube transmitir seus ensinamentos, confiança, dedicação e amizade, o meu mais sincero agradecimento.

Aos meus irmãos Fábio e Daniela, sempre me apoiando em minhas escolhas e torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu amor Claudio Lisboa, pelo carinho e incentivo. Obrigado por inspirar-me.

Ao amigo e exemplo de competência Gabriel Locatelli, por sua disponibilidade, competência, amizade e ensinamentos. Muito obrigada.

A querida Renata, sempre disponível e solidária as minhas análises no Departamento de Física da UFPE.

Aos Professores César Andrade e Danielly Andrade pelo uso do disruptor de células.

Aos técnicos do laboratório de Bromatologia do CAV, Silvio e Michelle, pela ajuda e disponibilidade. Obrigada.

Ao Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco, por possibilitar minhas análises indispensáveis ao sucesso de minha pesquisa.

Ao programa de Pós-graduação de Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória (UFPE), por minha inserção no mesmo.

A Bolsa Reuni/Propesq, que me possibilitou dedicação exclusiva ao meu projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1.....	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo geral	3
1.2.2. Objetivos específicos	3
1.3 Revisão da Literatura	4
1.3.1. Lipossomas.....	4
1.3.2. Preparação de lipossomas e capacidade de encapsulação de substâncias.....	8
1.3.3. Anestésicos locais/Tetracaína	11
1.3.4. Associação de lipossomas e anestésicos locais/Tetracaína	14
1.3.5. Planejamento de experimentos e delineamento experimental	15
CAPÍTULO 2.....	18
RESUMO	18
ABSTRACT	19
2.1. Introdução	20
2.2. Materiais e métodos	21
2.2.1. Materiais.....	21
2.2.2. Métodos.....	22
2.2.2.1. Preparação dos lipossomas	22
2.2.2.2. Homogeneização do tamanho das vesículas	25
2.2.2.3. Caracterização dos lipossomas	25
2.3. Resultados e discussão	27
2.3.1. Planejamento experimental da sonicação	27
2.3.2. Planejamento experimental -fase hidrofílica.....	30
2.3.2.1. Avaliação da estabilidade física dos lipossomas	34
2.3.3. Planejamento experimental -fase lipofílica	36
2.3.3.1. Avaliação da estabilidade física dos lipossomas	38
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS	40

ANEXOS.....	49
-------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura química do anestésico tetracaína (Fonte:LIU e FELDMAN, 1983)	13
Figura 2.1: Processo de formação das vesículas lipossomais (Fonte: SANTOS e CASTANHO, 2002).....	22
Figura 2.2: Fotografia do rotaevaporador (Marconi ®), utilizado no preparo do filme lipídico	23
Figura 2.3: Ilustração do sonicador ultrasônico Unique® (adaptado do catálogo Uniquegroup.INC) (a) e do equipamento Malvern Zetasizer Nanoseries / NANO ZS90	25
(adaptado do catálogo Malvern group.INC) (b)	25
Figura 2.4: Curva de contorno (a) e gráfico de Pareto (b) para a variável diâmetro médio de lipossomas em função da potência e do tempo de sonicação (lipossomas contendo 100% - 0,05 g/10 mL de fosfolípido fosfatidilcolina de soja)	28
Figura 2.5: Exemplo de um resultado de distribuição de tamanho dos lipossomas contendo 100% de lipídio (0,05 g/10 mL de fosfolípido fosfatidilcolina de soja) no ensaio 10 do planejamento experimental (3 min de sonicação, 14,9 KHz).....	29
Figura 2.6: Superfície de resposta (a), Curva de contorno (b) e gráfico de Pareto (c) para a variável eficiência de encapsulação de lipossomas preparados na fase hidrofílica	31
Figura 2.7: Curva de contorno (a) e gráfico de Pareto (b) para a variável diâmetro médio de lipossomas preparados na fase hidrofílica	33
Figura 2.8: Estrutura química (a) e representação do modelo da molécula (b) de fosfatidilcolina. Fonte: adaptado de http://www.educared.org/wikiEducared/Estructura_de_la_fosfatidilcolina.html	35
Figura 2.9: Curva de contorno (a) e gráfico de Pareto (b) para a variável eficiência de encapsulação de lipossomas preparados na fase lipofílica	37
Figura 2.11: Curva de calibração de absorbância <i>versus</i> concentração de tetracaína (faixa de concentração de 0 a 0,001 mg/mL; resultados obtidos em quintuplicata)	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Duração da anestesia local em função do tipo de anestésico local	12
Tabela 1.2: Principais anestésicos locais e suas doses máximas recomendadas.....	13
Tabela 2.1: Níveis codificados e valores reais das variáveis tempo e potência de sonicação	24
Tabela 2.2: Níveis codificados e valores reais das variáveis concentração de lipídio:colesterol e concentração de tetracaína para os experimentos realizados em ambas as fases hidrofílica e lipofílica	24
Tabela 2.3: Resultados dos experimentos realizados em triplicata empregando uma relação lipídio:colesterol de 79,5:20,5 (m%/m%) e concentração de tetracaína de 8,37 mg/mL para os lipossomas preparados na fase hidrofílica	30
Tabela 2.4: Resultados dos experimentos de estabilidade física dos lipossomas pela avaliação da variação de tamanho ao longo do tempo das amostras 1 a 4 do planejamento experimental	34
Tabela 2.5: Resultados dos diâmetros dos lipossomas preparados na fase lipofílica.....	38

LISTA DE SÍMBOLOS

Co	Colesterol
Conc. Total TTc	Concentração total de tetracaína
Conc. Difusa TTc	Concentração difusa de tetracaína
°C	Graus Celsius
D	Diâmetro médio dos lipossomas
E	Eficiência de encapsulação
g	Grama
h	Hora
KHz	Quilohertz
mL	Mililitro
m%/m%	Massa percentual/Massa percentual
mmHg	Milímetros de mercúrio
min	Minutos
mg/mL	Miligramas por mililitro
mol	Mol
nm	Nanômetro
PDI	Índice de polidispersidade
P	Potência de sonicação
%	Percentual
%v/%v	Percentual de volume/percentual de volume
rpm	Rotações por minuto
t	Tempo
TTc	Tetracaína
v/v	Volume por volume
α	Nível dos fatores no planejamento experimental

LISTA DE ABREVIATURAS

AL	Anestésico local
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DSPC	Diestearoilfosfatidilcolina
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
FDA	Administração de drogas e alimentos (Food and Drug Administration)
LUV	Vesículas unilamelares largas (Large Unilamellar Vesicles)
MLV's	Vesículas Multilamelares (Multilamellar Vesicles)
MM	Massa molar
pKa	Logaritmo do inverso da constante de acidez (K_a)
PCH	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada
PEG	Polietilenoglicol
REV's	Vesículas de evaporação em fase reversa (Reverse Phase Evaporation Vesicles)
SUV	Vesículas unilamelares pequenas (Small Unilamellar Vesicle)
TH	Temperatura de transição de fase hexagonal
Tt	Temperatura de transição de fase
UV-VIS	Ultravioleta-visível

RESUMO

Este estudo relata o desenvolvimento e caracterização de uma formulação lipossomal contendo o anestésico local tetracaína, visto que o emprego de lipossomas na área farmacêutica tem encontrado ampla aceitação, não somente na terapia clínica como no segmento da cosmética, podendo atuar veiculando os princípios ativos no organismo, tecidos ou células e aumentando sua eficácia terapêutica. O presente estudo teve como objetivo a incorporação do fármaco tetracaína em lipossomas e a caracterização das formulações lipossomais obtidas. Os lipossomas foram preparados utilizando a técnica de hidratação do filme seco de lipídios seguida de sonicação, sendo compostos pelo fosfolípido lecitina de soja. Inicialmente foi realizado um planejamento experimental do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) visando otimizar as condições de sonicação das partículas contendo 100% de lipídio. A determinação do raio hidrodinâmico e distribuição do tamanho das vesículas foi realizada por meio de espalhamento de luz a laser, sendo a condição ótima de sonicação estabelecida a uma potência de 16 KHz e tempo de 3 minutos, obtendo-se tamanhos menores que 800 nm. Em seguida, as formulações lipossomais foram realizadas de duas formas: incorporando-se o fármaco na fase hidrofílica ou na fase lipofílica. Em ambos os casos, foram realizados planejamentos experimentais do tipo DCCR, tendo como variáveis investigadas a relação lipídio/colesterol e a concentração de tetracaína, e como variáveis resposta a eficiência de encapsulação e o diâmetro médio das vesículas. A eficiência de encapsulação foi avaliada por meio da técnica de ultracentrifugação a 30.000 rpm por duas horas (10 °C), sendo a concentração de tetracaína determinada por espectrofotometria a 310 nm. A máxima eficiência de encapsulação (39,7%) foi obtida na fase hidrofílica para uma concentração de tetracaína de 8,37 mg/mL e relação lipídio/colesterol de 79,5:20,5 %. Os lipossomas contendo tetracaína apresentaram estabilidade de aproximadamente 30 dias quando armazenados em suspensão a 4° C, sem alterações nos aspectos macro e microscópico.

Palavras-Chave: Sistemas de Liberação Controlada, Anestésicos Locais, Lipossomas.

ABSTRACT

This study reports the development and characterization of a liposomal formulation of the local anesthetic tetracaine, once that the usage of liposome in the pharmaceutical area has found wide acceptance not only in the clinic therapy, as in the cosmetic segment, it can work linking the active ingredients in the body, tissues or cells and increasing its therapeutic efficiency. The present study aiming the incorporation of the drug tetracaine on liposome and its characterization. The liposomes were prepared using the hydration of dry film lipids technique followed by sonication, being composed by the soya lecithin phospholipid. Initially a Central Composite Rotatable Design was realized to optimize the conditions of sonication of the particles containing 100 % lipid. The determination of hydrodynamic radius and size distribution of vesicles was done by laser light scattering, and the condition of sonication was established at a power of 16 KHz and 3 minutes, obtaining sizes smaller than 800 nm. After, the liposomal formulations were performed on two ways: incorporating the drug on the hydrophilic phase or on the lipophilic phase. On both cases, was used an experimental planning, having as investigated variables the lipid/cholesterol ratio and the tetracaine concentration, and as response variables the encapsulation efficiency and liposomes size. The encapsulation efficiency was evaluated by the ultracentrifugation technique at 30,000 rpm for two hours (10°C), and tetracaine concentration was determined by spectrophotometry at 310 nm. The maximum encapsulation efficiency (39.7%) was obtained on the hydrophilic phase at a concentration of 8.37 mg/mL of tetracaine and 79.5:20.5% lipid/cholesterol ratio. Liposomal dispersions presented stability of about 30 days when stored at 4°C, without changes in macro and microscopic aspects.

Key words: Controlled Release Systems, Local Anesthetics, Liposomes.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Os anestésicos locais (AL) são uma classe de fármacos capazes de induzir o alívio da dor aguda ou crônica em virtude de se ligarem aos canais de sódio (Na^+) das membranas excitáveis, bloqueando assim o influxo destes íons e a propagação do impulso nervoso (COVINO e VASSALLO, 1985). Entre estes se encontra a tetracaína, um anestésico local potente, do tipo amino-éster, usado principalmente por via tópica em oftalmologia e indicado para medição da pressão intra-ocular (tonometria), remoção de corpo estranho, sutura de córnea e raquianestesia (LOFSTROM, 1970). As limitações do uso da tetracaína estão relacionadas à sua baixa estabilidade química (hidrólise da ligação éster por esterases plasmáticas) e sua toxicidade sistêmica.

Por apresentar uma estrutura cilíndrica e ser bastante hidrofóbica, a tetracaína se insere facilmente nas membranas, penetrando profundamente e desorganizando a bicamada em relação a outros tipos de anestésicos do tipo amino-amida e amino-éster (LOFSTROM, 1970).

Os benefícios do uso deste anestésico como medicamento tópico podem ser potencializados por meio do desenvolvimento de uma formulação encapsulada capaz de modular a sua taxa de liberação, de modo a controlar a farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), a farmacocinética (absorção e distribuição) e/ou os efeitos toxicológicos (locais ou sistêmicos).

Os lipossomas são vesículas coloidais fosfolipídicas, extensivamente estudadas como transporte seguro e eficaz de fármacos e compostos ativos (MARGALIT, 1995). A grande potencialidade terapêutica desses carreadores deve-se a sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição lipídica, carga superficial, fluidez da membrana e sua capacidade de incorporar tanto fármacos lipofílicos na membrana lipídica, quanto fármacos hidrossolúveis no compartimento aquoso interno (ANSEL *et al.*, 2000). Para a indústria farmacêutica, novas tecnologias de sistemas de liberação controlada representam uma

ferramenta estratégica com a finalidade de condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos (SAHOO e LABAHASETWAR, 2003).

O objetivo do presente estudo consistiu em preparar e caracterizar lipossomas contendo o anestésico local tetracaína, sendo preparados carreadores em duas fases: fase hidrofílica, com a incorporação do fármaco durante a hidratação do filme lipídico, e fase lipofílica, incorporando a tetracaína durante a preparação do filme. As duas formas de preparação foram realizadas com a finalidade de se determinar qual metodologia poderia acarretar numa maior eficiência de encapsulação do fármaco. Os experimentos foram realizados por meio de um planejamento de experimentos, visto que há uma ausência significativa da aplicação desta ferramenta estatística nas pesquisas envolvendo sistemas de liberação controlada de fármacos. Tais planejamentos permitem a obtenção de informações precisas sobre as variáveis de interesse com um menor número de experimentos, levando à obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Preparar e caracterizar lipossomas contendo o anestésico local tetracaína.

1.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a melhor condição de potência e tempo de sonicação sobre o tamanho de lipossomas contendo apenas lipídio por meio de um planejamento experimental.
- Preparar lipossomas contendo tetracaína na fase hidrofílica utilizando diferentes composições lipídio-colesterol e diferentes concentrações da droga por meio de um planejamento experimental.
- Preparar lipossomas contendo tetracaína na fase lipofílica utilizando diferentes composições lipídio-colesterol e diferentes concentrações da droga por meio de um planejamento experimental.
- Caracterizar os lipossomas (capacidade de encapsulação, tamanho e estabilidade *in vitro*).

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1. Lipossomas

As primeiras tentativas para a obtenção de um sistema transportador eficaz tiveram como base experimentos utilizando vesículas de nylon e outros polímeros sintéticos para o encapsulamento de biomoléculas. Contudo, essa abordagem mostrou-se totalmente inadequada, visto que essas vesículas de material artificial se acumulam no organismo (SANTOS e CASTANHO, 2002).

Nos últimos 30 anos, o desenvolvimento da nanotecnologia gerou diversos desafios na área de inovação farmacológica e está transformando a área dos sistemas de liberação de compostos biologicamente ativos (COUVREUR e VAUTHER, 2006).

