

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

ANDRÉ GALLO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE LIPOSSOMAS FURTIVOS COM
ANESTÉSICO LOCAL ROPIVACAÍNA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2016

ANDRÉ GALLO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE LIPOSSOMAS FURTIVOS COM
ANESTÉSICO LOCAL ROPIVACAÍNA**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso de Licenciatura em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça

LONDRINA
2016

TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE LIPOSSOMAS FURTIVOS COM ANESTÉSICO LOCAL ROPIVACAÍNA

ANDRÉ GALLO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 05/12/2016 como requisito para obtenção do título de Licenciado em Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Presidente da Banca

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Membro Titular

Prof. Dr. Janksyn Bertozzi
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Membro Titular

DEDICATÓRIA

A minha família, principalmente meus pais José Gallo e Aparecida Gallo (in memoriam) e minha irmã,

Que me ensinou os valores da vida, sempre me apoiou e me ensinou a nunca desistir,

Aos meus amigos, pelo apoio e ajuda em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram para esta experiência maravilhosa.

Ao meu pai, que os momentos em que mais precisei, foi um grande homem ao qual me espelho e quero transmitir seus ensinamentos de geração a geração dentro da minha família.

Mãe (in memorian).

Que a beleza das flores, a doçura do mel, o brilho das estrelas, envolvam você hoje e que você continue irradiando este amor e esta alegria que você sempre nos ofereceu! *Obrigado mãe e pai pelo homem que sou hoje.*

A minha irmã, que apesar das brigas eu AMO.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça, pela orientação não só no campo profissional, mas da vida, com certeza desempenhou além do papel de orientador, uma conselheiro, um grande amigo de Londrina. *Muito obrigado Cabeça.*

A todos os professores pelo aprendizado, e os servidores deste instituto.

A todos meus amigos e pessoas que conviveram do meu lado esses anos.

Acima de tudo agradeço a Deus.

LISTA DE ABREVIATURAS MAIS UTILIZADAS

- AL** - Anestésico Local
- DOSY** - Diffusion-ordered Spectroscopy
- COSY** - Homonuclear Correlation Spectroscopy
- RVC** - Ropivacaína
- LF** - Lipossoma Furtivo
- RVC/LF** - Ropivacaína em Lipossoma Furtivo
- RMN** - Ressonância Magnética Nuclear
- STD** - Saturation Transfer Difference
- D** - Coeficientes de Difusão
- f_x*** - Fração molar
- GOV** - Vesículas oligolamelares gigantes
- GUV** - Vesículas unilamelares gigantes
- K_a** - Constante de associação
- K_D** - Constante de dissociação
- LOV** - Vesículas oligolamelares grandes
- LUV** - Vesículas unilamelares grandes
- I_{on}*** - Irradiação em Ressonância
- I_{off}*** - Irradiação Fora de Ressonância
- mM** - Mili mol
- MLV** - Vesículas multilamelares
- MVL** - Lipossomas multivesiculares
- PEG** - Polietilenoglicol
- rf** - Rádio frequência
- RMN-COSY** - Ressonância Magnética Nuclear - Homonuclear Correlation Spectroscopy
- RMN-DOSY** - Ressonância Magnética Nuclear - Diffusion-ordered Spectroscopy
- RMN - STD** - Ressonância Magnética Nuclear - Saturation Transfer Difference
- SOV** - Vesículas oligolamelares pequenas
- SUV** - Vesículas unilamelares pequenas
- T1** - Relaxação longitudinal
- T2** - Relaxação transversal

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do experimento de STD. Quando o receptor torna-se saturado, os ligantes que estão complexados a ela tornam-se saturados também. Este fenômeno, chamado de difusão de spin, está representado pelas setas vermelhas. Através da subtração deste espectro de um espectro sem a saturação do receptor fornece um espectro no qual apenas os sinais dos compostos complexados à macromolécula aparecem. De forma geral, a saturação do receptor consiste de uma cascata de pulsos Gaussianos.	10
Figura 2 - A) Representação das unidades dos lipossomas. B) lipossoma encapsulando substâncias.....	12
Figura 3 - Moléculas de lipídios A) fosfatidilcolina, B) fosfatidilserinas e C) fosfatidilgliceróis.	13
Figura 4 - A) Mini extrusor e B) esquema de montagem e componentes do mini extrusor.	15
Figura 5 - Diagrama esquemático de um lipossoma revestido com polímero (LF).	16
Figura 6 - Estrutura química de alguns ALs do tipo amino-amida de uso clínico.	18
Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) de RVC [10 mmol L^{-1}].	22
Figura 8 - Espectro de RMN COSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) de RVC [10 mmol L^{-1}].	23
Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) da vesícula lipossomal de membrana modificada (LF) [10 mmol L^{-1}].	24
Figura 10 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do complexo RVC/LF [10 mmol L^{-1}].	24
Figura 11 - Tempo de relaxação em função do tamanho de molécula.	26
Figura 12 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) de RCV [10 mmol L^{-1}].	27
Figura 13 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do LF [$9,8 \text{ mmol L}^{-1}$].	27
Figura 14 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do complexo RCV/LF.	28
Figura 15 - iii) Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) da RPC [10 mmol L^{-1}] ii) Espectro controle (irradiando em 30 ppm) i) Espectro de STD RPC/LF (irradiando em -0,5 ppm). Tempo total de saturação 2,55 s.	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Atribuição e deslocamento químico dos ^1H da RVC [10 mmol L^{-1}].....	22
Tabela 2 - Sinais de RMN de ^1H de RVC, RVC/LF (Variação nos deslocamentos químicos referente aos sinais de RVC).	25
Tabela 3 - Coeficientes de Difusão (D) da RVC, LF e RVC/LF, constante de associação (K_a) e fração molar (f_x) do complexo RVC/LF.	29
Tabela 4 - Dados obtidos nos experimentos de STD.....	30

RESUMO

GALLO, A. **Estudo da interação de lipossomas furtivos com anestésico local ropivacaína**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR. Londrina, Paraná.

A entrega controlada e específica de fármacos é uma grande progressão nos tratamentos de diversas doenças. Por sua vez, doses ministradas são menores e direcionadas a locais específicos do tratamento e analgesia. Estas vantagens reduzem a toxicidade do fármaco no organismo. Em vista disso, a área de liberação controlada de fármacos deve ser continuamente explorada para o desenvolvimento de formulações com graus crescentes na eficácia. Nesse sentido, os usos de carreadores são de grande importância para que os benefícios de liberação de fármaco sejam alcançados. A encapsulação anestésicos locais (ALs), como a ropivacaína (RVC), já foi estudada em sistemas lipossomais normais, entretanto, pouco se sabe do seu comportamento frente a lipossomas furtivos (LF). O presente trabalho tem como objetivo principal o estudo das interações do complexo RVC/LF utilizando técnicas avançada de ressonância magnética nuclear - RMN de ^1H (STD e DOSY).

Os baixos valores de transferência de saturação dos hidrogênios do LF para os hidrogênios da RVC confirmam a encapsulação do AL nas vesículas de LF e corroboram com os baixos valores da fração complexada e constante de associação obtido no espectro de DOSY. Porém, o espectro de STD indica que toda a molécula de RVC foi encapsulada, pois hidrogênios aromáticos e o anel piperidínico sofreram transferência de saturação, observado através do mapa de STD normalizado.

Palavras-chave: Ropivacaína; Lipossomas Furtivos; ^1H -RMN; RMN-STD.

ABSTRACT

GALLO, A. **Study of the interaction between furtives liposomes with local anesthetic ropivacaine**. 2016. 46 p. Final Paper (Teaching Certificate in Chemistry). Federal Univerity of Technology - Londrina, Paraná.

The controlled and specific drugs delivery is a important development in the treatment of various diseases. In turn, doses given are smaller and targeted to specific treatment and analgesia sites. These advantages reduce the toxicity of the drug in the body. Accordingly, the controlled drug delivery area must be continuously exploited for the development of formulations with increasing degrees of effectiveness. In this sense, the use of carriers is of great importance for the drug release benefits to be achieved. Local anesthetic encapsulation (ALs), such as ropivacaine (RVC), has already been studied in normal liposomal systems, however, the literature brings little researches about the behavior towards furtives liposomes (FL). The main objective of this work is study of the building and interactions of the RVC/LF complex using advanced nuclear magnetic resonance techniques (NMR-STD and DOSY).

The low saturation transfer values from LF hidrogens to RVC hidrogens confirm the encapsulation of the LA in the LF vesicles and corroborate with the low values of the complex fraction and association constant obtained in the DOSY experiment. However, the STD spectrum indicates that the entire RVC molecule was encapsulated, since aromatic hidrogens and the piperidine cycle underwent saturation transfer, observed through the normalized STD map.

Keywords: Ropivacaine; Furtive liposomes; $^1\text{H-NMR}$; RMN-STD.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	OBJETIVOS	5
2.1	OBJETIVO GERAL.....	5
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3	JUSTIFICATIVA	5
4	REFERENCIAL TEÓRICO	7
4.1	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR - RMN	7
4.1.1	Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY).....	8
4.1.2	Saturation Transfer Difference (STD).	9
4.1.3	Correlation spectroscopy (COSY).....	11
4.2	LIBERAÇÃO CONTROLADA: LIPOSSOMAS.....	11
4.3	ANESTÉSICOS LOCAIS ENCASULADOS EM LIPOSSOMAS FURTIVOS.	17
5	MATERIAIS E MÉTODOS	19
5.1	MATERIAL EM ESTUDO	19
5.2	MÉTODOS	19
5.2.1	Preparação e encapsulação da RVC em lipossomas de longa circulação.....	19
5.2.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	20
5.2.2.1	Experimento de DOSY	20
5.2.2.2	Experimento de STD	20
5.2.2.3	Experimento de COSY	21
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
6.1	ANÁLISE DOS ESPECTROS DE RESSONÂNCIA (RMN DE ¹ H)	21
6.2	ANÁLISE DOS ESPECTROS DE RMN DOS EXPERIMENTOS DOSY	26
6.2.1	Avaliação do complexo RVC/LF experimentos de RMN - STD.....	29
7	CONCLUSÃO	31
8	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A ressonância magnética nuclear (RMN) é sem dúvida umas das mais importantes técnicas analíticas com aplicações em química, física, medicina, agricultura, alimentos, materiais, entre outras áreas.

A RMN tem sido utilizada como uma técnica experimental poderosa para a investigação de interações intermoleculares, promovendo evidências sobre a topologia e formação de complexos através do estudo do núcleo do hidrogênio (KAPUR, *et al.*, 2000; CABEÇA, 2009) o qual permite extrair um grande volume de informações a partir da análise de seus espectros. Com isso, muitos métodos de RMN de ^1H foram desenvolvidos e aplicados na triagem e caracterização de complexos supramoleculares tais como: rotational frame nuclear Overhauser effect spectroscopy (ROESY1D) (MO, *et al.*, 1997) difusion-ordered spectroscopy (DOSY) (MORRIS, *et al.*, 1992) e saturation transfer difference (STD) (MAYER, *et al.*, 2001; MEYER, *et al.*, 2003; CARLOMAGNO, 2005).

As técnicas descritas acima para triagem das interações supramoleculares serão demonstradas em complexos formados a partir de lipossomas furtivos de longa duração (LF) e o anestésico local ropivacaína (RVC). Lipossomas furtivos apresentam em sua membrana externa polietileno glicol, um polímero que torna o lipossoma com maior tempo de meia vida em função da diminuição do efeito da ação das opsoninas no processo de fagocitose dos lipossomas (GUBERNATOR, 2011).

A liberação controlada da ropivacaína em lipossomas promove, redução da concentração plasmática, baixa toxicidade e aumento da anestesia (FRANZ-MONTAN *et al.*, 2012). Sendo assim, o principal objetivo é analisar a interação de lipossomas de longa duração com o anestésico local ropivacaína utilizando como ferramenta principal as técnicas de RMN descritas acima.

O estudo das interações intermoleculares do novo complexo quanto à topologia e dinâmica poderá ser útil para desenvolvimento de novas formulações muito mais potentes e seletivas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo principal o uso das técnicas de RMN como STD e DOSY para mapear as interações intermoleculares entre lipossomas furtivos e o anestésico local ropivacaína (RVC).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparo das estruturas lipossomas utilizando Lipídeos de Fosfatidilcolina de ovo – EPC; 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenoglicol)-2000 (DSPE-PEC-2000) e colesterol.
- Preparar a formulação lipossomas com membrana modificada (lipossomas furtivos-LF) e o anestésico local Ropivacaina (RVC/LF).
- Determinar evidências, tais como topologia e dinâmica da complexação da RVC com (lipossomas furtivos LF), utilizando técnicas de ^1H -RMN.

