

LUCIANO SERPE

**“EFICÁCIA ANESTÉSICA DA BUPIVACAÍNA
COMPLEXADA COM 2-HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA EM BLOQUEIO DO NERVO ALVEOLAR
INFERIOR E EM INFILTRAÇÃO SUBCUTÂNEA EM FERIDA
CIRÚRGICA, EM RATOS.”**

PIRACICABA

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

LUCIANO SERPE

**EFICÁCIA ANESTÉSICA DA BUPIVACAÍNA
COMPLEXADA COM 2-HIDROXIPROPIL- β -
CICLODEXTRINA EM BLOQUEIO DO NERVO ALVEOLAR
INFERIOR E EM INFILTRAÇÃO SUBCUTÂNEA EM FERIDA
CIRÚRGICA, EM RATOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de mestre em Odontologia, área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Cristina Volpato

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado defendida pelo aluno Luciano Serpe, e orientada pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Se67e Serpe, Luciano, 1982-
Eficácia anestésica da bupivacaína complexada com 2-
hidroxipropil- β -ciclodextrina em bloqueio do nervo alveolar inferior
e em infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, em ratos /
Luciano Serpe. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Coorientador: Maria Cristina Volpato.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Anestésicos locais. 2. Ciclodextrinas. I. Groppo,
Francisco Carlos, 1966- II. Volpato, Maria Cristina, 1962- III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Anesthetic efficacy of bupivacaine complexed with 2-
hydroxypropyl- β -cyclodextrin in alveolar inferior nerve block and
subcutaneous infiltration in surgical wound, in rats

Palavras-chave em Inglês:

Anesthetics, local

Cyclodextrins

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Maria Cristina Volpato

Paulo Henrique Ferreira Caria

Rogério Heládio Lopes Motta

Data da defesa: 27-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2012, considerou o candidato LUCIANO SERPE aprovado.

Prof. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO

Prof. Dr. PAULO HENRIQUE FERREIRA CARIA

Prof. Dr. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA

Dedico este trabalho à Deus, pelo dom da vida, que para mim se traduz na eterna chance de tentar e recomeçar; aos meus pais, pelo amor e atenção que sempre dedicaram a mim e a meus irmãos, e pelo sacrifício que fizeram para custear nossos estudos, especialmente os meus na Odontologia, que não foram baratos; À minha esposa Bernadete, pelos perfeitos momentos que o nosso convívio conjugal me proporciona, pela sua compreensão por minha ausência durante o mestrado, e pela cumplicidade em todos os momentos que passamos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do Magnífico Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio do Exmo. Diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, por meio da Exma. coordenadora, Prof.^a Dr.^a Cíntia Pereira Machado Tabchoury.

A área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica do Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP-UNICAMP, por meio do Responsável pela área, Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado recebida – processo nº 2009/11820-3.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, e a minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Volpato, pela ajuda e prestatividade, e pelos ensinamentos recebidos.

Ao laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial à Prof.^a Dr.^a Eneida de Paula, coordenadora do projeto temático (processo 2006/00121-9) ao qual este projeto de dissertação está vinculado, e ao técnico do laboratório Márcio Aparecido Paschoal, responsável pela preparação das soluções de bupivacaína em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Pela sempre pronta ajuda que obtivemos e pela prestatividade em sanar nossas dúvidas, vale nosso agradecimento.

Ao coordenador do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, pela sempre pronta disposição em ajudar os alunos usuários do biotério.

Aos meus pais, Maristella e José Luiz, pelo exemplo de vida que proporcionam a mim e a meus irmãos, pelos valores sociais e religiosos que nos ensinaram, pelo incondicional apoio e pela ajuda no custeio de meus estudos, os quais jamais esquecerei.

À minha esposa Bernadete, pela sua compreensão pela minha ausência por motivos dos estudos, pela paciência nos momentos em que estava irritado ou cansado, e pelo apoio quando ficava desanimado ou desestimulado.

Aos meus irmãos Juliana e Vinícius, e a meu cunhado Marlon, pela força e incentivo que sempre me deram nos momentos de dificuldade.

Aos meus avós Ângelo e Estela, por me apoiarem e me ajudarem sempre que precisei.

Aos amigos Wagner e Kattia, pelo apoio e torcida e pela amizade de muitos anos.

As minhas amigas do mestrado, Fabiana e Cristina, que me ajudaram muito na fase experimental deste trabalho. Nos momentos fáceis ou difíceis, sempre estavam prontas em ajudar.

Aos demais amigos da pós-graduação: Cleiton, Camila, Luiz, Marcos, Marcelo, Lívia, Ana Paula, Luciana Berto, Bruno Bueno Silva “Burns”, Bruno Vilela Muniz “bigode”, Myrella, Salete e Inês pela amizade e companheirismo.

À Sra. Maria Elisa dos Santos, secretária da pós-graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP, pela prestatividade e eficiência.

À Dr.^a Eliane Melo Franco e a José Carlos Gregório, técnicos do Laboratório de Farmacologia da FOP/UNICAMP, pela pronta disposição em ajudar os alunos.

Ao meu Professor de Farmacologia e orientador de iniciação científica durante minha graduação na Universidade Estadual de Ponta Grossa - Paraná, Prof. Dr. Vitoldo Antonio Kozlowski Junior, por ter despertado em mim o gosto pela pesquisa, pelo seu respeito e paciência ao ensinar, e pela amizade de muitos anos.

A todos os meus familiares e amigos que sempre estiveram prontos para oferecer um conselho e um “ombro amigo”.

“Um pouco de Ciência nos afasta de Deus. Muita, nos aproxima.”

Louis Pasteur

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia anestésica da formulação de bupivacaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, comparando-a com soluções comerciais de bupivacaína com e sem vasoconstritor, em dois modelos experimentais: bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI) e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (ISFC). Para o BNAI 30 ratos receberam, próximo ao forame mandibular, 0,2ml de uma das seguintes formulações: bupivacaína 0,5% (Bupi), bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 (Bupi-Epi) e formulação de bupivacaína 0,5% complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Bupi-HP β CD). Os lados contralaterais (controle) receberam solução de NaCl 0,9% ou solução de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD) sem anestésico local. Foram avaliadas latência, sucesso e duração da anestesia pulpar por meio da aplicação de estímulo elétrico (“pulp tester”). Para a ISFC, 30 animais receberam 0,1mL de cada uma das formulações anestésicas ou o respectivo controle na pata traseira direita, 24h após indução de hipernocicepção (ferida cirúrgica - incisão e sutura). A pata traseira esquerda também recebeu injeção, constituindo o controle sem hipernocicepção. A anestesia foi avaliada pela aplicação de força ao lado da ferida (analgesímetro de von Frey). Os resultados foram submetidos à ANOVA e aos testes de Tukey, Student-Newman-Keuls, Kruskal-Wallis, Log Rank e Qui-Quadrado ($\alpha = 5\%$). No BNAI não foram observadas diferenças na latência entre as formulações ($p > 0,05$); Bupi apresentou menor duração de anestesia ($p < 0,05$) que Bupi-Epi e Bupi-HP β CD, sem diferença entre estas ($p > 0,05$). Bupi-Epi apresentou maior sucesso de anestesia que Bupi-HP β CD e esta, maior sucesso que Bupi ($p < 0,05$). Para ISFC, nas patas sem hipernocicepção Bupi-Epi induziu maior duração de anestesia do que Bupi ($p < 0,05$); Bupi-HP β CD não diferiu das demais ($p > 0,05$); quanto ao sucesso, Bupi-Epi induziu maior sucesso que as demais soluções e Bupi-HP β CD, maior sucesso que Bupi ($p < 0,05$). Nas patas com hipernocicepção

Bupi-Epi induziu maior sucesso de anestesia do que as demais formulações ($p < 0,05$), sem diferença entre estas ($p > 0,05$). Não houve diferença entre as formulações quanto à duração da anestesia nas patas com hipernocicepção ($p > 0,05$). Concluí-se que a complexação da bupivacaína em HP β CD aumentou a taxa de sucesso, mas não a duração da anestesia no BNAI e na ISFC na ausência de hipernocicepção, em relação à bupivacaína sem aditivos, não sendo eficaz em aumentar a eficácia da bupivacaína em tecido com hipernocicepção. A epinefrina aumentou a eficácia anestésica da bupivacaína, à exceção do modelo de ISFC com hipernocicepção, o qual diminuiu a eficácia de todas as soluções de bupivacaína estudadas.

Palavras chave: ciclodextrina; bupivacaína; nervo alveolar inferior; ferida cirúrgica; hipernocicepção.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the anesthetic efficacy of 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin bupivacaine formulation, compared with commercial bupivacaine solutions, in two experimental models: inferior alveolar nerve block (IANB) and subcutaneous infiltration in surgical wound (SISW). For IANB, 30 rats received an injection of 0.2mL of one of the following formulations, near to the mandibular foramen: 0.5% bupivacaine (Bupi), 0.5% bupivacaine with 1:200.000 epinephrine (Bupi-Epi), and 0.5% bupivacaine in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex (Bupi-HP β CD). The contralateral sides (control) received 0.9% NaCl or anesthetic free 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) solution. The onset, success and duration of pulpal anesthesia were assessed by electrical stimulation ("pulp tester"). For SISW, 30 animals received 0.1 mL of each anesthetic formulation (both hind paws) or their respective control, 24 hours after hypernociception induction (surgical wound - incision and suture) in the right hind paw. The left hind paw also received the injection and was the control without hypernociception. Analgesia was evaluated by applying force lateral to the incision (von Frey aesthesiometer). Results were submitted to ANOVA and Tukey, Student-Newman-Keuls, Kruskal-Wallis, Log Rank and Chi-square tests ($\alpha = 5\%$). No differences were observed among the formulations concerning IANB onset ($p > 0.05$); Bupi presented lower anesthesia duration ($p < 0.05$) than Bupi-Epi and Bupi-HP β CD, with no difference between these two solutions ($p > 0.05$). Bupi-Epi presented higher anesthesia success than Bupi-HP β CD, which showed higher success than Bupi ($p < 0.05$). For SISW, Bupi-Epi showed higher anesthesia success than Bupi ($p < 0.05$) in the non hypernociceptive paws; Bupi-HP β CD did not differ from the others ($p > 0.05$). In this condition Bupi-Epi provided higher anesthesia success than the other formulations and Bupi-HP β CD presented higher anesthesia success than Bupi ($p < 0.05$). In the hypernociceptive paws, Bupi-Epi promoted higher anesthesia success than the other formulations ($p < 0.05$), with no

difference between Bupi-HP β CD and Bupi ($p < 0.05$). No difference among formulations were observed in relation to anesthesia duration in the hypernociceptive paws ($p > 0.05$). In conclusion, the complexation of bupivacaine in HP β CD increased anesthesia success, but not duration in IANB and SISW without hypernociception in relation to bupivacaine; in the presence of hypernociception it did not improved bupivacaine efficacy. Epinephrine increased bupivacaine efficacy, except in SISW model with hypernociception, which decreased efficacy of all bupivacaine solutions studied.