A descoberta sobre o comportamento de determinados lipídios em meio aquoso foi feita por Alec Bangham, em 1965. Esses estudos mostraram a capacidade desses lipídios de se organizarem em bicamadas e formarem vesículas esféricas artificiais, capazes de oferecerem barreiras para a difusão do soluto, sendo este o primeiro avanço na área. Tais sistemas têm sido amplamente estudados no mundo com o propósito de direcionar e controlar fármacos (SAKATA *et al.*, 2007).

Allison e Gregoriadis demonstraram, em 1971, as propriedades imunoadjuvantes dos lipossomas (SIMONETTI e ANDRADE, 1996). Partindo desses estudos, outros avanços relacionados à aplicação de lipossomas foram desenvolvidos, inclusive uma vacina associada contra hepatite A, que foi licenciada em humanos em 1995 (FREZÁRD *et al.*, 2005). Portanto, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada tem sido alvo de estudos há pelo menos quatro décadas, sendo utilizados como carreadores de drogas antivirais, antifúngicos, antibióticos, medicamentos anti-câncer e melhoria nas propriedades terapêuticas dos anestésicos locais (LAW *et al.*, 2000; KOTWANI *et al.*, 2002; ERRIDGE *et al.*, 2002; MURA *et al.*, 2007; BRIONES *et al.*, 2008).

Conceitualmente os lipossomas correspondem a sistemas carreadores coloidais, sob a forma de vesículas esféricas microscópicas, constituídos de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo. As caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior das vesículas,

enquanto suas cabeças polares para o exterior da bicamada, mantendo o contato com a fase aquosa (RANADE, 1989).

Sua membrana lipídica é capaz de controlar a liberação de moléculas hidrofílicas encapsuladas na cavidade aquosa, por meio da difusão lenta, assim como as moléculas lipofílicas, mediante a ação dos líquidos corporais sobre a estrutura da membrana lipossomal (ANSEL *et al.*, 2000).

O grande valor dos lipossomas como modelo de biomembranas se dá pelo fato das vesículas poderem ser preparadas a partir de constituintes naturais, com finalidade de se obter uma estrutura idêntica à porção lipídica das membranas biológicas, inclusive a humana. Esta similaridade entre lipossomas e membranas naturais pode ainda ser melhorada pela inclusão de proteínas, formando um ambiente que se aproxima ainda mais do fisiológico, mas com o benefício de se poder controlá-lo, de maneira a determinar o papel de cada componente em um determinado fenômeno a ser estudado (ORIVE *et al.*, 2004).

A adição de compostos naturais como o PEG (polietilenoglicol) à superfície dos lipossomas possibilita o aumento do tempo de permanência deste carreador na corrente sanguínea, minimizando sua captura por macrófagos. Estudos mostram que a natureza da interação entre os lipídios, a composição e o método de preparo dos lipossomas determina o padrão, o tamanho e o número de bicamadas lipídicas formadas. O tamanho do lipossoma afeta a biodistribuição, pois, após a administração subcutânea, lipossomas menores que 120 nm atravessam rapidamente os capilares, enquanto que lipossomas com cerca de 200 nm ou mais tendem a permanecer no local da injeção (GRANT e BANSINATH, 2001). Na administração por via intramuscular, o destino dos lipossomas varia conforme o diâmetro: os menores passam para a corrente sanguínea; os de tamanho médio dirigem-se para o sistema linfático, enquanto que os maiores permanecem localizados e liberam lentamente seu conteúdo. Quando injetados por via venosa, os lipossomas são rapidamente removidos da corrente sanguínea, principalmente pelas células fagocitárias do sistema retículo-endotelial do baço, pelas células de *Kupffer* do fígado e também pelos hepatócitos. Dentro dessas células os lipossomas fundem-se com os lisossomas e a estrutura do fosfolipídio é degradada, permitindo a liberação do fármaco que foi incorporado em seu interior (SIMONETTI e ANDRADE, 1996).

A vantagem dos lipossomas como carreadores de fármacos é a sua biocompatibilidade elevada, especialmente quando estes são formados de lipídios pertencentes às famílias de lipídios naturais (FREZÁRD, 2005). O processo de encapsulação consiste em aprisionar um fármaco dentro do lipossoma, sendo que este será orientado pela sua hidrofiliidade ou lipofiliidade. As drogas hidrofílicas tendem a

permanecer no compartimento central e aquoso e os fármacos lipofílicos encontram-se dispersos na bicamada lipídica, permanecendo mais tempo encapsulados devido ao alto particionamento na fase membranar (HARRY *et al.*, 1997).

A encapsulação de fármacos em lipossomas tem a função de veicular uma concentração necessária e determinada de um fármaco (anestésicos, vacinas, bactericidas, antivirais, etc.), em um local ou órgão específico. Através da afinidade das biomembranas com as células locais, os lipossomas podem promover uma liberação lenta e controlada da droga. Neste caso, a ocorrência de uma possível toxicidade sistêmica será minimizada, pois somente uma fração desejável da droga será disponibilizada para o local de determinada ação, o que aumentará a eficácia da droga minimizando seus efeitos adversos. Isto porque há similaridade entre os monômeros lipídicos constituintes dos lipossomas (fosfatidilcolina de ovo, de soja ou sintética) com as membranas biológicas humanas (MALINOVSKY *et al.*, 1997).

Alguns produtos lipossomais aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) e comercializados incluem: Ambisome® (anfotericina B lipossomal), indicado para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e para segundo tratamento da leishmaniose; Daunoxome® (daunorrubicina lipossomal), para tratamento de Sarcoma de Kaposi; Doxil® (daunorrubicina em lipossomas furtivos), para Sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e de mama; Depocyt® (citarabina lipossomal), para meningite; e Visudyne® (verteporfina lipossomal), para degeneração macular com tratamento a laser.

De maneira geral, os lipossomas podem ser classificados em cinco categorias, de acordo com sua composição e aplicação:

a) Lipossomas convencionais

São formados de fosfatidilcolina ou de surfactantes não iônicos e colesterol. Esses lipossomas, quando administrados por via endovenosa, são naturalmente capturados pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário, principalmente do fígado, do baço e da medula óssea. Quando os fármacos são administrados na forma encapsulada nos lipossomas convencionais ocorre um aumento da concentração desses carreadores nos órgãos citados, assim como a redução da concentração em órgãos que apresentam capilares contínuos.

b) Lipossomas de longa circulação

São lipossomas com a superfície modificada de tal modo que não sejam reconhecidos pelas células do sistema fagocitário mononuclear. Tais carreadores representam um passo determinante para sua aplicação *in vivo*.

A primeira geração desses lipossomas continha componentes hidrofílicos naturais como o monosialogangliosídeo GM1, com a finalidade de torná-los similares aos eritrócitos (ALLEN e CHONN, 1987) e foram denominados lipossomas *stealth*. O desenvolvimento da segunda geração de lipossomas de longa circulação foi motivado pela busca de outras opções clinicamente seguras, os quais contém na sua composição derivados lipídicos do polímero hidrofílico polietilenoglicol (PEG), sendo escolhido o metoxiPEG-diestearilfosfatidiletalona (mPEG-DSPE) para a preparação de lipossomas estericamente estabilizados (KLIBANOV *et al.*, 1990). Tem sido demonstrado que os lipossomas de longa duração podem ser passivamente direcionados para vários tipos de tumores, pelo fato de eles poderem circular por tempo prolongado e extravasar nos tecidos com permeabilidade vascular elevada (LASIC, 1998; SAPRA e ALLEN, 2003).

Nesses lipossomas, a presença de grupos hidrofílicos na superfície pode ser capaz de formar um obstáculo estérico às proteínas do plasma, atuando como opsoninas. Desse modo, os mesmos ficam protegidos do reconhecimento e conseqüente destruição por parte das células do sistema fagocitário mononuclear. Estudos demonstram que a concentração do conjugado PEG na composição da membrana e o tamanho da cadeia do polímero afetam as características de longa circulação desses lipossomas (SEMPLE *et al.*, 1998).

Chou *et al.* (2006) avaliaram a atividade da doxorubicina encapsulada em lipossomas furtivos (Lipo-Dox®) em pacientes com carcinoma ovariano epitelial resistente à platina na dose de 45 mg/m² a cada quatro semanas. A eficácia do Lipo-Dox foi constatada em câncer recorrente e platina-resistente.

Lukyanov *et al.* (2004) modificaram lipossomas de longa duração contendo doxorubicina, comercialmente disponíveis como Doxil®, com anticorpos monoclonais que conseguem reconhecer antígenos da superfície do tumor, mas não de células normais. Um aumento da citotoxicidade desses lipossomas sítio-específicos foi constatado nas células cancerígenas.

c) Lipossomas pH-Sensíveis

Nos lipossomas pH-sensíveis as suas bicamadas lipídicas são intrinsicamente instáveis, não sendo capazes de formação da bicamada a uma determinada temperatura, a chamada temperatura de transição de fase hexagonal (TH). Para estes lipídios obterem a

fase lamelar é necessária a adição de compostos carregados em pH neutro, os quais perdem suas cargas em pH ácido, portanto sua capacidade de estabilizar a bicamada.

A associação de lipídios polimórficos (fosfatidiletanolamina insaturada), com compostos anfífilos fracamente ácidos, como por exemplo o ácido oléico, vem sendo a classe de formulação mais estudada dos lipossomas pH-sensíveis (DRUMOND *et al.*, 2000).

A utilização dos lipossomas pH-sensíveis ocorre na liberação do fármaco no citoplasma ou tecido intersticial das células tumorais, devido ao reduzido pH desse meio quando comparado ao pH fisiológico normal. Os resultados obtidos apontam para um produto útil como carreador de agentes de imagem na identificação de focos inflamatórios e infecciosos.

d) Lipossomas catiônicos

A busca de novas estratégias para o combate à tuberculose tem mostrado que o uso de vacinas de DNA veiculadas em lipossomas catiônicos é bastante promissor. Estes lipossomas, que apresentam carga positiva na superfície, têm sido utilizados para a liberação de ácidos nucleicos dentro da célula (DASS e CHONG, 2006).

A obtenção de lipossomas catiônicos consiste na alimentação e recirculação da dispersão lipídica em fase alcoólica para promover a adsorção destes lipídios em um tubo de vidro, drenagem do sistema e secagem. Os lipídios catiônicos apresentam uma ou duas cadeias de ácidos graxos acopladas a um grupo éster e um grupamento amínico hidrofílico.

e) Lipossomas termo-sensíveis

A mistura de lipídios sintéticos, como por exemplo, a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e a diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), formam este tipo de lipossoma. Tais lipídios possuem uma temperatura de transição de fase (T_t) alguns graus acima da temperatura fisiológica (SANDIP *et al.*, 2000).

1.3.2. Preparação de lipossomas e capacidade de encapsulação de substâncias

De acordo com o processo de preparação, os lipossomas podem ser classificados como unilamelares (apresentam apenas uma bicamada lipídica) e multilamelares (possuem mais de uma bicamada lipídica). Os lipossomas unilamelares por sua vez, podem variar de tamanho, sendo os maiores (LUV- *Large Unilamellar Vesicles*) com proporções que variam

entre 100 a 1000 nm, e os menores (SUV- *Small Unilamellar Vesicles*) com tamanhos, em geral, menores que 100 nm (NEW, 1990). Os lipossomas do tipo LUV e SUV são obtidos a partir das vesículas multilamelares por meio de processos mecânicos, eletrostáticos ou químicos.

De maneira geral, a preparação de lipossomas multilamelares (MLV's) é feita por meio do método da "hidratação do filme seco de lipídios". Esse processo consiste na dissolução dos lipídios em solvente orgânico, o qual evapora para a formação do filme e na subsequente hidratação deste filme com água ou solução tampão, sob agitação mecânica vigorosa.

Outro método utilizado é o de evaporação em fase reversa, que leva à formação de lipossomas oligolamelares de tipo REV's (*Reverse Phase Evaporation Vesicles*). Esse processo permite alcançar maiores taxas de encapsulação que o método de hidratação do filme seco. Entretanto, os lipossomas de tipo REV's se mostram menos estáveis que aqueles do tipo MLV's.

Um inconveniente dos dois métodos citados é que as preparações resultantes só podem ser armazenadas na forma de suspensão aquosa, o que limita o seu potencial como produto farmacêutico, mesmo se a substância encapsulada apresenta um baixo coeficiente de permeabilidade ou se a preparação é mantida na forma de sedimento com pequeno volume externo.

Recentemente, métodos foram propostos para a preparação de lipossomas em escala piloto com possibilidade de escalonamento para a escala industrial, como o método de injeção de etanol com fluxo cruzado, utilizando um módulo de injeção múltipla (WAGNER *et al.*, 2002) baseado na técnica de injeção de etanol (NEW, 1990; PUISIEUX *et al.*, 1995). A preparação de lipossomas através da técnica de fluxo cruzado ocorre em ambiente estéril, sem o imperativo de esterilização posterior do produto acabado, sendo o equipamento qualificado para despirogenização e adaptado para esterilização pelo calor.

O método de aquecimento de uma dispersão de fosfolipídios e colesterol em glicerol a 120°C permite a obtenção de lipossomas em escala piloto de 1L de preparação lipossômica, sendo possível sua utilização em escala industrial. Neste método não há uso de qualquer produto químico ou processos que causem estresse mecânico durante a preparação da formulação lipossomal, sendo o aquecimento o passo principal desta metodologia. Foram obtidos pelo método de aquecimento lipossomas aniônicos complexados com cálcio e DNA, referidos como HM-lipossomas. (MOZAFARI, 2005).

O processo de encapsulação da biomolécula pode ser feito incorporando-a diretamente na solução tampão (hidrofílicos) ou dissolvendo-a na mistura lipídica

(lipofílicos). De acordo com FREZARD *et al.* (2005), maiores taxas de encapsulação e de retenção são obtidas com lipossomas constituídos de fosfolípido de alta temperatura de transição de fase (dipalmitoilfosfatidilcolina, $T_t = 42^{\circ}\text{C}$), de colesterol e de fosfolípido carregado negativamente.

São dois os parâmetros importantes em relação à medida de capacidade de encapsulação de substâncias em lipossomas: a taxa de encapsulação e a relação entre substância encapsulada e o teor de lipídios. Esta relação deverá ser maximizada, pois quanto menor a quantidade de lipídio veiculada, menores serão os riscos associados aos mesmos. Taxas de encapsulação próximas a 100% podem ser obtidas com substâncias lipofílicas incorporadas na membrana dos lipossomas. Os parâmetros citados acima devem ser levados em consideração quando se faz a escolha do método de preparação a ser utilizado, sobretudo para o desenvolvimento de uma preparação farmacêutica.

Outro fator importante a se considerar no processo de encapsulação é verificar se a substância está efetivamente incorporada na membrana e não simplesmente adsorvida na sua superfície ou auto-associada na forma de microcristais em suspensão com os lipossomas. No caso de substâncias hidrossolúveis, é improvável atingir níveis de encapsulação de 100%, devido à necessária co-existência dos compartimentos aquosos interno e externo.

