ATENUAÇÃO DA TOXICIDADE TISSULAR DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES ADMINISTRADOS, VIA INTRAMUSCULAR, PELA ENCAPSULAÇÃO EM TRANSPORTADORES COLOIDAIS.

ELIANA MARTINS LIMA[1]
ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA[2]

1 Faculdade de Farmácia - UFG – Praça Universitária c/ 1ª av., quadra 62, 74605-220, Goiânia, GO, Brasil. E-mail: emlima@farmacia.ufg.br

2 Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp, Rodovia Araraquara-Jaú km 01, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brasil. E-mail: oliveiag@boldo.fcfar.unesp.br

Introdução

A administração de fármacos, via intramuscular, é um método bem consolidado e de utilização muito freqüente para a obtenção de concentrações terapêuticas, em curto espaço de tempo. Em comparação com a via oral, existe a vantagem de evitar a primeira passagem pelo fígado e certos efeitos secundários. Com relação à via intravenosa, a administração intramuscular é mais cômoda, mais segura e pode permitir a modulação velocidade de liberação do fármaco.

Entretanto, dependendo do fármaco, existe a possibilidade do aparecimento de lesões tissulares, acompanhadas de dor [Kadir *et al*, 1992], as quais podem evoluir até necrose dos tecidos locais [Müller-Vahl, 1983]. A administração parenteral de antiinflamatórios não esteróides é bastante freqüente, sendo indicada para várias situações, particularmente na dor pós-operatória. Embora reações gastrintestinais, renais, nervosas e de hipersensibilidade sejam comuns na prática médica com os AINEs, outras complicações podem não ser devidamente consideradas, como a trombose venosa e necrose tecidual, após administração intramuscular [Campbell & Watters, 1989; 1991].

Müller-Vahl [1983] descreveu um estudo de 1384 casos suspeitos de imperícia médica, dos quais 90 casos envolveram reações adversas ocorridas após injeção intramuscular. Na maioria deles o resultado foi uma deficiência severa e permanente, com alta incidência de necrose asséptica.

A necrose tissular é uma reação bem documentada como complicação de injeção intramuscular de certos fármacos, principalmente antiinflamatórios não esteróides. A patogenia não está bem esclarecida, mas a evolução do quadro clínico inicia-se com dor intensa e desenvolvimento de uma área inflamatória. Em seguida, a região torna-se lívida, ocorrendo infarto e necrose, resultando em úlceração local.

Diversos casos de severas reações locais associadas à injeção intramuscular de diclofenaco foram descritos [Pillans & Connor 1995]. Em alguns pacientes, a reação desenvolveu-se, após a administração de dose única de 75 mg. Em outros, foram isolados microorganismos contaminantes da região necrosada. Outro paciente desenvolveu septicemia. Fascite necrotizante tornou-se evidente, após o 3º dia da injeção, a qual foi caracterizada por infecção, que se espalhou rapidamente, com necrose e edema da camada lipídica subcutânea e fascia adjacente geralmente é fatal.

As áreas de necrose eram extensas (de 10 x 10 cm até 28 x 10 cm), sendo necessários vários debridamentos cirúrgicos. Em um dos pacientes, a necrose se estendeu por todo o glúteo e pelas costas até o nível da escápula, comprometendo também toda a parede abdominal e a metade superior da coxa. Três pacientes desenvolveram septicemia, coagulação intravascular disseminada e necrose tubular aguda.

O diclofenaco sódico está disponível no mercado mundial, desde 1974. Estima-se que o número de usuários, nos primeiros quatro anos, tenha sido de dez milhões de pessoas. É o primeiro AINE derivado do ácido fenil acético a ser aprovado para uso. Projetado com base nas propriedades físico-químicas da fenilbutazona, indometacina e ácido mefenâmico [Sallmann, 1986]. O fato de o diclofenaco sódico ser um potente analgésico, fez com que seu uso se difundisse em quase todos os campos da medicina, tornando mais comum o registro de efeitos colaterais associados ao uso deste medicamento. Por exemplo, os pacientes descritos no trabalho acima receberam injeções intramusculares de diclofenaco para o tratamento das mais diversas condições, como: hemorroidectomia, cólica renal, influenza, pancreatite, dor de cabeça, mialgia pós esporte.