3 Justificativa

Sistemas de liberação controlada de fármacos vêm sendo estudados por pesquisadores do mundo todo e se justifica por oferecerem inúmeras vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração com fármacos na forma livre (KONINGETAL, 2002). Os lipossomas são um dos melhores sistemas de entrega de drogas de baixo peso molecular como são o caso de moléculas de anestésicos locais. Anestésicos locais encapsulados fornecem uma melhor resposta farmacológica, maior absorção do que os correspondentes ativos livres aumentando a ação da droga, melhorando a biodisponibilidade e limitando os efeitos secundários tóxicos (ALLEM *et al.*, 2013). Assim, a eficiência dos lipossomas como transportador e liberador de moléculas com atividade terapêutica é grande no que se refere à estabilidade do complexo formado, aumento da taxa de permeabilidade em aplicações tópicas, diminuição da toxicidade da droga e aumento da eficiência

terapêutica (ALLEM *et al.*, 2013; GUBERNATOR, 2011). Com o propósito de desenvolver uma formulação para liberação controlada do anestésico local ropivacaína e lipossomas furtivos, propõe-se, no presente estudo, o uso de lipossomas com membranas modificadas por polímeros denominados lipossomas furtivos (LF).

Embora estudos do uso de lipossomas como carreadores de drogas datem de algumas décadas, a literatura ainda é restrita quanto à arquitetura, dinâmica e topologia dos complexos, principalmente com relação aos nanolipossomas e lipossomas modificados. Assim, o entendimento físico-químico das alterações das propriedades do AL encapsulado pode levar à compreensão das interações intermoleculares dos complexos e eventuais desenvolvimentos de fármacos mais eficientes. Neste aspecto, o estudo das interações de anestésicos locais com lipossomas furtivos será realizado utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear como ferramenta principal.

A espectroscopia de RMN é hoje usada de forma generalizada por todos os que se dedicam a estudar direta ou indiretamente compostos ou fenômenos químicos. A espectroscopia de RMN é uma técnica analítica sofisticada e poderosa que tem aplicações em diferentes áreas. A diversidade de aplicações só foi possível devido ao contínuo desenvolvimento de diferentes técnicas que se baseiam no fenômeno de RMN. Este desenvolvimento permitiu que ao longo dos tempos cada técnica fosse otimizada de acordo com as necessidades da respectiva aplicação.

O uso de técnicas de RMN é de extrema importância para se ter conhecimento da dinâmica e topologia dos complexos formados. Uma das metodologias mais usadas na caracterização de interações RVC/LF por RMN é a técnica de transferência de saturação STD, que fornece o mapa de interação que é concedido somente para os hidrogênios que receberam magnetização, ou seja, que foram encapsulados.

Outra técnica de suma importância neste estudo é a espectroscopia ordenada por difusão DOSY, o qual se estuda a visão global da dinâmica translacional dos constituintes de uma mistura. Este é um experimento que separa os sinais através dos coeficientes de difusão.

A escolha destas técnicas como principal ferramenta recai, primeiramente, no fato de que esta permite uma avaliação ao nível molecular dos componentes que constituem o sistema supramolecular.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR - RMN

Os núcleos de certos elementos e isótopos comportam como se fossem imãs girando em torno de um eixo. Têm esta propriedade os núcleos do hidrogênio comum o (^1H) e do (^{13}C) entre outros. Quando se coloca um composto contendo átomos de ^1H ou de ^{13}C num campo magnético muito forte e simultaneamente se irradia o composto com energia eletromagnética, os núcleos podem absorver energia num processo denominado ressonância magnética (SOLOMONS, 1996). Esta absorção de energia é quantizada e produz um espectro característico do composto. A absorção de energia não ocorre a menos que a intensidade do campo magnético e a frequência da radiação eletromagnética tenham valores bem determinados (SILVERSTEIN, *et al.* 2006). Os aparelhos de RMN trabalham com campos magnéticos muitos intensos e irradiam a amostra com radiação eletromagnética na região de radiofrequência (PAVIA, *et al.*, 2010).

A técnica de RMN é muito utilizada no auxílio da determinação da fórmula estrutural de substâncias, teor de pureza de uma amostra, conformação molecular, dinâmica, bem como estudo das propriedades físicas ao nível molecular. O uso da RMN para análise das interações intermoleculares é de suma importância para explicar topologias de complexos em solução.

A RMN vem sendo utilizada como uma técnica experimental de grande poder na investigação de interações intermoleculares, promovendo evidências sobre a topologia e formação de complexos através do núcleo do hidrogênio (RMN de ^1H) (KAPUR, *et al.*, 2000), este por sua vez, possui alta sensibilidade e permite extrair um grande volume de informações a partir da análise de seus espectros.

Conseqüentemente, diversos métodos de RMN de ^1H foram desenvolvidos e aplicados na triagem e caracterização de complexos supramoleculares, tais como: Diffusion-ordered Spectroscopy (DOSY) (MORRIS, *et al.*, 1992) e Saturation

Transfer Difference (STD) (MAYER, *et al.*, 1999; MAYER, *et al.*, 2001; MEYER, *et al.*, 2003; CARLOMAGNO, 2005).

4.1.1 Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY).

A técnica de DOSY é um experimento que fornece uma visão global da dinâmica translacional dos constituintes de uma mistura, sejam eles moléculas pequenas, macromoléculas, complexos ou agregados moleculares. Por sua vez, DOSY é um experimento que separa os sinais de uma mistura de componentes de acordo com o tamanho e forma da molécula através dos coeficientes de difusão¹. Como o coeficiente de difusão de uma determinada molécula sob certas condições depende do seu peso molecular, tamanho e forma (raio hidrodinâmico), fica evidente que a difusão pode ser usada para estudo das interações moleculares ou eventos de complexações. Logo, o coeficiente de difusão pode fornecer informações importantes sobre organização molecular. Valores típicos de coeficiente de difusão em líquidos, a temperaturas moderadas (25-30°C), vão desde $10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (polímeros de alta massa molar) até $10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (moléculas pequenas em soluções pouco viscosas) (STILBS, 1987). Em virtude de sua habilidade em resolver misturas complexas e permitir a simultânea identificação dos compostos, a técnica de DOSY vem sendo sugestivamente denominada pelos químicos como a “cromatografia de spins” (GOUNARIDES *et al.*, 1999).

O coeficiente de difusão para um complexo é determinado baseado na troca entre um estado livre e complexado do ligante. Assim, representa-se a fração do ligante no estado livre f_{livre} e complexado f_{compl} , e no caso de D_{compl} e D_{livre} seria o coeficiente de difusão do complexo e ligante livre, respectivamente. A fração do ligante complexado (f_{compl}) e a constante de associação (K_a) podem ser calculadas através das equações 1 e 2, respectivamente.

$$f_{\text{compl}} = (D_{\text{livre}} - D_{\text{compl}}) / (D_{\text{livre}} - D_{\text{macro}}) \quad (1)$$

$$K_a = f_{\text{compl}} / ((1 - f_{\text{compl}}) ([\text{molécula receptora}] - f_{\text{compl}} [\text{ligante}])) \quad (2)$$

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

Aplicando os valores de difusão obtidos experimentalmente na equação 1, calculam-se os valores aproximados da percentagem das populações de moléculas receptoras complexadas com os ligantes (eq. 2).

4.1.2 Saturation Transfer Difference (STD).

O experimento de STD é muito utilizado na triagem de componentes em misturas de complexos (YANG *et al.*, 2003; MAYER *et al.*, 2001; MEYER *et al.*, 2003). Ele é baseado na transferência de saturação do sinal da macromolécula para o ligante ligado. Macromoléculas apresentam um grande número de prótons que estão acoplados por interação dipolo-dipolo. A saturação de um sinal simples da macromolécula pode resultar em uma propagação da magnetização por toda a macromolécula quando a difusão de spin na estrutura for eficiente. Durante o período de propagação da magnetização, ligantes ligados irão ser saturados e então apresentaram um forte sinal no espectro de STD.

O RMN-STD permite fazer estudos de triagem de ligantes de um modo rápido e eficaz. Por outro lado, como o objetivo de técnica reside na “observação” do ligante, não são necessárias grandes quantidades de amostra. Nestes estudos, o receptor apenas terá como função transferir a magnetização para o ativo em estudo. O RMN-STD permite por um lado determinar a ordem de grandeza da afinidade que o ligante em estudo tem com o receptor, e fornecer o mapeamento das interações envolvidas no processo de reconhecimento molecular (CARLOMAGNO, 2005).

Como o nome já diz consiste na diferença entre dois experimentos, onde, no primeiro experimento ("em ressonância"), satura-se o receptor (Lipossoma furtivo) via um trem de pulsos seletivos de rádio frequência (*rf*). Esses pulsos são aplicados na frequência de ressonância dos núcleos do receptor e não do ligante. A saturação propaga-se através dos hidrogênios do receptor via rede de interações dipolares intramoleculares $^1\text{H}-^1\text{H}$; isto é chamado difusão de spin², este processo é eficiente devido a grande massa molecular do receptor. A saturação é transferida aos

² Difusão de spin é um fenômeno da relaxação longitudinal, T_1 , frequentemente observado em RMN de macromoléculas, onde a velocidade de transferência de energia entre os núcleos (hidrogênio) é muito maior que a velocidade de transferência de energia com a rede. Assim as velocidades de relaxação longitudinal dos hidrogênios das moléculas tendem a ter o mesmo valor de T_1 com conseqüente NOEs iguais e negativos.

compostos ligados via relaxação cruzada intermolecular para a interface receptor-ligante. As pequenas moléculas dissociam-se do receptor, mas permanecem em um estado "saturado" devido aos seus longos tempos de relaxação longitudinal T_1 quando livres (MAYER *et al.*, 2001; MEYER *et al.*, 2003; CARLOMAGNO, 2005).

Em seguida, se realiza um segundo experimento ("fora de ressonância") ao qual um trem de pulsos de rf idêntico ao primeiro é aplicado fora da faixa de ressonância dos núcleos dos ligantes e do receptor onde nenhum sinal é perturbado. Os experimentos *em ressonância* e *fora de ressonância* são obtidos e subtraídos sequencialmente através de ciclagem de fase. O resultado da diferença dos espectros fornece somente os sinais dos ligantes que foram saturados. Esta diferença de espectros simplifica grandemente a interpretação dos dados. O experimento de RMN-STD é capaz de identificar interações de baixa afinidade entre ligantes ligados em receptores específicos com constante de dissociação K_D entre 10^{-8} a 10^{-3} M (Figura 1).

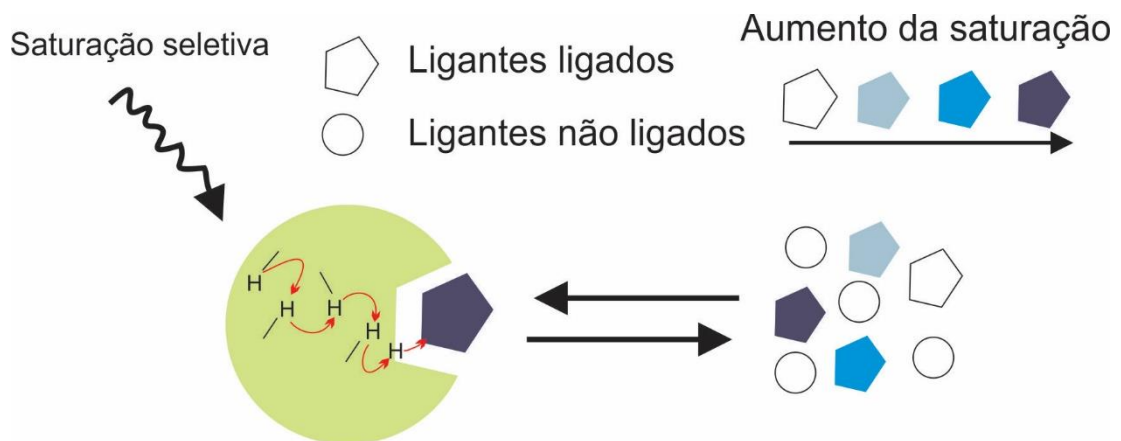


Figura 1 - Representação esquemática do experimento de STD. Quando o receptor torna-se saturado, os ligantes que estão complexados a ela tornam-se saturados também. Este fenômeno, chamado de difusão de spin, está representado pelas setas vermelhas. Através da subtração deste espectro de um espectro sem a saturação do receptor fornece um espectro no qual apenas os sinais dos compostos complexados à macromolécula aparecem. De forma geral, a saturação do receptor consiste de uma cascata de pulsos Gaussianos.