Os lipossomas são classicamente preparados a partir do glicerofosfolípido fosfatidilcolina, sendo a variação do seu diâmetro de 20 a 5000 nm. Quando a membrana destas vesículas lipídicas se encontra na fase cristal-líquido ou “fluida”, ela foi formada por lipídios cuja temperatura de transição (T_t) é menor que a temperatura do meio estudado, permitindo a esses lipídios e suas cadeias hidrocarbonadas uma maior liberdade de movimento. Exemplos desse comportamento podem ser encontrados nos lipídios formados dedimiristoilfosfatidilcolina ($T_t = 23^{\circ}\text{C}$) ou de dioleilfosfatidilcolina ($T_t < 0^{\circ}\text{C}$).

A fase gel ou “rígida”, de modo contrário, é formada de lipídios de temperatura de transição maior que a do meio estudado, restringindo o movimento dos lipídios e apresentando cadeias hidrocarbonadas com conformação “toda-trans”, como os lipossomas formados de diesteraroilfosfatidilcolina ($T_t = 55^{\circ}\text{C}$), por exemplo.

O colesterol representa um importante componente lipídico, podendo aumentar a rigidez de suas membranas no estado cristal líquido e reduzir a rigidez e defeitos estruturais na fase gel.

A carga dos lipídios, sendo positiva ou negativa, também deve ser levada em consideração, visto que poderá influenciar na taxa de incorporação de substâncias, pois impedem a agregação/fusão das vesículas lipídicas e orientam seu destino no organismo.

1.3.3. Anestésicos locais/Tetracaína

Foi em 1860 que a cocaína foi isolada pela primeira vez por Albert Niemann, que constatou que a mesma causava entorpecimento na língua. As propriedades anestésicas da cocaína levaram à sua classificação como primeiro anestésico local. Em 1884, Carl Koller introduziu a cocaína na prática clínica como um anestésico para cirurgia oftalmológica (ARAÚJO *et al.*, 2008). Experiências posteriores, realizadas por Sigmund Freud, demonstraram o potencial de dependência química, o que levou a proibição da cocaína em 1914.

O primeiro anestésico local (AL) sintético surgiu em 1904, a procaína, que se tornou o protótipo dos anestésicos locais por quase meio século (DE JONG, 1994). Outros derivados do ácido para-amino benzóico, tal qual a procaína, foram sintetizados e mostraram-se mais potentes, como a tetracaína, e menos tóxicos, como a cloroprocaína.

O controle da dor é uma constante preocupação para a área de saúde e os anestésicos locais são muito utilizados, tornando-se um dos fármacos mais utilizados em procedimentos cirúrgicos (FRANZ-MONTAN, 2009). O mecanismo de ação dos anestésicos locais está ligado ao bloqueio dos canais de sódio, impedindo a despolarização normal e mantendo a célula em estado de repouso (LOFSTROM, 1970). Estes anestésicos consistem de uma porção lipofílica (um anel aromático não saturado) e uma porção hidrofílica (amina terciária) separadas por uma conexão de cadeia de hidrocarbono, sendo a porção lipofílica essencial para a atividade anestésica (STOELTING e HILLIER, 2007).

Os anestésicos locais podem ser classificados, conforme sua cadeia intermediária, em dois tipos: ésteres ou amidas. Esta classificação tem importância clínica, pois está associada à duração dos efeitos dos mesmos e ao risco de alergias. Os ésteres são hidrolisados por enzimas do plasma e de alguns tecidos, o que pode determinar um efeito menos duradouro, e também possuem um maior risco de alergias. As amidas têm metabolismo hepático e maior tempo de duração, demorando mais para serem ativadas (FRACETO e DE PAULA, 2006). A tetracaína é uma exceção: apesar de ser um éster, é considerado um AL de longa duração (WANMACHER, 1999).

Os anestésicos locais são bases orgânicas fracas e pouco solúveis em água e por esse motivo as soluções comerciais são preparadas como sais ácidos (hidrossolúveis), geralmente obtidos por adição de ácido clorídrico. Assim, apesar de serem bases fracas, as preparações farmacêuticas (hidrocloratos) são levemente ácidas, com o pH variando entre 4,5 a 6,0. Esta acidez aumenta a estabilidade das soluções anestésicas. Quando o anestésico local é injetado nos tecidos (pH = 7,4), há tamponamento do ácido, liberando

base em forma não ionizada, passível de ser absorvida. Quando o pH do meio não favorece essa transformação, a ação do anestésico não se processa. Isto ocorre na presença dos processos inflamatórios e/ou infecciosos, em que o pH tecidual extremamente baixo promove ionização da molécula impedindo sua ação. Em meio ácido, as bases recebem íons hidrogênio e tornam-se carregadas positivamente (ionizadas ou polarizadas), diminuindo seu poder de atravessar membranas celulares (menor lipossolubilidade). O excesso de AL num mesmo sítio de ação não determina uma melhor anestesia, mas sim uma menor resposta tecidual, pois esgota a capacidade tamponante do meio, não liberando a base para a ligação (ANDRADE, 2006).

A escolha de um AL quando o paciente não tem alterações sistêmicas ou em tratamento médico deve ser feita pelo profissional com base no tempo de duração da anestesia e perspectiva em relação ao procedimento clínico a ser realizado (MALAMED, 2005; ANDRADE, 2006).

Todos os anestésicos locais têm ação vasodilatadora, o que faz com que tenham uma rápida absorção pela corrente sanguínea, diminuindo o tempo de anestesia e a sua concentração no local. Para diminuir esses efeitos, estas drogas usualmente são associadas com vasoconstrictores, tais como adrenalina, noradrenalina e levonordefrina. O maior tempo de contato da droga com as fibras nervosas eleva o tempo de anestesia local, diminuindo o risco de toxicidade sistêmica e promovendo a homeostasia (MALAMED, 2005; ANDRADE, 2006). As Tabelas 1.1 e 1.2 demonstram o tempo de duração e as doses máximas recomendadas para alguns anestésicos locais., respectivamente.

Tabela 1.1: Duração da anestesia local em função do tipo de anestésico local

Curta Duração	Duração intermediária	Longa Duração
Procaína (éster)	Lidocaína (amida)	Tetracaína (éster)
Cloroprocaína (éster)	Mepivacaína (amida)	Ropivacaína (amida)
	Prilocaina (amida)	Bupivacaína (amida)
	Articaína (amida)	

Fonte: Baseado em MALAMED (2005)

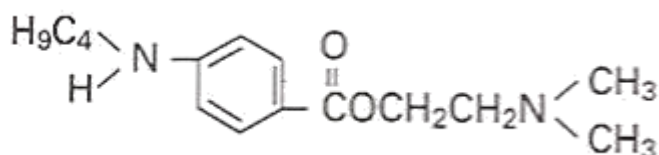
Tabela 1.2: Principais anestésicos locais e suas doses máximas recomendadas

Anestésico Local (por kg de peso)	Dose máxima (mg) (independente da massa)	Máximo absoluto (mg)
Lidocaína 2%	4,4	300
Lidocaína 3%	4,4	300
Mepivacaína 2%	4,4	300
Mepivacaína 3%	4,4	300
Articaína 4%	7,0	500
Prilocaína 3%	6,0	400
Bupivacaína 0,5%	1,3	90
Tetracaína 0,5%	5,0	300

Fonte: Baseado em MALAMED (2005)

Introduzida em 1932, a tetracaína é um potente anestésico local, do tipo amino-éster, muito utilizado topicamente em oftalmologia e raquianestesia (FERREIRA *et al.*, 2009). Esta droga tende a se inserir facilmente nas membranas por possuir uma estrutura cilíndrica e ser hidrofóbica. Tal característica permite que a tetracaína penetre profundamente, desorganizando a bicamada lipídica em relação a outros tipos de anestésicos do tipo amino-amida e amino-éster. A Figura 1.1 mostra a estrutura química do anestésico tetracaína.

Figura 1.1: Estrutura química do anestésico tetracaína (Fonte:LIU e FELDMAN, 1983)



A potência dos anestésicos locais depende de sua lipossolubilidade, sendo deste modo a tetracaína um anestésico local potente (WEIBERG *et al.*, 2003). Se adicionada a um meio ácido (local infectado), aumenta-se a fração ionizada da droga. Assim, a tetracaína, que possui um pK_a de 8,5 e massa molar de 264,35 g/mol, tem um rápido início de ação (KLEIN, 2003). Em casos de superdosagem o paciente poderá apresentar nervosismo,

tontura, visão turva, náuseas, tremores, podendo ocorrer ainda nos casos mais graves parada cardíaco-respiratória. Sua apresentação comercial no mercado inclui o Hexomedine[®], Talsutin Creme[®], solução oftálmica Oto-Betnovate[®], entre outros produtos.

A tetracaína é muito utilizada na raquianestesia quando se necessita de um agente de longa duração. O efeito do anestésico consiste em um incremento gradual do limiar do estímulo elétrico, cuja máxima expressão provoca um bloqueio na condução do impulso. É utilizada por via parenteral, para procedimentos que demoram de duas a três horas. Também é incorporada a várias preparações anestésicas tópicas, sendo utilizada na anestesia da córnea e da conjuntiva (GOODMAN *et al*, 1996).

O uso clínico da tetracaína é subaracnóideo ou tópico, sendo sua concentração de 2% para o uso tópico, com um início de ação rápida e um tempo de duração de trinta a sessenta minutos. Na aplicação subaracnóide, sua concentração é de 0,5% e sua ação tem início rápido, com duração máxima de trezentos e sessenta minutos (STOELTING e HILLIER, 2007).

Os ensaios com anestésicos locais lipossômicos demonstraram viabilidade farmacotécnica e principalmente confirmaram a liberação lenta e prolongada dos agentes que nele foram incorporados. Quando a tetracaína encapsulada foi injetada na cauda do rato obteve-se 43 horas de analgesia, e mesmo com a aplicação direta no nervo ciático não foram observadas lesões teciduais (BOEDEKER *et al.*, 1991).

Num outro estudo para investigar a neurotoxicidade (BURNHAM *et al*, 1994), a tetracaína lipossômica a 10% foi aplicada intratecalmente em ratos e em um segmento da medula espinhal, de C1 (primeira vértebra cervical) a L5 (quinta vértebra lombar), incluindo a porção proximal da cauda equina (responsável pela inervação dos membros inferiores), sendo realizada a análise histológica. Não foram detectados sinais de lesão tecidual, desmielinização ou ainda processos inflamatórios na substância branca medular e na sua raiz nervosa.

1.3.4. Associação de lipossomas e anestésicos locais/Tetracaína

Atualmente, as pesquisas feitas com anestésicos locais buscam alcançar maior efeito e máxima eficiência dos mesmos, diminuindo as contra-indicações e os efeitos colaterais, sendo que as alternativas mais viáveis são as formulações farmacêuticas com liberação controlada de fármacos. A encapsulação em lipossomas e beta-ciclodextrinas tem se mostrado válidas para melhorar algumas das propriedades farmacológicas dos

anestésicos locais.

Na Bélgica, foi realizado um estudo em pacientes com dor devido ao câncer de pulmão com a bupivacaína encapsulada em lipossomas multilamelares, sendo seus efeitos comparados com a solução convencional de bupivacaína em diferentes concentrações. Os resultados mostraram analgesia completa durante 4 horas para solução convencional e 11 horas para a solução encapsulada em lipossomas multilamelares. Também houve menor toxicidade e potencialização da analgesia (sem bloqueio do nervo motor), sendo conveniente a utilização clínica desta solução lipossomal (LAFONT *et al.*, 1996).

Estudos investigaram através de espectroscopia de infravermelho os efeitos da benzocaína e lidocaína sobre as propriedades estruturais e dinâmicas de vesículas lipossomais unilamelares. Foi verificado um aumento na concentração da lidocaína no interior das moléculas lipossomais e uma posição preferencial dos anestésicos pelas membranas fosfolipídicas, as quais podem modular o acesso destas em seus sítios de ligação na proteína canal de sódio voltagem-dependente (FRACETO e DE PAULA, 2006).

A eficácia tópica de anestésicos locais encapsulados em lipossomas já foi demonstrada na área da dermatologia. A similaridade das vesículas com a epiderme, em relação à sua composição, permite que o anestésico penetre através da camada epidérmica atingindo as camadas mais profundas da derme, promovendo a liberação lenta da droga, protegendo-a da metabolização e garantindo maior duração de ação (FRIEDMAN *et al.*, 2001; FRANZ-MONTAN, 2006).

Tem sido demonstrado que os lipossomas de longa duração podem ser passivamente direcionados para vários tipos de tumores, pelo fato deles poderem circular por um tempo prolongado e extravasar nos tecidos com permeabilidade vascular elevada. Tumores sólidos crescentes, assim como regiões de infecção e inflamação, tem capilares com permeabilidade aumentada como resultado da angiogênese. O diâmetro dos poros desses capilares podem se estender de 100 a 800 nm. Os lipossomas contendo o fármaco possuem diâmetros de aproximadamente 60 a 150 nm. Portanto, são pequenos o suficiente para extravasar do sangue para o espaço intersticial do tumor passando através desses poros (SAPRA e ALLEN, 2003).

1.3.5. Planejamento de experimentos e delineamento experimental

O plano do experimento e particularmente o delineamento experimental devem garantir as propriedades necessárias para a derivação das inferências que constituem o

objeto do experimento. Não há um conjunto de regras e procedimentos que garanta a elaboração de um plano de experimento que cumpra essas exigências. Entretanto, a observância de alguns requisitos e princípios básicos é fundamental para o sucesso de qualquer experimento (KEMPTHORNE, 1979).

A exposição desses delineamentos clássicos é comum em textos de Estatística Experimental e a ampla difusão desses delineamentos os tornou amplamente acessíveis aos pesquisadores. Em particular, a disponibilidade de esquemas de delineamentos experimentais mais complexos tem facilitado sua utilização. Outra razão da tendência generalizada do uso desses delineamentos é a facilidade propiciada para a análise de dados, que se tornaram de grande importância na época em que as facilidades para o processamento de análises estatísticas eram precárias (SHADISH, 2002).

O objetivo do experimento é a derivação de inferências referentes a relações causais entre as características respostas relevantes e as características explanatórias que são definidas pelo problema e pela hipótese científica. Essas inferências são baseadas em uma amostra onde também estão presentes as características estranhas cujos efeitos sobre as características respostas ficam confundidos com efeitos das características explanatórias. Assim, essas inferências devem basear-se nos efeitos dessas duas origens e, particularmente, na relação entre esses efeitos (SHADISH, 2002).

A designação delineamento de experimento ou delineamento experimental também é usada com o significado mais estrito da forma de associação entre a estrutura das condições experimentais e a estrutura das unidades. A estrutura das condições experimentais deve ser estabelecida em consonância com os objetivos do experimento, enquanto que a estrutura das unidades é elaborada segundo as possibilidades de material experimental (MEAD, 1988).