Giovannetti *et al* [1993] relataram sete casos de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - USP, apresentando necrose tecidual decorrente da injeção intramuscular do diclofenaco sódico. A maioria destes pacientes recebeu o diclofenaco sódico para analgesia, havendo situações de pós operatório, doença reumática e carcinoma de pleura em um portador da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. Estes pacientes apresentaram dor, durante a aplicação do fármaco, sem que esta fosse descontinuada. Tardiamente, vieram a desenvolver necrose tecidual que eventualmente se estendia até o plano muscular, necessitando de debridamento cirúrgico e ocasionalmente enxertia de pele.

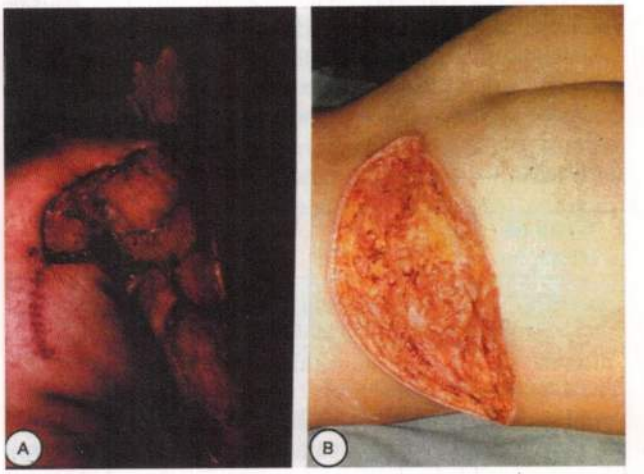

Figura 1- A.: G.M.L., 60 anos. Necrose de pele e tecido celular subcutâneo do braço 20 dias após injeção de diclofenaco sódico para analgesia. Paciente foi submetida a limpeza cirúrgica com retirada de tecido necrótico e fechamento por segunda intenção. B.: A.M.P.G., 30 anos. Paciente havia recebido no local, cerca de um mês antes, uma ampola IM de diclofenaco sódico, tendo evoluído com intensa dor local, hiperemia e aparecimento de bolhas. Formou-se extensa área necrótica na nádega com continuidade na região lombar esquerda, com drenagem purulenta. A paciente foi submetida a debridamento cirúrgico. J Fotografias gentilmente cedidas pelo Dr. Nivaldo Alonso, do Depto. de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

O desenvolvimento de formulações injetáveis exige a avaliação da toxicidade local do produto final [Burnet *et al*, 1981], assim também a avaliação da irritação local que se segue, após uma administração intramuscular, constitui um critério importante. A toxicidade de uma formulação depende de vários parâmetros: o pH, a pressão osmótica, bem como da toxicidade intrínseca do fármaco, do veículo e dos adjuvantes utilizados.

Vários métodos *in vitro* e *in vivo* podem ser utilizados para determinar a toxicidade local de um medicamento.

Os métodos *in vivo* avaliam a miotoxicidade, seja através da observação das alterações visíveis ou histológicas, em nível do músculo, seja através do doseamento da atividade da enzima intracelular creatina fosfoquinase (CPK) [Diness, 1985]. O princípio geral destes métodos consiste na injeção intramuscular do produto teste em cobaias e posterior análise do plasma ou do músculo no qual foi efetuada a injeção [Svendsen *et al*, 1985].

A CPK é a enzima chave nos processos energéticos celulares, gerando ATP a partir da fosfocreatina em tecidos com alta demanda de energia [Wallimann *et al*, 1992; Wyss *et al*, 1992; Soboll *et al*, 1997].

Entre os métodos *in vitro*, os mais utilizados são aqueles que empregam os efeitos biológicos, como o efeito hemolítico ou citológico sobre as células cultivadas [Svendsen *et al*, 1985]. Estes modelos podem ser utilizados para prever a toxicidade *in vivo* e para a realização de uma seleção rápida e econômica, durante o desenvolvimento galênico de um novo produto.