Fonte: Autoria própria.

O experimento de STD fornece o mapa de interação através da equação 3 que é fornecido somente para os hidrogênios que receberam magnetização, ou seja, que foram encapsulados. Portanto, pode-se calcular o mapa de interação através do valor da área dos sinais do espectro de STD dividido pelo valor da área dos sinais *fora* de ressonância (Eq. 3) (CABEÇA, 2009).

$$\Delta_{\text{STD}} = I_{\text{fora}} - I_{\text{em}} / I_{\text{fora}} = \Delta_{\text{STD}} / I_{\text{fora}} \quad (3)$$

4.1.3 Correlation spectroscopy (COSY).

A técnica de RMN-COSY permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ($^n J_{\text{H,H}}$), (BREITMAIER, 1987; SILVERSTEIN *et al.*, 1995) entre si. É a prática de obtenção de espectros em duas dimensões (2D), homonucleares ($^1\text{H}, ^1\text{H}$) e também heteronucleares ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) (CROASMUN *et al.*, 1994; SILVERSTEIN *et al.*, 1995; KAISER *et al.*, 1997). Através deste método é possível fazer mapeamento estrutural mais rigoroso do que utilizando somente as técnicas 1D e dados de possíveis compostos similares da literatura, principalmente quando se refere a análise de estruturas mais complexas, com correlações de moléculas homonucleares ou hetero nucleares.

Devido ao número de fatores a ser considerados em uma análise de RMN - COSY é sempre recomendável que o usuário de RMN 2D esteja familiarizado com a influência de fatores como eletronegatividade ou anisotropia magnética ou compressão estérica sobre os deslocamentos químicos e também constantes de acoplamentos (BREITMAIER, 1987; SILVERSTEIN *et al.*, 1995; KAISER *et al.*, 1997). Em síntese, com está técnica pode-se estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por $J_{\text{H,H}}$ (acoplamentos axial e equatoriais, mensuráveis no espectro 1D) e assim diferenciar a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN ^1H (OSCHKINAT *et al.*, 1994; DEROME, 1987).

4.2 LIBERAÇÃO CONTROLADA: LIPOSSOMAS

Alec Bangham em 1965 foi quem descreveu pela primeira vez a formação espontânea de estruturas de membranas fechadas, após a dispersão de fosfolípidos num meio aquoso (BANGHAM *et al.*, 1965). O termo lipossoma surgiu mais tarde e este surgimento deve-se a Weissman, que deu origem a uma só palavra dois elementos de origem grega: lipo (significando gordura) e soma (significando corpo) (SESSA, G. E WEISSMANN, G., 1968).

Os lipossomas são vesículas esféricas microscópicas, constituídas de uma ou várias bicamadas lipídicas (lipídios anfipáticos) orientadas concentricamente, isolando um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo, onde as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior e as cabeças polares para o exterior da bicamada (LOPES; OLIVEIRA, 2000; SANTOS; CASTANHO, 2002; ARAÚJO, *et al.*, 2003; FRÉZARD, *et al.*, 2005; BATISTA, *et al.*, 2007; KLÜPPEL, *et al.*, 2007; CABEÇA, *et al.*, 2008; DIMER, *et al.*, 2013; ANCHIÊTA-JÚNIOR, *et al.*, 2014). Funcionam como carreadores (transportadores) de fármacos e biomoléculas, independentemente de sua carga ou massa molar (SANTOS; CASTANHO, 2002), com capacidade de veicular estes compostos a órgãos-alvo, disponibilizando apenas uma fração liberação controlada dos mesmos para os sítios de ação. Podem encapsular substâncias hidrofílicas no compartimento aquoso interior e substâncias lipofílicas (hidrofóbicas) inseridas ou adsorvidas na membrana lipídica (ARAÚJO, *et al.*, 2003; FRÉZARD, *et al.*, 2005; BATISTA, *et al.*, 2007; CABEÇA, *et al.*, 2008).

Os lipídios não são solúveis em água e alinham-se em vesículas de bicamadas a fim de minimizar as interações desfavoráveis entre a fase aquosa e as longas cadeias carbônicas, dando origem às vesículas lipossomais. Esse sistema organizado expõe a ponta polar lipídica para a água e o restante da cadeia carbônica forma uma região hidrofóbica (Figura 2) (MEURE *et al.*, 2009). Lipossomas podem ser constituídos por uma bicamada de lipídios simples (vesículas unilamelares) ou múltiplas bicamadas (vesículas multilamelares).

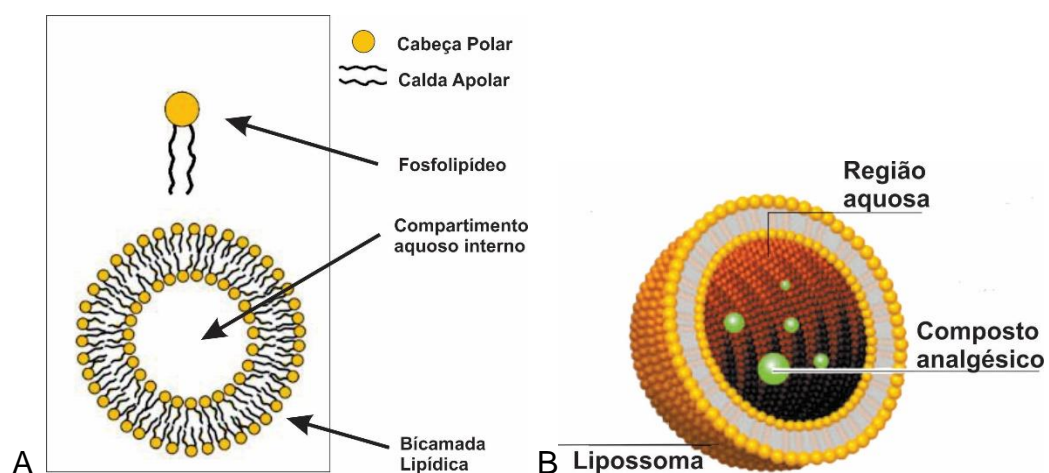


Figura 2 - A) Representação das unidades dos lipossomas. B) lipossoma encapsulando substâncias.

Fonte: Adaptada de <http://www.ingredientstodiefor.com>

Os lipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são os que se aproximam de uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas e fosfatidilgliceróis, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa (Figura 3). As fosfatidilcolinas são as mais empregadas em estudos de formulação de lipossomas, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (BATISTA *et al.*, 2007).

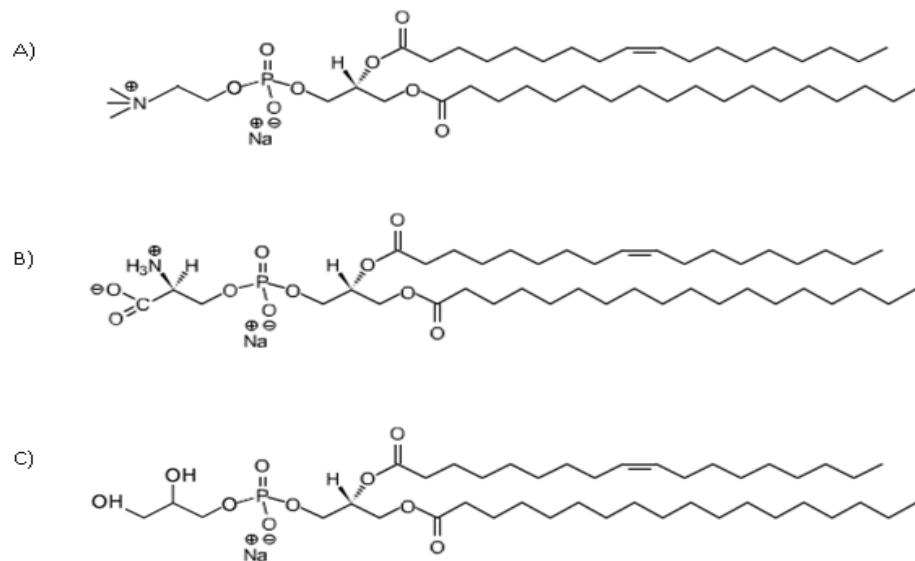


Figura 3 - Moléculas de lipídios A) fosfatidilcolina, B) fosfatidilserinas e C) fosfatidilgliceróis.
Fonte: Autoria própria.

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

- Vesículas unilamelares pequenas (SUV – Small Unilamellar Vesicles): formada por apenas uma bicamada fosfolipídica e um pequeno compartimento aquoso, com tamanho variando de 20 a 50 nm.
- Vesículas unilamelares grandes (LUV – Large Unilamellar vesicles): constituídas por uma simples bicamada com grande cavidade aquosa, com tamanho variando de 200 a 1000 nm.

- Vesículas multilamelares grandes (MLV – Multilamellar Vesicles): consistem de várias bicamadas fosfolipídicas concêntricas intercaladas por compartimento aquosos, com diâmetro de 400 a 3500 nm.

Estes sistemas supramoleculares são preparados classicamente por fosfolipídios (ANCHIÊTA-JÚNIOR, *et al.*, 2014) (podendo ser de origem natural ou sintética), porém de uma forma geral, podem ser obtidos a partir de qualquer substância anfifílica formadora de fase lamelar. As fosfatidilcolinas (Figura 3 A) são as mais empregadas em estudos de formulação de lipossomas (FRÉZARD, *et al.*, 2005; KLÜPPEL, *et al.*, 2007) pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (BATISTA, *et al.*, 2007).

Um dos métodos de preparação de lipossomas a partir de fosfolipídios inclui a hidratação do filme lipídico. O filme é formado através da dissolução dos lipídios em solvente orgânico e seguido de sua evaporação. A hidratação deste filme pode ser efetuada com água ou solução tampão, sob agitação magnética vigorosa, formando uma dispersão de LUVs. As moléculas de fármacos a serem encapsulados podem ser incorporadas na solução tampão ou dissolvidas na mistura lipídica (lipofílicos). Por fim, a solução unilamelares grandes é então sonicada ou extrusada através de membranas de policarbonato com diferentes porosidades (SANTOS; CASTANHO, 2002).

Em geral utiliza-se um extrusor com pressão a base de nitrogênio, onde a pressão é aplicada sobre os lipossomas forçando-os através de filtros (normalmente de policarbonato) com diâmetros de poros adequados para o diâmetro de lipossoma desejado. O processo de extrusão também pode ser realizado utilizando-se um mini-extrusor (Figura 4 A). Neste caso, a pressão exercida pelo usuário no êmbolo da seringa força a passagem das vesículas lipossômicas de uma seringa para outra através de filtros com diâmetro desejado.

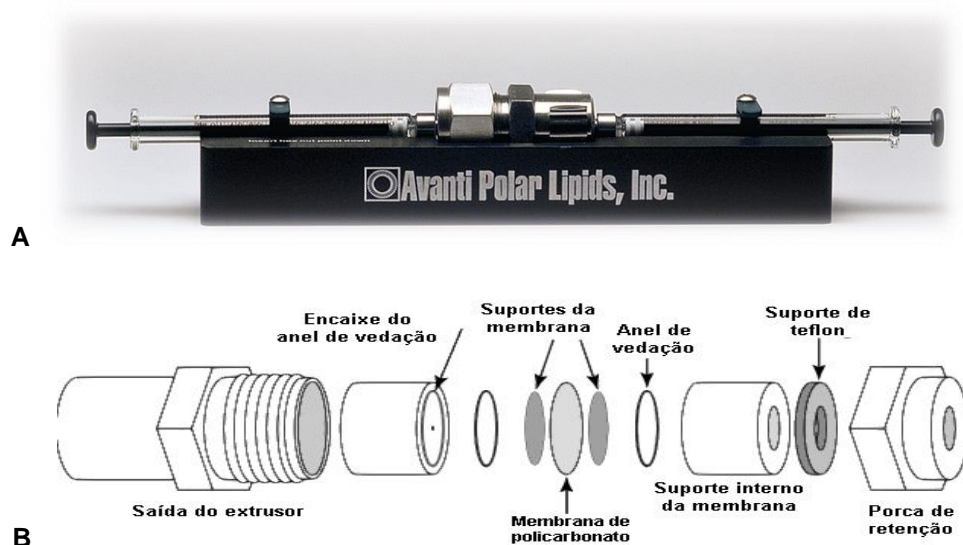


Figura 4 - A) Mini extrusor e B) esquema de montagem e componentes do mini extrusor.
Fonte: Adaptada de www.avantilipids.com

O principal problema existente na utilização dos lipossomas é que na corrente sanguínea, as opsoninas presentes no sangue aderem facilmente a membrana dos lipossomas convencionais (KLÜPPEL, *et al.*, 2007). Devido a isto, são rapidamente capturados pelo sistema fagocitário mononuclear, levando a sua eliminação (BATISTA, *et al.*, 2007).