De acordo com Pinto e Schwaab (2011), planejar experimentos pode ser definido como:

- a) Definir as variáveis a serem observadas e que, portanto, constituem o universo da investigação;
- b) Definir como e com que equipamentos as variáveis serão medidas e/ou avaliadas;
- c) Definir o conjunto de medidas a serem feitas e as condições da experimentação;
- d) Definir a sequência experimental a ser seguida, dado que nem todas as observações podem ser feitas ao mesmo tempo.

O experimento deve prover as inferências relevantes a seus objetivos ao custo mínimo. Para esse propósito o plano do experimento deve satisfazer as seguintes propriedades ou requisitos essenciais:

- . estabelecimento do plano antes do início da execução do experimento;
- . estimação dos erros que afetam efeitos de fatores experimentais;
- . precisão;
- . validade;
- . simplicidade, economia de recursos e exeqüibilidade;
- . manifestação dos efeitos reais dos tratamentos e;
- . previsão dos procedimentos de inferência estatística e provimento de medida de incerteza.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi incorporar a tetracaína em lipossomas utilizando como ferramenta o planejamento experimental, ausente na maioria dos trabalhos envolvendo nanopartículas, possibilitando desse modo a realização de experimentos que possam ser reproduzidos sob condições controladas.

CAPÍTULO 2

Preparação e caracterização de lipossomas contendo o anestésico tetracaína

Ana Karina Vidal Pereira, Noêmia Pereira da Silva Santos, Christine Lamenha Luna Finkler
Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil, 55608-680.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a incorporação do fármaco tetracaína em lipossomas e a sua caracterização. Os lipossomas foram preparados utilizando a técnica de hidratação do filme seco de lipídios seguida de sonicação, sendo compostos pelo fosfolípido lecitina de soja. Inicialmente foi realizado um planejamento experimental do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) visando otimizar as condições de sonicação das partículas contendo 100% de lipídio. A determinação do raio hidrodinâmico e distribuição do tamanho das vesículas foi feita por meio de espalhamento de luz a laser, sendo a condição ótima de sonicação estabelecida a uma potência de 16 KHz e tempo de 3 minutos, obtendo-se tamanhos menores que 800 nm. Em seguida, as formulações lipossomais foram realizadas de duas formas: incorporando-se a droga na fase hidrofílica ou na fase lipofílica. Em ambos os casos, foram realizados planejamentos experimentais do tipo DCCR, tendo como variáveis investigadas a relação lipídio/colesterol e a concentração de tetracaína, e como variáveis resposta a eficiência de encapsulação e o diâmetro médio das vesículas. A eficiência de encapsulação foi avaliada por meio de ultracentrifugação a 30.000 rpm por 2 horas (10 °C), e a concentração de tetracaína foi determinada por espectrofotometria a 310 nm. A máxima eficiência de encapsulação (39,7%) foi obtida na fase hidrofílica para uma concentração de tetracaína de 8,37 mg/mL e relação lipídio/colesterol de 79,5:20,5 %. Os lipossomas apresentaram estabilidade de cerca de 30 dias quando armazenados a 4 °C, sem alterações nos aspectos macro e microscópico.

Palavras-Chave: Sistemas de Liberação Controlada, Anestésicos Locais, Lipossomas

ABSTRACT

The present study aiming the incorporation of the drug tetracaine on liposome and its characterization. The liposomes were prepared using the hydration of dry film lipids technique followed by sonication, being composed by the soya lecithin phospholipid. Initially a Central Composite Rotatable Design was realized to optimize the conditions of sonication of the particles containing 100 % lipid. The determination of hydrodynamic radius and size distribution of vesicles was done by laser light scattering, and the condition of sonication was established at a power of 16 KHz and 3 minutes, obtaining sizes smaller than 800 nm. After, the liposomal formulations were performed on two ways: incorporating the drug on the hydrophilic phase or on the lipophilic phase. On both cases, was used an experimental planning, having as investigated variables the lipid/cholesterol ratio and the tetracaine concentration, and as response variables the encapsulation efficiency and liposomes size. The encapsulation efficiency was evaluated by the ultracentrifugation technique at 30,000 rpm for two hours (10°C), and tetracaine concentration was determined by spectrophotometry at 310 nm. The maximum encapsulation efficiency (39.7%) was obtained on the hydrophilic phase at a concentration of 8.37 mg/mL of tetracaine and 79.5:20.5% lipid/cholesterol ratio. Liposomal dispersions presented stability of about 30 days when stored at 4°C, without changes in macro and microscopic aspects.

Key words: Controlled Release Systems, Local Anesthetics, Liposomes.

* Artigo a ser submetido à revista Journal of Liposome Research

2.1. Introdução

A nanotecnologia de sistemas de liberação prolongada de fármacos surgiu no início da década de 80, como um método comercialmente atrativo para administração de fármacos e obtenção de sua ação prolongada (OLIVEIRA e SCARPA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

As principais nanoestruturas utilizadas para encapsulação de ativos são os lipossomas, as ciclodextrinas, as nanopartículas poliméricas e as nanopartículas lipídicas. Os ativos podem ainda estar associados à nanopartículas metálicas, fulerenos, dendrímeros ou nanotubos de carbono. As vantagens destes sistemas são a melhora da estabilidade química e física dos ativos, melhora da biodisponibilidade, manutenção do ativo no tecido alvo, muitas vezes, possibilitando a penetração deste em zonas corpóreas de difícil acesso, solubilização de ativos hidrofóbicos, redução de efeitos colaterais e da toxicidade, assim como do número de doses e frequência de administração, proporcionando maior conforto do paciente e, conseqüentemente, a maior adesão ao tratamento (LASIC, 1993; PICOS *et al.*, 2000; SZEJTLI, 1998).

Os lipossomas, também chamados de vesículas lipídicas, são estruturas esféricas, compostas de bicamadas de lipídios que delimitam um compartimento aquoso interno central. Esse tipo de estrutura permite a encapsulação de compostos de naturezas hidrofílica, hidrofóbica e anfifílica, e liberação controlada do conteúdo encapsulado por difusão, através da bicamada lipídica e/ou por erosão da vesícula.

O controle da dor é uma constante preocupação para a área de saúde e os anestésicos locais são muito utilizados, tornando-se um dos fármacos mais utilizados em procedimentos cirúrgicos (FRANZ-MONTAN, 2006). O mecanismo de ação dos anestésicos locais está ligado ao bloqueio dos canais de sódio, impedindo a despolarização normal e mantendo a célula em estado de repouso (LOFSTROM, 1970). Estes anestésicos consistem de uma porção lipofílica (um anel aromático) e uma porção hidrofílica (amina terciária) separadas por uma conexão de cadeia de hidrocarbono, sendo a porção lipofílica essencial para a atividade anestésica (STOELTING e HILLIER, 2007).

Entre estes se encontra a tetracaína, um anestésico local potente, do tipo amino-éster, usado principalmente por via tópica em oftalmologia e indicado para medição da pressão intra-ocular (tonometria), remoção de corpo estranho, sutura de córnea e raquianestesia (LOFSTROM, 1970). As limitações o uso da tetracaína estão relacionadas à

sua baixa estabilidade química (hidrólise da ligação éster por esterases plasmáticas) e sua toxicidade sistêmica.

Ensaio com anestésicos locais lipossômicos demonstraram viabilidade farmacotécnica e principalmente confirmaram a liberação lenta e prolongada dos agentes que nele foram incorporados. Quando a tetracaína encapsulada foi injetada na cauda do rato obteve-se 43 horas de analgesia, e mesmo com a aplicação direta no nervo ciático não foram observadas lesões teciduais (BOEDEKER *et al.*, 1991).

O objetivo deste trabalho consistiu em preparar e caracterizar lipossomas contendo o anestésico local tetracaína, sendo preparados tais carreadores em duas fases: fase hidrofílica, com a incorporação da droga durante a hidratação do filme lipídico, e fase lipofílica, incorporando a tetracaína durante a preparação do filme, com a finalidade de determinar qual metodologia acarretaria uma maior eficiência de encapsulação do fármaco no sistema de liberação controlada. Em ambos os casos, foram realizados planejamentos experimentais do tipo DCCR, tendo como variáveis investigadas a relação lipídio/colesterol e a concentração de tetracaína, e como variável resposta a eficiência de encapsulação e o tamanho dos lipossomas.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Materiais

Os lipossomas contendo tetracaína foram preparados utilizando os seguintes lipídios, droga, solventes, reagentes e equipamentos:

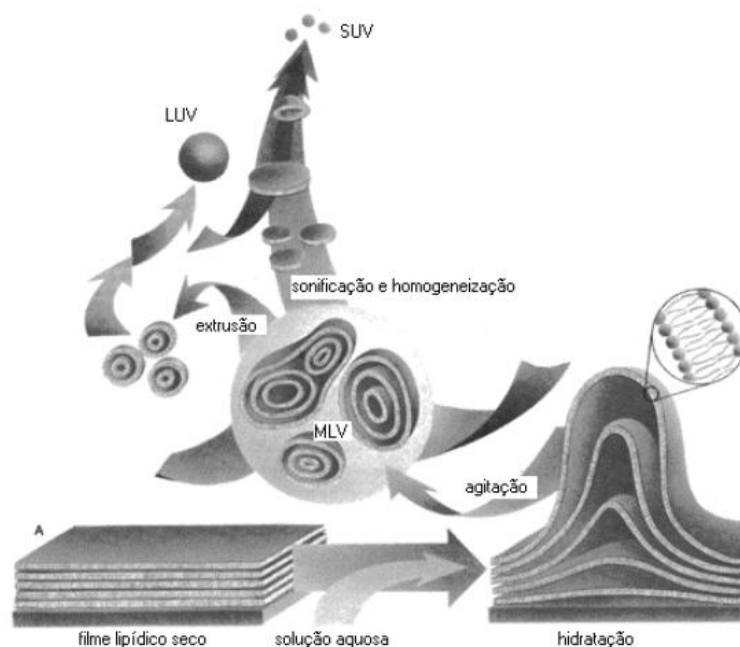
- fosfatidilcolina de soja hidrogenada, MM 784,5g/mol (Via Farma®);
- tetracaína, MM 264,35 g/mol (Sigma®);
- clorofórmio (CHCl₃), MM 119,38 g/mol (Merck®);
- metanol (CH₃OH), MM 32,04 g/mol (Merck ®);
- água Milli-Q, MM18,01 g/mol;
- colesterol, MM 386,65 g/mol (Sigma®);
- rotaevaporador (Marconi ®);
- sonicador ultra-sônico (Unique®);
- centrífuga refrigerada (Hermle Z36HK);
- analisador de tamanho de partícula (Malvern Zetasizer Nanoseries/ NANO ZS90);
- espectrofotômetro UV-VIS (Spectrum Meter SP- 2000UV).

2.2.2. Métodos

2.2.2.1. Preparação dos lipossomas

A preparação dos lipossomas foi realizada pelo método de Bangham (NEW, 1990) através da hidratação do filme seco, com posterior homogeneização do tamanho das vesículas (LASIC,1993). O processo de formação das vesículas lipossomais pode ser observado na Figura 2.1.

Figura 2.1: Processo de formação das vesículas lipossomais (Fonte: SANTOS e CASTANHO, 2002)



O fosfolípido estocado à temperatura ambiente (27 °C) era pesado de acordo com a composição pretendida e então solubilizado juntamente com colesterol em 10 mL de uma solução 9:1 de clorofórmio/metanol (v/v). A solução era homogeneizada durante 5 minutos em evaporador rotatório (Figura 2.2), seguindo-se da evaporação do solvente sob vácuo (650 mmHg) a uma temperatura acima da transição de fases do lipídio ($T_t = 33^{\circ}\text{C}$) até a formação do filme seco. Na etapa de hidratação do filme seco era adicionada 10 mL de uma solução 60:40 (%v/%v) de água/etanol a temperatura ambiente.

Figura 2.2: Fotografia do rotaevaporador (Marconi ®), utilizado no preparo do filme lipídico



Inicialmente, foram preparados lipossomas contendo 100 % de lipídio (0,05g de lipídio /10 mL de solvente), visando a otimização das condições de sonicação. Esta foi avaliada a partir de um planejamento de experimentos do tipo DCCR com repetição em triplicata no ponto central (nível 0) e quatro axiais (níveis $\pm \alpha$, onde $\alpha = 1,4142$), totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes consideradas foram tempo e potência de sonicação e a variável dependente (resposta) foi o tamanho do lipossoma. Os experimentos foram realizados randomicamente e a Tabela 2.1 mostra os níveis codificados e os valores reais das variáveis estudadas.

Após definidas as condições ótimas de sonicação, foram preparados lipossomas contendo tetracaína de acordo com dois planejamentos experimentais. No primeiro, a droga era incorporada durante a hidratação do filme lipídico, correspondendo à fase hidrofílica. No segundo planejamento experimental, os lipossomas foram preparados com a incorporação da droga durante a preparação do filme lipídico (droga na fase lipofílica). Em ambos os casos, foi realizado um planejamento do tipo DCCR, tendo como variáveis independentes a proporção lipídio-colesterol e a concentração da droga e como variáveis dependentes o tamanho do lipossoma e a eficiência de encapsulação. A solução de hidratação era composta por uma solução 60:40 (%v/%v) de água/etanol, sendo esta escolhida por solubilizar a tetracaína à temperatura ambiente. A Tabela 2.2 mostra os níveis codificados e os valores reais das variáveis estudadas.

Tabela 2.1: Níveis codificados e valores reais das variáveis tempo e potência de sonicação

Ensaio	Tempo		Potência	
	Nível codificado	Valor (min)	Nível codificado	Valor (KHz)
1	-1	1,58	-1	11,4
2	+1	4,42	-1	11,4
3	-1	1,58	+1	18,4
4	+1	4,42	+1	18,4
5	-1,41	1	0	14,9
6	+1,41	5	0	14,9
7	0	3	-1,41	10,0
8	0	3	+1,41	19,8
9	0	3	0	14,9
10	0	3	0	14,9
11	0	3	0	14,9

Tabela 2.2: Níveis codificados e valores reais das variáveis concentração de lipídio:colesterol e concentração de tetracaína para os experimentos realizados em ambas as fases hidrofílica e lipofílica

Ensaio	Relação lipídio:colesterol		Tetracaína	
	Nível codificado	Valor (m%/m%)*	Nível codificado	Valor (mg/mL)
1	-1	57:43	-1	2,5
2	-1	57:43	+1	8,5
3	+1	93:7	-1	2,5
4	+1	93:7	+1	8,5
5	0	75:25	-1,41	1,0
6	0	75:25	+1,41	10,0
7	-1,41	50:50	0	5,5
8	+1,41	100:0	0	5,5
9	0	75:25	0	5,5
10	0	75:25	0	5,5
11	0	75:25	0	5,5

*100% corresponde a uma massa de 0,05 g em 10 mL de solvente

2.2.2.2. Homogeneização do tamanho das vesículas

As amostras obtidas pelo método da hidratação do filme seco foram mantidas em repouso por 30 minutos, para atingirem o equilíbrio, antes da homogeneização do tamanho das vesículas. Esta foi realizada pelo método de sonicação, utilizando um sonicador ultrasônico (Unique®) (Figura 2.3a), nas condições otimizadas obtidas no planejamento de experimentos (3 min e 16 KHz).