Key words: cyclodextrin, bupivacaine, inferior alveolar nerve; surgical wound, hypernociception

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	-	anestésicos locais
HP β CD	-	2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina
SNC	-	sistema nervoso central
NAI	-	Nervo Alveolar Inferior
BNAI	-	bloqueio do Nervo Alveolar Inferior
ISFC	-	infiltração subcutânea em ferida cirúrgica
IANB	-	inferior alveolar nerve block
SISW	-	subcutaneous infiltration in surgical wound
Bupi	-	bupivacaína; bupivacaine
Bupi-Epi	-	bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000; 0.5% bupivacaine with 1:200.000 epinephrine
Bupi-HP β CD	-	bupivacaína 0,5% complexada com 2- hidroxiopropil- β -ciclodextrina; 0.5% bupivacaine in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Toxicidade da bupivacaína	4
2.2 Ciclodextrinas e sua aplicação com Anestésicos Locais	6
2.3 Modelo do bloqueio do Nervo Alveolar Inferior	9
2.4 Modelo da infiltração subcutânea em ferida cirúrgica	10
3 PROPOSIÇÃO	12
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Materiais utilizados	13
4.2 Delineamento experimental	13
4.3 Material	14
4.4 Soluções anestésicas utilizadas	15
4.4.1 <i>Preparação da formulação de bupivacaína em 2-hidroxi-propil-β-ciclodextrina</i>	16
4.5 Avaliação da eficácia anestésica	17
4.5.1 <i>Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior (BNAI)</i>	17
4.5.1.1 <i>Técnica de Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior (BNAI)</i>	19
4.5.1.2 <i>Avaliação das anestésias do modelo do BNAI</i>	19
4.5.2 <i>Modelo de infiltração em ferida cirúrgica</i>	20
4.5.2.1 <i>Avaliação da sensibilidade nas patas</i>	22
4.6 Forma de análise dos dados	24
5 RESULTADOS	25
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO	47

1 INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais (AL) estão entre as drogas mais amplamente utilizadas em todo mundo, tanto na medicina quanto na odontologia. A lidocaína é o fármaco padrão do grupo das amidas. Posteriormente surgiram a mepivacaína, prilocaína, bupivacaína e, mais recentemente, a articaína. Todos estes anestésicos são utilizados em odontologia, sendo a bupivacaína aquela com maiores potência e duração de anestesia (Malamed, 2005).

O relato inicial de George Albright, em 1979, de uma parada cardíaca súbita após a anestesia regional com a bupivacaína iniciou pesquisas quanto a toxicidade cardíaca dos anestésicos locais. O maior objetivo destas pesquisas tem sido a busca de agentes anestésicos de longa duração menos tóxicos ao tecido cardíaco (Heavner, 2002).

Dentre as opções para diminuir a toxicidade desses anestésicos, o uso de substâncias carreadoras, as quais permitem a diminuição dos efeitos adversos e prolongamento do efeito anestésico, tem se destacado (de Araújo *et al.*, 2003).

Os lipossomas, as ciclodextrinas e mais recentemente as nanocápsulas estão entre as principais substâncias carreadoras, as quais são usualmente chamadas de sistemas de liberação controlada. Além destes, outros sistemas de liberação controlada vem sendo testados com anestésicos locais, como por exemplo, o manitol, um açúcar, já estudado como carreador de AL na odontologia em bloqueio do nervo alveolar inferior em humanos (Wolf *et al.*, 2011).

As ciclodextrinas têm sido estudadas nos últimos anos, e podem ser consideradas uma alternativa para a melhora da eficácia anestésica e diminuição da toxicidade de anestésicos em muitos modelos *in vivo* (Cereda *et al.*, 2006; Bragagni *et al.*, 2010; Grant *et al.*, 1997; Mowat *et al.*, 1996; de Araújo *et al.* 2005, 2006; Grant *et al.*, 2004; Dollo *et al.*, 1998; Karashima *et al.*, 2007). Elas foram descobertas por Villiers, em 1881, e são formadas pela hidrólise de açúcares por glicosiltransferases de bactérias. Apresentam uma estrutura molecular que se

mantém espacialmente em forma cônica, em cujo interior moléculas mais lipossolúveis, como a bupivacaína, se ligam (Davis & Brewster, 2004).

As ciclodextrinas de ocorrência natural são as α , β e γ . A administração desses compostos, particularmente a β -ciclodextrina, pode causar disfunções renais e hemólise dos eritrócitos em humanos. Portanto, formas mais compatíveis, como a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, a 2,6-dimetil- β -ciclodextrina e o sulfobutiléter de β -ciclodextrina, foram desenvolvidas (Moraes *et al.*, 2007).

A complexação com ciclodextrinas é interessante, pois, ao se ligar em sua estrutura interna, os compostos não sofrem metabolização por enzimas do organismo, nem se ligam a receptores nos diferentes sistemas, além de aumentarem sua solubilidade e modificarem suas propriedades organolépticas (Moraes *et al.*, 2007). A liberação lenta do fármaco permite o aumento da duração do efeito e diminuição da toxicidade, como já observado com a bupivacaína (de Araújo *et al.* 2005, 2006).

Além dos AL, existem outros fármacos complexados com ciclodextrinas sendo estudados atualmente, tais como etomidato (hipnótico não-barbitúrico), propofol (opióide), benzodiazepínicos (sedativos-hipnóticos), além de bloqueadores da junção neuromuscular, como o vecurônio e o rocurônio. (Welliver, 2007).

Muitas formas de ciclodextrinas complexadas com os mais variados tipos de fármacos, já se encontram no mercado, especialmente dos Estados Unidos da América e Europa. Dentre os complexados com a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, encontram-se a hidrocortizona (Dexocort[®] - Europa); Indometacina (Indocid[®] - Europa) e o Itraconazol (Sporanox[®] - Europa e EUA) (Davis & Brewster, 2004). No Brasil, apenas o anti-inflamatório piroxicam complexado em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Brexin[®] - Gross S.A.) foi registrado na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Os resultados positivos obtidos por de Araújo *et al.* (2005, 2006) com a complexação da bupivacaína racêmica e da mistura de 75% levobupivacaína e 25% dextrobupivacaína com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, motivaram a

realização do presente estudo, que teve como objetivo avaliar a eficácia anestésica da bupivacaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, comparando-a com a bupivacaína associada à epinefrina e bupivacaína sem aditivos, em dois modelos experimentais, bloqueio do nervo alveolar inferior (que avalia anestesia da polpa dental) (Silva *et al.*, 2009) e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (que avalia a eficácia anestésica em tecidos moles com hipernocicepção) (Grant *et al.*, 1997).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TOXICIDADE DA BUPIVACAÍNA

Apesar da reconhecida eficácia clínica, os anestésicos locais ainda apresentam limitações no que diz respeito ao tempo de duração e toxicidade. Essas são características ligadas principalmente às particularidades de cada base anestésica, modo de aplicação e características do meio onde são injetadas. Os anestésicos locais, contrariamente à maior parte dos fármacos utilizados em medicina ou odontologia, deixam de exercer seus efeitos desejados quando são absorvidos para a circulação sanguínea, devendo permanecer no tecido alvo para exercerem adequadamente suas propriedades farmacológicas (Malamed, 2005).

Os AL utilizados em odontologia variam em potência anestésica. A lidocaína é o padrão, com a qual todos os outros anestésicos são comparados. A bupivacaína é o AL com maior potência anestésica e é utilizada usualmente no pós-operatório imediato, como forma de diminuir a utilização de analgésicos opióides pelos pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos mais complexos. Como anestésico, devido ao seu tempo de latência prolongado (cerca de 6 a 10 minutos), é utilizada em conjunto com outro anestésico local, para que a anestesia se instale mais rapidamente, obtendo-se assim o benefício das duas soluções, latência curta e duração longa (Malamed, 2005).

Embora a atividade desejada dos anestésicos locais seja bloquear o impulso nervoso dos nervos periféricos, os mesmos são capazes de deprimir todas as membranas excitáveis (Hardman *et al.*, 2005), podendo expressar sua toxicidade nos sistemas cardiovascular e nervoso.

Com relação a esse aspecto, a bupivacaína tem importante cardiotoxicidade intrínseca, a qual é considerada como a maior dentre todos os anestésicos locais. A toxicidade da bupivacaína se expressa, principalmente, por meio de três formas: influência direta na condução nervosa cardíaca, ação sobre

as células musculares cardíacas e efeitos mediados no sistema nervoso central (Mather & Chang, 2001).

Ao ligar-se aos canais de sódio das células musculares cardíacas, a bupivacaína apresenta um tipo de associação conhecida como *fast in - slow out* (entrada rápida – saída lenta). Isto significa que o fármaco tem facilidade de se ligar ao receptor, mas tem dificuldade em se desligar durante a diástole, causando um acúmulo do mesmo no órgão (Clarkson & Hondeghem, 1985). Clinicamente, essa cardiotoxicidade se expressa como arritmias ventriculares graves e depressão miocárdica, podendo levar o paciente à morte (Onyuksel *et al.*, 2007).

Embora a lidocaína também tenha a propriedade de diminuir a excitabilidade cardíaca, tem maior facilidade em se desligar do receptor, realizando um tipo de associação chamada de *fast in - fast out* ou entrada rápida – saída rápida (Clarkson & Hondeghem, 1985).

Além dos canais de sódio, a bupivacaína tem a capacidade de bloquear os canais de potássio, o que pode prolongar o tempo do potencial de ação, e exacerbar o bloqueio dos canais de sódio (Mather & Chang, 2001).

Como vários anestésicos locais, a molécula de bupivacaína apresenta isomeria óptica e sua toxicidade está principalmente relacionada ao isômero dextrorrotatório, o qual possui maior afinidade pelos canais de sódio cardíacos em comparação com a bupivacaína levorrotatória (denominada levobupivacaína) e com a mistura racêmica. O isômero dextrorrotatório produz bloqueio nos canais de sódio cardíacos cerca de duas vezes maior do que a levobupivacaína, além desse se instalar mais rápido (Mather & Chang, 2001).

Já foi proposta a substituição da bupivacaína pela levobupivacaína na odontologia (Branco *et al.*, 2006) e na medicina (Zink & Graf, 2008). É pouco provável que a cardiotoxicidade da bupivacaína se evidencie durante o atendimento odontológico. Considerando a dose máxima de bupivacaína por atendimento (como recomendada por Malamed, 2005), 1,3mg/Kg, a concentração utilizada (0,5%) e o volume contido em 1 tubete (1,8mL), para que um paciente com 50kg recebesse a dose máxima seria necessária a injeção de 7,2 tubetes

anestésicos (Malamed, 2005). Considerando que o paciente fosse se submeter à exodontia dos quatro terceiros molares e que fossem utilizados dois tubetes para cada molar inferior e 1,5 tubete para cada um dos superiores, ainda assim a dose máxima não seria ultrapassada. Entretanto, a toxicidade da bupivacaína é um fator importante e que deve ser considerado em bloqueios na área médica, como já observado por Albright (1979).

Além da levobupivacaína, a ropivacaína, comercializada como isômero levorrotatório puro, também tem sido pesquisada (Zink & Graf, 2008). Embora menos cardiotoxicas que a bupivacaína (Mather & Chang, 2001), relatos de toxicidade tem sido publicados (Breslin *et al.*, 2003; Crews *et al.*, 2003; Kimura *et al.*, 2007; Dhir *et al.*, 2007).

Devido à toxicidade relatada não somente para os anestésicos locais, mas também para outros fármacos, as pesquisas tem sido voltadas para a associação dos mesmos com carreadores, como ciclodextrina, lipossomas e biopolímeros, os quais por promoverem liberação controlada dos fármacos, permitem aumentar o efeito e diminuir a toxicidade dos mesmos (de Paula *et al.*, 2010).