A existência deste problema levou a pesquisa e desenvolvimento de sistemas lipídicos modificados, essencialmente pela inserção de determinadas moléculas em sua camada exterior com o objetivo de evitar sua eliminação pelo sistema retículo-endotelial (LOPES; OLIVEIRA, 2000;). Os lipossomas que apresentam este tipo de superfície modificada são denominados lipossomas furtivos (lipossomas de longa circulação) (SANTOS; CASTANHO, 2002; ANCHIÊTA-JÚNIOR, *et al.*, 2014).

As vesículas lipossômicas de longa duração *in vivo* são obtidas por diferentes métodos, sendo um deles o revestimento da superfície lipossômica com componentes hidrofílicos naturais, como polímeros hidrofílicos sintéticos, especificamente os polietilenoglicóis PEG (Figura 5) (BATISTA, *et al.*, 2007; KLÜPPEL, *et al.*, 2007). O PEG é um polímero biologicamente inerte usado em carreadores farmacológicos para criar uma barreira estérica e/ou uma estrutura aquosa ao redor dos lipossomas, para protegê-los contra as proteínas plasmáticas do corpo (LOPES; OLIVEIRA, 2000; ANCHIÊTA-JÚNIOR, *et al.*, 2014).

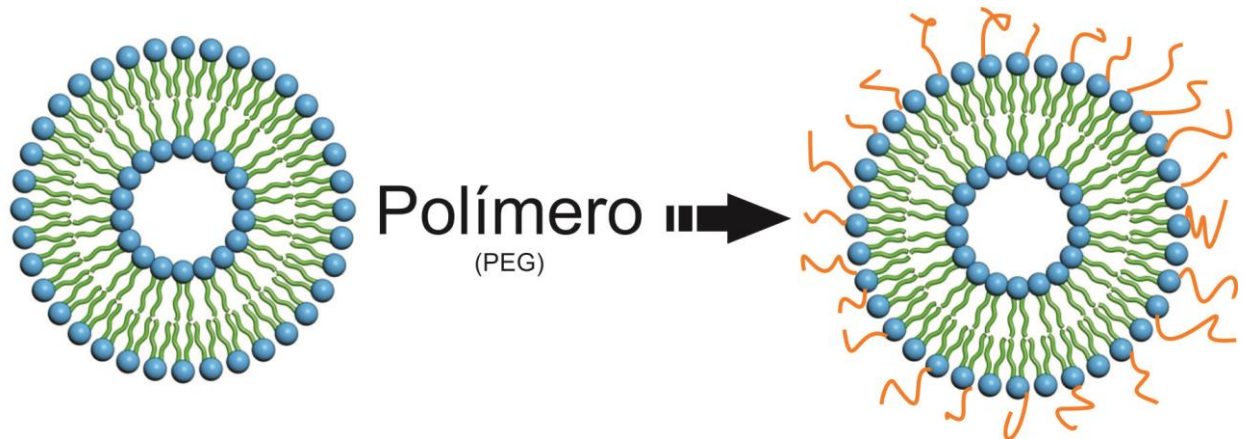


Figura 5 - Diagrama esquemático de um lipossoma revestido com polímero (LF).
 Fonte: Adaptada de <http://www.suggest-keywords.com>

Grandes avanços em pesquisas foram iniciados no final da década de 90 com intuito de reduzir a captura dos lipossomas convencionais pelo sistema fagocitário. Deste modo, surge uma nova geração de lipossomas que possuem superfície de membranas alteradas denominados lipossomas furtivos (LF) (BOERMAN *et al.*, 2000). Estes lipossomas com a superfície modificada pela inclusão de PEG (polietilenoglicol) de alto peso molecular (Figura 5) reduz a captação pelo sistema mononuclear fagocitário e aumenta a sua permanência na circulação sanguínea. Esta ocorrência se dá devido à ocupação do espaço adjacente à superfície do lipossoma, com moléculas de água, criando um impedimento estérico, devido à solvatação da macromolécula, conseqüentemente, estará prejudicando a interação com as proteínas plasmáticas do sangue (LOPES; OLIVEIRA, 2000; JÚNIOR).

Tendo em vista que a principal limitação dos lipossomas convencionais é a sua eliminação de circulação pelo sistema retículo-endotelial, reduzindo seu período de circulação no organismo, consegue-se obter com lipossomas furtivos com tempo de meia vida em circulação 100 vezes superiores aos dos lipossomas convencionais (SANTOS; CASTANHO, 2002). O fator que determina esta maior duração, no caso da utilização do PEG, é o seu peso molecular bem como sua concentração na superfície da bicamada (LOPES; OLIVEIRA, 2000).

De maneira geral, pode-se dizer que o uso de anestésicos locais encapsulados em lipossomas furtivos unilamelares tem como vantagens prolongar a duração da anestesia e a redução da toxicidade para os sistemas cardiovascular e nervoso central (LANGERMAN *et al.*, 1992; MOWAT *et al.*, 1996).

4.3 ANESTÉSICOS LOCAIS ENCASULADOS EM LIPOSSOMAS FURTIVOS

Os anestésicos locais (AL) são compostos químicos que promovem o bloqueio reversível da condução nervosa. O primeiro composto a ser utilizado como anestésico local foi a cocaína, um alcalóide isolado das folhas de *Erithroxylon coca*, que teve sua ação demonstrada por Köller (1884) (GRZYBOWSKI, 2008) ao utilizá-la como anestésico oftálmico. Foi empregada clinicamente durante muito tempo e foi substituída por outras substâncias devido aos seus efeitos colaterais como dependência química e psíquica.

Os anestésicos locais AL são uma classe de fármacos capazes de induzir alívio da dor agindo sobre os processos de geração e condução nervosa. Isso se dá em virtude da sua capacidade de se ligar ao canal de sódio de membranas excitáveis. Este mecanismo de ação envolve o bloqueio de um ou mais sítios específicos de ligação dos canais de sódio, impedindo o fluxo de íons sódio e a propagação do impulso nervoso (COVINO & VASSALO, 1985); (COLLINS, 1993; HARVEY *et al.*, 1998; MALAMED, 2001; MURA *et al.*, 2007). O bloqueio da condução nervosa é reversível, sendo que essa propriedade é uma consequência da inibição do processo de excitação-condução em nervos periféricos, após aplicação local e em concentrações adequadas. Um AL exerce sua ação reversível em qualquer tecido nervoso, podendo bloquear a passagem de impulsos tanto em fibras sensoriais quanto motoras, aliviando ou evitando a dor, o que contribui para a grande utilização desses fármacos na prática médica (COVINO, 1986).

Os ALs mais comumente usados no tratamento da dor são pertencentes à família das aminoamidas: bupivacaína, ropivacaína, lidocaína, mepivacaína e prilocaína (KOEHLER *et al.*, 2005), o qual a Figura 6 demonstra alguns destes AL em sua forma molecular.

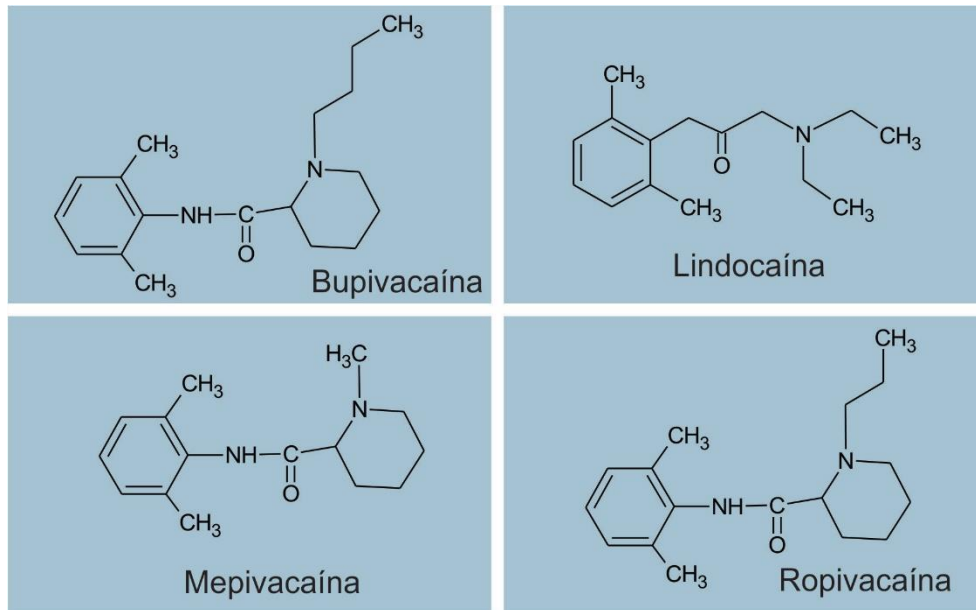


Figura 6 - Estrutura química de alguns ALs do tipo amino-amida de uso clínico.
Fonte: Autoria própria.

Estudos apontam a RVC como uma alternativa ao uso dos AL mais utilizado em procedimentos clínicos e cirúrgicos, justamente por induzir menor toxicidade sistêmica e promover maior grau de dissociação entre o bloqueio motor e sensorial, sendo útil na administração epidural, infiltração e alívio da dor pós-operatória (WHITESIDE & WILDSMITH, 2001).

Entretanto, em solução aquosa quase todas as drogas estão sujeitas a alguma degradação e, frequentemente, a atividade terapêutica é prejudicada pela instabilidade da droga (LOFTSSON *et al.*, 1996). A consequência mais comum da degradação da droga é a perda da sua eficiência e em alguns casos os produtos de degradação são tóxicos. Para aumentar a estabilidade e solubilidade de drogas, em especial anestésicos locais AL, em solventes aquosos utilizam-se diversas técnicas tais como ajuste do pH das soluções aquosas, suspensões lipossomais tamponadas e formação de géis e emulsões (ENNIS *et al.*, 1986; MCCORMACK *et al.*, 1998).

A proposta do uso de anestésicos locais encapsulados em lipossomas vesícula tem como vantagens a liberação lenta do fármaco prolongando a duração da anestesia e a redução da toxicidade para os sistemas cardiovascular e nervoso central (LANGERMAN *et al.*, 1992; MOWAT *et al.*, 1996). Grandes avanços têm sido alcançados em pesquisas envolvendo lipossomas e anestésicos locais, que demonstram suas vantagens em relação ao uso do fármaco livre (DE PAULA *et al.*,

2010; WEINIGER *et al.*, 2010; FRANZ-MONTAN *et al.*, 2012; MERCADO & WEINBERG, 2011; RICHARD *et al.*, 2011). Logo, o conhecimento preciso da interação entre o AL e lipossomas, bem como topologia do complexo formado é fundamental para desenvolvimento de anestésicos mais eficazes e potentes.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAL EM ESTUDO

As amostras de fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol e polietilenoglicol DSPE-PEG-2000 serão adquiridos da Avast lipids. Solventes deuterados e AL, RVC, foram adquiridos da Sigma Aldrich. Esses reagentes foram adquiridos via recursos do projeto Universal CNPq Processo: 448908/2014-0.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Preparação e encapsulação da RVC em lipossomas de longa circulação

Lipossomas furtivos foram preparados a partir de fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol e de polietilenoglicol DSPE-PEG-2000 a uma razão molar de 54:41:5. Os componentes serão solubilizados em clorofórmio. Cerca de 10 mM de anestésico local RVC (Sigma Aldrich) foi adicionado à fase lipídica. O solvente foi retirado em temperatura ambiente para obtenção de um filme lipídico (HAERI, *et al.*, 2013). Em seguida, os lipídeos foram hidratados com uma solução aquosa e agitados de 10-15 rpm e deixado em equilíbrio por 2 horas. A formulação foi, então, extrusada 13 vezes através de uma membrana de policarbonato de 400 nm em um extrusor Avanti mini-extruder.

5.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Todos os experimentos de RMN serão realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade de Londrina - UEL. O equipamento de RMN usado foi o Bruker 400 MHz para a frequência de hidrogênio.