2.2.2.3. Caracterização dos lipossomas

a) Determinação do raio hidrodinâmico e a distribuição do tamanho das vesículas

O raio hidrodinâmico e a distribuição de tamanho dos lipossomas foi realizada no departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco, através do espalhamento de luz utilizando um laser (Malvern Zetasizer Nanoseries/NANO ZS90) (Figura 2.3b), em 1 mL da dispersão a 25°C.

Figura 2.3: Ilustração do sonicador ultrasônico Unique® (adaptado do catálogo Uniquegroup.INC) (a) e do equipamento Malvern Zetasizer Nanoseries / NANO ZS90 (adaptado do catálogo Malvern group.INC) (b)



a



b

b) Eficiência de encapsulação (E%)

Foi determinada pela técnica de ultracentrifugação (centrífuga refrigerada / Hermle Z36HK). As amostras eram centrifugadas a 30.000 rpm por 2 h a 10 °C, e os sobrenadantes diluídos em 100 mL de uma solução 60:40 (%v/%v) de água/etanol para determinação da concentração de tetracaína não encapsulada. Esta técnica foi escolhida com base na descrição na literatura de que não há diferença entre o método de diálise em membranas de celulose e o método de ultracentrifugação (CHENG *et al*, 2005).

A eficiência de encapsulação (E%) foi determinada pela Equação 1:

$$E(\%) = \left[\frac{\text{Conc. Total TTC} - \text{Conc. Difusa TTC}}{\text{Conc. Total TTC}} \right] \times 100 \quad (1)$$

onde:

Conc. Total TTC = concentração inicial de tetracaína

Conc. Difusa TTC = concentração de tetracaína no sobrenadante (não encapsulado)

c) Determinação da concentração de tetracaína

Inicialmente foram preparadas soluções contendo tetracaína em solução água/etanol 60:40 (v%/v%) e em diferentes faixas de concentração (0 a 0,001 mg/mL e 0 a 0,015 mg/mL, sendo esta última a concentração máxima que permitiu um ajuste linear entre as variáveis). A partir dos dados experimentais, foram plotadas curvas padrão de absorbância (determinada a 310 nm) *versus* concentração. Os experimentos foram realizados em quintuplicata e em dias alternados.

Para determinar as concentrações de tetracaína nos sobrenadantes obtidos após centrifugação (droga não encapsulada), foram realizadas leituras de absorbância e determinadas as respectivas concentrações por meio das curvas de calibração previamente plotadas. As curvas padrão obtidas encontram-se no Anexo.

d) Avaliação da estabilidade física dos lipossomas ao longo do tempo

Foi determinada por meio da observação das características macroscópicas (homogeneidade, cor, consistência, sedimentação, floculação, coalescência e separação de

fases) e das características microscópicas (diâmetro médio e distribuição de tamanho de partículas).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Planejamento experimental da sonicação

A Figura 2.4a mostra a curva de contorno para a variável diâmetro médio dos lipossomas contendo 100% (0,05 g/10 mL) de lipídio. Pode-se notar que valores de potência e tempo de sonicação correspondentes a 16 KHz e 3 min, respectivamente, produzem lipossomas com tamanho menores que 800 nm. Desta forma, estas condições de sonicação foram selecionadas nos experimentos posteriores para diminuição de tamanho das partículas.

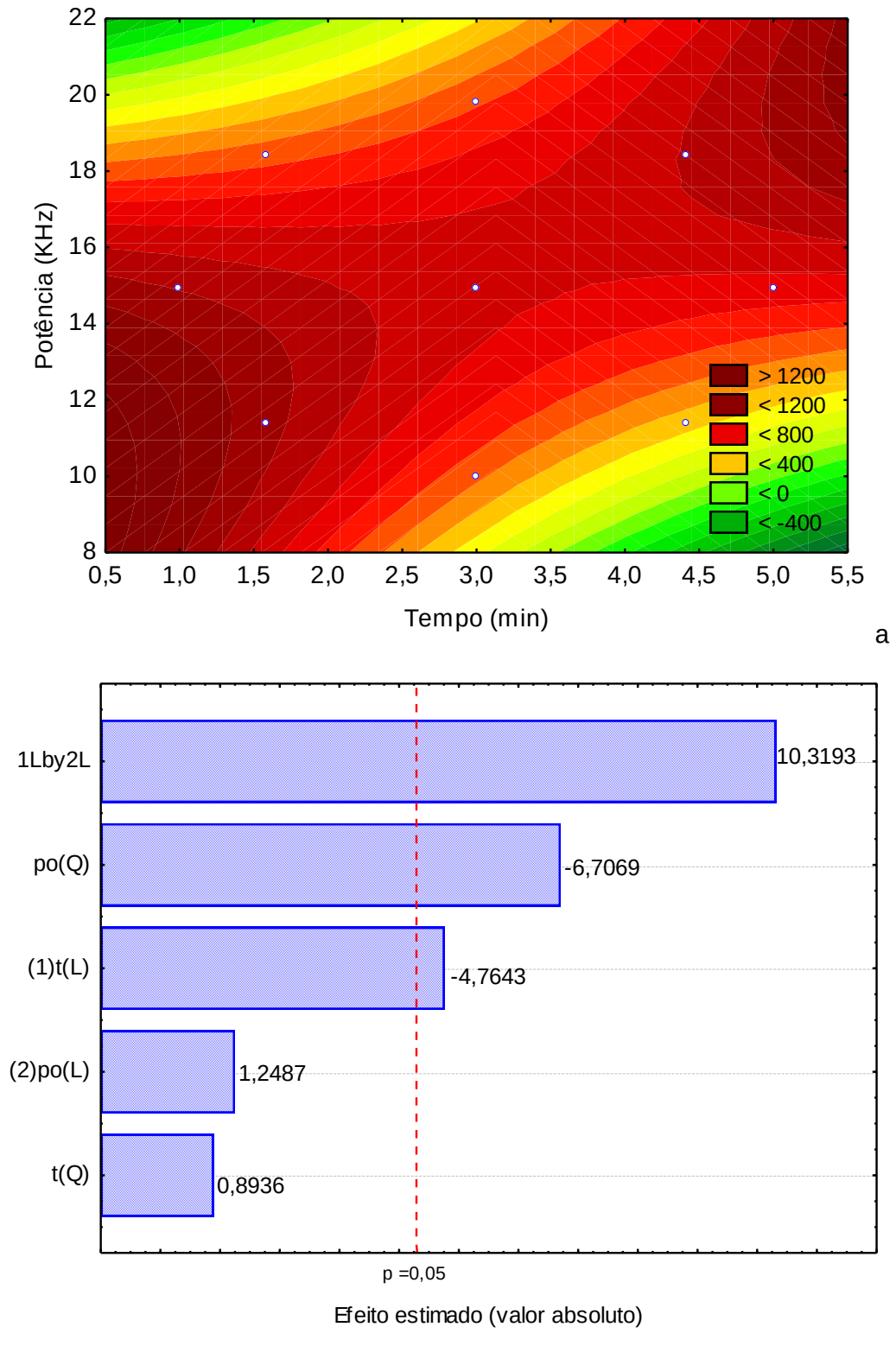
Os lipossomas obtidos no diâmetro LUV foram escolhidos por serem capazes de extravasar do sangue para o espaço intersticial, sem causar embolia pulmonar (LASIC, 1993; SAPRA e ALLEN, 2003). Além disso, estudos realizados sobre o tamanho das vesículas mostram que a taxa de reconhecimento e remoção pelo sistema fagocitário de defesa varia de acordo com o diâmetro, sendo o tempo de meia-vida dos lipossomas grandes (>1000 nm) de 0,2 h, enquanto os menores apresentam uma meia-vida de 1,5 h (LAVERMAN *et al.*, 1999).

Na sonicação com potência acima de 16 KHz e tempos de sonicação maiores que 4,5 min ocorreu uma perda da estabilidade física da formulação lipossomal, sendo observada a formação de uma espuma viscosa na suspensão, tendo como resultado o subsequente aumento do diâmetro das vesículas.

Na Figura 2.4b temos o diagrama de Pareto, no qual podemos observar que o termo quadrático da variável potência de sonicação e os termos lineares das variáveis tempo e interação potência x tempo foram significativos. O modelo empírico que descreve o comportamento das variáveis nas condições experimentais investigadas é apresentado na Equação 2, estando os termos significativos destacados em negrito, onde D é o diâmetro, t o tempo e P a potência de sonicação.

$$D = 730,99 - \mathbf{901,70*t} + 9,50*t^2 + 201,72*P - \mathbf{11,85*P^2} + \mathbf{52,64*t*P} \quad (2)$$

Figura 2.4: Curva de contorno (a) e gráfico de Pareto (b) para a variável diâmetro médio de lipossomas em função da potência e do tempo de sonicação (lipossomas contendo 100% - 0,05 g/10 mL de fosfolipídio fosfatidilcolina de soja)

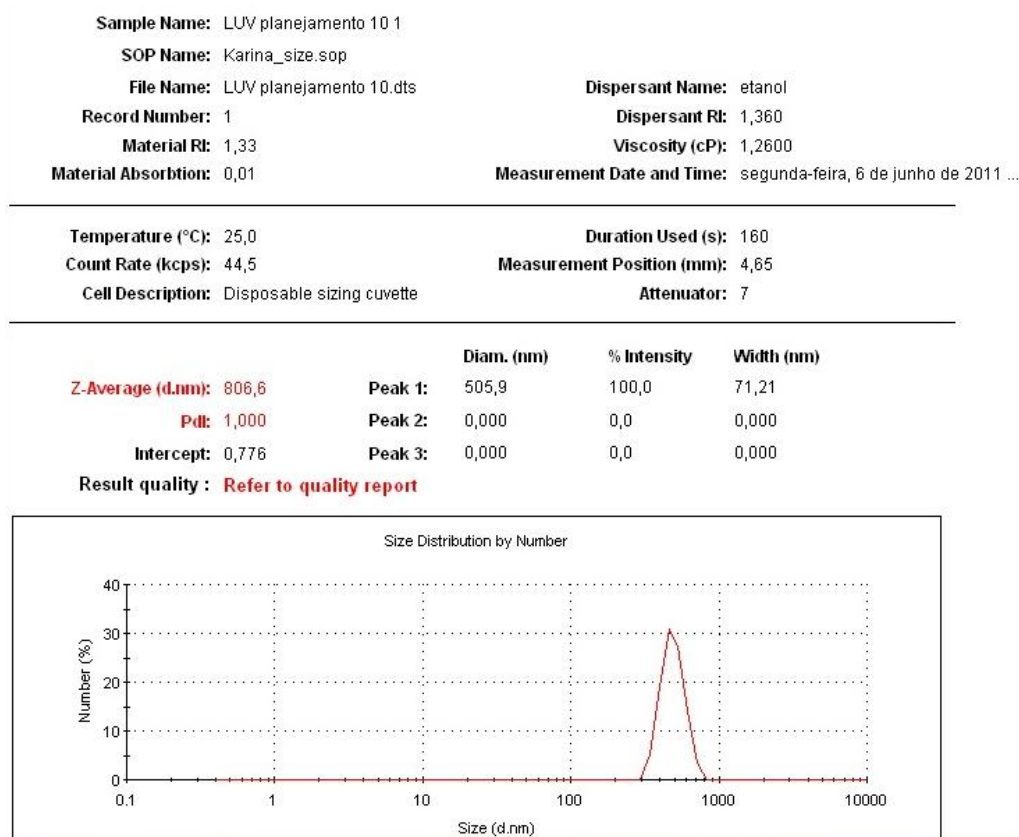


A análise distribuição de tamanhos de um material compreende sua caracterização por meio do tamanho de partículas e da frequência com que ocorrem em uma determinada faixa de tamanhos (LIMA e LUZ, 2001). Este é um parâmetro importante utilizado no controle de qualidade de amostras lipossomais, pois a estabilidade física das dispersões depende do tamanho da partícula e do índice de polidispersidade.

A determinação do raio hidrodinâmico e distribuição de tamanho das vesículas lipossomais foram feitas a partir de trabalhos semelhantes descritos pela literatura, usando sistemas de liberação controlada no carregamento de fármacos (MURA *et al*, 2007; SIMONETTI e ANDRADE, 1996; LIU e FELDEMAN, 1983).

A Figura 2.5 mostra um exemplo de resultado de distribuição do tamanho dos lipossomas contendo 100 % de lipídio, realizado no ensaio 10 do planejamento experimental.

Figura 2.5: Exemplo de um resultado de distribuição de tamanho dos lipossomas contendo 100% de lipídio (0,05 g/10 mL de fosfolipídio fosfatidilcolina de soja) no ensaio 10 do planejamento experimental (3 min de sonicação, 14,9 KHz)



2.3.2. Planejamento experimental - fase hidrofílica

A Figura 2.6a mostra a superfície de resposta e a Figura 2.6b a curva de contorno para a variável resposta eficiência de encapsulação dos lipossomas. Como podemos observar a região ótima para a eficiência de encapsulação foi atingida. Os valores críticos do modelo que maximizam a resposta foram equivalentes a uma concentração de tetracaína de 8,37 mg/mL e relação lipídio/colesterol de 79,5:20,5 (m%/m%), para uma máxima eficiência de encapsulação de 39,7%.