Métodos *in vivo* para a avaliação da tolerância local de fármacos

Os primeiros métodos propostos foram descritos por Benitz & Dambach [1966] e Shintani *et al* [1967]. Com base nas análises macroscópicas, morfológicas e histológicas das lesões encontradas em coelhos, eles avaliaram a miotoxicidade em função das intensidades das alterações observadas. Uma outra técnica fundamentada sobre os mesmos princípios foi desenvolvida por Kienel [1973]. Neste caso, o animal utilizado foi o rato e a observação das lesões foi feita, após o corte transversal das fibras musculares.

Em geral, em um estudo macroscópico, os parâmetros observados são a presença de necrose com diferentes graus de edema e de hemorragia [Diness, 1985]. Surber & Sucker [1987] estipularam os parâmetros utilizados para avaliar as lesões musculares, segundo seu aspecto macroscópico, conforme pode ser observado pelo quadro que se segue:

Parâmetros utilizados para a avaliação das lesões musculares

Grau de irritação	Nível	Observação
ausência	0	nenhuma alteração visível
discreta	1	ligeira alteração de cor
moderada	2	Alteração de cor importante comparada aos tecidos circundantes
grave	3	coloração parda com pequenas lesões necróticas
muito grave	4	necrose avançada e abcessos englobando todo o músculo

Com relação às análises histológicas, uma inspeção direta do sítio de injeção deve ser feita. A observação dos parâmetros descritos, como a presença de infiltrações de células polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos, células plasmáticas ou aparição de edema, hemorragia, necrose ou o desenvolvimento de fibrose, deve ser realizada para descrever as alterações patológicas provocadas pela injeção. Os parâmetros utilizados por Kadir *et al* [1992] para a avaliação histológica foram os seguintes: necrose celular, hemorragia, fibrose, infiltração por granulócitos, infiltração por macrófagos.

A determinação da atividade plasmática da Creatina Fosfoquinase (CPK) parece ser o método mais preciso para a avaliação da tolerância local de fármacos administrados, via intramuscular [Steiness *et al*, 1978]. Normalmente, um aumento da atividade da CPK traduz o dano muscular no sítio de injeção [Surber & Dubach, 1989]. Não apenas as fibras musculares necróticas, mas também as fibras que estão ligeiramente afetadas, podem liberar a CPK [Diness, 1985]. A quantidade de CPK liberada depende de vários fatores, como a toxicidade do produto, por si próprio, o volume de músculo atingido, a atividade normal da CPK no sítio de injeção e a vascularização do músculo acometido [Steiness *et al*, 1978]. Após um episódio de infarto do miocárdio, a atividade sérica da CPK fica alterada, de forma significativa, nas primeiras 24 horas [Wilkinson, 1970].

Um dos primeiros estudos que associaram as lesões musculares com o aumento do nível plasmático da CPK foi realizado por Warnock & Ellman, em 1969. Eles demonstraram que o aumento da atividade plasmática da CPK em pacientes psicóticos estava associado aos efeitos locais provocados pela clorpromazina. Para reforçar sua hipótese, eles demonstraram que a injeção intramuscular de clorpromazina no coelho provocava um aumento significativo da atividade desta enzima.

Em 1978, um estudo comparativo da atividade da CPK, no coelho, no porco e no homemm, foi desenvolvido por Steiness *et al*, antes e depois de injeções intramusculares contendo sempre o mesmo volume de lidocaína, diazepam, digoxina e soro fisiológico. Os autores concluíram que um ligeiro aumento na atividade da CPK, no homem, pode indicar severas lesões musculares. Além disso, foi demonstrado que a utilização de modelos animais para prever a extensão dos danos musculares, no homem, exclui a possibilidade da utilização dos mesmos volumes de produtos. Por outro lado, no coelho, mesmo pequenos volumes de substâncias ativas tóxicas podem conduzir a importantes aumentos da atividade enzimática, o que comprova a adequação deste método, quando esta espécie animal é escolhida.

Apesar dos bons resultados obtidos com a utilização da dosagem plasmática da CPK para a avaliação da toxicidade tissular, utilizando-se animais de laboratório, vários problemas foram descritos. Variações importantes na atividade da CPK foram observadas, no coelho, devido a reações de fuga apresentadas pelos animais, antes e depois do tratamento [Steiness *et al*, 1978]. Para evitar estes problemas, foi proposta a familiarização dos animais com o local de manipulação. A determinação da diminuição da atividade da CPK, em nível do sítio de injeção, também, foi utilizada [Svendsen *et al*, 1985]. A influência do espécime animal escolhido foi posta em evidência por Diness [1985], que demonstrou que as preparações miotóxicas provocam maiores danos tissulares no coelho do que no porco.