2.2 CICLODEXTRINAS E SUA APLICAÇÃO COM ANESTÉSICOS LOCAIS

As ciclodextrinas foram descobertas por Villiers em 1881 e, desde então, têm sido consideradas moléculas carreadoras promissoras, pois formam estruturas do tipo receptor-substrato, constituindo complexos de inclusão para muitas substâncias (Venturini *et al.*, 2008).

As ciclodextrinas de ocorrência natural, α , β e γ , são compostas de 6, 7 e 8 moléculas de glicose, respectivamente (Udelsmann *et al.*, 2007). Esses oligossacarídeos cíclicos são resultantes da hidrólise do amido por alguns microorganismos, como o *Bacillus macerans*, através de uma enzima produzida por este, a glicosiltransferase (Welliver, 2007). Especialmente, as ciclodextrinas formam um cone truncado (Welliver, 2007), com os grupos hidroxila voltados para

o exterior do cone, o que confere à molécula um exterior hidrofílico e um interior hidrofóbico, ao qual fármacos lipossolúveis, com molécula de tamanho compatível com a cavidade do cone, podem se ligar (Moraes, *et al.*, 2007; Davis & Brewster, 2004).

A estrutura das ciclodextrinas apresenta uma série de grupamentos hidroxipropil, o que confere à estrutura solubilidade em água. Essa solubilidade varia para os subtipos de ciclodextrinas naturais, sendo para as formas α , β e γ , respectivamente de 13%, 2% e 26%, em temperatura ambiente (Davis & Brewster, 2004).

A complexação pode promover modificações na farmacocinética e farmacodinâmica de fármacos, tornando-o mais hidrossolúveis, aumentando a biodisponibilidade, podendo também alterar as propriedades organolépticas, como o odor (Moraes *et al.*, 2007). A liberação controlada de bupivacaína complexada com a hidroxipropil- β -ciclodextrina já foi demonstrada (Fréville *et al.*, 1996; Dollo *et al.*, 1998).

As ciclodextrinas ainda apresentam em sua estrutura, locais chamados de graus de substituição. Esses são sempre o segundo, o terceiro e o sexto átomos de carbono de cada molécula de glicose que forma a ciclodextrina. Assim, as α , β e γ ciclodextrinas possuem 18, 21 e 24 locais para ligação de radicais. Cada radical diferente ligado, em cada um desses locais, muda as características da ciclodextrina, formando um novo composto, chamados de ciclodextrinas modificadas (Davis & Brewster, 2004).

Como a solubilidade da β -ciclodextrina é a menor dentre as três (α , β e γ) de ocorrência natural, buscou-se um tipo de modificação em sua estrutura que conferisse à mesma maior solubilidade. Assim, chegou-se a forma 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, que apresenta solubilidade em água de cerca de 60%, enquanto a da β -ciclodextrina natural é de apenas 2% (Davis & Brewster, 2004).

As ciclodextrinas também diferem no tamanho de seu anel, dentro da estrutura cônica formada. As ciclodextrinas naturais α , β e γ , possuem tamanho do anel de 0,5, 0,6 e 0,8 nm, respectivamente. Isso é importante, pois o tamanho da

estrutura dita o tamanho da molécula que pode se complexar com a ciclodextrina (Davis & Brewster, 2004).

Apesar de proporcionarem diminuição da toxicidade de fármacos, as próprias ciclodextrinas, em especial a β -ciclodextrina, apresentam toxicidade intrínseca. Quando administradas por via parenteral, podem causar nefrotoxicidade devido à formação de um complexo de baixa solubilidade entre o carreador e o colesterol, complexo esse que precipita e impede a filtração glomerular nos rins. A β -ciclodextrina pode também causar hemólise em eritrócitos humanos (Davis & Brewster, 2004). Assim, formas menos tóxicas tem sido propostas como a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, entre outras (Moraes *et al.*, 2007).

As β -ciclodextrinas são as ciclodextrinas mais amplamente utilizadas para a complexação de várias classes de fármacos como, antidiabéticos (tolbutamida) e anti-inflamatórios (piroxicam), entre outros (de Araújo *et al.*, 2003).

A eficácia da complexação de bupivacaína com a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina tem sido demonstrada em roedores, com aumento do bloqueio sensitivo após anestesia subaracnóidea em ratos (de Araújo *et al.* 2006) e bloqueio do nervo ciático em camundongos (de Araújo *et al.* 2005), bem como aumento no tempo do bloqueio motor após bloqueio epidural em ratos (Fréville *et al.*, 1996).

Estudos com outros tipos de ciclodextrinas também já foram realizados em modelos animais. A bupivacaína complexada com 7-sulfobutileter β -ciclodextrina no bloqueio motor em coelhos (Dollo *et al.*, 1998) não mostrou maior duração do efeito anestésico, mas mostrou aumento no tempo para início do bloqueio.

Ainda, a levobupivacaína complexada com maltosil- β -ciclodextrina, estudada por Karashima *et al.* (2007), proporcionou aumento da duração da anestesia em ratos, após injeção intratecal e no teste de retirada da cauda (*tail flick*).

No entanto, a eficácia da complexação de bupivacaína com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina ainda não foi estudada em anestesia pulpar ou em tecidos com hipernocicepção.

2.3 MODELO DO BLOQUEIO DO NERVO ALVEOLAR INFERIOR

O modelo de bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI) em ratos foi desenvolvido por Silva *et al.* (2009) e consta da fixação de fios de cobre aos molares inferiores do rato, sob anestesia geral, para permitir a aplicação de estímulo elétrico e, assim, avaliar a anestesia pulpar. O modelo foi desenvolvido a partir da descrição da anatomia do nervo alveolar inferior em ratos feita por Naftel *et al.* (1999).

Dos três molares inferiores dos ratos, o primeiro e o segundo são inervados pelo nervo alveolar inferior e o terceiro é inervado pelo nervo lingual, o qual é localizado anatomicamente próximo ao nervo alveolar inferior (Naftel *et al.*, 1999). Assim, uma solução anestésica depositada próximo ao nervo alveolar inferior também irá anestésiar o nervo lingual e produzirá anestesia efetiva de todos os molares do animal (Silva *et al.*, 2009).

A avaliação da anestesia nesse modelo é feita pela aplicação de estímulo elétrico, através de um *pulp tester* elétrico, à extremidade desencapada do fio de cobre, externa à cavidade bucal do animal. O estímulo é então conduzido através do fio até esmalte dos molares e transmitido à dentina, sendo percebido como estímulo doloroso (Silva *et al.*, 2009).

O aparelho *pulp tester* é composto por uma unidade produtora de corrente elétrica intermitente, com voltagem progressiva de 15 a 300 V e baixa amperagem, um eletrodo para a aplicação e um fio terra, que deve ser colocado em contato com o paciente (ou animal) no momento das tomadas (Dreven *et al.*, 1987). Apresenta ainda um mostrador com escala arbitrária que varia de 0 a 80. Quando é atingido o valor de 80 no aparelho e não há resposta aversiva, considera-se como anestesia pulpar (Dreven *et al.*, 1987).

O uso do *pulp tester* para avaliação da anestesia pulpar, em bloqueio do nervo alveolar inferior de ratos, têm sido utilizado em vários estudos (Silva *et al.*, 2009; Bhering, 2010; Berto, 2010).

2.4 MODELO DA INFILTRAÇÃO SUBCUTÂNEA EM FERIDA CIRÚRGICA

O modelo de resposta de retirada da pata à aplicação de força com filamentos de von Frey em tecido inflamado foi descrito por Vandermeulen *et al.* (1994) e Brennan *et al.* (1996) e posteriormente modificado por Grant *et al.* (1997). Consiste, basicamente, na incisão, com posterior sutura na superfície plantar da pata traseira de ratos, para desencadear reação inflamatória e sensibilização de nociceptores. De acordo com Grant *et al.* (1997) a força deve ser aplicada lateralmente à ferida, com intensidade variando de 0,0073N até 0,456N. A aplicação da força não deve ultrapassar o limite de 0,456N, pois essa é suficiente para levantar a pata do animal. Quando o animal não eleva a pata até a aplicação do estímulo máximo, considera-se que a região de aplicação do estímulo está anestesiada (Grant *et al.*, 1997). Este modelo é amplamente aceito para a avaliação dos mecanismos de dor pós-operatória e seu controle farmacológico (Clark *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Obata *et al.*, 2010; Xu & Brennan, 2011).

A lesão tecidual causa dois tipos de alteração no sistema nociceptivo, a sensibilização periférica e a sensibilização central, as quais são responsáveis pela dor aguda pós-operatória. A sensibilização de nociceptores leva a resposta exagerada a estímulo nocivo, conhecida como hiperalgesia (Sessle *et al.*, 2010), que pode ser classificada como primária, quando ocorre na área da injúria (mediada pelas fibras aferentes primárias) e secundária, quando ocorre frente a estímulo fora da área da lesão (mediada pelos neurônios do corno dorsal da medula) (Brennan *et al.*, 2005).

De acordo com Parada *et al.* (2003), a hiperalgesia medida em ratos com o analgesímetro de von Frey deve ser referida como hipernocicepção, pois o método não permite diferenciação entre alodinia (sensação dolorosa devido a

estímulo que usualmente não elicia esse tipo de percepção) e hiperalgesia (considerada como aumento da sensibilidade dolorosa em determinada região).

O modelo de ferida cirúrgica, desenvolvido por Brennan *et al.* (1996), considera que procedimentos cirúrgicos que envolvem a pele e estruturas profundas provocam, no pós-operatório, dor espontânea e dor a estímulos normalmente não nocivos, como pressão e tato, e essas respostas exacerbadas à dor podem ser medidas por aplicação de força (von Frey). O mesmo ocorre em estudos clínicos, como em cirurgias (histerectomia, colectomia e nefrectomia) (Brennan *et al.*, 2005), sendo dessa forma um importante modelo de estudo para soluções anestésicas utilizadas no controle de dor pós-operatória.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia anestésica da bupivacaína 0,5% complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, comparada às formulações comercialmente disponíveis de bupivacaína a 0,5% com epinefrina 1:200.000 (Neocaína[®]) e bupivacaína 0,5% sem vasoconstritor (Neocaína[®]), em dois modelos experimentais: bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI) e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (ISFC).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP sob protocolo nº 1936-1 (Anexo 1).

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos, machos, pesando 200-250g, provenientes do CEMIB-UNICAMP, os quais permaneceram em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), ciclos claro-escuro estabelecidos (12/12h) e com água e comida *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos distintos para os dois experimentos.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste estudo foi avaliada a eficácia anestésica das formulações de bupivacaína complexada em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, bupivacaína sem aditivos e bupivacaína com epinefrina em dois modelos experimentais: bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI) e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (ISFC), em ratos. O delineamento dos dois experimentos é mostrado na Figura 1.