Na Figura 2.6c observamos que o único efeito significativo ($p < 0,05$) é o termo linear da variável tetracaína. Este termo encontra-se em negrito na Equação 3, onde E representa a eficiência de encapsulação, Ttc a concentração de tetracaína e Co o teor de colesterol.

$$E = -41,51 + \mathbf{15,78*Ttc} - 0,83*Ttc^2 + 1,48*Co - 0,02*Co^2 - 0,09*Ttc*Co \quad (3)$$

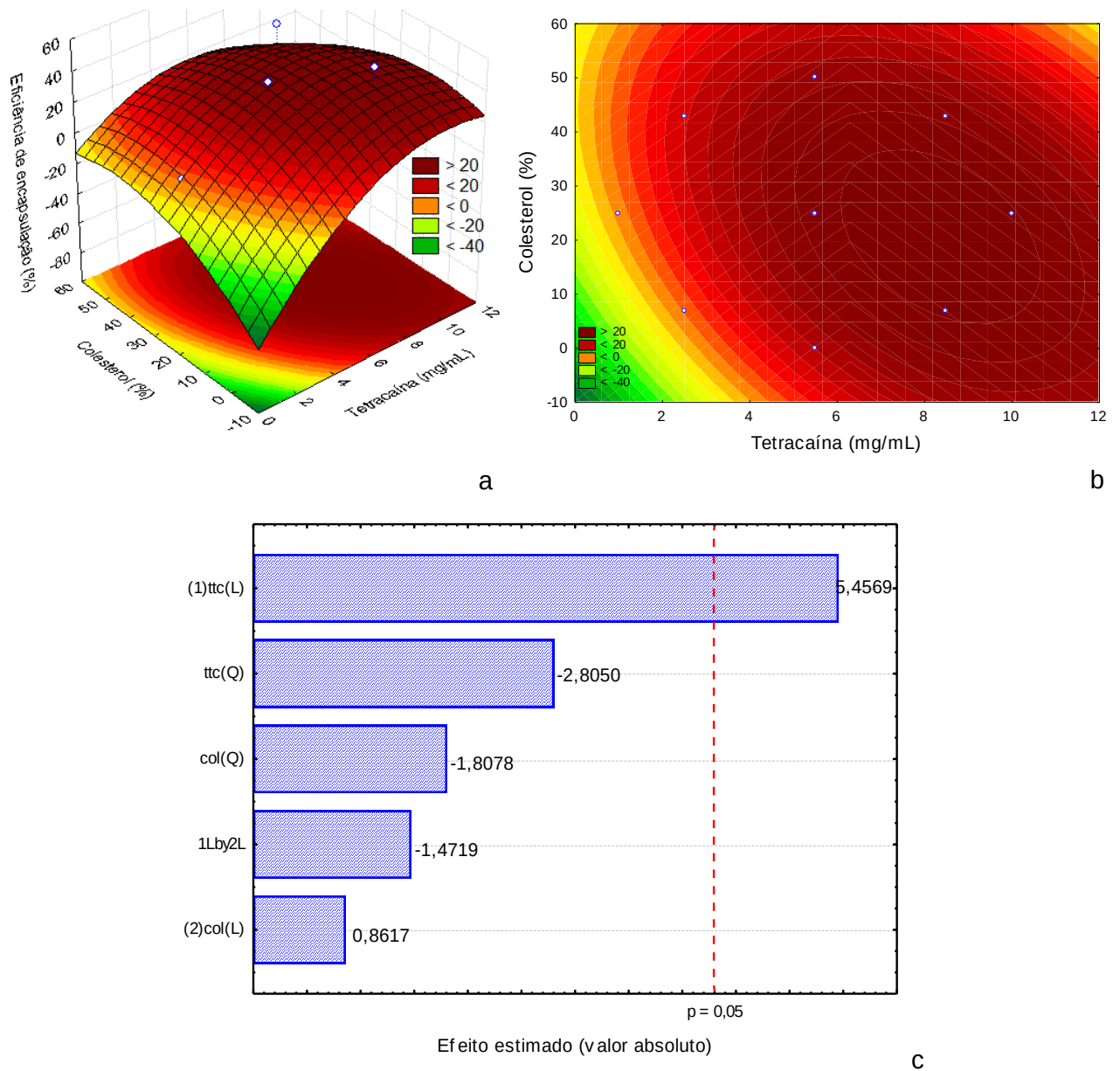
Com o objetivo de confirmar os resultados previstos pelo modelo, foram realizados experimentos em triplicata na condição ótima prevista (8,37 mg/mL e relação lipídio/colesterol de 79,5:20,5 (m%/m%). Os resultados estão mostrados na Tabela 2.3, obtendo-se um valor médio de $32,3 \pm 7,5$ %, estando próximo do valor previsto.

Tabela 2.3: Resultados dos experimentos realizados em triplicata empregando uma relação lipídio:colesterol de 79,5:20,5 (m%/m%) e concentração de tetracaína de 8,37 mg/mL para os lipossomas preparados na fase hidrofílica

Ensaio	Relação lipídio:colesterol	Tetracaína	E (%)
	Valor (m%/m%)*	Valor (mg/mL)	
1	79,5:20,5	8,37	32
2	79,5:20,5	8,37	25
3	79,5:20,5	8,37	40

*100% corresponde a uma massa de 0,05 g em 10 mL de solvente

Figura 2.6: Superfície de resposta (a), Curva de contorno (b) e gráfico de Pareto (c) para a variável eficiência de encapsulação de lipossomas preparados na fase hidrofílica



Por serem moléculas anfifílicas, os anestésicos locais têm grande afinidade pela membrana celular (COVINO e VASSALO, 1976). Podemos classificar as teorias propostas para explicar os mecanismos de ação destes compostos em duas categorias: a que atribui o efeito anestésico à ligação na proteína canal de sódio voltagem-dependente de axônios e a que considera a interação dos anestésicos locais com os lipídios da membrana (conhecida como “hipótese do lipídio”) como o mecanismo responsável pelas alterações na proteína

canal de sódio, levando ao bloqueio da condução do estímulo nervoso. Apesar destas teorias, trabalhos têm relatado que a tetracaína, incorporada em membranas de fosfatidilcolina, fosfatidilserina e biológicas, é expulsa da bicamada por aumento da pressão (AUGER *et al*, 1987), observação comprovada por meio da técnica de infravermelho.

A literatura traz relatos da ação de anestésicos locais na diminuição da temperatura de transição de fases de lipídios, estudada por diferentes técnicas. Estudos utilizando calorimetria diferencial de varredura registraram uma diminuição da Tt de vesículas de fosfatidilcolina causada pela partição da benzocaína, procaína, tetracaína, lidocaína e dibucaína, em concentrações iguais às necessárias para 50% de bloqueio na condução do estímulo nervoso (LEE, 1978).

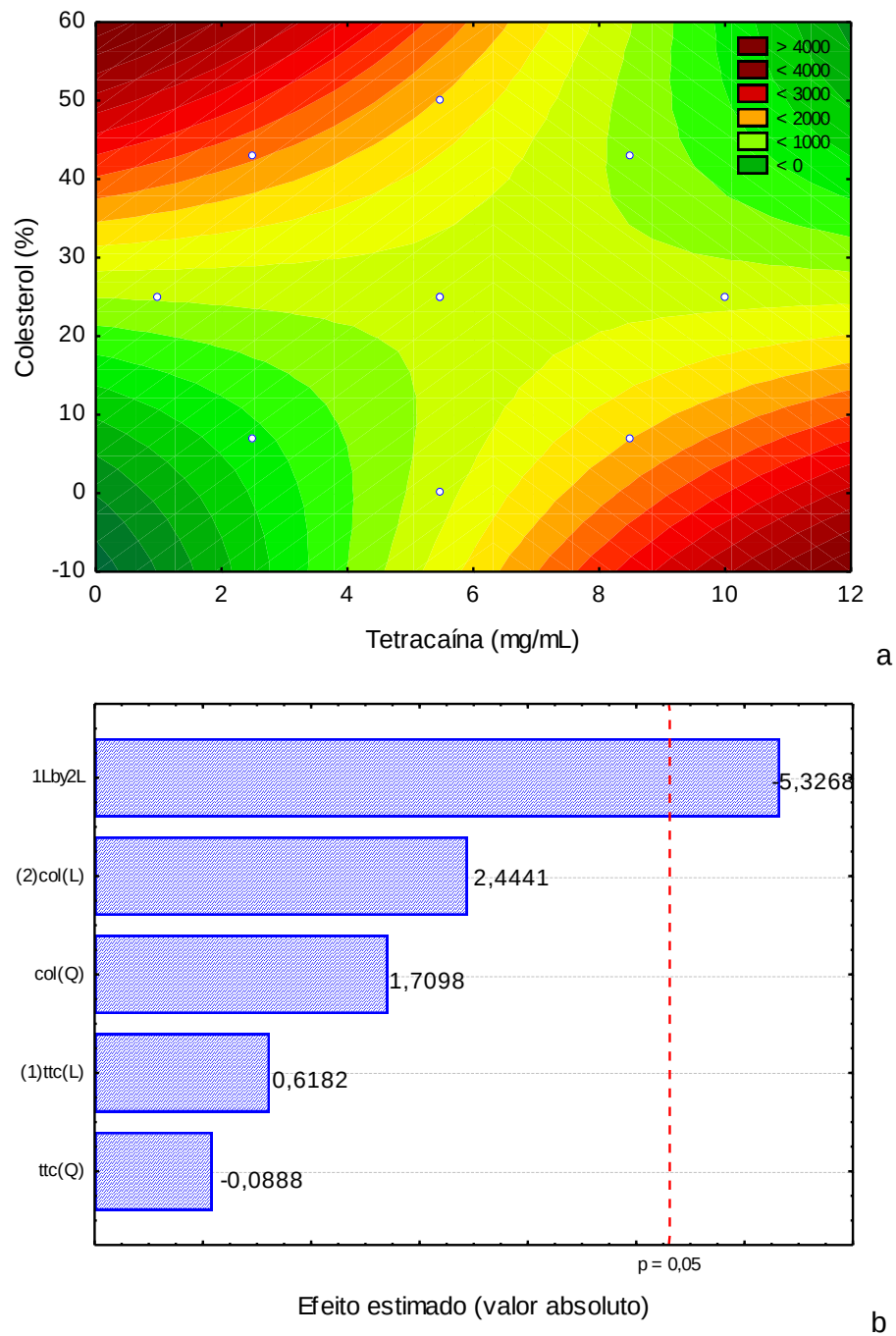
Têm-se estudado a interação de anestésicos locais com membranas lipídicas, através de técnicas de RMN, RPE e fluorescência (DE PAULA e SCHREIER, 1995; FRACETO *et al*, 2006). Para os anestésicos locais do tipo amino-amida (lidocaína, mepivacaína, bupivacaína e etidocaína), o efeito diferencial dos anestésicos locais sobre regiões da bicamada monitoradas por diferentes sondas paramagnéticas, alterações nos tempos de relaxação longitudinal dos lipídios em presença de anestésicos locais e interações intermoleculares específicas entre hidrogênios dos anestésicos locais e lipídios forneceram evidências sobre a localização destes no interior da bicamada (FRACETO *et al*, 2006).

Um fato que deve ser levado em consideração é que grupos fosfato apresentam cargas negativas, que podem estabilizar cargas positivas dos anestésicos locais. Há na literatura vários relatos da competição de anestésicos locais com íons cálcio, pela interação com grupamentos fosfato de vesículas lipídicas (DE KRUIJFF *et al*, 1978; CULLIS e VERKLEIJ, 1978).

Importante destacar que esta localização é a preferencial, isto é, onde o AL deve se encontrar na maior parte do tempo. No entanto, não podemos esquecer que estas moléculas anfifílicas distribuem-se rapidamente entre a membrana biológica e a fase aquosa (DE PAULA e SCHEREIR, 1996), ou seja, apresentam um equilíbrio dinâmico, além da inserção preferencial no interior das bicamadas. Esta localização, determinada pelas interações do AL com os fosfolipídios deve ser determinante para a ação específica do mesmo em sítio(s) de ligação na proteína canal de sódio (RASGADALE, 1994).

A Figura 2.7a mostra a curva de contorno para a variável resposta diâmetro médio dos lipossomas. Pode-se notar que nos valores ótimos de relação lipídio:colesterol 79,5:20,5 (m%/m%) e concentração de tetracaína de 8,37 mg/mL são observados tamanhos do tipo LUV (< 1000 nm), adequados para administração da droga em lipossomas. O diagrama de

Figura 2.7: Curva de contorno (a) e gráfico de Pareto (b) para a variável diâmetro médio de lipossomas preparados na fase hidrofílica



Pareto (Figura 2.7b) mostra que o único efeito significativo é o termo de interação concentração de tetracaína x teor de colesterol. Este termo encontra-se em negrito na Equação 4.

$$D = -488,64 + 306,94*TTc - 0,86*TTc^2 + 46,69*Co + 0,52*Co^2 - \mathbf{11,25*TTc*Co} \quad (4)$$

As preparações contendo altas concentrações de tetracaína e baixas de colesterol, bem como concentrações baixas de tetracaína e altas de colesterol apresentaram maiores diâmetros, provavelmente devido a competição destas moléculas pela bicamada lipídica no momento da formação dos lipossomas. Quando as concentrações de ambos foram aumentadas, houve uma diminuição do diâmetro lipossomal e uma diminuição da eficiência de encapsulação.

2.3.2.1. Avaliação da estabilidade física dos lipossomas

A Tabela 2.4 mostra os resultados dos experimentos de estabilidade física dos lipossomas pela avaliação da variação de tamanho médio ao longo do tempo das amostras 1 a 4 do planejamento experimental. A partir de 138 dias de estocagem (4 °C) das formulações, foi observada uma variação do diâmetro médio das vesículas lipossomais e uma diminuição da homogeneidade da formulação, comprovando a diminuição da estabilidade das suspensões. Pode-se observar também que a partir de 166 dias de preparo, as amostras analisadas voltaram a ter seus diâmetros reduzidos em relação à análise anterior. No entanto, do ponto de vista macroscópico as formulações já apresentavam uma viscosidade bem atenuada, com redução do aspecto leitoso inicial e início de sedimentação das partículas.

Tabela 2.4: Resultados dos experimentos de estabilidade física dos lipossomas pela avaliação da variação de tamanho ao longo do tempo das amostras 1 a 4 do planejamento experimental

Ensaio	0 dia		138 dias		166 dias	
	D	p	D	p	D	p
Amostra 1	1833	1,000	3433 (77,1%) 718,5 (22,9%)	0,417	1040	0,057
Amostra 2	887,1	1,000	3463 (62,5%) 859,9 (37,5%)	0,430	1272	0,269
Amostra 3	773,2	1,000	1443 (79,3%) 5174 (20,7%)	0,330	1114	1,000
Amostra 4	2258	0,328	1798 (65,6%) 4690 (34,4%)	0,325	1204	0,596

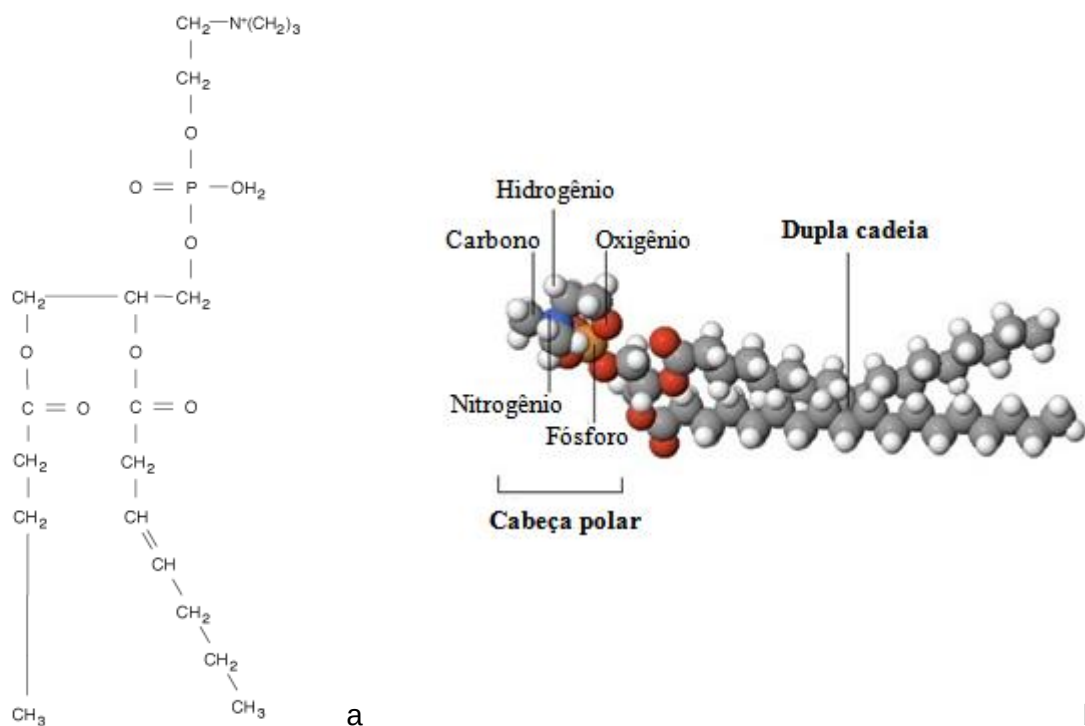
D: diâmetro médio; p: polidispersidade

As formulações lipossomais se mantiveram estáveis por aproximadamente 30 dias, isto é, não apresentaram mudanças no seu aspecto macro e microscópico. Os lipossomas contendo tetracaína exibiram o aspecto leitoso e homogêneo, sem sedimentação das partículas.