As amostras foram analisadas em sonda de cinco mm para detecção direta e indireta, com gradiente de campo magnético em z e pulsos seletivos. O sinal de deutério do solvente foi utilizado como trava do campo e ajuste da homogeneidade do campo magnético.

Os experimentos foram realizados com “*softwares*” padrões Bruker sob condições típicas.

5.2.2.1 Experimento de DOSY

Para todos os experimentos, foram utilizadas 16 amplitudes diferentes de gradientes e com otimização do tempo de difusão de 0,06 s. O programa de processamento de dados utilizado foi o DOSY Toolbox. Os coeficientes calculados para cada sinal selecionado foram listados juntamente com os respectivos desvios padrões. O valor do coeficiente de difusão e do desvio padrão de cada espécie envolvida na análise foi dado através da média aritmética de todos os coeficientes da mesma espécie. Coeficientes com valores diferentes daqueles apresentados pela maioria foram descartados.

Os resultados do método de análise DOSY são espectros de pseudo duas-dimensões com deslocamentos químicos de RMN de ^1H em um eixo e o coeficiente de difusão calculado ($\text{m}^2 \text{s}^{-1} \times 10^{-10}$) em outra dimensão. O tempo médio de aquisição do experimento foi de 25 minutos.

5.2.2.2 Experimento de STD

Todos os experimentos de STD foram seletivamente saturados usando trens de pulsos Gaussianos em -0,5 ppm para aquisição *em* ressonância e 30 ppm para a

aquisição *fora* de ressonância. Os experimentos foram processados utilizando o programa TOP SPIN.

5.2.2.3 Experimento de COSY

O experimento foi adquirido para identificação de sinais em overlap. O mapa de correlação foi obtido em um tempo total de 40 minutos (ns 16). O experimento foi processado em software Top Spin da Bruker.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 ANÁLISE DOS ESPECTROS DE RESSONÂNCIA (RMN DE ^1H)

A caracterização do complexo proposto no trabalho foi iniciada através de experimentos de ressonância magnética nuclear de ^1H . Foram realizados experimentos para as moléculas de RVC, LF e RVC/LF. A primeira evidência para formação de um complexo pode ser feita através da variação do deslocamento químico no espectro de RMN de ^1H da RVC em contato com LF.

O espectro de RMN de ^1H do anestésico local RVC está representado na Figura 7.

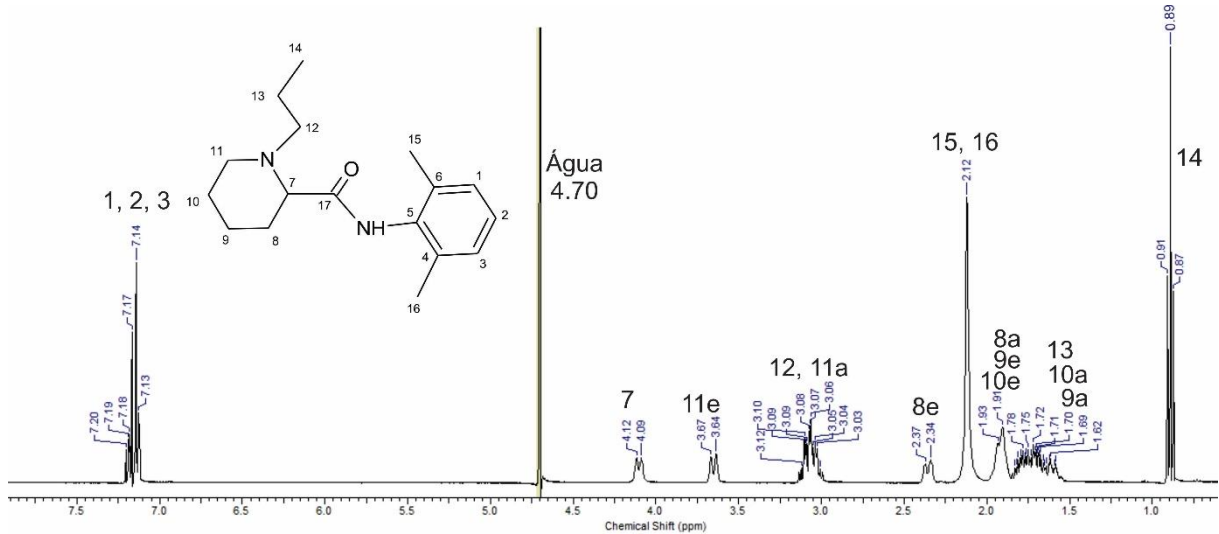


Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) de RVC [10 mmol L^{-1}].

Fonte: Autoria própria.

O deslocamento químico dos hidrogênios, bem como a atribuição dos hidrogênios estão apresentados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Atribuição e deslocamento químico dos ^1H da RVC [10 mmol L^{-1}].

RVC	
Identificação dos ^1H	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)
1	7,17
2	7,14
3	7,13
7	4,09
8 _e	2,34
8 _a ; 9 _e ; 10 _e	1,91
9 _a ; 10 _a ; 13	1,72
11 _e	3,64
11 _a , 12	3,06
14	0,89
15;16	2,12

_a hidrogênio axial; _e hidrogênio equatorial.

Ao analisar o espectro de RMN da Figura 7 observou-se a presença do sinal em 7,14 ppm que se refere aos hidrogênios do H-1, 2 e 3 que por sua vez pertencentes ao anel aromático. No entanto para os hidrogênios equatoriais e axiais,

aos quais encontraram-se em overlap de sinal, só foi possível a atribuição através de experimento de RMN-COSY que é apresentado na Figura 8.

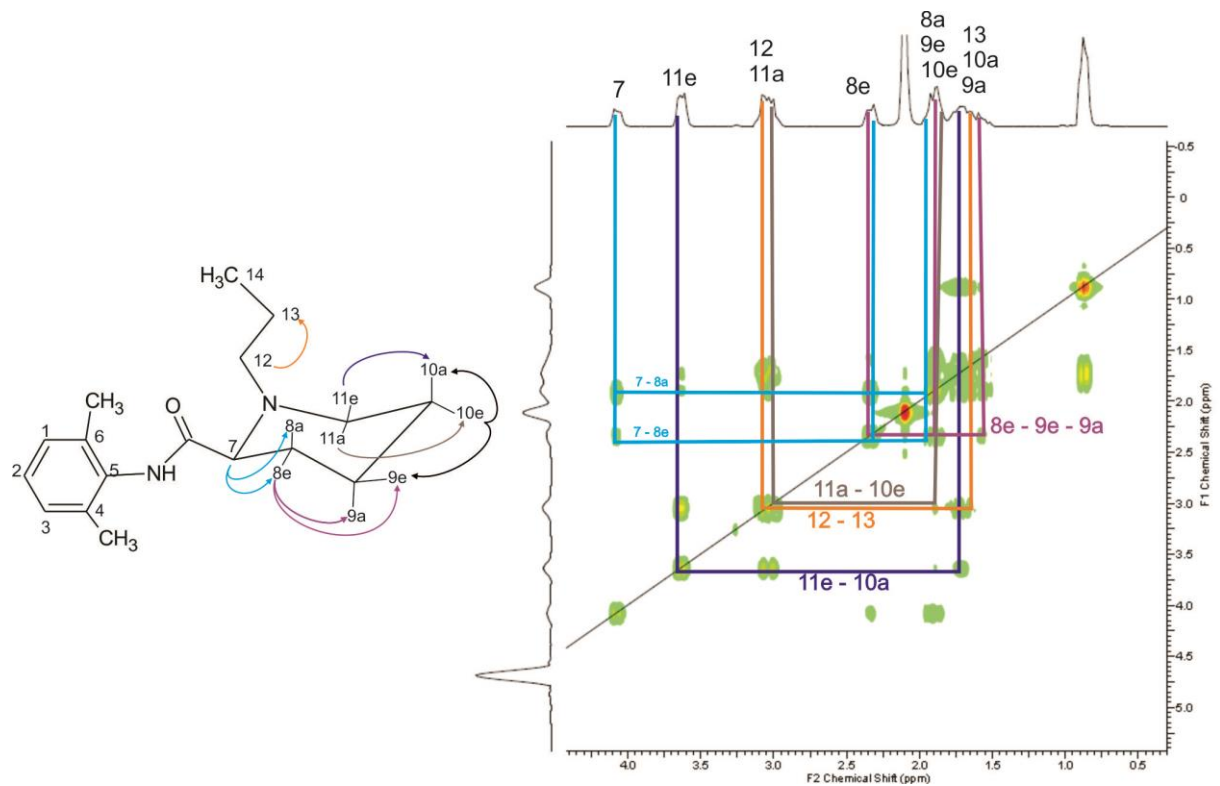


Figura 8 - Espectro de RMN COSY (400 MHz, D₂O/ referência H₂O residual em 4,7 ppm) de RVC [10 mmol L⁻¹].

Fonte: Autoria própria.

Portanto os sinais como se pode observar Figura 8 existe correlações entre os hidrogênios 11_e - 10_a, 11_a - 10_e, 12 - 13, 8_e - 9_e - 9_a, 7 - 8_e, 7 - 8_a. Dessa forma pode-se mapear e atribuir os hidrogênios que estão em sobreposição.

A Figura 9 traz o espectro de RMN de ¹H da vesícula lipossomal de membrana modificada LF, antes da formação do complexo. Este espectro foi obtido apenas como referência, pois, tendo em vista que a estrutura da vesícula lipossomal apresenta diversos hidrogênios sobrepostos, não se consegue definir quais foram alterados na complexação.

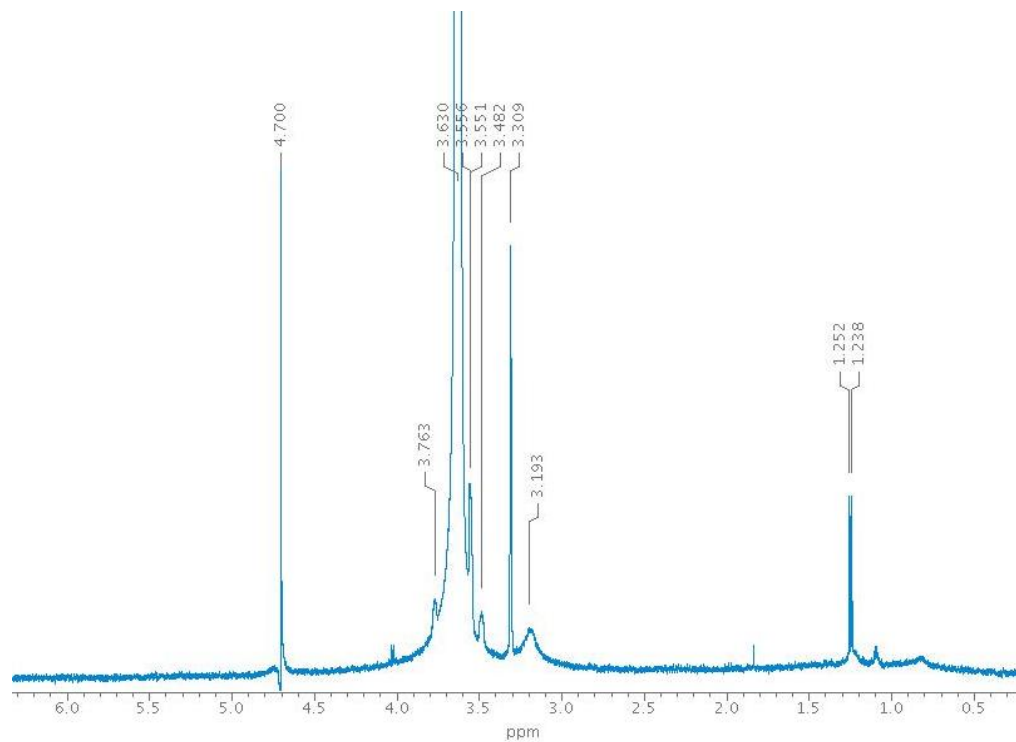


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) da vesícula lipossomal de membrana modificada (LF) [10 mmol L^{-1}].
Fonte: Autoria própria.