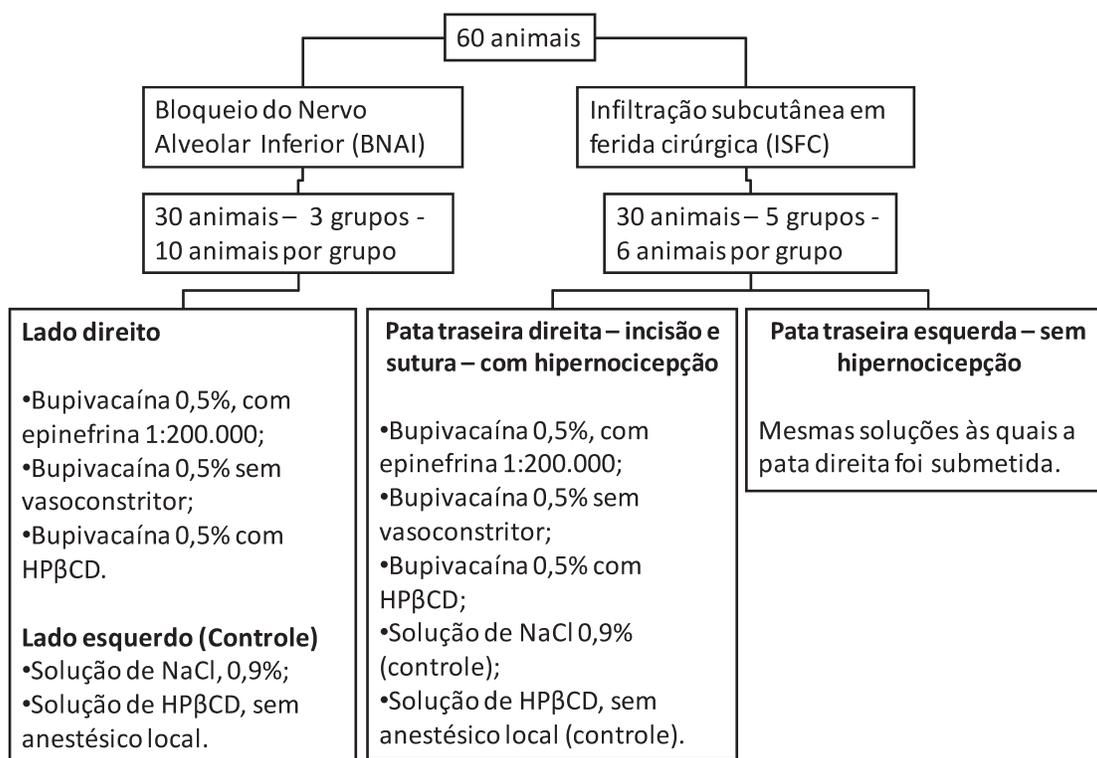


Figura 1 - Delineamento experimental dos estudos de bloqueio no nervo alveolar inferior e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica com formulações de bupivacaína.

4.3 MATERIAL

Neste estudo foram utilizados:

- Para o preparo das formulações com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina: cloridrato de bupivacaína (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (Roquette Serv. Tech. Lab., França), tampão HEPES 20mM com NaCl 0,9% (Q-biogene).
- Para anestesia geral, sedação e injeção dos animais: quetamina (Dopalen[®]), xilazina (Rompun[®]), tiopental (Thiopentax[®] - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil) e isoflurano (Isoforine, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), agulhas descartáveis 13 X 4,5 (BD

PrecisionGlide[®] - 26G, Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR, Brasil), acopladas a seringas centesimais de 1mL (BD[®]).

- Para o bloqueio do nervo alveolar inferior: pinça clínica para algodão, gaze estéril, algodão, mesa cirúrgica para ratos, solução a base de ácido fosfórico a 37% em forma de gel (MAGIC ACID Gel, Vigodente[®]), adesivo fotopolimerizável (MAGIC BOND, Vigodente[®]), pincel com cerdas macias, resina fotopolimerizável (Z100, 3M ESPE[®]), espátula para resina composta, aparelho fotopolimerizador (Gnatus[®]) e mesa operatória especial para inserção do fio na cavidade oral do animal e manutenção da abertura bucal.
- Para a realização da ferida cirúrgica: lâmina de bisturi descartável n. 10 (Solidor[®], Suzhou Kyuan medical apparatus Co. Ltd. Beiqiao Town, Suzhou City, China), cabo de bisturi, porta-agulhas de Mayo-Hegar e tesoura de Metzemaum curva. Para a sutura foi utilizado fio de sutura de nylon monofilamento preto 6-0 com agulha (BRASUTURE Ind Com Imp Exp Ltda, São Sebastião da Grama, SP, Brasil), gaze estéril, capela para exaustão de gases (Ideoxima Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto-SP).
- Para a avaliação da anestesia no BNAI e ISFC: “pulp tester” elétrico Vitality Scanner modelo 2006 (Analytic Technology, Redmond, EUA); aparelho para aplicação de força com intensidade controlada - analgesímetro digital von Frey (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e gaiolas com fundo aramado para uso com o analgesímetro de von Frey (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

4.4 SOLUÇÕES ANESTÉSICAS UTILIZADAS

Foram utilizadas neste estudo as seguintes formulações:

- Solução de bupivacaína 0,5% complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina;

- Solução de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sem anestésico local;
- Solução comercial de bupivacaína a 0,5% com epinefrina 1:200.000 (Neocaina[®] com epinefrina 1:200.000 – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil);
- Solução comercial de bupivacaína 0,5% (Neocaina[®] - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil);
- Solução de cloreto de sódio 0,9% (EquiPLEX Ind. Farm., Brasil).

Previamente às injeções anestésicas, os pHs das formulações de bupivacaína (comerciais e em HP β CD) foram aferidos em pHmetro (ORION[®], modelo 290^a) acoplado a um micro-eletrodo (LAZAR BNC), para controle. As condições de análise do pH foram estabelecidas através de validação com soluções tampão Merck[®] (Merck S.A. Indústrias Químicas) com pH 4,0 e 7,0.

4.4.1 Preparação da formulação de bupivacaína em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina

A formulação de bupivacaína em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina foi preparada no Laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Eneida de Paula, onde foi feito também o controle de qualidade da preparação.

O complexo de inclusão sólido foi obtido misturando-se quantidades apropriadas de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) e bupivacaína em água, para obtenção de razão molar de 1:1. A amostra foi deixada sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi liofilizada e guardada a -20° C para posterior uso (Dollo *et al.*, 1998; Loftsson & Masson, 2001).

O complexo liofilizado foi pesado em quantidade suficiente para obtenção de bupivacaína na concentração final de 0,5%. Logo após, foi dissolvido em tampão (HEPES 20mM pH 7,4 com NaCl 154mM).

4.5 MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANESTÉSICA

4.5.1 Bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI)

O bloqueio do nervo alveolar inferior foi realizado de acordo com a técnica de Silva *et al.* (2009), descrita no item 4.5.1.1. Conforme o delineamento experimental, nesse experimento foram utilizados 30 ratos (10 animais/ grupo), os quais receberam do lado direito formulação contendo bupivacaína e do lado esquerdo o respectivo controle, conforme descrito no Quadro 1.

Formulação com bupivacaína (lado direito)	Formulações controle (lado esquerdo)
Solução de bupivacaína 0,5% complexada em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina	Solução de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
Bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000	Solução de NaCl 0,9%
Bupivacaína 0,5%	Solução de NaCl 0,9%

Quadro 1 - Formulações anestésicas e respectivos controles administrados no BNAI.

No dia do experimento, os animais foram retirados da câmara de armazenamento e levados a um centro cirúrgico, nas dependências do Biotério central da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Sob anestesia geral, com xilazina 10mg/kg e quetamina 90mg/kg, administradas por via intramuscular, foram fixados dois fios de cobre (um de cada lado da mandíbula), com as extremidades desencapadas, na superfície oclusal dos molares inferiores dos animais (Figura 2A), com resina fotopolimerizável, ficando assim uma extremidade de cada fio em contato com os molares inferiores e a outra fora da cavidade oral.

Esse procedimento visava permitir a aplicação de estímulo elétrico, por meio do aparelho “pulp tester”, aos dentes dos animais, o qual foi utilizado para avaliar os parâmetros da anestesia: sucesso, latência e duração.

Após retorno da anestesia geral os animais foram sedados com tiopental 25 mg/kg (Cereda *et al.*, 2006) por via intraperitoneal, mantendo reação a estímulos dolorosos (preensão da cauda) para permitir avaliação da percepção de dor ao estímulo elétrico aplicado ao dente.

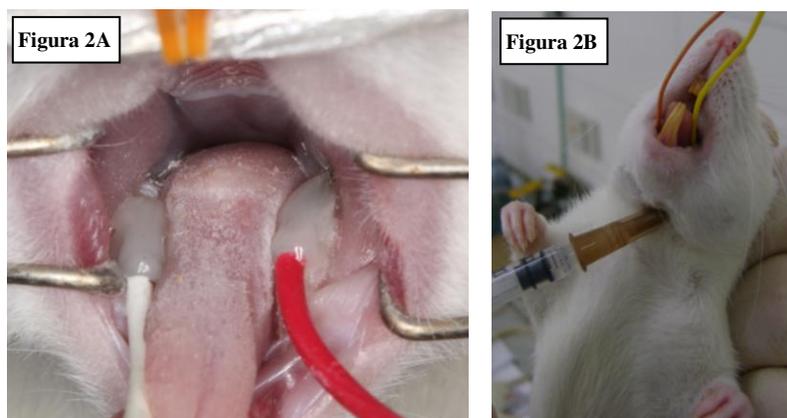


Figura 2A - Fios de cobre instalados nas superfícies oclusais dos molares inferiores; Figura 2B - Técnica do BNAI.

Uma vez constatada sedação do animal e resposta à preensão da cauda, os molares de cada lado foram testados por meio da aplicação do estímulo elétrico na extremidade do fio externa à cavidade oral do animal. Esta medida foi considerada como sendo o limiar basal de cada lado do animal (média de três medições de cada lado). Em seguida foi realizado o bloqueio do nervo alveolar inferior, descrito a seguir.

4.5.1.1 Técnica de Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior (BNAI)

O bloqueio do NAI foi realizado conforme a técnica descrita por Silva *et al.* (2009) e consistiu na introdução de 11 a 13 mm de uma agulha 13x4,5 pela face medial do ramo da mandíbula, na região do ângulo mandibular. A agulha foi introduzida com inclinação de 30° a 45° em relação à face medial da mandíbula (Figura 2B) até a posição final de injeção, próximo ao forame mandibular, onde a formulação foi depositada. Foram injetados 0,2 mL de uma das formulações anestésicas, no lado direito, próximo ao forame mandibular dos animais para bloqueio do nervo alveolar inferior (Figura 2B). O lado esquerdo recebeu o mesmo volume da respectiva formulação controle (solução de cloreto de sódio 0,9% ou de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina), servindo como controle negativo.

4.5.1.2 Avaliação das anestésias no modelo do BNAI

Logo após a injeção, os estímulos elétricos foram aplicados a cada 2 minutos durante os primeiros 16 minutos, para estabelecer o tempo de latência das preparações. Os animais que apresentaram resposta aversiva ao estímulo elétrico (movimentação da cabeça ou das vibriças), após esse período, no lado em que foi injetada preparação anestésica foram considerados como insucesso da anestesia.

Os animais que apresentaram ausência de resposta aversiva, continuaram a receber aplicação de estímulo elétrico a cada 5 minutos, até a observação de resposta aversiva do animal no lado direito (lado teste).

