

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CAMILA BATISTA DA SILVA

EFICÁCIA ANESTÉSICA DAS PREPARAÇÕES LIPOSSOMAIS UNI E  
MULTILAMELAR DE ARTICAÍNA, EM BLOQUEIO DOS NERVOS  
INFRAORBITAL E ALVEOLAR INFERIOR E EM INFILTRAÇÃO  
SUBCUTÂNEA EM FERIDA CIRÚRGICA, EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade  
de Odontologia de Piracicaba, da UNICAMP, para  
obtenção do Título de Mestre em Odontologia na  
Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Volpato  
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Este exemplar corresponde à  
versão final da Dissertação  
defendida pela aluna Camila  
Batista da Silva, e orientada pela  
Profa. Dra. Maria Cristina  
Volpato.

---

Assinatura do Orientador

**PIRACICABA**

**2012**

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

Si38e

Silva, Camila Batista da, 1985-

Eficácia anestésica das preparações lipossomais uni e multilamelar de articaína, em bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior e em infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, em ratos / Camila Batista da Silva. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Maria Cristina Volpato.

Coorientador: Francisco Carlos Groppo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Anestesia local. 2. Lipossomas. 3. Carticaína. I. Volpato, Maria Cristina, 1962- II. Groppo, Francisco Carlos, 1966- III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Anesthetic efficacy of uni and multilamelar liposomal articaine formulations in block of infraorbital and inferior alveolar nerve and in subcutaneous infiltration in surgical wound, in rats

**Palavras-chave em Inglês:**

Anesthesia, local

Liposomes

Carticaine

**Área de concentração:** Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

**Titulação:** Mestre em Odontologia

**Banca examinadora:**

Maria Cristina Volpato [Orientador]

Giovana Radomille Tófoli

Felipe Bevilacqua Prado

**Data da defesa:** 24-02-2012

**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 24 de Fevereiro de 2012, considerou o candidato CAMILA BATISTA DA SILVA aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. Volpato", is positioned above a horizontal line.

Profa. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Giovana Tófoli", is positioned above a horizontal line.

Profa. Dra. GIOVANA RADOMILLE TÓFOLI

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "F. Bevilacqua Prado", is positioned above a horizontal line.

Prof. Dr. FELIPPE BEVILACQUA PRADO

Dedico este trabalho àqueles que compartilharam meus ideais e acreditaram em meus sonhos, me incentivando a seguir em frente e a superar os desafios: Minha família.

Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

À Deus. Pois foi Ele que me deu e me dá forças e saúde pra levantar todos os dias e lutar pelos meus ideais.

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), por meio do diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior e ao Instituto de Biologia (IB-UNICAMP), por meio da diretora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Shirlei Maria Recco Pimentel pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>, Renata C. M. R. Garcia, coordenadora dos cursos de pós graduação da FOP/UNICAMP e à Profa. Dra. Cinthia P. M. Tabchoury coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP pelo empenho dedicado aos alunos de pós-graduação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida (Processo #2009/11842-7) e auxílio ao Projeto Temático “Novas formulações de anestésicos locais de liberação controlada: do desenvolvimento ao teste clínico odontológico” (Processo #2006/00121-9), coordenado pela Profa. Dra. Eneida de Paula, do Instituto de Biologia/UNICAMP.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Volpato, meus sinceros agradecimentos pela paciência e inteligência ao me orientar. És modelo de professora e amiga e por ti tenho muito carinho, respeito e admiração.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo pela atenção e confiança depositadas à mim em todos os trabalhos. É essencial na minha história acadêmica e estarei sempre disposta a aprender com você.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eneida de Paula, do Instituto de Biologia, pela habilidade de coordenar o projeto temático, no qual este projeto está inserido. À Maribel Correia da Silva e Márcio Aparecido Paschoal, funcionários do Laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela preparação das formulações lipossomais e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia, e Terapêutica, Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e Prof. Dr. José Ranali, pelo incentivo e ensinamentos durante esses anos.

Aos professores das bancas de qualificação primeira e segunda fase, Profas. Dras. Maria Cecília F.A. Veiga, Juliana T. C. Napimoga, Carina Deny, Michelle Franz-Montan e Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, obrigada pelas contribuições e sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta dissertação, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Giovana Radomille Tofoli, Prof Dr Felipe Bevilacqua Prado, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Míriam Elias Cavallini e Prof Dr Rogério Heládio Lopes Motta pela disponibilidade de avaliação deste trabalho.

Aos funcionários da Farmacologia, Maria Elisa dos Santos, Eliane Melo Franco de Souza e José Carlos Gregório pela gentilezas, ajudas no laboratório, biotério, pelos shows na ASFOP, bom humor e abraços essenciais no dia a dia.