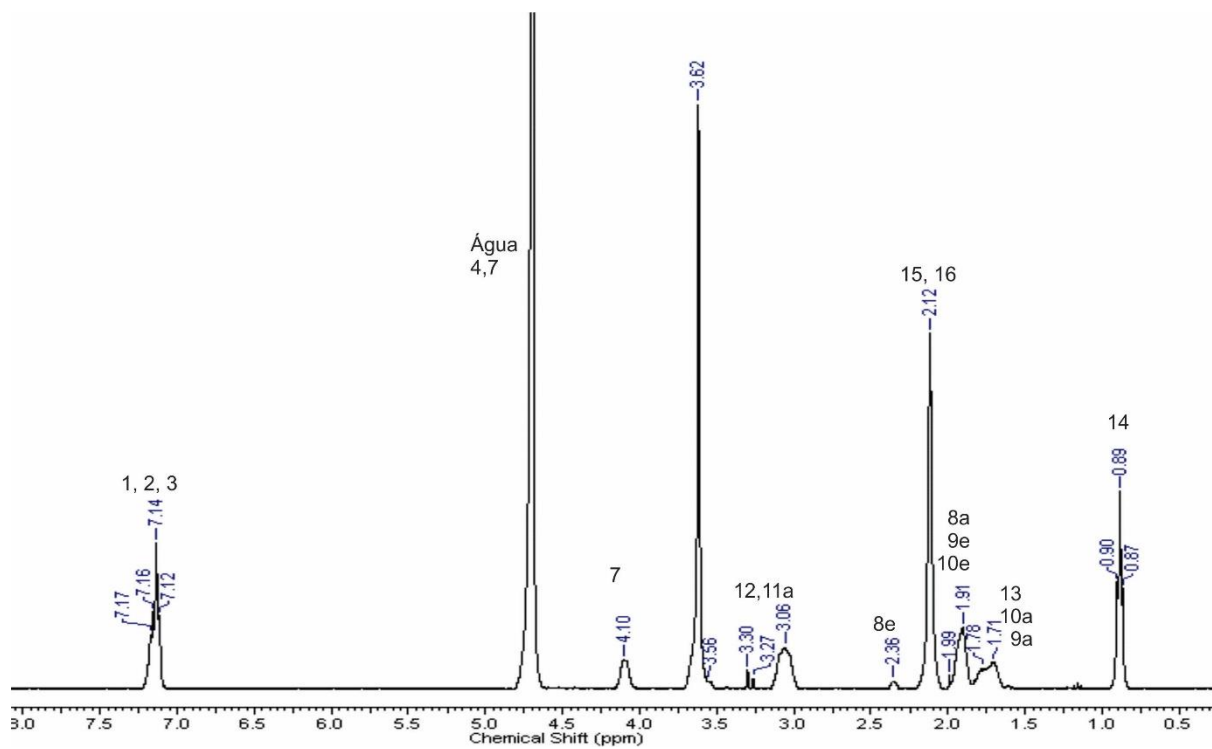


Figura 10 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do complexo RVC/LF [$10:10 \text{ mmol L}^{-1}$].
Fonte: Autoria própria.

O Figura 10 mostra um espectro de ^1H do complexo RVC e LF. Ao analisar o espectro da Figura 10 nota-se que houve um deslocamento dos sinais de hidrogênio do fármaco RVC quando complexado em LF. Os valores de deslocamento químico dos hidrogênios da RVC livre e do complexo RVC/LF foram apresentados na Tabela 2. Alguns sinais não apresentaram variação no deslocamento químico, entretanto outros indicaram algumas evidências de complexação de RVC em LF. Os maiores valores de variação de deslocamento foram para os H12; 11_a ($\Delta\delta = 0,23$ ppm) seguido dos H9_a; 10_a; 13 ($\Delta\delta = 0,07$ ppm) e H9_e; 8_a; 10_e ($\Delta\delta = 0,06$ ppm). Esses valores de variação do deslocamento químico indicam que o anel ciclopentano e H12; 11_a da RVC esta interagindo com LF com maior intensidade do que a parte aromática da molécula. No entanto, a variação no deslocamento químico do H3 e H7 indica também interage com LF, porem com menor intensidade.

Tabela 2 - Sinais de RMN de ^1H de RVC, RVC/LF (Variação nos deslocamentos químicos referente aos sinais de RVC).

^1H	RVC	RVC/LF	$\Delta\delta$ (ppm)
	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)	
1	7,17	7,17	0,00
2	7,14	7,14	0,00
3	7,13	7,12	-0,01
7	4,12	4,10	-0,02
8_e	2,34	2,34	0,00
8_a; 9_e; 10_e	1,93	1,99	0,06
9_a; 10_a; 13	1,71	1,78	0,07
11_e	3,64	-	-
11_a; 12	3,07	3,30	0,23
14	0,89	0,89	0,00
15, 16	2,12	2,12	0,00

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que a variação no deslocamento químico foi muito pequena, porém isso já pode ser considerado um indicativo que houve evidência de encapsulação da molécula de RVC em LF. Nota-se o também o alargamento dos sinais da Figura 10 quando comparado com os sinais da Figura 7, o que é outra evidência de complexação. Esse alargamento é devido à diminuição do tempo de relaxação T2 para macroestruturas (Figura 11). Assim, pode se concluir que a RVC esta complexada no lipossoma assumindo um tempo de correlação maior (RVC

assumindo característica do lipossoma) diminuindo assim seu valor de T2 e alargando o sinal.

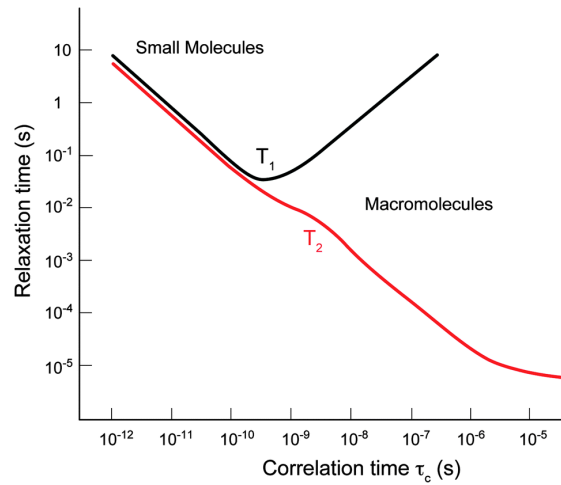


Figura 11 - Tempo de relaxação em função do tamanho de molécula.

6.2 ANÁLISE DOS ESPECTROS DE RMN DOS EXPERIMENTOS DOSY

Para um melhor entendimento do complexo formado entre a RVC e o LF (RCV/LF), foi necessária a obtenção de outras informações a seu respeito como a fração molar (f_x) e a constante de associação (K_a). Estes dados foram obtidos através dos coeficientes de difusão (D) resultantes de experimentos RMN-DOSY.

Para o estudo da interação do complexo, foram realizados experimentos DOSY para a RVC em sua forma livre (Figura 12), LF livre (Figura 13), e para o complexo de inclusão RVC/LF (Figura 14).

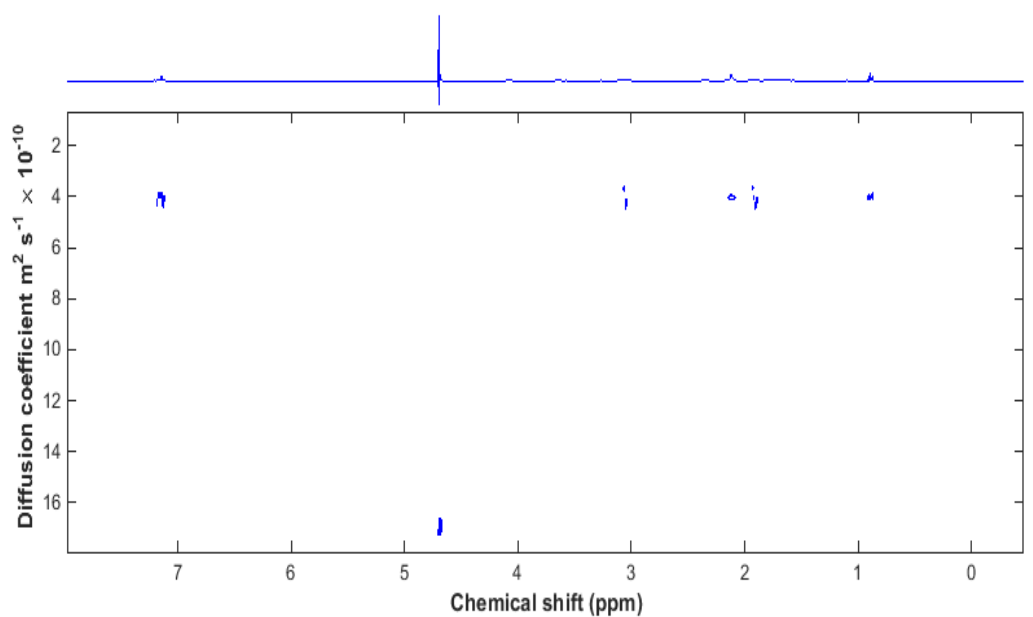


Figura 12 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) de RCV [10 mmol L^{-1}].
Fonte: A autoria própria.

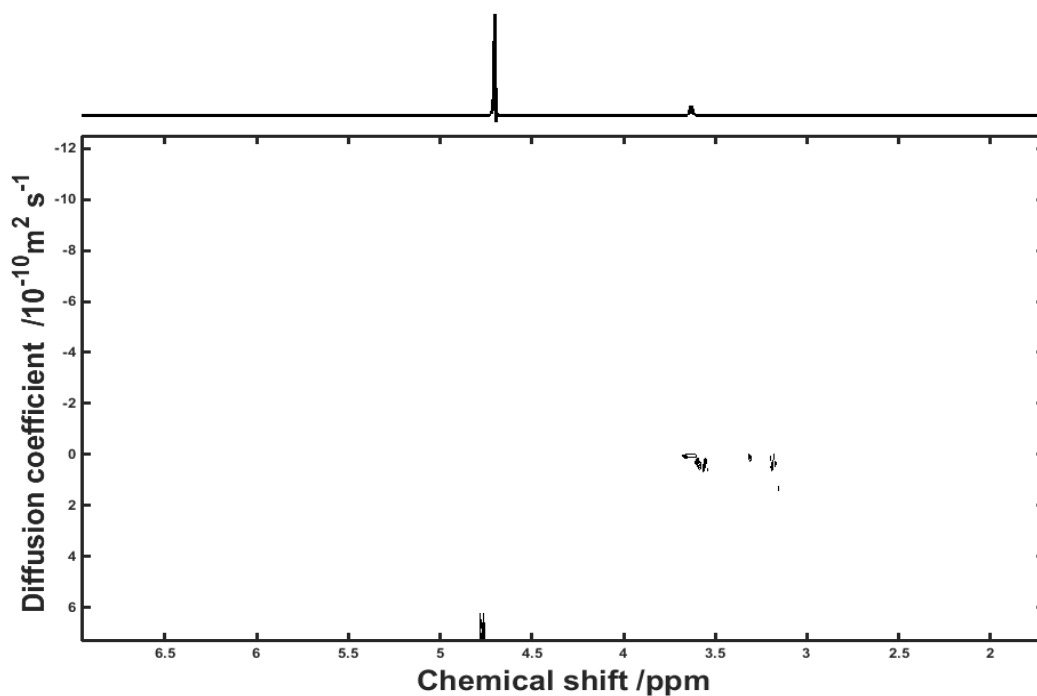


Figura 13 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do LF [$9,8 \text{ mmol L}^{-1}$].
Fonte: A autoria própria.

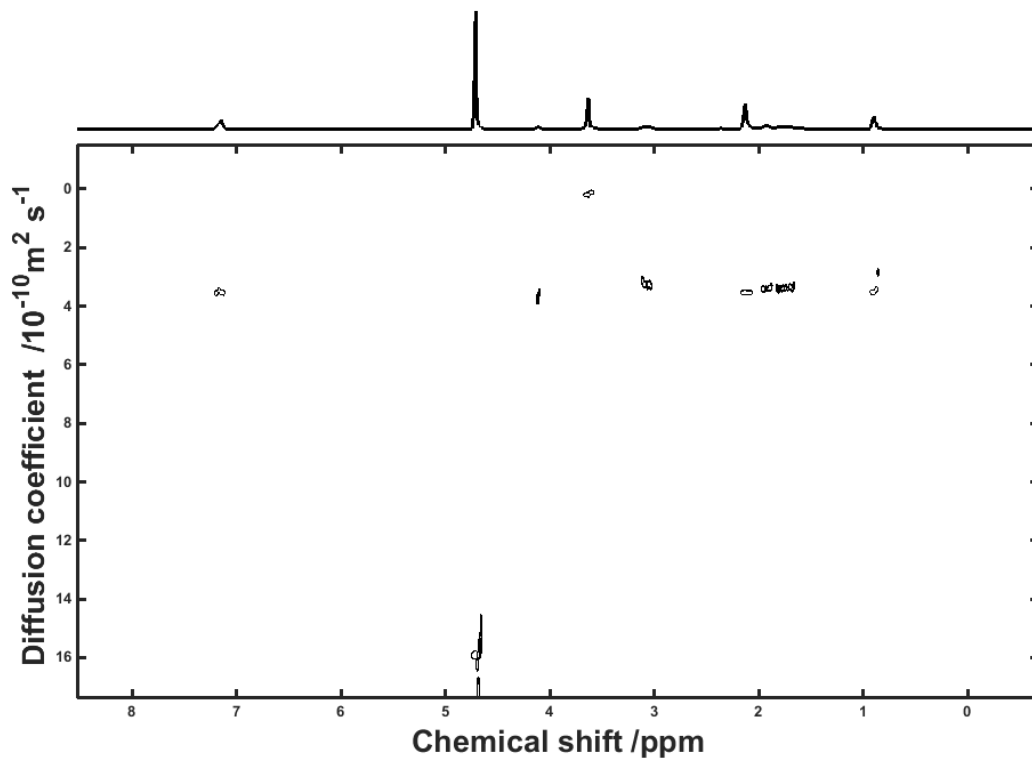


Figura 14 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D₂O/ referência H₂O residual em 4,7 ppm) do complexo RCV/LF.