Os parâmetros latência, duração e sucesso da anestesia foram assim considerados:

- Tempo de latência: intervalo de tempo entre o final da injeção da solução anestésica e o início de ausência de resposta ao teste elétrico.
- Duração da anestesia: tempo entre o início da anestesia e o tempo imediatamente anterior ao de obtenção de duas respostas aversivas

consecutivas, ou seja, intervalo de tempo no qual o animal não apresentou resposta ao estímulo elétrico máximo emitido pelo aparelho.

- Sucesso da anestesia: a anestesia foi considerada como sucesso quando o animal apresentou latência de no máximo 16 minutos e permaneceu anestesiado por pelo menos 10 minutos.

4.5.2 Modelo de infiltração em ferida cirúrgica

Para a realização desse estudo foi seguido o modelo proposto por Vandermuelen *et al.*, (1994) e Brennan *et al.*, (1996), modificado por Grant *et al.*, (1997).

Foram utilizados 30 ratos, sendo 6 por grupo de estudo, conforme descrito adiante. Os animais foram mantidos conforme descrito no item 4.1, em gaiolas plásticas com cama de maravalha (proveniente de pinus, sem contato externo).

No dia do experimento os ratos foram colocados em gaiolas plásticas específicas (23 x 20 x 18 cm - largura x profundidade x altura), com fundo aramado (trama de 0,5 x 0,5 cm) para permitir a passagem do dispositivo do analgesímetro de von Frey para aplicação da força na pata do animal. Essas gaiolas apresentam um espelho angulado abaixo do fundo aramado que permite a observação do animal (Figura 3). Cada animal foi colocado em uma gaiola por cerca de 30 minutos para adaptação. Após esse período foi avaliada a sensibilidade basal da pata traseira direita pela aplicação de força com intensidade crescente (0,0073N até 0,456N) com o analgesímetro de von Frey. A aplicação foi realizada pela parte inferior da gaiola, sendo o teste terminado quando o animal levantava a pata ao estímulo. Este teste foi realizado em triplicata, em intervalos de 10 minutos. Foi considerada como sensibilidade basal a média das forças que proporcionavam o reflexo de retirada da pata.



Figura 3 – Animais posicionados nas gaiolas para avaliação com o analgesímetro de von Frey.

Em seguida os animais foram anestesiados com isofluorano (colocado em um algodão no fundo de um béquer) em uma capela com exaustão de gases, e submetidos a incisão na superfície plantar da pata traseira direita (Figura 4A). A incisão foi realizada com lâmina de bisturi nº 10 (1cm de extensão por 3mm de profundidade) e suturada com 3 pontos de sutura com fio de nylon 6-0 (Figura 4B).

Para a padronização da incisão utilizaram-se as seguintes referências:

- Para a profundidade de 3 mm, utilizou-se como referência o chanfro da própria lâmina de bisturi utilizada para a inserção (Figura 4C). Do início do chanfro até a ponta da lâmina, tem-se em torno de 4 mm. Assim, a incisão foi realizada mantendo 1 mm do chanfro para fora da tecido.
- Para a extensão de 1 cm da incisão, usou-se como referência um paquímetro, ajustado para a distância de 1cm.



Figura 4A - Incisão na superfície plantar da pata traseira direita. Figura 4B - Sutura com 3 pontos isolados. Figura 4C - Lâmina de bisturi nº 10, cujo chanfro mede 4mm e serve como referência da profundidade da incisão (3mm).

Após esse procedimento os animais ficaram em repouso durante 24 horas, em gaiolas plásticas com cama de maravalha, com água e alimentação *ad libitum*.

4.5.2.1 Avaliação da sensibilidade das patas

Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram novamente colocados nas gaiolas específicas para o experimento (fundo aramado) e permaneceram por 30 minutos para adaptação. Em seguida, a sensibilidade das patas traseiras, direita e esquerda, foi testada em intervalos de 10 minutos pela aplicação do dispositivo do analgesímetro de von Frey, lateralmente à incisão.

A resposta foi considerada hiperalgésica (hipernocicepção) quando a retirada da pata ocorria com a aplicação de força 20% menor que a observada na sensibilidade basal (antes da cirurgia); os animais que não apresentassem hipernocicepção seriam descartados (Grant *et al.*, 1997). No presente estudo todos os animais apresentaram hipernocicepção.

Os ratos com hipernocicepção foram divididos aleatoriamente em 5 grupos e receberam, na pata direita, ao lado da incisão (Figura 5), e na pata esquerda, em local correspondente ao da pata direita, a injeção de 0,1 mL de uma das seguintes soluções:

- bupivacaína 0,5% complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina;

- bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000;
- bupivacaína 0,5%;
- 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sem anestésico local;
- solução de cloreto de sódio 0,9%.



Figura 5 - Local de infiltração das formulações (ao lado da incisão).

A pata não operada funcionou como controle sem hipernocicepção. Cinco minutos após a infiltração das preparações, foi iniciada a aplicação de força com o Analgesímetro de von Frey da forma já descrita, com força crescente até o animal apresentar o reflexo de retirada da pata. A aplicação da força foi realizada lateralmente à incisão, ou seja, no local de aplicação das preparações. Os testes foram aplicados a cada 10 minutos (somente a primeira tomada foi realizada em cinco minutos) até que se obtivesse resposta de retirada da pata pelo animal, ou se atingisse o limite máximo de 0,456N.

A ausência de reflexo de retirada da pata (elevação da pata) à aplicação do limite máximo de força foi considerada como sucesso da anestesia. A duração da anestesia foi considerada como o tempo no qual o animal não apresentou reflexo de retirada da pata.

4.6 Forma de análise dos dados

Os resultados foram submetidos à ANOVA e aos testes de Tukey, Student-Newman-Keuls, Kruskal-Wallis e Log Rank e Qui-Quadrado. As análises foram realizadas com o pacote estatístico BioEstat 5.0 (Instituto Mamirauá, Belém, PA), sendo considerado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

O pH das soluções analisadas foram de 5,31 para a bupivacaína 0,5% sem vasoconstritor, de 4,93 para a bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 e de 7,0 para a bupivacaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina.

Em todos os experimentos não foi observada anestesia com uso das soluções controle.

A Figura 6 mostra a latência observada após o bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI) com as formulações de bupivacaína, não sendo observadas diferenças entre as mesmas (ANOVA, $p>0,05$). Todos os animais apresentaram latência de até 10 minutos à exceção de um rato que recebeu bupivacaína sem aditivos, que apresentou latência de 16 minutos.

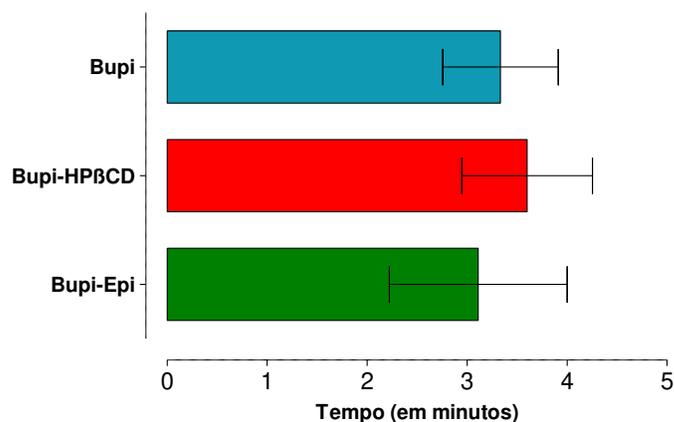


Figura 6 - Tempo de latência (média \pm erro padrão, em minutos) após bloqueio do nervo alveolar inferior com as soluções de bupivacaína complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Bupi-HP β CD), bupivacaína sem aditivos (Bupi), e bupivacaína com epinefrina (Bupi-Epi) (n=10/grupo; ANOVA, $p>0,05$).

As Figuras 7 e 8 mostram, respectivamente, o tempo de duração e o sucesso da anestesia, observados após o BNAI. A solução de bupivacaína com epinefrina apresentou maior duração (ANOVA e teste de Tukey, $p < 0,05$) que a solução de bupivacaína sem vasoconstritor. Entretanto, a bupivacaína complexada em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina não apresentou diferenças em relação às demais soluções ($p > 0,05$) (Figura 7).

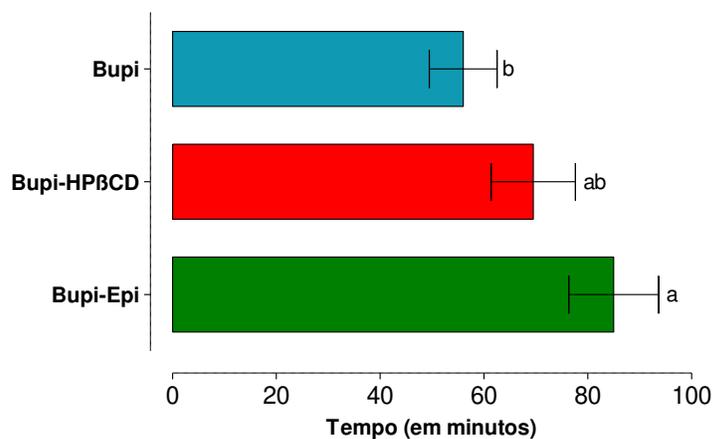


Figura 7 - Duração da anestesia (média \pm erro padrão, em minutos) após bloqueio do nervo alveolar inferior com as soluções de bupivacaína complexada em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Bupi-HP β CD), bupivacaína sem aditivos (Bupi), e bupivacaína com epinefrina (Bupi-Epi). (n=10/grupo; Tukey; letras diferentes: $p < 0,05$).

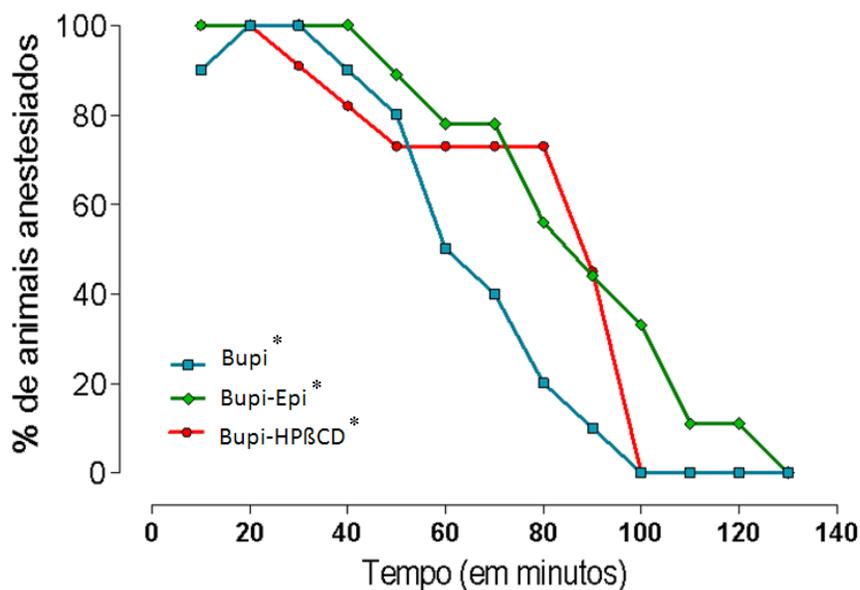


Figura 8 - Sucesso da anestesia (em %) após bloqueio do nervo alveolar inferior com as soluções de bupivacaína complexada em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Bupi-HP β CD), bupivacaína sem aditivos (Bupi), e bupivacaína com epinefrina (Bupi-Epi). (n=10/grupo; Log-Rank; * p<0,05).