Burnett *et al* [1981] propuseram um método, utilizando ratos, no qual a avaliação da toxicidade é feita pela determinação da quantidade de tinta liberada no sítio de injeção. Este método apresenta a vantagem de localizar mais facilmente o

sítio de injeção do que aqueles onde a atividade da CPK é medida por diferença entre a concentração normal no músculo e aquela medida, após a injeção no mesmo animal [Svendsen *et al*, 1979].

O princípio deste método é o seguinte: antes do experimento, realiza-se uma injeção intravenosa de tinta. A tinta se liga às proteínas plasmáticas e delimita as regiões onde os processos inflamatórios agudos estão presentes. Na verdade, a inflamação provoca um aumento na permeabilidade capilar, com liberação da tinta ligada às proteínas. Na maior parte dos casos, pode ser observada uma correlação entre a quantidade de tinta liberada e a intensidade da inflamação resultante do dano muscular. Entretanto, é possível que uma formulação provoque um aumento da permeabilidade vascular, sem que haja lesão muscular. Esta é a razão pela qual também se sugere uma caracterização histológica para determinar a natureza das alterações no sítio de injeção.

Diness [1985] utilizou a determinação da CPK, no coelho e no porco, para avaliar a toxicidade tissular. O estudo foi baseado nas diferenças de atividade da CPK no sítio de injeção e em um músculo controle quando diferentes quantidades de produtos são injetadas. Este método se mostrou adequado, os resultados obtidos foram coerentes com aqueles obtidos por análises macro e microscópicas das lesões musculares.

Foi também remarcado que a extensão do acometimento muscular é proporcional ao volume injetado. Cingolani *et al* [1985] realizaram um estudo, no coelho, associando a liberação da CPK e a observação visual e histológica das lesões. Ficou demonstrado que os dois métodos são complementares: as perdas musculares em CPK assinalam o fenômeno, logo após a administração, enquanto que as avaliações visuais e histológicas traduzem a evolução das lesões com o tempo.

Mais tarde, Surber e Sucker [1987] realizaram um estudo com ratos, efetuando a determinação de várias enzimas no sítio de injeção e no plasma. As enzimas estudadas foram a CPK, a aspartato amino transferase e a desidrogenase lática, todas presentes no músculo. Foi relatado que a elevação plasmática da CPK está associada à toxicidade muscular, enquanto que a diminuição da concentração desta no local de injeção não pode ser correlacionada ao comprometimento muscular. Os aumentos das taxas plasmáticas de aspartato amino transferase e da desidrogenase lática foram menos indicativos das diferenças entre as preparações estudadas.

Finalmente, foi evidenciada a influência das injeções intraperitoneais sobre o aumento das taxas plasmáticas de CPK, mas sem correlação com o comprometimento muscular, o que pode então, levar a falsos resultados.

Em 1986, Comereski *et al* realizaram um estudo sobre a correlação entre dor e irritação muscular causados por vários antibióticos associados ou não a anestésicos locais. Para avaliar a irritação muscular, foi utilizado o método de determinação da CPK plasmática, no coelho. A presença de um agente anestésico eliminou a dor, mas não impediu a corrência de lesões tissulares.

Métodos combinados *in vitro* e *in vivo* para avaliação da tolerância local de fármacos

Em 1989, Surber & Dubach também demonstraram que o aumento da CPK no rato é útil para quantificar um acometimento muscular. Neste estudo, foi evidenciada uma boa correlação entre o potencial hemolítico (método *in vitro*) de uma substância ativa e de um excipiente e a taxa plasmática da CPK, após injeção no rato. Entretanto, esta mesma correlação não pode ser encontrada no homem.