Fonte: Aatoria própria.

Ao analisar os espectros das substâncias livres, RVC (Figura 12) e LF (Figura 13) pode-se observar uma grande diferença nos valores de D ($4,07 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ e $0,32 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ respectivamente) (Tabela 3). Isso se dá pelo fato da molécula de RVC apresentar uma estrutura menor, o qual gera uma difusão mais rápida ($4,07 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$) em relação à LF que se difunde mais lentamente ($0,32 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$) devido a sua maior e mais complexa estrutura. A análise do espectro do complexo RCV/LF (Figura 14) demonstra que a difusão do RVC em sua forma complexada sofreu uma grande redução comparada a sua forma livre ($4,07 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$) evidenciando a formação do complexo de inclusão.

A partir dos valores de D obtidos foi calculada a fração molar (f_x) do complexo seguindo a Eq. 1 (pág. 08) e com este valor se determinou sua constante de associação (K_a) por meio da Eq. 2 (pág. 08). Os valores de D , f_x e K_a encontrados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Coeficientes de Difusão (D) da RVC, LF e RVC/LF, constante de associação (K_a) e fração molar (f_x) do complexo RVC/LF.

Complexos	Compostos	$D (10^{-10} m^2 s^{-1})$	Fração molar do complexo $f_x\%$	K_a L/mol
-	RVC	$4,07 \pm 0,40$	-	-
-	LF	$0,32 \pm 0,17$	-	-
RVC/LF	RVC	$3,38 \pm 0,05$	18	28

Fonte: Autoria própria.

Com o valor de fração molar do complexo obtido 18 % juntamente com sua constante de associação $28 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ comprovam a associação da RVC e a molécula de LF.

Para confirmar a formação do complexo foi realizado experimentos de STD.

6.2.1 Avaliação do complexo RVC/LF experimentos de RMN - STD.

O experimento de STD fornece informações dos hidrogênios da molécula RVC encapsulada na vesícula de LF (Figura 15). A Figura 15iii refere ao espectro de ^1H do complexo RVC/LF. A Figura 15ii refere-se ao espectro controle I_{off} (fora de ressonância) e a Figura 15i ao espectro de STD. Na região de 3,62 ppm observa-se sinal referente aos hidrogênios do PEG e do H11e da RVC que estão sobrepostos, logo, essa região foi descartada para análises de STD.

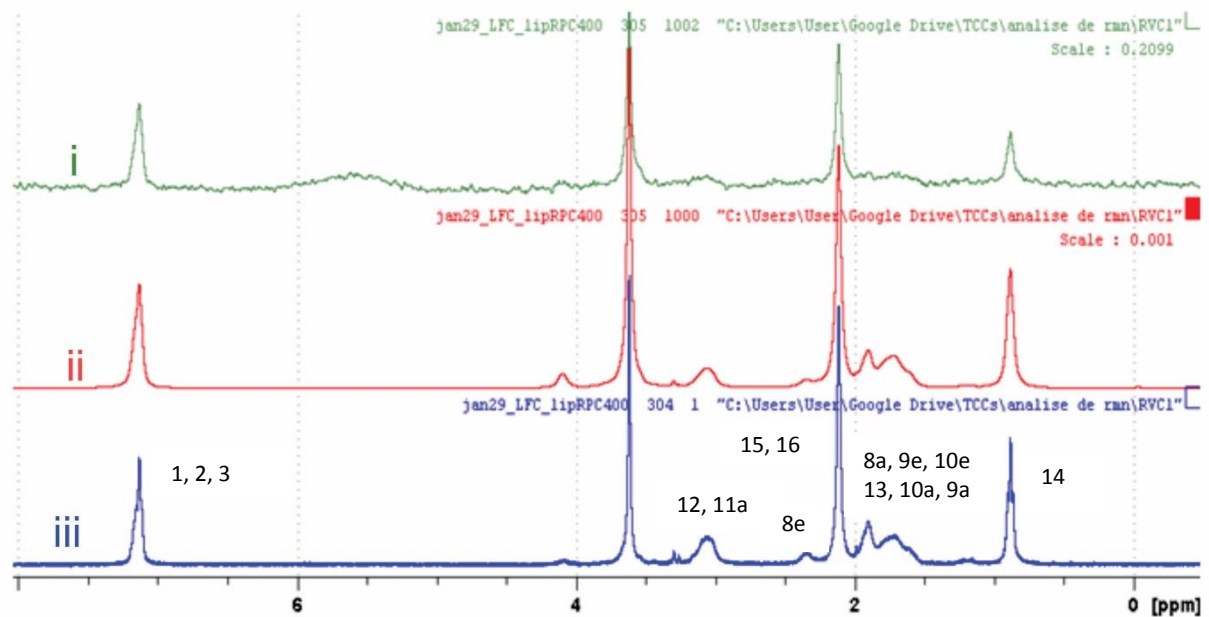


Figura 15 - iii) Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) da RPC [10 mmol L^{-1}] ii) Espectro controle (irradiando em 30 ppm) i) Espectro de STD RPC/LF (irradiando em -0,5 ppm). Tempo total de saturação 2,55 s.
Fonte: Própria.

O espectro de STD (irradiado em -0,5 ppm) indicou que ocorreu a transferência de saturação do lipossoma para hidrogênios da RVC indicando que a molécula de RVC foi encapsulada no LF. Os valores de magnetização foram normalizados. Assim, o hidrogênio com maior intensidade de transferência de magnetização foi o H_{8e} , seguido dos H aromáticos e H_{11a} , 12 (Tabela 1 Tabela 4). Os H_{15} , 16 e H_{14} apresentaram menor valor de transferência de saturação.

Tabela 4 - Dados obtidos nos experimentos de STD

H - (ppm)	Área STD	Área fora de ressonância	Mapa de STD normalizado.
H1, 2, 3 (7,17)	0,0003	1,0000	31 %
H 11 _a , 12 (3,07)	0,0003	0,8970	34 %
H_{8e} (2,36)	0,0003	0,3135	100%
H_{15} , 16 (2,12)	0,0006	2,2047	28 %
H_{14} (0,89)	0,0002	1,0843	19 %

Fonte: Autoria própria.

Os baixos valores de transferência de saturação do LF para os hidrogênios da RVC confirmam a encapsulação do AL nas vesículas de LF e corroboram com os

baixos valores da fração complexada obtida no espectro de DOSY 18% e baixa constante de associação $28 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$. Porém, o espectro de STD indica que toda a molécula de RVC foi encapsulada, pois hidrogênios aromáticos e piperidínicos sofreram transferência de saturação.

7 CONCLUSÃO

A determinação do complexo de RVC/LF proposto foi inicialmente realizada através do deslocamento químico. Os valores de variação no deslocamento químico dos espectros de RMN de ^1H da RVC foi o primeiro indício de complexação entre a molécula de RVC e LF. Esses resultados foram confirmados através dos experimentos de RMN-DOSY. Os coeficientes de difusão da RVC livre foram de $4,07 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e após complexada $3,38 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ o que indica interação da molécula de RVC com LF. Os cálculos de fração molar complexada de 18% e a constante de associação $K_a = 28 \text{ L/mol}$ mostraram que a molécula de RVC está encapsulada no LF porém fracamente.

A encapsulação do complexo RVC em LF foi comprovada também através dos experimentos de RMN-STD. A molécula de RCV foi totalmente encapsulada, pois o experimento de STD indicou transferências de saturação do LF para os hidrogênios do anel aromático e anel piperidínico.

8 REFERÊNCIAS

- ALLEN, T.M.; CULLIS, P.R. *Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications*. **Advanced Drug Delivery**, v. 65(1), p. 36-48, 2013.
- ANCHIÊTA-JÚNIOR, J. J.; LIMA, H. R. S.; CAVALCANTE, I. M. F.; LEITE, J. R. de S. de A.; MAGALHÃES, N. S. S.; ROLIM, H. M. L. *Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de anuros: citotoxicidade *in vitro* em células tumorais humanas*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 119-125, 2014.
- BANERJEE, D.; BROEREN, M.; VAN GENDEREN, M.; MEIJER, B.; RINALDI, P. *An NMR Study of the Supramolecular Chemistry of Modified Poly(propyleneimine) Dendrimers*. **Macromolecules**, v. 37 (22), p. 8313-8318, 2004.

BANGHAM, A.D., STANDISH, M.M., WATKINS, J.C., *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. **J. Molecular Biology**, v.13: p. 238-252, 1965.

BARFIELD, M.; CHAKRABARTI, B.; *Longe-range Proton Spin-Spin Coupling*. **Chemica Reviews**, v. 69, p. 757, 1969.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. de; MAGALHÃES, N. S. S. *Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BOERMAN, O.C.; LAVERMAN, P.; OYEN, W.J.G.; CORSTENS, F.H.M.; STORM, G. *Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging*. **Progress in Lipid Research**, v. 39, p. 461-475, 2000.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W.; **Carbon-13 NMR Spectroscopy**; Verlag; Weinheim, 1987.

CABEÇA, L.F. **Topologia de complexos entre drogas/ β -ciclodextrinas/lipossomas/células, aplicando técnicas de ressonância magnética nuclear**, *Tese de doutorado*, 2009. Instituto de Química, Departamento de Orgânica. Universidade de Campinas – Unicamp – Campinas-SP.

CABECA, L. F.; FERNANDES, S. A.; PAULA, E. de; MARSAIOLI, A. J. *Topology of a ternary complex (proparacaine-beta-cyclodextrin-liposome) by STD NMR*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 832-837, 2008.

CARLOMAGNO, T. *Ligand-target interactions: What can we learn from NMR?* **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 3, p. 245-266, 2005.

COLLINS, V. J. *Principles of Anesthesiology: general and regional*. - **Lea & Febiger**, U.S.A, 1993.

COVINO, B. *Pharmacology of local anaesthetic agents*. **Br J Anaesth** v. 58, p. 701-16, 1986.

COVINO, B. G. & VASSALO, H. G. **Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico**. Colina, Rio de Janeiro, 1985.

CROASMUN, W. R.; CARLSON, R. M. K.; EDS; **Two Dimensional NMR Spectroscopy**; VCH, New York, 1994.

DE ARAUJO, D. R.; DE PAULA, E.; FRACETO, L. F. *Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente*. **Química Nova** v. 31(7), p.1775-1783, 2008.

DE ARAUJO, D. R.; PINTO, L. M. A.; BRAGA, A. F. A.; DE PAULA, E. *Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas*. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53(5), p. 653-661, 2003.

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

DE PAULA, E., CEREDA, C., TOFOLI, G., FRANZ-MONTAN, M., FRACETO, L. & DE ARAÚJO, D. *Drug delivery systems for local anesthetics*. **Recent Pat Drug Deliv Formul** v. 4, p. 23-34, 2010.

DE MAREUIL, J.; MABROUK, K.; DORIA, E.; MOULARD, M.; DE CHASTEIGNER, S.; OUGHIDENI, R.; VAN RIETSCHOTEN, J.; ROCHAT, H.; DE WAARD, M.; SABATIER, J. M. *"Liposomal encapsulation enhances antiviral efficacy of SPC3 against human immunodeficiency virus type-1 infection in human lymphocytes."* **Antiviral Research**, v. 54(3): p. 175-188, 2002.