As três soluções apresentaram sucessos distintos após o BNAI (teste de Log-Rank; p<0,001) (Figura 8), sendo que a solução com epinefrina apresentou o maior sucesso, seguida pela formulação complexada em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. A análise (Qui-quadrado para proporções esperadas iguais) das áreas sob as curvas dos sucessos mostrou que a área da solução com epinefrina foi maior (p<0,0001) do que as demais e a área da formulação em HP β CD foi maior do que área da bupivacaína sem vasoconstritor (p<0,0001).

A figura 9 mostra o efeito da inflamação na sensibilidade da pata direita dos animais previamente a administração das formulações anestésicas.

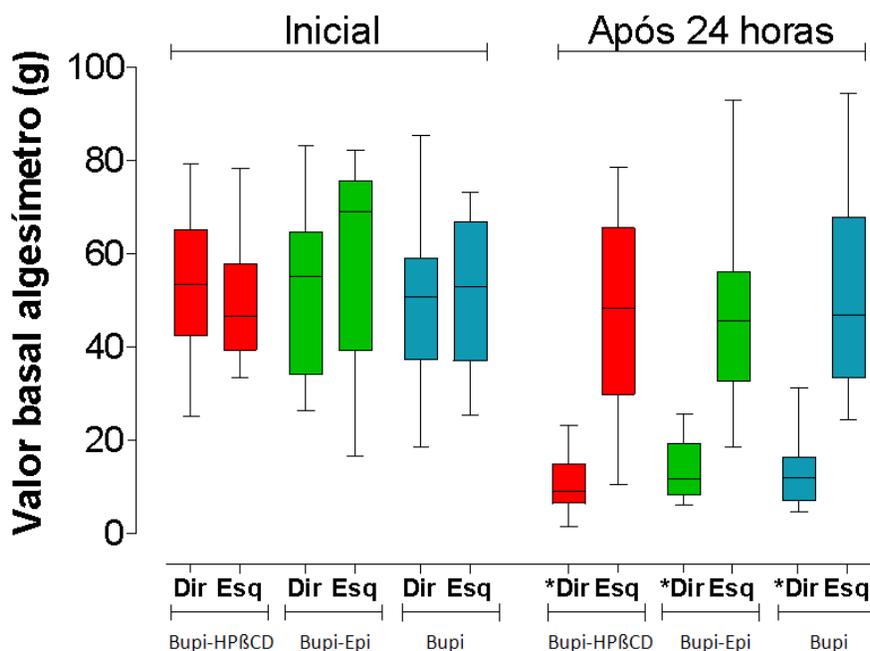


Figura 9 - Sensibilidade dolorosa (em g) das patas dos ratos previamente à administração das soluções de bupivacaína complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Bupi-HP β CD), bupivacaína sem aditivos (Bupi), e bupivacaína com epinefrina (Bupi-Epi). A linha central representa a mediana, a caixa o 1º e 3º quartis e as suíças os valores máximo e mínimo. Dir – pata direita, com hipernocicepção. Esq - pata esquerda, sem hipernocicepção (n=6/grupo; Kruskal Wallis e Student-Newman-keuls; p>0,05 entre todos no período inicial; *p<0,05 entre pata dir e esq para cada grupo no período após 24h).

Não foram observadas diferenças (teste de Kruskal-Wallis; p>0,05) entre os valores de sensibilidade basal das patas direita e esquerda entre os grupos no período inicial (antes da indução de hipernocicepção); entretanto, em todos os grupos, as patas submetidas a hipernocicepção (pata direita) mostraram diminuição significativa dos valores basais medidos com algésímetro de von Frey (teste de Kruskal-Wallis, Student-Newman-keuls; p>0,05).

A figura 10 mostra a duração da anestesia com as formulações anestésicas após injeção nas patas direita (com hipernocicepção) e esquerda (sem hipernocicepção).

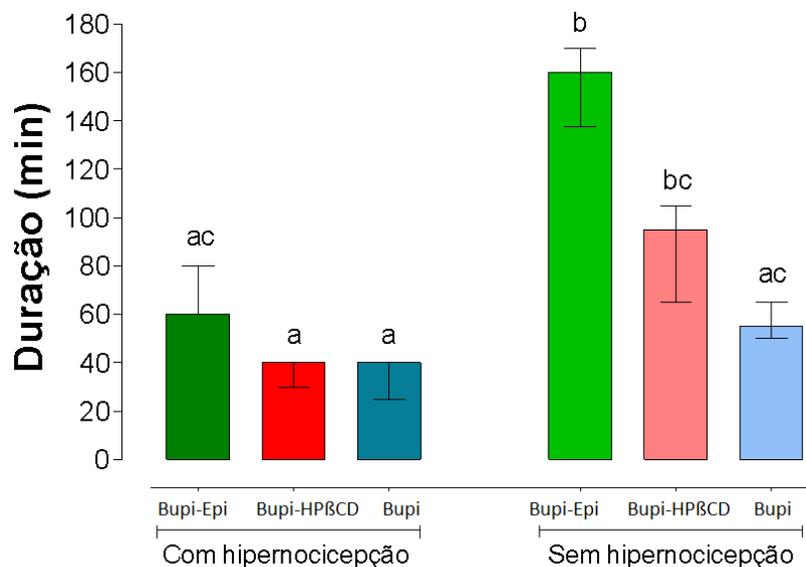


Figura 10 - Duração da anestesia (média \pm desvio interquartilico, em minutos) após injeção das soluções de bupivacaína complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Bupi-HP β CD), bupivacaína sem aditivos (Bupi), e bupivacaína com epinefrina (Bupi-Epi) nas patas com e sem hipernocicepção. (n=6/grupo; Kruskal-Wallis e Student-Newman-keuls; Letras distintas: p<0,05 para todas as comparações).

Como pode ser observado na figura 10, na ausência de hipernocicepção, a solução contendo epinefrina induziu maior duração de anestesia (ANOVA e Student-Newman-Keuls, p<0,05) do que solução sem aditivos, sendo que a bupivacaína complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina não apresentou diferença em relação às demais. Na presença de hipernocicepção, não foram observadas diferenças entre as soluções (p>0,05).

A comparação de uma mesma formulação nas situações com e sem hipernocicepção mostrou que a solução com epinefrina e a formulação

complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina apresentaram menor duração de anestesia quando utilizadas na pata com hipernocicepção. Para a solução sem vasoconstritor não foram observadas diferenças entre as duas condições ($p < 0,05$).

A figura 11 mostra o sucesso da anestesia proporcionado pelas formulações nas patas inflamadas (com hipernocicepção) e não inflamada (sem hipernocicepção).

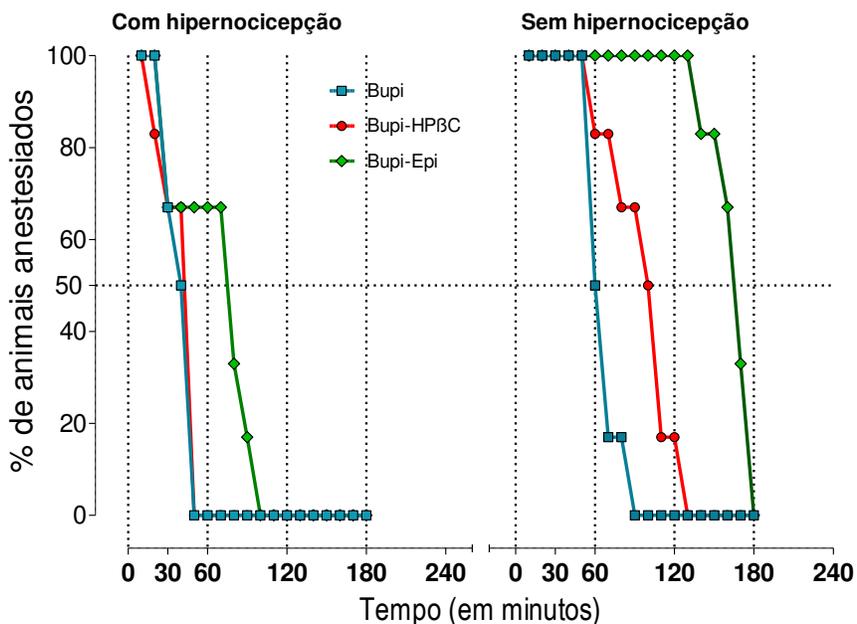


Figura 11 – Sucesso da anestesia (em %) após injeção das soluções de bupivacaína complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Bupi-HP β CD), bupivacaína sem aditivos (Bupi), e bupivacaína com epinefrina (Bupi-Epi) nas patas com e sem hipernocicepção. ($n=6$ /grupo; Log-Rank; $p < 0,01$ entre todas as soluções para patas sem hipernocicepção, entre a Bupi-Epi e as demais para as patas com hipernocicepção, e também para Bupi-Epi entre as patas com e sem hipernocicepção).

Nas patas sem hipernocicepção, o sucesso anestésico da solução com epinefrina foi maior do que com a bupivacaína complexada em 2-hidroxiopropil- β -

ciclodextrina e a solução sem aditivos (Log-Rank; $p < 0,0001$), sendo que esta última apresentou menor sucesso (Log-Rank; $p = 0,0015$) do que a formulação de bupivacaína complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Nas patas com hipernocicepção a bupivacaína com epinefrina apresentou maior taxa de sucesso que as demais soluções (Log-Rank; $p < 0,01$), sem diferença entre estas (Log-Rank; $p = 0,90$).

Na comparação de uma mesma solução nas condições com e sem hipernocicepção, observou-se que todas as formulações apresentaram menor sucesso de anestesia nas patas com hipernocicepção (Log-Rank; $p < 0,01$).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados dois modelos experimentais, um para avaliação da anestesia pulpar (bloqueio do nervo alveolar inferior - BNAI) e outro para avaliação de anestesia em tecido com hipernocicepção (infiltração subcutânea em ferida cirúrgica - ISFC).

Estudos no mesmo modelo de BNAI em ratos têm sido conduzidos para comparar a eficácia anestésica de vários anestésicos locais (articaína, prilocaína e ropivacaína) incorporados em sistemas de liberação, como lipossomas, em relação às formulações comerciais disponíveis, sem aditivos e com vasoconstritor (Gayoso *et al.*, 2009; Berto, 2010; Bhering, 2010). Não há, até o momento, estudos publicados utilizando este modelo, para avaliação de anestésicos complexados com a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina.

Da mesma forma que no presente trabalho, estudos que compararam formulações de prilocaína (Gayoso *et al.*, 2009) e ropivacaína (Bhering, 2010) sem aditivos, com vasoconstritor e encapsuladas em lipossomas, também não observaram diferença na latência entre as formulações à exceção de Berto (2010), que relatou menor latência com a articaína associada à epinefrina, mesmo tendo esta solução apresentado pH 2,9.