Svendsen *et al* [1985] realizaram um estudo comparativo, utilizando várias substâncias ativas e métodos *in vivo* e *in vitro* para a determinação da toxicidade tissular. Dentre os métodos *in vivo*, no coelho, foram avaliados a determinação da alteração do peso do músculo isolado, três dias após a injeção e a perda em CPK do músculo atingido, em comparação com o músculo contralateral não tratado. No que se refere aos métodos *in vitro*, foram empregados o potencial hemolítico sobre os eritrócitos humanos e a citotoxicidade, em cultura celular, utilizando-se um modelo contendo fibroblastos MRC-5.

Estes autores concluíram que a utilização dos métodos *in vitro* é possível para uma pesquisa preliminar da toxicidade local dos produtos destinados à administração, via intramuscular, e que este tipo de ensaio, sobretudo o de hemólise, apresenta as seguintes vantagens: são menos onerosos e de fácil realização.

Brown *et al* [1989] utilizaram o método de determinação da hemólise *in vitro* para prever a toxicidade muscular. Segundo estes autores, as formulações capazes de provocar a hemólise são também capazes de provocar lesões tissulares e, consequentemente, a determinação do grau de hemólise pode ser útil para a avaliação da toxicidade. De fato, os resultados confirmaram esta hipótese, uma vez que foram obtidas boas correlações entre os resultados *in vivo* e *in vitro*.

Uma excelente correlação entre um método *in vitro* e outro *in vivo* foi obtida, utilizando-se a determinação da atividade da CPK. Brazeau & Fung [1989] realizaram um estudo com misturas binárias de solventes utilizados em preparações injetáveis, determinando *in vivo* das taxas plasmáticas da CPK, após injeção intramuscular, no coelho e *in vitro* a liberação cumulativa da CPK de músculos isolados de ratos.

Laska *et al* [1990], realizaram um trabalho, utilizando uma técnica in vitro anteriormente descrita por Williams *et al* [1987], empregando células L6 de músculo de rato para avaliar a toxicidade provocada pela administração parenteral. Neste estudo, foi possível estabelecer uma boa correlação entre a morfologia ultraestrutural (determinada por microscopia eletrônica) e a liberação de CPK das células L6 após a administração de vários antibióticos. Em 1991, Laska *et al* desenvolveram um outro trabalho utilizando também a liberação de CPK de células L6 para avaliar a irritação provocada por vários produtos injetáveis.

Apesar desta técnica ser adequada durante a formulação de um novo produto injetável, a utilização de um modelo animal para a avaliação posterior da toxicidade no homem não pode ser excluída. A relação entre formulações irritantes e lise celular também foi analisada por Evans *et al* [1996], utilizando o modelo celular L6.

Atenuação da toxicidade local de fármacos pela encapsulação em transportadores coloidais.

Estudos com o objetivo da utilização de transportadores coloidais para contornar os problemas de efeitos tóxicos produzidos por fármacos administrados pela via intramuscular ainda são limitados.

Entre os sistemas de transporte de fármacos, os lipossomas merecem a atenção em razão de que eles têm sido usados eficientemente na liberação de vários grupos de substâncias ativas [Lasic 1997, Oliveira & Scarpa 1997, Oliveira, Scarpa & Leite 1997, Lasic 1998, Canto, Dalmora & Oliveira 1999.

Na decada de 80, Litterst *et al* [1982], Forssen & Tökes

[1983], e Axelsson [1989] estudaram indiretamente as propriedades protetoras da encapsulação em em lipossomas em relação ao fármaco livre. Kadir *et al* [1992] utilizaram avaliações histológicas para explicar os efeitos irritantes das injeções intramusculares de lipossomas. De acordo com estes autores, à medida que a se atinge a liberação prolongada do medicamento, a administração intramuscular, através de lipossomas, pode ser vantajosa, em particular, para substâncias miotóxicas, em razão de que lipossomas vazios não demonstram serem miotoxicos [Kadir et al 1992, Lima 1998]

O fenômeno de toxicidade tissular provocada pela administração intramuscular de diclofenaco contido em nanocápsulas como sistema transportador foi estudado [Guterres 1995, Guterres *et al* 1995]. Para isso, foram preparadas nanocápsulas poliméricas de ácido poli-lático, e a tolerância muscular local foi avaliada, através da atividade da enzima CPK (creatina fosfoquinase) e, também, através de análise histopatológica dos tecidos. Entretanto, também houve significativa elevação da atividade da CPK provocada pela a injeção das nanocápsulas vazias. Isto provavelmente se deve à própria natureza das nanocápsulas, cuja composição (benzoato de benzila ou miglyol e polímero) poderia provocar uma irritação no local da administração. Lalla & Sapna [1993] também utilizaram microsferas de ácido poli-lático para a liberação controlada do piroxicam após administração parenteral.