DEROME, A. E.; **Modern NMR Techniques for Chemistry Research**; Pergamon; Oxford, 1987.

DIEDERICH, F. *40 Years of Supramolecular Chemistry*. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 46(1-2), p. 68-69, 2007.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. *Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos*. **Química Nova**, v.36, n.10, p. 1520-1526, 2013.

DINCEL, A.; BASCI, N. E.; ATILLA, H.; BOAURT, A. *Development and validation of an HPLC-UV-Vis method for the determination of proparacaine in human aqueous humour*. **Chromatographia**, v. 66, p. S51-S56, 2007.

DISAPIO, A. J. *Microporous entrapment polymers offer new options for formulators*. **Global. Cosmetic Industry**, v. 165(3), p. 28-35, 1999.

DRUMMOND, D. C. *Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors*. **Pharmacol, Rev.**, v. 51, p. 691-743, 1999.

ENNIS, M.; LORENZ, W.; GERLAND, W. *Modulation of Histamine-Release from Rat Peritoneal Mast-Cells by Noncytotoxic Concentrations of the Detergents Cremophor El (Oxethylated Castor-Oil) and Triton X100 - a Possible Explanation for Unexpected Adverse Drug-Reactions*. **Agents and Actions**, v. 18(1-2), p. 235-238, 1986.

FRACETO, L. F.; PINTO, L. D. A.; FRANZONI, L.; BRAGA, A. A. C.; SPISNI, A.; SCHREIER, S.; DE PAULA, E. *"Spectroscopic evidence for a preferential location of*

lidocaine inside phospholipid bilayers. **Biophysical Chemistry**; v. 99(3): p. 229-24, 2002.

FRANZ-MONTAN, M.; DE PAULA, E.; GROppo, F. C.; RANALI, J.; VOLPATO, M. C. *Efficacy of liposome-encapsulated 0.5% ropivacaine in maxillary dental anaesthesia.* **Br J Oral**, v. 55 (5), p. 454-458, 2012.

FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI, A. J. "Screening protein-ligand interactions using H-1 NMR techniques for detecting the ligand." **Quimica Nova**, v. 30(7): p. 1597-1605, 2007.

Goniotaki, M.; Hatziantoniou, S.; Dimas, K.; Wagner, M.; Demetzos, C. *Physicochemical Properties of Liposomal Formulations Encapsulating Naturally Occurring Flavonoids. In Vitro Cytotoxicity Studies of the Liposomal Preparations against Human Cancer Cell Lines.* **Anticancer Research**, v. 24(5D): p. 3502-3503, 2004.

GRZYBOWSKI, A. *Cocaine and the eye: a historical overview.* **Ophthalmologica**, v. 222(5), p. 296-301, 2008.

GUBERNATOR, J. *Active methods of drug loading into liposomes: recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity.* **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8(5), p. 565–580, 2011.

GUPTA, S. P. *Quantitative Structure-Activity Relationship Studies on Local Anesthetics.* **Chemical Reviews**, v. 91, p.1109-1119, 1991.

HAERI, A.;SADEGHIAN, S.; RABBANI, S.; ANVARI, M.S.; LAVASANIFAR, A.; AMINI, M.; SIMIN, D. *Sirolimus-loaded stealth colloidal systems attenuate neointimal hyperplasia after balloon injury: A comparison of phospholipid micelles and liposomes.* **S. International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, p. 320–330, 2013.

HARVEY, R. A., CHAMPE, P. C. & MYCEK, M. J. (1998). **Anestésicos.** In: **Farmacologia Ilustrada** (A. Editora, ed). Ricardo M. Oliveira-Filho, Porto Alegre, p. 117-118.

HUA, S.; WU, S.Y. *The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies.* **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 143-1, 2013.

KAPUR, G. S.; CABRITA, E. J.; BERGER, S. The qualitative probing of hydrogen bond strength by diffusion-ordered NMR spectroscopy. **Tetrahedron Letters**, v. 41(37): p. 718, 2000.

KOEHLER, A., OERTEL, R. & KIRCH, W. *Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacain, prilocaine and ropivacain in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* **J Chromatography**, v. 1088, p. 126-30, 2005.

KONING, G.A.; SCHIFFELERS,R.M.; STORM, G. *Endothelial cells at inflammatory sites as target for therapeutic intervention.* **Endothelium**, v. 9, p. 161–171, 2002.

KLÜPPEL, M. L. W.; MACHADO, L. C.; GNOATTO, S. A. *Lipossomas em farmacologia: uma revisão da literatura*. **Estud. Biol.**, v.29, n.67, p. 215-224, 2007.

KUZMA, P., KLINE, M., CALKINS, M. & STAATS, P. *Progress in the development of ultralong- acting local anesthetics*. **Reg Anesth**, v. 22, p. 543-51, 1997.

KAISER, C. R.; RITTNER, R.; BASSO, E. A.; *Substituent-Induced ¹H Chemical Shifts of 3-Substituted Camphors*.; **Magn. Reson. Chem.** , v. 35, p. 609, 1997.

LANGERMAN, L.; GRANT, G. J.; ZAKOWSKI, M.; GOLOMB, E.; RAMANATHAN, S.; TURNDORF, H. *Prolongation of epidural anesthesia using a lipid drug carrier with procaine, lidocaine, and tetracaine*. **Anesthesia & Analgesia**, v. 75(6), p. 900-905, 1992.

LASIC, D. D.; PAPAHDJOPOULOS, D. *"Liposomes Revisited."* **Science**; v. 267(5202): p. 1275-1276, 1995.

LASIC, D. D.; BARENHOLZ, Y. *Handbook of nonmedical applications of liposomes / edited by Yechezkel Barenholz, Danilo D. Lasic*, Boca Raton, CRC, 1996.

LEHN, J.M. *Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture)*. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 27(1), p. 89-112, 1988.

LIU, Y.; YANG, Y.W.; YANG, E.C.; GUAN, X.D. *Molecular Recognition Thermodynamics and Structural Elucidation of Interactions between Steroids and Bridged Bis(β -cyclodextrin)s*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69(20), p. 6590-6602, 2004.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization.* **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85(10), p. 1017-1025, 1996.

LOPES, L. B.; OLIVEIRA, A. G. DE. *Lipossomas de longa circulação: estrutura e aplicações*. **Infarma**, v. 12, n. 7-8, p 66-69, 2000.

MACDONALD, J.C.; LUO, T.J.M.; PALMORE, G.T.R. *Supramolecular behavior of an isomorphous series of five bis (2-methylimidazolium 2, 6-dicarboxypyridine) M (II) complexes*. **Crystal Growth & Design**, v. 4(6), p. 1203-1209, 2004.

MALAMED, S. F. **Manual de anestesia local**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
MAYER, M.; MEYER, B. *Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy*. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 38(12), p. 1784-1788, 1999.

- MAYER, M.; MEYER, B. *Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor.* **Journal of the American Chemical Society**, v. 123(25), p. 6108-6117, 2001.
- MCCORMACK, B.; GREGORIADIS, G. *Comparative studies of the fate of free and liposome-entrapped hydroxypropyl-beta-cyclodextrin/drug complexes after intravenous injection into rats: Implications in drug delivery.* **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1291(3), p. 237-244, 1996.
- MERCADO, P. & WEINBERG, G. L. (2011). *Local anesthetic systemic toxicity: prevention and treatment.* **Anesthesiol Clin** v. 29, p. 233-42, 2011.
- MEURE, L.A.; KNOTT, R.; FOSTER, N.R.; DEHGhani, F. *The depressurization of an expanded solution into aqueous media for the bulk production of liposomes.* **Langmuir**, v. 25, p. 326-337, 2009.
- MEYER, B.; PETERS, T. *NMR Spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors.* **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 42(8), p. 864-890, 2003.
- MO, H. P.; POCHAPSKY, T. C. *Intermolecular interactions characterized by nuclear Overhauser effects.* **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 30, p. 1-38, 1997.
- MORAES, A. M. **Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade de lipossomas contendo o carboranilpropilamina, L-p-boronofenilalanina e doxorubicina.** (1996). *Tese de Doutorado*; Universidade de Campinas (Unicamp), Campinas.
- MORRIS, K. F.; JOHNSON, C. S. *Diffusion-Ordered 2-Dimensional Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy.* **Journal of the American Chemical Society**, v. 114(8): p. 3139-3141, 1992.
- MOWAT, J. J.; MOK, M. J.; MACLEOD, B. A.; MADDEN, T. D. *"Liposomal bupivacaine - Extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient."* **Anesthesiology**, v. 85(3), p. 635-643, 1996.
- MOWAT, J., MOK, M., MACLEOD, B. & MADDEN, T. *Liposomal bupivacaine. Extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient.* **Anesthesiology**, v. 85, p. 635-43, 1996.
- MURA, P., MAESTRELLI, F., GONZALEZ-RODRIGUEZ, M., MICHELACCI, I., GHELARDINI, C. & RABASCO, A. *Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes.* — **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, p. 86-95, 2007.
- NEEDHAM, D.; MCINTOSH, T. J.; LASIC, D. D. *Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes.* **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1108, p. 40-48, 1992.

NEW, R.R.C. *Lipossomes-a praticai approach*. Rickwood D., Hames B.D., Eds. IRL Press, **Oxford**, 1990.

NUNEZ, M. M., A.; SORIANO, V.; PODZAMCZER, D.; GONZALEZ-LAHOZ, J. "Clearance of human herpesvirus type 8 viraemia in HIV-1-positive patients with Kaposi's sarcoma treated with liposomal doxorubicin." **Aids**; v. 14(8): p. 913-919., 2000.

OSCHKINAT, H.; MÜLLER, T.; DIECKMANN, T.; *Protein Structure Determination with Three- and Four-Dimensional NMR Spectroscopy*. **Angew. Chem.**, Int. Ed. Engl., v. 33, p. 277, 1994.

PAVIA, D. L.; et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PUGLIA, C.; TROMBETTA, D.; VENUTI, V.; SAIJA, A.; BONINA, F. *Evaluation of in-vivo topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56(10), p. 1225-1232, 2004.

RICHARD, B. M., OTT, L. R., HAAN, D., BRUBAKER, A. N., COLE, P. I., NELSON, K. G., ROSS, P. E., REBELATTO, M. C. & NEWTON, P. E. *The safety and tolerability evaluation of DepoFoam bupivacaine (bupivacaine extended-release liposome injection) administered by incision wound infiltration in rabbits and dogs*. **Expert Opin Investig Drugs** v. 20, p. 1327-41, 2011.

SANDERS, J. K. M.; CONSTABLE, E. C.; HUNTER, B. K.; **Modern NMR Spectroscopy**, Oxford, New York, 1989.

SAGRISTÁ, M. L.; MORA, M.; MADARIAGA, M. A. *Surface modified liposomes by coating with charged hydrophilic molecules*. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, Washington, v. 5, p. 19-33, 2000.

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

SESSA, G, WEISSMANN, G. *Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes*. **J. Lipid Res.**, v. 9, p. 310-318, 1968.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7a ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C.; **Spectrometric Identification of Organic Compounds**; Wiley & Sons; New York, 1995.

SOLOMONS, T. W. G. **Química orgânica 1**. LTC Livros Técnicos e Científicos S.A., 6ª ed, 1996.

STILES, J.; KROHNE, S.; RANKIN, A.; CHANG, M. *The efficacy of 0.5% proparacaine stored at room temperature. Veterinary Ophthalmology*, v. 4(3), p. 205-207, 2001.

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

WHITESIDE, J. & WILDSMITH, J. *Developments in local anaesthetic drugs. Br J Anaesth*, v. 87, p. 27-35, 2001.

WEINIGER, C. F., GOLOVANEVSKI, M., SOKOLSKY-PAPKOV, M. & DOMB, A. J. *Review of prolonged local anesthetic action. Expert Opin Drug Deliv*, v. 7, p. 737-52, 2010.

YANG, S.; LIU, C.; LIU, W.; YU, H.; ZHENG, H.; ZHOU, W.; HU, Y. *Preparation and Characterization of Nanoliposomes Entrapping Medium-Chain Fatty Acids and Vitamin C by Lyophilization. International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, p. 19763-19773, 2013.

ZALLOUM, N. L. **Encapsulamento e caracterização físico-química do antibiótico em lipossomas. (2001).** *Dissertação de Mestrado*; Universidade de Campinas Campinas.

ZUCKER, D.; MARCUS, D.; BARENHOLZ, Y.; GOLDBLUM, A. *Liposome drugs' loading efficiency: a working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. Journal of Controlled Release*, v. 139, p.73–80, 2009.