A teoria mais aceita atualmente para o mecanismo de ação dos anestésicos locais é a que propõe o bloqueio dos canais de sódio pela sua porção interna, voltada para o axoplasma (Strichartz & Ritchie, 2005 *apud* Malamed, 2005). Considerando que soluções mais ácidas levam mais tempo para serem tamponadas pelos tecidos, apresentando maior número de moléculas do anestésico na forma ionizada, e portanto, incapazes de atravessar a membrana axoplasmática, é esperado que estas soluções apresentem tempo de latência maior (De Jong, 1994; Malamed, 2005). O mesmo é observado quando o próprio tecido no qual a solução é injetada apresenta-se inflamado, o que ocorre com frequência em dentes com pulpite (De Jong, 1994; Claffey *et al.*, 2004). É importante lembrar, ainda, que uma vez o anestésico dentro do axoplasma, volta a

ocorrer o equilíbrio entre moléculas não ionizadas e ionizadas, sendo que apenas as últimas se ligam aos canais de sódio (Malamed, 2005).

É possível que, pela faixa de pH apresentada pelas soluções no presente estudo, 4,93 a 7,0, a capacidade tamponante do tecido tenha proporcionado número suficiente de moléculas não ionizadas para promover o bloqueio do nervo alveolar inferior em tempo relativamente curto (3 a 4 minutos) e por isso não tenham sido observadas diferenças entre as mesmas (Malamed, 2005). Um dos animais que recebeu bupivacaína sem aditivos, entretanto, apresentou latência de 16 min.

Este resultado não é incomum, pois estudos em humanos também têm demonstrado latência maior com anestésicos de longa duração de ação, os quais apresentam pKa mais elevado. Assim, Volpato *et al.*, (2005) e Branco *et al.*, (2006) observaram variação de latência de 2 min a 14 min após BNAI em humanos. Anestésicos com pKa mais elevado, em torno de 8,1 como a bupivacaína e a ropivacaína, tendem a apresentar menor número de moléculas não ionizadas no pH tecidual (7,4) do que a mepivacaína, lidocaína e prilocaína, que apresentam pKa variando entre 7,6 e 7,9. Assim, com menor número de moléculas não ionizadas, há necessidade de um tempo maior para ocorrer o bloqueio (De Jong, 1994).

Em modelos de bloqueio do nervo ciático em camundongos e anestesia subaracnóidea em ratos, de Araújo *et al.*, (2005 e 2006, respectivamente) observaram latência menor com a bupivacaína racêmica e com a mistura de 75% levobupivacaína e 25% dexbupivacaína, ambas complexadas com 2-hidropropil- β -ciclodextrina, quando comparadas aos fármacos livres. Diferenças no tipo de bloqueio estudado e também no tecido avaliado (considerando que no presente estudo foi avaliada anestesia pulpar) poderiam explicar os resultados distintos obtidos no presente estudo e por de Araújo *et al.* (2005; 2006).

As taxas de sucesso obtidas no modelo do BNAI no presente estudo (90% a 100%) estão dentro da faixa encontrada por Bhering (2010) (80% a 90%), que também avaliou anestésico de longa duração de ação, a ropivacaína. Da

mesma forma que no presente estudo, também Bhering (2010) observou maior sucesso e duração de anestesia nos molares inferiores de ratos quando o anestésico local estava associado à epinefrina do que sem aditivos ou encapsulado em lipossomas unilamelares. Apesar de ter sido avaliado outro sistema de liberação, também no presente estudo a associação à epinefrina promoveu maior sucesso de anestesia que as formulações sem aditivos e complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Embora Bhering (2010) não tenha observado aumento do sucesso do BNAI com a formulação encapsulada em lipossomas unilamelares, no presente estudo a complexação com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina aumentou a taxa de sucesso da bupivacaína, sugerindo que este sistema de liberação possa ser mais eficaz do que a encapsulação em lipossomas unilamelares.

A durações de anestesia no BNAI observadas no presente estudo (56 min, 69,5 min e 85 min, respectivamente para as soluções de bupivacaína sem aditivos, bupivacaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e bupivacaína com epinefrina) foram próximas das relatadas por Bhering (2010) para a ropivacaína (48 min, 55 min e 73 min respectivamente para a ropivacaína encapsulada em lipossomas unilamelares, sem aditivos e com epinefrina). Com relação a este parâmetro, tanto no estudo de Bhering (2010), quanto no presente, a solução contendo epinefrina promoveu maior duração de anestesia que a solução sem aditivos. No presente estudo, entretanto, a bupivacaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina não diferiu das demais, enquanto que no Bhering (2010) a ropivacaína com epinefrina apresentou maior duração comparada às duas outras formas.

Com relação ao modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, observou-se que a inflamação alterou a eficácia anestésica das formulações considerando a taxa de sucesso e duração da anestesia. Embora neste modelo não tenha sido proposta a avaliação da latência (pois o animal precisava voltar para a gaiola com fundo aramado e manter as quatro patas apoiadas para o teste ser realizado), todos os animais apresentaram a pata anestesiada já no primeiro

tempo de avaliação (Figura 11), podendo-se inferir que o tempo para instalação da anestesia nesse modelo foi inferior a 5 min.

A presença de inflamação, condição na qual o pH tecidual pode passar de 7,4 para valores entre 5 e 6 (Malamed, 2005), pode aumentar clinicamente a latência de tal forma que, mesmo com tempo de espera de 15 min após o bloqueio do nervo alveolar inferior em humanos, não se consiga anestesia efetiva para permitir o tratamento de dentes com pulpite irreversível e sintomatologia dolorosa (Claffey *et al.*, 2004). Guardadas as diferenças de espécie (respectivamente, humanos e ratos), tipo de técnica (respectivamente, BNAI e infiltração subcutânea) e ainda de tecido avaliado (respectivamente, polpa dental e pele da região plantar), entre o estudo de Claffey *et al.*, (2004) e o presente, possivelmente a observação de anestesia em 100% dos animais no presente estudo possa estar relacionada ao tempo inicial de avaliação (5 minutos após a anestesia).

Outro fator a ser considerado é o volume utilizado. Clinicamente, em odontologia, para se obter anestesia efetiva em áreas inflamadas, especialmente em presença de infecção, duas abordagens podem ser utilizadas: anestesia por bloqueio regional, distante do local inflamado, ou ainda, o uso de volumes maiores de solução anestésica (Meechan, 2002; Malamed, 2005).

Grant *et al.* (1997) ao utilizarem o modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica para estudo de formulação lipossomal multilamelar a base de bupivacaína utilizaram volume de 0,3 mL. No presente trabalho foi utilizado volume de 0,1 mL, pois no estudo piloto foi observado que esse era o volume ideal para promover anestesia, sem extravasamento do líquido. Mesmo a utilização deste menor volume foi suficiente para promover instalação da anestesia em tempo de 5 min em todos os animais.

Nas patas sem hipernocicepção (não inflamadas), a bupivacaína com epinefrina apresentou maior duração que a bupivacaína sem aditivos, sem diferença entre a bupivacaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e as demais. Nessa mesma condição de ausência de inflamação, a bupivacaína com epinefrina promoveu maior taxa de sucesso de anestesia que a bupivacaína

complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e esta, maior sucesso que a bupivacaína sem aditivos.

Em outro modelo experimental (bloqueio do nervo ciático de camundongos para avaliação dos bloqueios motor e sensitivo), de Araújo *et al.* (2005; 2006) observaram aumento do limiar de dor e da duração da analgesia (considerada como redução de 50% na resposta de retirada da pata à aplicação de força) com a utilização de soluções de bupivacaína e ropivacaína complexadas com HP β CD em comparação com as soluções sem aditivos. É possível que a utilização de técnica de bloqueio (de Araújo *et al.* 2005 e 2006), ao invés de infiltração no local avaliado, como no presente estudo, possa ter influenciado na resposta. Deve ainda ser levado em consideração que no presente estudo, foi avaliada a anestesia completa (ausência de resposta ao estímulo máximo considerado) enquanto que de Araújo *et al.* (2005; 2006), consideraram como parâmetro de avaliação a redução de 50% na resposta de retirada da pata à aplicação de força. Embora não tenha sido observado aumento da duração da anestesia com a bupivacaína complexada com HP β CD no presente estudo, a taxa de sucesso aumentou em relação à solução sem aditivos.

A indução de processo inflamatório, no presente estudo, modificou a eficácia das soluções avaliadas, resultando em menor sucesso de anestesia quando comparada à condição sem inflamação. Com relação à duração da anestesia, esta também foi menor para as formulações de bupivacaína com epinefrina e complexada em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, na presença de inflamação quando comparadas à condição sem inflamação. A solução de bupivacaína sem aditivos não sofreu alteração na duração com a presença de inflamação.

Desta forma, a sensibilização dos nociceptores (hipernocicepção), gerada pela inflamação decorrente da incisão e sutura do tecido, levou à diminuição da eficácia das soluções estudadas. E embora as formulações não tenham diferido com relação à duração, a solução contendo vasoconstritor proporcionou maior taxa de sucesso, quando comparada à solução sem aditivos.

A duração da anestesia (mediana) nas patas com hipernocicepção no presente estudo foi de 70 min, 40 min e 35 min, respectivamente, para bupivacaína com epinefrina, complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e sem aditivos, enquanto Grant *et al.* (1997) observaram duração (média) de 23 min para a bupivacaína sem aditivos e 180 min para a bupivacaína encapsulada em lipossomas multilamelares. A comparação da duração da anestesia com a bupivacaína sem aditivos nos dois estudos mostra que, mesmo com utilização de volume menor no presente estudo, os resultados foram bastante próximos.

Analisados em conjunto, esses resultados mostram que, embora a complexação com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina possa aumentar a taxa de sucesso da bupivacaína sem aditivos no BNAI e em tecido não inflamado (patas sem hipernocicepção), a adição do vasoconstritor tornou a solução anestésica ainda mais eficiente, garantindo um melhor desempenho anestésico da bupivacaína. No entanto, na presença de hipernocicepção, a adição do vasoconstritor não aumentou a duração da anestesia.

Mesmo com a diminuição da eficácia anestésica observada na condição de hipernocicepção, a associação com epinefrina permitiu aumento da taxa de sucesso da anestesia.

Assim, os resultados do presente estudo mostram que a adição de vasoconstritor (epinefrina) é mais eficaz que a complexação com a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em aumentar a eficácia anestésica da bupivacaína.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se com o presente trabalho que:

A complexação da bupivacaína em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina aumentou a taxa de sucesso da anestesia no BNAI e na infiltração subcutânea em tecido não inflamado (sem hipernocicepção), em relação à solução sem aditivos, porém, não foi eficaz em aumentar o sucesso da anestesia na infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (tecido com hipernocicepção), situação onde houve diminuição da eficácia de todas as soluções anestésicas estudadas. Da mesma forma, não aumentou a duração da anestesia em nenhum dos modelos estudados salvo na infiltração em tecido não submetido à hipernocicepção, no qual aumentou o tempo de anestesia frente à formulação sem vasoconstritor.

A adição de epinefrina à bupivacaína aumentou a duração e o sucesso da anestesia em comparação à solução sem aditivos em todos os modelos estudados, com exceção da duração da anestesia no modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (tecido com hipernocicepção). Desta forma, ratifica-se sua eficiência como aditivo para aumentar a eficácia anestésica da bupivacaína.