Utilizando lipossomas como modelos de membranas, Jullien *et al* [1990] relataram que a afinidade da anfotericina B pela fosfatidilcolina das vesículas é um fator determinante de sua toxicidade celular.

Vários outros pesquisadores têm concentrado seus estudos na tentativa de monitorar os efeitos irritantes de fármacos sobre o tecido muscular após a aplicação de injetável e também de encontrar meios para solucionar este problema. Neste sentido Forssen & Tokes [1983] verificaram a atenuação da toxicidade dérmica (após injeção intradérmica) da doxorrubicina pela encapsulação em lipossomas. Soehngen *et al* [1988] comprovaram que os lipossomas reduzem ou eliminam a ulceração normalmente associada à administração de indometacina. Titulaer *et al* [1990] observaram que a liberação controlada de cloroquina encapsulada em lipossomas após a administração parenteral em ratos, reduz os efeitos tóxicos da mesma.

Outro estudo interessante foi efetuado por Kadir *et al* [1992], monitorando as reações tissulares após a injeção intramuscular de lipossomas em ratos. Os autores concluíram que, uma vez que os lipossomas não possuem propriedades irritantes, eles podem ser úteis para reduzir a irritação causada por fármacos administrados por via parenteral.

Mais recentemente, Lima [1998], estudou o efeito da encapsulação do diclofenaco sódico em lipossomas unilamelares na toxicidade tissular após administração intramuscular em ratos (Lima, 1998). A reação tissular foi acompanhada medindo-se a atividade sérica da enzima creatina fosfoquinase (CPK). Os resultados mostraram que formulações contendo diclofenaco livre produziram grande aumento na atividade da enzima CPK, enquanto que o diclofenaco encapsulado resultou em reações insignificantes, similares à dos grupos controle. A análise histológica do tecido muscular local, no terceiro e no sétimo dias, após a injeção, mostrou intensos danos celulares provocados pelo diclofenaco livre e ausência de miotoxicidade para o fármaco encapsulado (Lima, 1998).

Referências bibliográficas

AXELSSON, B. Liposomes as carriers for anti-inflammatory agents. *Adv. Drug Delivery Rev.*, Amsterdam, v.3, p.391-404, 1989.

BENITZ, K.F., DAMBACH, G. Morphologic quantification of muscular lesions after injections of aqueous solutions. *Arzneim. Forsch.*, Aulendorf, v.16, p.658-661, 1966.

BRAZEAU, G.A., FUNG, H.L. Use of in vitro model for the assesment of muscle damage from intramuscular injections: in vitro - in vivo correlation and predictability with mixed solvent systems. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.6, p.766-771, 1989.

BROWN, S., TEMPLETON, L., PRATER, D.A., POTTER, C.J. Use of na in vivo haemolysis test to predict tissue irritancy in na intramuscular formulation. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.43, p.117-120, 1989.

BURNETT, S., DAVY, C.W., JACKSON, M.R. Assesment of local irritancy of drugs in rats after intramuscular injection. *Int. J. Tissue React.*, Geneva, v.111, p.107, 1981.

CAMPBELL, W., WATTERS, C. Venous sequelae after I.V. diclofenac. *Br. J. Anaesth.*, London, v.67, p.803-804, 1991.

CAMPBELL, W.I., WATTERS, C.H. Venous sequelae following i.v. administration of diclofenac. *Br. J. Anaesth.*, London, v.62, p.545-547, 1989.

CANTO, G.S. Piroxicam encapsulado em lipossomas para aplicação tópica: caracterização, liberação *in vitro* e avaliação da atividade antiinflamatória. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria – RS. 126p, 1997.

CANTO, G.S., DALMORA, S.L., OLIVEIRA, A.G. Piroxicam encapsulated in liposomes: characterization and in vivo evaluation of topical anti-inflammatory effect. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1999, in press.