Na preparação de lipossomas, as principais matérias-primas utilizadas são os fosfolipídios, principalmente a fosfatidilcolina, e os esteróides, entre eles, o colesterol.

A estrutura química geral dos fosfolipídios tem como base uma molécula de glicerol, na qual as hidroxilas das posições 1 e 2 estão esterificadas por ácidos graxos de cadeia longa e a da posição 3 pelo ácido fosfórico (Figura 2.8). Um dos oxigênios presentes no ácido fosfórico pode se esterificar com várias moléculas orgânicas, como glicerol, colina, etanolamina, serina, etc, sendo que a região do grupamento fosfato representa a cabeça polar do fosfolipídio (PARKS e HELLERSTEIN, 2006).

Figura 2.8: Estrutura química (a) e representação do modelo da molécula (b) de fosfatidilcolina. Fonte: adaptado de http://www.educared.org/wikiEducared/Estructura_de_la_fosfatidilcolina.html



Com o propósito de aumentar a estabilidade das membranas lipídicas, pode-se empregar fosfatidilcolina de soja hidrogenada (PCH) ou colesterol às formulações lipossomais (PIETZYK e HENSCHKE, 2000). Estudos verificaram que a incorporação de colesterol à bicamada dos lipossomas proporciona uma influência positiva na sua estabilidade, exercendo um maior empacotamento das moléculas fosfolipídicas e induzindo à formação de uma estrutura organizada, mais rígida e com menor mobilidade. Isso parece indicar que lipossomas acrescidos de colesterol são mais estáveis (LEE *et al*, 2005).

2.3.3. Planejamento experimental - fase lipofílica

A Figura 2.9a mostra a curva de contorno para a variável resposta eficiência de encapsulação dos lipossomas preparados na fase lipofílica. Ao contrário dos lipossomas preparados na fase hidrofílica, não foi observado um valor ótimo de eficiência. Os resultados oscilaram entre 5,6 e 83 %. Este último valor foi obtido para os menores valores de concentração da droga e de colesterol (1 mg/mL e 25 %, respectivamente), não correspondendo efetivamente a uma alta taxa de encapsulação considerando que o teor de droga em relação ao teor de lipídios é baixo (0,1: 75 m%/m%)

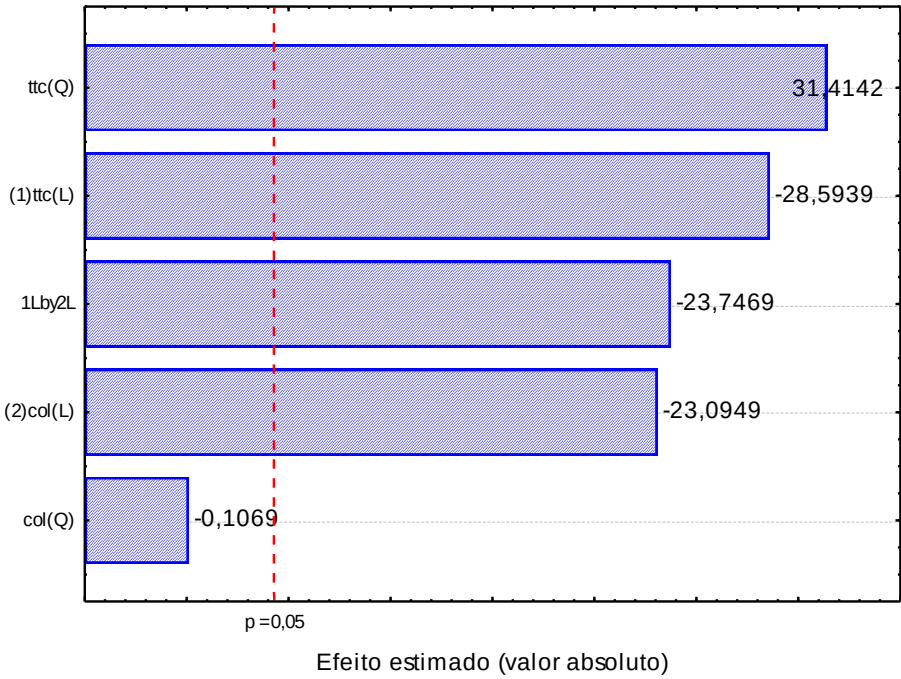
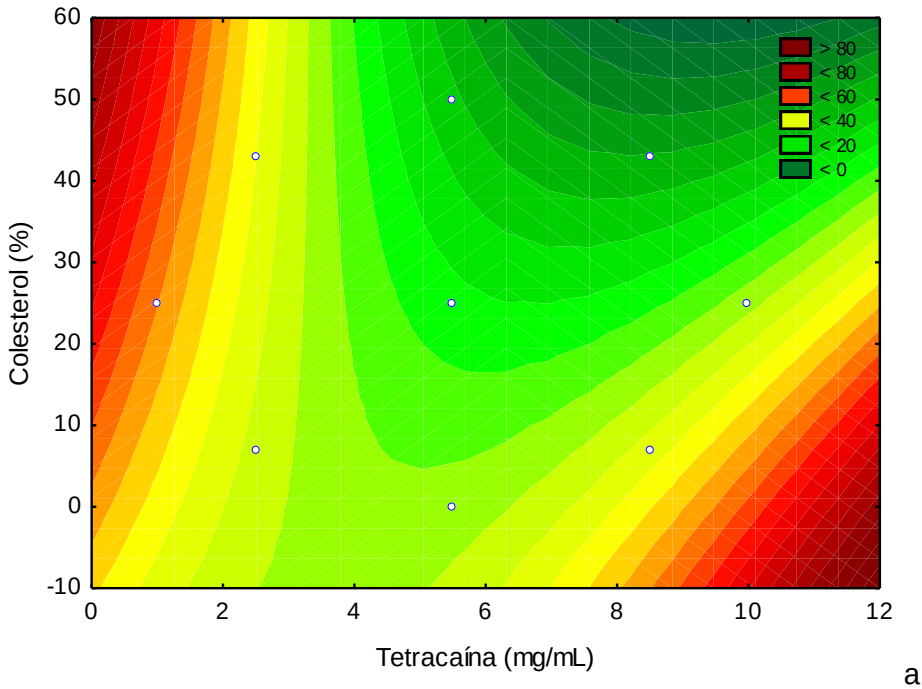
O diagrama de Pareto (Figura 2.9b) mostra que o único efeito que não se mostrou significativo foi o termo quadrático da variável concentração de colesterol. A Equação 5 mostra o modelo teórico previsto, estando em negrito os termos significativos do modelo.

$$E = 50,51 - 9,19*TTc + 0,98*TTc^2 + 0,56*Co - 0,00010*Co^2 - 0,16*TTc*Co \quad (5)$$

Os resultados demonstraram que mesmo a tetracaína sendo um AL lipofílico, pode-se obter um melhor encapsulamento do fármaco na fase hidrofílica e não na fase lipofílica, como o esperado. Estudos demonstram que a tetracaína incorporada em membranas sintéticas (fosfatidilcolina e fosfatilserina) e biológicas é expulsa da bicamada por aumento da pressão (AUGER *et al*, 1987). A incorporação do anestésico pela fase lipídica provoca uma expansão da área superficial de monocamadas (SKOU, 1954) e de bicamadas (SEEMAN, 1966). Esta expansão é favorecida pela diferença entre o comprimento da molécula do anestésico (mais curta) e a dos fosfolipídios. Assim, abaixo do seu ponto de inserção o anestésico criaria um “volume livre” que seria compensado com uma mudança

conformacional das cadeias lipídicas adjacentes, diminuindo a bicamada, bem como a expansão lateral (TRUDELL, 1977).

Figura 2.9: Curva de contorno (a) e gráfico de Pareto (b) para a variável eficiência de encapsulação de lipossomas preparados na fase lipofílica



A avaliação estatística dos resultados em relação ao diâmetro não foi conclusiva, visto que todos os parâmetros não se mostraram significativos a um nível de confiança de 95%. A Tabela 2.5 mostra os resultados obtidos para os diâmetros.

Tabela 2.5: Resultados dos diâmetros dos lipossomas preparados na fase lipofílica

Ensaio	D	p
1	871,3 (97,2%) 2780 (2,8%)	0,335
2	1695,0	0,531
3	1048,0	0,345
4	694,9	1,000
5	429,8	1,000
6	774,7	1,000
7	1045,0	1,000
8	594,0	1,000
9	927,8	1,000
10	2286,0	0,123
11	1903,0	0,137

D: diâmetro médio; p: polidispersidade

2.3.3.1. Avaliação da estabilidade física dos lipossomas

Foi observada uma diminuição do aspecto viscoso das amostras e sedimentação de partículas após o prazo de 30 dias de preparo.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Considerando a carência de informações a respeito de formulações lipossomais à base de tetracaína, o uso da ferramenta de planejamento experimental mostrou-se útil com o objetivo de otimizar as condições de preparo dos lipossomas contendo este anestésico. Foi possível determinar as condições ótimas de sonicação de lipossomas contendo 100 % de lipídio para a obtenção de lipossomas tipo LUV, condições estas que foram utilizadas para o preparo das vesículas contendo o fármaco.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que o método de Bangham para formação do filme seco de lipídios e o respectivo preparo dos lipossomas em duas fases diferentes, hidrofílica e lipofílica, é eficiente na formação de sistemas carreadores de tetracaína. A eficiência de encapsulação da droga mostrou-se maior na fase hidrofílica, mesmo a tetracaína sendo um anestésico hidrofóbico.

Um estudo de condições de processo e composição (com a formação do filme lipídico em duas fases e o teor ativo encapsulado) comprovou a formação de vesículas lipossomais com tamanho na faixa LUV (< 1000 nm) e com baixo fracionamento das partículas lipossomais.

Pode se verificar que as formulações apresentam estabilidade física em suspensão aquosa até 30 dias de preparação das amostras e mantidas a uma temperatura de 4 °C.

A avaliação do conjunto dos resultados obtidos demonstra que as formulações lipossomais contendo o fármaco tetracaína na fase hidrofílica são sistemas promissores de encapsulação do mesmo e, conseqüentemente, de liberação controlada, com potencial para futuras aplicações em estudos de atividade farmacológica.

REFERÊNCIAS

- ANDRADRE, E.D. **Terapêutica medicamentosa em odontologia**. 2 ed. Aries Medicas, São Paulo, 2006.
- ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. **Antitumor activity of cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes**. EuropeJournal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Amesterdam, v. 278, pp. 435-445, 2004.
- ALLEN, T. M.; CHONN, A. **Large unilamellar liposomes whith low uptake intoreticuloendotelial system**. FEBS Letters, v. 223, pp. 42-46, 1987.
- ARAÚJO, D. R.; DE PAULA. E. **Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente**. Química Nova, São Paulo, v.31, p. 1775-1783, 2008.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. J. **Sólidos perorais, cápsulas, comprimidos e sistemas de liberação controlada**. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos, 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, cap. 5, p. 175-250, 2000.
- AUGER, M.; JARREL, H.C.; SMITH, I.C.P.; WONG, P.T.T.; SIMINOVITH, D.J.; MANTSCH, H.H. **Pressure-induced exclusion of a local anesthetic from model and nerve membranes**. Biochemistry. v, 29, p. 8513–8516, 1987.
- BATISTA, M. C.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. **Lipossomas e suas aplicações terapêuticas : Estado da arte**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.43, p. 167- 175, 2007.
- BANERJEE, R. **Liposomes: applications in medicine**. Journal of Biomaterial Applications, London, v. 16, p. 3-21, 2001.

BOEDEKER, B. H.; KLINE, M. D.; BURNHAM K. A. **Peripheral neurotoxicity of lecithin-coated tetracaine micro-crystals.** *Anesthesiology*, New York, v. 79, pp. 825, 1991.

BRIONES, E.; COLINA, C.L.; LANAO, J.M. **Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells.** *Journal Controlled Release*, v.27, p.125-210, 2008.

BURNHAM, K. A.; BOEDEKER, B. H.; KLINE, M. D. **Spinal cord toxicity of lecithin-coated tetracaine micro crystal in the rat.** *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, New York, supp. 18, p. 45, 1994.

CHENG, X.Y.; LIANG, J.X.; LI, Q.G. **Construction of RNA-cointaining virus-like nanoparticles expression vector with cysteine residues on surface and fluorescent decoration,** *Yi Chuang Xue Bao*, v.32, p. 874-878, 2005.

COVINO, B.G; VASSALO, H.G. **Local anesthetics: mechanisms of action and clinical use.** *Grune and Stratton*, cap.3, 1976.

COVINO, B. G.; VASSALO H. G. **Anestésicos locais: mecanismo de ação e uso clínico.** *Editora Colina*, Rio de janeiro, v. 32, p.135, 1985.

COUVRER, P.; VAUTHIER, C. **Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease.** *Pharmaceutical Research*, v.23, n.7, p.1417-1450, 2006.

CHOU, H.; WANG, K.; CHENG, C.; WEI, L.; LAI, C; HSIEH, C.; YANG, Y.; TWU, N.; CHANG, T.; YEN, M. **Pegylated liposomal doxorubicin (Lipo-Dox*) for carcinoma: A Taiwanese gynecologic oncology group study with long-term-follow-up.** *Gynecologic Oncology*, New York, v. 101, p. 423-428, 2006.

CULLIS, P. R.; VERKLEIJ, A. J.; VERVEGAET, P. H. J.Th. **Modulation of membrane structure by Ca²⁺ and dibucaine as detected by ³¹P NMR.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v.11, p.513, 1978.

DASS, C. R. ; CHOONG, P. F. M. **Carrier-mediated delivery of peptidic drugs for cancer therapy.** *Peptides*, v. 27, pp. 3020-3028, 2006.

DE JONG, R.H. **Local Anesthetics.** *Springfield, Illinois*, cap.2, 1994.

DE PAULA, E.; SCHEREIER, S. **Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction.** Brazilian Journal of Medicine, v.29, p.877-894, 1996.