REFERÊNCIAS*

1. Albright GA. Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine or bupivacaine. *Anesthesiology*. 1979; 51: 285-287.
2. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [acesso 2012 Jan 14]. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp.
3. Berto LA. Eficácia anestésica da formulação lipossomal de articaína em ratos. [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010. 31p.
4. Bhering CLB. Eficácia anestésica da preparação lipossomal de ropivacaína em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos [Monografia]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010.
5. Bragagni M, Maestrelli F, Mennini N, Ghelardini C, Mura P. Liposomal 29 formulations of prilocaine: Effect of complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin on drug anesthetic efficacy. *Journal of Liposome Research*. 1 2010; 20(4): 315–322.
6. Branco FP, Ranali J, Ambrosano GM, Volpato MC. A double-blind comparison of 0.5% bupivacaine with 1:200,000 epinephrine and 0.5% levobupivacaine with 1:200,000 epinephrine for the inferior alveolar nerve block. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodontics*. 2006; 101(4): 442-7.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseados na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

7. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996; 64(3):493-501.
8. Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Mechanisms of Incisional Pain. *Anesthesiology Clin N Am*. 2005; 23: 1 – 20.
9. Breslin DS, Martin G, Macleod DB, D'ercole F, Grant SA. Central nervous system toxicity following the administration of levobupivacaine for lumbar plexus block: a report of two cases. *Reg Anesth Pain Med* 2003; 28:144-7.
10. Cereda CMS, Brunetto GB, de Araújo DR, de Paula E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. *Can J Anesth*. 2006; 53(11):1092–1097.
11. Claffey E, Reader A, Nusstein J, Beck M, Weaver J. Anesthetic efficacy of articaine for inferior alveolar nerve blocks in patients with irreversible pulpitis. *J Endod*. 2004; 30(8):568-71.
12. Clark JD, Shi X, Li X, Qiao Y, Liang D, Angst MS, Yeomans DC. Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision. *Molecular Pain*; 2007. 3:28.
13. Clarkson CW, Hondeghem LM. Mechanisms for bupivacaine depression of cardiac conduction. Fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. *Anesthesiology*. 1985; 62:396-405.
14. Crews JC, Rothman TE. Seizure after levobupivacaine for interscalene brachial plexus block. *Anesth Analg* 2003; 96: 1188-90.

15. Davis ME; Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews/ Drug Discovery*. 2004; 3.
16. de Araújo DR; Pinto LMA; Braga AFA; de Paula E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: Aplicações Terapêuticas. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2003; 53(5): 653-661.
17. de Araújo DR; Fraceto LF; Braga A de F de A; Paula E de; Sistemas de Liberação Controlada com Bupivacaína Racêmica (S50-R50) e Mistura Enantiomérica de Bupivacaína (S75-R25): Efeitos da Complexação com Ciclodextrinas no Bloqueio do Nervo Ciático em Camundongos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2005; 55(3): 316 – 328.
18. de Araújo DR; Braga A de F; Moraes CM; Fraceto LF; Paula E. Complexation of 50% enantiomeric excess (S75-R25) bupivacaine with cyclodextrins and spinal block anesthesia in rats. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2006; 56(5): 495-506.
19. De Jong RH. *Local anesthetics*. Mosby. 1 ed. 1994.
20. de Paula E, Cereda CM, Tofoli GR, Franz-Montan M, Fraceto LF, de Araújo DR. Drug delivery systems for local anesthetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2010; 4(1):23-34.
21. Dhir S, Ganapathy S, Lindsay P, Athwal GS. Case report: ropivacaine neurotoxicity at clinical doses in interscalene brachial plexus block. *Can J Anaesth*. 2007; 54(11):912-6.
22. Dollo G; Thompson DO; Le Corre P; Chevanne F; Le Verge R. Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with b-cyclodextrin and derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7-b-CD complex

- following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. *International Journal of Pharmacology*. 1998; 164: 11-9.
23. Dreven LJ, Reader A, Beck FM, Meyers WJ, Weaver J. An Evaluation of an Electric Pulp Tester as a Measure of Analgesia in Human Vital Teeth. *Journal of Endodontics*. 1987; 13(5).
24. Fréville JC; Dollo G; Le Corre P; Chevanne F; Le Verge R. Controlled Systemic Absorption and Increased Anesthetic Effect of Bupivacaine Following Epidural Administration of Bupivacaine-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complex. *Pharmaceutical Research*. 1996; 13: (10)1576-1580, 1996.
25. Gayoso GR, Zago PMW, Baroni DB, Berto LA, Groppo FC, Paula E, Volpato MC. Eficácia anestésica da prilocaína lipossomal em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos. In: *Anais da 26ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica*, 2009. Painei PNd081.
26. Gorfine SR, Onel E, Patou G, Krivokapic ZV. Bupivacaine Extended-Release Liposome Injection for Prolonged Postsurgical Analgesia in Patients Undergoing Hemorrhoidectomy: A Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial [Abstract]. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2011; 54(12): 1552-1559.
27. Grant GJ; Lax J; Susser L; Zakowski M; Weissman TE; Turndorf H. Wound infiltration with liposomal bupivacaine prolongs analgesia in rats. *Acta Anaesthesiology Scandinav*. 1997; 41(2): 204-7.
28. Grant GJ; Barenholz Y; Bolotin EM; Bansinath M; Turndorf H; Piskoun B *et al*. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiology*. 2004; 101(1): 133-7.

29. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editores. Goodman & Gilman: As bases Farmacológicas da Terapêutica. 10^o ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. 2005. 1647p.
30. Heavner JE. Cardiac toxicity of local anesthetics in the intact isolated heart model: a review. *Reg Anesth Pain Med.* 2002; 27(6): 545-55.
31. Karashima K; Taniguchi M; Nakamura T; Takasaki M; Matsuo K; Irikura M *et al.* Prolongation of Intrathecal and Sciatic Nerve Blocks Using a Complex of Levobupivacaine with Maltosyl- β -Cyclodextrin in Rats. *Anesthesia & Analgesia.* 2007; 104(5).
32. Kimura Y, Kamada Y, Kimura A, Orimo K. Ropivacaine-induced toxicity with overdose suspected after axillary brachial plexus block. *J Anesth.* 2007; 21(3):413-6.
33. Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *International Journal of Pharmaceutics.* 2001; 225(1-2):15-30.
34. Malamed SF. Manual de anestesia local. Mosby. 5^a edição. 2005.
35. Mather LE; Chang DH-T. Cardiotoxicity with Modern Local Anaesthetics. Is There a Safer Choice? *Drugs.* 2001; 61 (3).
36. Meechan JG. Supplementary routes to local anaesthesia. *Int Endod J.* 2002; 35(11):885-96.
37. Moraes CM; Abrami P; Gonçalves MM; Andréo Filho N; Fernandes SA; de Paula E *et al.* Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- β -ciclodextrina. *Quim. Nova.* 2007; 30(4): 777-784.

38. Mowat JJ; Mok MG; Macleod BA; Madden TD. Liposomal bupivacaine extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient. *Anesthesiology*. 1996; 85: 635-43.
39. Naftel JP, Richards LP, Pan M, Bernanke JM. Course and composition of the nerves that supply the mandibular teeth of the rat. *Anatomic Records*. 1999; 256(4): 433-47.
40. Obata H, Kimura M, Nakajima K, Tobe M, Nishikawa K, Saito S. Monoamine-Dependent, Opioid-Independent Antihypersensitivity Effects of Intrathecally Administered Milnacipran, a Serotonin Noradrenaline Reuptake Inhibitor, in a Postoperative Pain Model in Rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 334(3):1059–1065.
41. Onyuksel H; Sethi V; Weinberg GL; Dudeja PK; Rubinstein I. Bupivacaine, but not lidocaine, disrupts cardiolipin-containing small biomimetic unilamellar liposomes. *Chemical Biology Interactive*. 2007; 169(3): 154-9.
42. Parada CA, Vivancos GG, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(5):2923-8.
43. Richard BM, Rickert DE, Doolittle D, Mize A, Liu J, Lawson CF. Pharmacokinetic Compatibility Study of Lidocaine with EXPAREL in Yucatan Miniature Pigs. *ISRN Pharmaceutics*. 2011a. In press.
44. Richard BM, Newton P, Ott LR, Haan D, Brubaker AN, Cole PI, Ross PE, Rebelatto MC, Nelson KG. The Safety of EXPAREL[®] (Bupivacaine Liposome Injectable Suspension) Administered by Peripheral Nerve Block in Rabbits and Dogs. *Journal of Drug Delivery*. 2011b. In Press.

45. Sessle B, Lavigne GJ, Lund JP, Dubner R. Dor orofacial – Da ciência à conduta clínica. Quintessence Editora Ltda. 2ed. 2010.
46. Silva RAP, Berto LA, Volpato MC, Ranali J, Paula ED, Groppo FC. 26 Experimental model of inferior alveolar nerve block in rats. *In: 87th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research*, 28 2009. Miami. Fla, USA. Abstract 706.
47. Strichartz GR, Ritchie JM. The action of local anesthetic on ion channels of excitable tissues. In: Strichartz GR, editor: Local anesthetics. New York: Springer Verlag, 1987. Apud Malamed SF. Manual de anestesia local. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
48. Udelsmann A; Lorena SER de S; Girioli SU; Silva WA, Moraes AC de. Efeitos hemodinâmicos da intoxicação aguda com Bupivacaína, levoBupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50%: estudo experimental em suínos. *Revista Brasileira Anestesiologia*. 2007; 57(1): 63-73.
49. Vandermeulen E; Gebhart GF; Brennan TJ. Effect of pre-emptive bupivacaine infiltration on animal model of incisional pain (Abstract). *Anesthesiology*. 1994; 81: A986.
50. Venturini C de G; Nicolini J; Machado C; Machado VG. Propriedades e aplicações recentes das Ciclodextrinas. *Química Nova*. 2008; 31(2): 360-368.
51. Volpato MC, Ranali J, Ramacciato JC, de Oliveira PC, Ambrosano GM, Groppo FC. Anesthetic efficacy of bupivacaine solutions in inferior alveolar nerve block. *Anesth Prog*. 2005; 52(4): 132-5.

52. Xu J, Brennan TJ. The pathophysiology of acute pain: animal models. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2011; 24(5):508-14.
53. Welliver M. Cyclodextrin introduction to anesthesia practice: Form, function, and application. *AANA Journal/August.* 2007; 75(4).
54. Wolf R, Reader A, Drum M, Nusstein J, Beck M. Anesthetic Efficacy of Combinations of 0.5 M Mannitol and Lidocaine With Epinephrine in Inferior Alveolar Nerve Blocks: A Prospective Randomized, Single-Blind Study. *Anesth Prog.* 2011; 58:157-165.
55. Wu C, Boustany L, Liang H, Brennan TJ. Nerve Growth Factor Expression after Plantar Incision in the Rat. *Anesthesiology.* 2007; 107:128 –35.
56. Zink W; Graf BM. The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine. *Current Opinion of Anaesthesiology.* 2008; 21(5): 645-50.

ANEXO

APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CEEA/Unicamp

 UNICAMP	 CEEAA/Unicamp
--	--

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

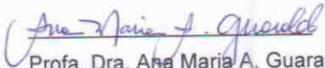
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1936-1, sobre "Eficácia anestésica da preparação de bupivacaina com hidroxipropil beta-ciclodextrina em bloqueio do nervo alveolar inferior e em ferida cirúrgica, em ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo / Luciano Serpe, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em 03 de setembro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1936-1, entitled "Anesthetic efficacy of bupivacaine with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin formulation in infraorbital and inferior alveolar nerve blocks and surgical wound, in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 3, 2009.

Campinas, 03 de setembro de 2009.

 Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	 Fátima Alonso Secretária Executiva
---	---

<small>CEEAA – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil</small>	<small>Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/</small>
--	--