CINGOLANI, E., CINGOLANI, G., MOSCONI, P., COPPI, G. Local tolerance evaluation of intramuscular drug preparations. *Farmaco – Ed. Pr.*, Pavia, v.41, n.3, p. 89-97, 1985.

COMERESKI, C.R., WILLIAMS, P.D., BREGMAN, C.L., HOTTENDORF, G.H. Pain injection and muscle irritation: a comparison of animal models for assessing parenteral antibiotics. *Fundam. Appl. Toxicol*, v.6, p.335-338, 1986.

DINESS, V. Local tissue damage after intramuscular injections in rabbits and pigs: quantitation by determination of creatine kinase activity at the injections sites. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v.56, p.410-415, 1985.

EVANS, L.A.F., GENEREUX, P.E., GIBBS, E.M., SUTTON, S.C. Predicting injection site muscle damage III: evaluation of intramuscular formulations in the L6 cell model. *Pharm. Res.*, Sttutgart, v.13, n.10, p.1585-1587, 1996.

FORSSEN, E.A., TOKES, Z.A. Attenuation of dermal toxicity of doxorubicin by liposome encapsulation. *Cancer Treat. Reports*, v.67, n.5, p.481-484, 1983.

GIOVANNETTI, M., MACHADO, M.A.C., BORRELLI Jr., M., IKEJIRI, C.I., ALONSO, N., BRANCO, P.D. Necrose tecidual: efeito colateral do diclofenaco de sódio, relato de casos e discussão da fisiopatologia. Rev. *Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.48, n.1, p.39-42, 1993.

GUTERRES, S.S. *Etude pharmacothecnique, pharmacocinetique et detolerances digestive et tissulaire des nanocapsules de diclofenac*. Paris, 1995. 195p. (These de Doctorat, - Université de Paris-SUD).

GUTERRES, S.S, FESSI, H., BARRAT, G., DEVISSAGUET, J.P., PUISIEUX, F. Poly (DL- lactide) nanocapsules containig diclofenac: I: Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.*, v.113, p.57-63, 1995.

GUTERRES, S.S; FESSI, H., BARRAT, G.,PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-Inflamatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharm. Res.*, v.12, n.10, p.1545-7, 1995.

JULLIEN, S., BRAJTBURG, J., BOLARD, J. Affinity of amphotericin B for phosphatidylcholine vesicles as a determinant of the in vitro cellular toxicity of liposomal preparations. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1021, p.39-45, 1990.

KADIR, F., ELING, W.M.C., ABRAHAMS, D., ZUIDEMA, J., CROMMELIN, D.J.A. Tissue reaction after intramuscular injection of liposomes in mice. *Int. J. Clin. Pharmacol., Ther. Toxicol.*, Muniche, v.30, n.10, p.374-382, 1992.

KIENELL, V.G. Eine rationelle methode zur tierexperimentellen prüfung der lokalen verträglichkeit com intramuskulären injektionen. *Arzneim. Forsch.*, Aulendorf, v.23, p.264-266, 1973.

LALLA, J.K., SAPNA, K. Biodegradable microspheres of poly (DL-lactic acid) containing piroxicam as a model drug for controlled release via the parenteral route. *J. Microencapsulation*, London, v.10, p.449-460, 1993.

LASIC, D.D. Liposomes in gene delivery. Boca Raton: CRC, p.67-112. 1997.

LASIC, D.D. Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.48, p.203-222, 1997.

LASIC, D.D. & PAPAHADJOUPOULOS, D. Medical application of liposomes. New York: Elsevier, 1998, 779p.

LASKA,D.A., WILLIAMS,P.D., REBOULET,J.T., MORRIS,R.M. The L6 muscle cell line as a tool to evaluate parenteral products for irritation. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.45, n.2, p.77-82, 1991.

LIMA, E.M. Lipossomas: estrutura, propriedades, aplicações. São Paulo, 1995b. 209p. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

LIMA, E.M., KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Utilidade terapêutica dos lipossomas. *Rev. Bras. Med.*, São Paulo, v.51, n.5, p.585-590, 1994.

LITTERST, C., SIEBER, S.M., COPLEY, M., PARKER, R.J. Toxicity for free and liposome-encapsulated adriamycin following large volume short-term intraperitoneal exposure in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v.64, p.517-528, 1982.

OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V., LEITE C.Q.F. Lipossomas: estratégia biotecnológica para liberação controlada e direcionamento intracelular de fármacos com efeito antimicobacteriano. Ver. Ciênc. Farm., São Paulo, v.18, p.109-121, 1997.

OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V. Vetorização intracelular de fármacos em infecções bacterianas através de lipossomas. Infarma, Brasília, v.6, p. 12-20, 1997.

PILLANS, P.I., O'CONNOR, N Tissue necrosis and necrotizing fasciitis after intramuscular administration of diclofenac. *Ann. Pharmacother.*, Cincinnati, v.29, p.264-266, 1995.

SALLMANN, A.R. The history of diclofenac. *Am. J. Med.*, New York, v.80(4B), p.29-33, 1986.

SHINTANI, S., YAMAZAKI, M., NAKAMURA, M., NAKAYAMA, I. A new method to determine the irritation of drugs after intramuscular injection in rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v.2, p.293-301, 1967.

SOBOLL, S., CONRAD, A., EISTERT, A., HERICK, K., KRÄMER, R. Uptake of creatine phosphatase into heart mitochondria: a leak in the creatine shuttle. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1320, p.27-33, 1997.

SOEHNGEN, E.L., GODIN-OSTRO, E., FIELDER, F.G., GINSBERG, R.S., SLUSHER, M.A., WEINER, A.L. Encapsulation of indomethacin in liposomes provides protection against both gastric and intestinal ulceration when orally administered to rats. *Arthritis Rheum.*, Hagerstown, v.31, p.414-422, 1988.

STEINESS, E., RASMUSSEN, F., SVENDSEN, O., NIELSEN, P. A comparative study of serum creatine phosphokinase (CK) activity in rabbits, pigs and humans after intramuscular injection of local damaging drugs. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v.42, p.357-364, 1978.

SURBER, C., DUBACH, U.C. Tests for local toxicity of intramuscular drug preparations. *Arzneim. Forsch.*, Aulendorf, v. 39(II), n.12, p.1586-1589, 1989.

SURBER, C., SUCKER, H. Tissue tolerance of intramuscular injectables and plasma enzyme activities in rats. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.4, n.6, p.490-494, 1987.

SVENDSEN, O., HOJELSE, F., BAGDON, R.E. Tests for local toxicity of intramuscular drug preparations: comparison of in vivo and in vitro methods. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v.56, p.183-190, 1985.

SVENDSEN, O.F., RASMUSSEN, F., NIELSEN, P., STREINESS, E. The loss of creatine phosphokinase (CK) from intramuscular injection sites in rabbits. A predictive tool for local toxicity. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v.44, p.324-328, 1979.

TITULAER, H.A.C., ELING, W.M.C., CROMMELIN, D.J.A., PEETERS, P.A.M., ZUIDEMA, J. The pareneral controlled release of liposome encapsulated chloroquine in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.42, p.529-53, 1990.

WALLIMANN, T., WYSS, M., BRDICSKA, D., NICOLAI, K., EPPENBERGER, H.M. Intracellular compartmentation structure and function of creatine kinase isoenzimes in tissues with high and fluctuating energy demands; the phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.*, London, v.281, p.21-40, 1992.

WARNOCK, D.G., ELLMAN, G.L. Intramuscular clorpromazine and creatine kinase: acute psychoses or local muscle trauma? *Science*, Washington, v.164, p.726, 1969.

WILKINSON, J.H. Clinical significance of enzyme activity measurements. *Clin. Chem.*, Washington, v.16, n.11, p.882-890, 1970.

WILLIAMS, P.D., MASTERS, B.G., EVANS, L.D., LASKA, D.A., HOTTENDORF, G.H. An in vitro model for assessing muscle irritation due to parenteral antibiotics. *Fundam. Appl. Toxicol.*, Akron, v.9, p.10-17, 1987.

WYSS,M., SMEITINK,J., WEVERS,R.A., WALLIMANN,T. - Mitochondrial creatine kinase: a key enzime of aerobic energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta,* Amsterdam, v.1102, p.119-166, 1992.