DE KRUIJFF, B.; VAN DEN BESSELAAR, A. M. H. P.; CULLIS, P. R.; VAN DEN BOSCH, H.; VAN DEENEN, L.L. **Polimorphic phase behavior of lipid mixtures as detected by PNMNR. Evidence that cholesterol may desestabilize billayer structure in membrane systems containg phosphatidylethanolamine.** Biochimica et Biophysica Acta, v.1, p.514, 1978.

DRUMOND, D. C.; ZIGNANI, M.; LEROUX, J. C. **Currents status of pH-sensitive liposomes en drug delivery.** Progress in Lipid Research, v. 39, p. 409-460, 2000.

ERRIDGE, C.; STEWART, J.; BENNET-GUERRERO. **The biological activity of a liposomal complete core lipopolysacharide vaccine.** Journal Endotoxin Research, v.8, pp. 39-46, 2002.

FRACETO, L.F.; DE PAULA, E. **Interação de anestésicos locais com lipossomas determinada por espectroscopia de infravermelho.** Revista de Ciências Farmacêutica Básica, v.1, n. 27, p. 27-35, 2006.

FRANZ-MONTAN, M. **Avaliação da eficácia anestésica da ropivacaína a 1% encapsulada em lipossomas em anestesia tópica em odontologia.** Universidade Estadual de Campinas- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, São Paulo, 2006.

FRIEDMAN, P.M.; MAFONG, E.A.; FRIEDMAN, E.S.; GERONEMUS, R.G. **Topical anesthetics update: EMLA and beyond.** Dermatologic Surgery, v.12, n.27, p.1019-1026, 2001

.

FERREIRA, M. et al. **Anestesia peridural para cesariana: Estudo comparativo entre bupivacaína racêmica e bupivacaína com excesso enantiomérico de 50% a 0,5% associados a Sufentanil.** Revista Brasileira de Anestesiologia, Campinas, V. 59, n. 3, 2009.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DIMICHELI, C. **Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio.** Química Nova, São Paulo, v. 8, p. 511-518, 2005.

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W. **Asbases farmacológicas daterapêutica.** 9 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana Editores, Cap. 3, p. 243, 1996.

GRANT, G.J; BANSINATH, M. **Liposomal delivery systems for local anesthetics.** Regional Anesthesia and Pain Medicine, v.26, p.61-63, 2001.

HARRY, H.; SHARATA, M.D; KENETH, H.; KATZ, M.D. **Liposomes.** International Journal of Dermatology, v.55, n.11, 1996.

HAYNES, D. H.; KIRKPATRICK, A. F. **Long duration local anesthetic with human skin.** Regional Anesthesia and Pain Medicine, v.16, p.173-180, 1991.

HINKELMANN, K.; KEMPTHORNE, O. **Design and analysis of experiments.** John Wiley, v.1, p.495. New York, 1994.

KEMPTHORNE, O. **Sampling inference, experimental inference and observation inference.** Sankhya, v.40, p. 115-145, 1979.

KLIBANOV, A. L. et al. **Amphipatic polyetyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes.** FEBS Lett, v.268, p. 235-237, 1990.

KLEIN, S.M. **Successful resuscitation after ropivacaine-induced ventricular fibrillation.** Anesthesia & Analgesia, v.97, n.3, p.901-903, 2003.

KOTWANI, R.N.; GOKHALE, P.C.; BODHE, P.V. **A comparative study of plasma concentrations of liposomal amphotericin-B (L-AMP-LRC-1) in adults, children and neonates.** International Journal of Pharmaceutics, v.238, p.11-15, 2002.

LAVERMAN, P.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W. J. G.; DAMS, E. Th. M.; STORM, G.; CORSTENS, F. H. M. **Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation**. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 37, p. 225-235, 1999.

LAFONT, N.O.; LEGROS, F.J.; BOOGAERTS, J.G. **Use of liposome-associated bupivacaine in a cancer pain syndrome**. Regional Anesthesia and Pain Medicine, v.51, p.578-579, 2006.

LAPA, A.J.; SOURCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. ; CASTRO, M.S.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação farmacológicas de plantas medicinais**. Ed. Lagoa Florianópolis, 2003.

LASIC, D. **Liposomes: From physics to applications**. Elsevier. Amesterdan, 1993.

LASIC, D.D. **Novel applications of liposomes**. Tibtech., v. 16, p. 307-320, 1998.

LAW, S.L.; HUANG, K.J; CHIANG, C.H. **Aciclovir-containing liposomes for potential ocular delivery corneal penetration and absortion**. Journal Control Release. V.63, pp.135-140, 2000.

LEE, A.G. **Effects of charged drugs on the phase transition temperatures of phospholipid billayers**. Biochimica et Biophysica Acta, n. 95, p. 514, 1978.

LEE, S.C., LEE, K.E. ;KIM, J.J.; LIM, S.H. **Combinetd strategies for liposome charactherization during in vitro digestion**. Journal Liposome Research, v.15, p.157-166, 2005.

LIU, P.L.; FELDMAN, H.S. **Comparative CNS toxicity of lidocaine, etidocaine, bupivacaine and tetracainein awake dog following rapid intravenous administration**. Anesthesia & Analgesia, v.62,pp.375-379, 1983.

LIMA, R. M.F.; LUZ, J.A.M. **Análise granulométrica por técnicas que se baeiam na sedimentação gravitacional: Lei de Stokes**. Revista Escola de Minas, v.54, n.2, 2001.

LOFSTROM, B. **Aspects of pharmacology of local anesthetic agents**. Brazilian Journal of Anaesthesiology, v.42, p. 194-206, 1970.

LUKYANOV, A. N.; ELBAYOUMI, T. A.; CHAKILAM, A. R.; TORCHILIN, V.P. **Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody**. Journal Controlled Release, amsterdam, v. 100, p. 135-144, 2004.

MARGALIT, R. **Liposome-mediated drug targeting in topical and regional therapies**. Advanced Drug Carriers System Review, Tel Aviv, v.12, p. 233-261, 1995.

MALAMED, S.F. Manual de anestesia local. 5 ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2005.

MALINOVSKY, J.M. **Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits**. Anesthesia & Analgesia, v.85, p.1331-1336, 1997.

MEAD, R. **The design of experiments: Statistical principles for practical application**. Cambridge University, p.620. Cambridge, 1988.

MOZAFARI, M. R. **Liposomes: an overview of manufacturing techniques**. Cellular & Molecular Biology Letters, Washington, v.10, p. 157-162, 2005.

MURA, P.; MAESTRELLI, F.; RODRIGUEZ, M.L.; MICHELACCI, I.; GHELARDINI, C.; RABASCO, A.M. **Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Amsterdam, v.67, p.86-95, 2007.

NEW, R. R. C. (Ed.). **Liposomes: a practical approach**. IRL/ Oxford University Press, New York, p.432, 1990.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. **Microemulsões : estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos**. Química Nova, v.27, p.131-138, 2004.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V. **Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.1, p.73-79, 2001.

ORIVE, G.; GASCON, A.R.; HERNANDEZ, R.M.; DOMINGUEZ-GIL, A.; PEDRAZ, J.L. **Techniques: new approaches in the delivery of biopharmaceuticals.** Trends in Pharmaceutical Sciences, v.25, p.382-387, 2004.

PARKS, E.J.; HELLERSTEIN, M.K. **Thematic review series: patient-oriented research. Recent advances in lives triacylglycerol and fatty acid metabolism using stable isotope labelling techniques.** Journal Lipid Research, v.47, p.1651-1660, 2006.

PICOS, D.R.; CARRIL, M.G.; MENA, D.F. **Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral.** Revista Cubana de Farmacia, v.34, n.1, p. 70-77, 2000.

PINTO, J. C.; SCHWAAB, M. **Análise de Dados Experimentais II.** Planejamento de Experimentos. 1. ed. Rio de Janeiro: E-Papers, v. 1, p. 514, 2011.

PLATEL, D.; CHOPRA, S.; BERMAN, M. D. **Serious systemic toxicity resulting from use of tetracaine for pharyngeal anesthesia in upper endoscopic procedures.** Digestive Disease and Science, v.34, p.882-884, 1989.

PIETZYK, B.; HENSCHKE, **Degradation of phosphatidycholine in liposomes containing carboplatin in dependence on composition and storage conditions.** International Journal Pharmaceutics, v.196, p.215-218, 2000.

PUISIEUX, F. ; COUVREUR, P.; DELATRE, J.; DEVISAGUET, J. P. **Liposomes, new system and new trends in their applications.** Éditions de Santé, Paris, p.266, 1995.

RAGSDALE, D.S.; MCPHEE, J.C; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. **Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channel by local anesthetics.** Science, v.16, p.1724-1728, 1994.

RANADE, W. **Drug delivery systems. Site specific drug delivery using liposomes as carriers.** Journal Clinical Pharmacology, v.29, p.685-694, 1989.

RABASCO, A. **Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes.** Europe Journal Pharmacy Biopharmaceutics, v.67, p. 86-95, 2007.

SANDIP, B.T.; UDUPA, N.; RAO, B.S.S.; DEVI, P.U. **Thermosensitive liposomes and localised hyperthermia – an effective bimodality approach for tumour management.** Indian Journal of Pharmacology, v. 32, p. 214-220, Pondicherry, 2000.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. **“Lipossomas: a bala mágica acertou?”**, Revista Química Nova, v. 25, p. 1181-1185, 2002.

SHADISH, W. R.; COOK, T.D.; CAMPBELL, D.T. **Experimental and quasi-experimental designs for generalized causal inference.** Houghton Mifflin, p.623. Boston, 2002.

SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. **Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signal using sensor and electroresponsive hydrogel.** Radiation Physics and Chemistry, v.76, p.733-737, 2007.

SKOU, J.C. Local anaesthetics. V. **The action of local anaesthetics on monomolecular layers of stearic acid.** Acta Pharmacol Toxicol, v.10, p. 317-324, 1954.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. **Nanotech approaches to drug delivery and imaging.** Drug Discovery Today, v.8, n.24, p.112-120, 2003.

SAPRA, P.; ALLEN, T.M. **Ligand-targeted liposomal anticancer drugs.** Program LipidResearch. v.42, p.439-462, 2003.

SEMPLE, S. C.; CHONN, A.; CULLIS, P. R. **Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: relation to clearance behavior *in vivo*.** Advanced DrugDelivery Review, V. 32, p. 13-17, 1998.

SEEMAN, P. **Erythrocyte membrane stabilization by steroids and alcohols, a possible model for anesthesia.** Biochem Pharmacol, v.15, p.1753-1766, 1966.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin technology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 1988.

SIMONETTI, M. P. B.; ANDRADE, M. P. **Anestésicos locais e opióides encapsulados em lipossomas: um avanço farmacotécnico em progresso.** Revista Brasileira Anestesiologia, v.46, p. 35-42, 1996.

STOELTING, R. K.; HILLIER, S.C. Farmacologia e fisiologia naprática anestésica. 2 ed. Por Artemed editora, cap. 7, p. 159, Porto Alegre, 2007.

TRUDELL, J.R. A . **Unitary theory of anesthesia based on lateral phase separations in nerve membranes.**Anesthesiology, v.46, p.5-10, 1977.

WANMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C.; Farmacologia Clínica para dentistas. Guanabara editora, cap.1, p. 3-6, Rio de Janeiro, 1999.

WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K.; KATINGER, H. **Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects.**Europe Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Amesterdam, v.54, p.213-219, 2002.

WEINBERG, G.; VADEBONCOUER, T.; RAMARAJU, G.A.; GARCIA-AMARO, M.F.;CWIK, M. **Pretreatment or resuscitation ith a lipid infusion shifts the dose-response to bupivacaine-induce asytrole in rats.** Anesthesiology, v.88, p.1071-1075, 1998.

WEINBERG, G.; RIPPER, R.; FEINSTEIN, D.L.; HOFFMAN, W. **Lipid emulsion infusion rescues dogs from bupivacaine-induce cardiac toxicity.** Regional Anesthesia and Pain Medicine, v.28, p.198-202, 2003.

WILSON, E.B. **An introduction to scientific research.** Mcgraw-hill, p.373. New York, 1952.

ANEXO

Figura 2.10: Curva de calibração de absorbância *versus* concentração de tetracaína (faixa de concentração de 0 a 0,015 mg/mL; resultados obtidos em quintuplicata)

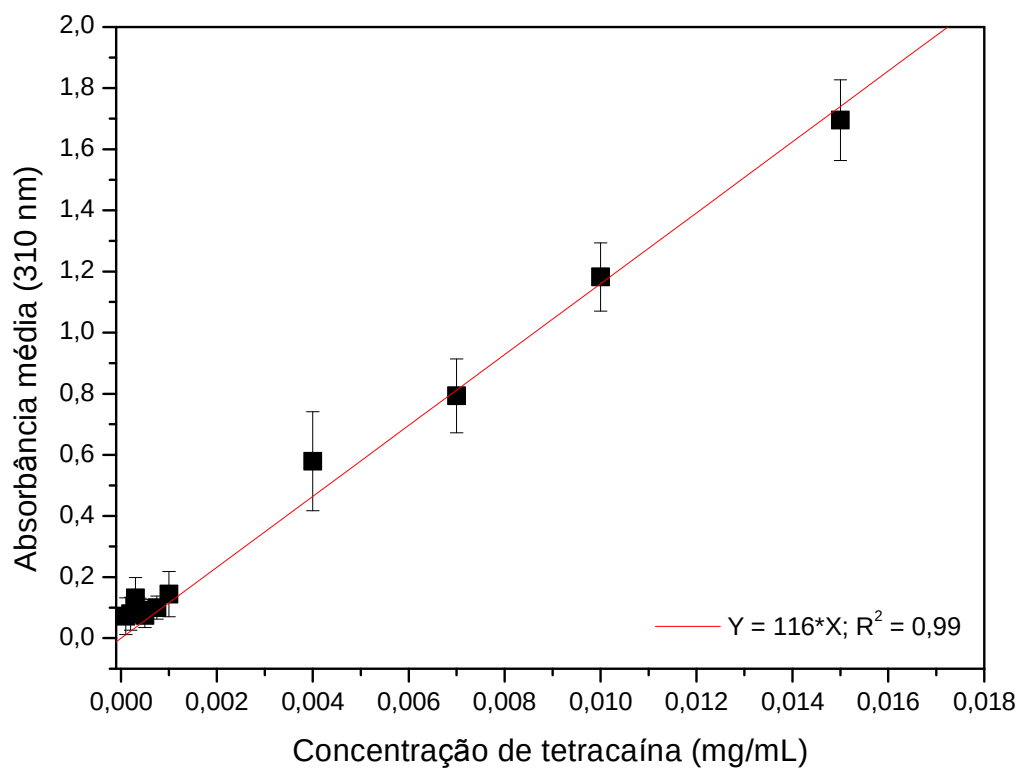


Figura 2.11: Curva de calibração de absorbância *versus* concentração de tetracaína (faixa de concentração de 0 a 0,001 mg/mL; resultados obtidos em quintuplicata)