À melhor turma de mestrado da Farmacologia: Ana Paula Bentes, Cristina Caldas, Fabiana Nolasco, Inês Juliana, Luciano Serpe, Luiz Ferreira, Marcelo Franchin, Marcos Cunha, Salete Fernandes, e em especial aos meus cúmplices e amigos-irmãos Cleiton Pita e Lívia Galvão um profundo agradecimento pela convivência, amizade, risadas, choros, estudos e festas. Não teria a menor graça sem vocês!

Aos outros amigos da Farmacologia, Bruno Bueno, Bruno Vilela, Carina Deny, Fabiano Brito, Fabrício Favero, Leila Servat, Luciana Almeida, Luciana Berto, Mirian Cavalini, Myrella Castro, Patrícia Zago, Sonia Fernandes e Talita Graziano, obrigada pelas ajudas e incentivos.

Aos funcionários do CEMIB-Unicamp que cuidaram e me enviaram as peças fundamentais desta pesquisa, os *Rattus norvegicus albinus*, Wistar. Obrigada!

Ao Wanderlei Francisco Vieira, Fábio Vinicius b. Padilha, Daniely Libório Machado e Floriza Aparecida Godoy, funcionários do biotério, que foram indispensáveis para um ambiente de trabalho adequado.

A minha família Piracicabana, Carolina Bosso, Juliana Públio, Monique Lourenço, Priscila Campioni, Samantha Veronez, obrigada pelos jantares, risadas na sala, amizade e incentivo de todos os dias. Obrigada em especial para a Carolina Bosso pela disponibilidade de tirar as fotos para esse trabalho.

Aos meus amigos de graduação que já não divido meu dia a dia, mas que fazem parte da minha história e que se mantiveram na torcida pelo meu sucesso. Muitas saudades de cada um de vocês!

Aos meus pais, Sandra Batista e Carlos Alberto, agradeço por fazerem de suas vidas um grande exemplo para mim. Cada resposta minha tem uma marca da educação que vocês me deram. Obrigada por terem acreditado em mim.

Ao meu irmão: Lucas Batista, por ser um ótimo irmão. Compreensível e amigo assim como minha vovó Dirce que indiscutivelmente é uma avó maravilhosa e que merece muitos beijos e muitos “obrigada vovó” por ter me colocado no colo de Deus todas às vezes que precisei.

Ao meu namorado: Lucas Candido, pelo amor, paciência, amizade e carinho dedicado a mim nesses quase 6 anos juntos. Com você do meu lado eu posso seguir tranquila, sem pressa pra voar.

Aos meus amores Belly (*in memorian*) e Gary que fizeram ainda mais felizes os momentos de retorno pra casa. Obrigada pelo carinho, companheirismo e ternura dedicados a mim.

A minha avó Maria Lucinda (*in memorian*) e meu avô João Batista (*in memorian*) por terem sido tão especiais na minha vida. Gostaria que vocês estivessem aqui para assistir a conquista desse título

E a todas as pessoas queridas e que não foram citados aqui, mas estiveram na torcida pela realização e sucesso deste trabalho, um muito obrigada!

## RESUMO

Este estudo avaliou a eficácia anestésica das seguintes formulações: articaína 4% encapsulada em lipossomas multilamelares – Arti-MLV, articaína 4% encapsulada em lipossomas unilamelares – Arti-LUV e solução comercial de articaína 4% com epinefrina 1:100.000 – Arti-Epi, em três modelos animais (bloqueio do nervo infraorbital – BNIO, infiltração subcutânea em ferida cirúrgica – ISFC e bloqueio do nervo alveolar inferior – BNAI). Para o BNIO, 24 ratos (8 animais/grupo) receberam 0,1 mL da preparação próximo ao forame infraorbital. Foi avaliada a duração da anestesia em tecido mole por pinçamento do lábio superior, a cada 5 minutos. Para a ISFC, 36 ratos (6 animais/grupo) receberam 0,1 mL das formulações anestésicas 24h após a realização de uma ferida cirúrgica (incisão e sutura) na superfície plantar da pata traseira direita. A anestesia foi avaliada pela aplicação de força ao lado da ferida com o analgesímetro eletrônico de von Frey. Para o BNAI, 45 ratos (15 animais/grupo) receberam 0,2 mL das formulações próximo ao forame mandibular e os parâmetros latência, duração e sucesso da anestesia pulpar foram avaliados por estímulo elétrico. Nos três modelos estudados foram utilizadas, como controle negativo, as formulações: solução de NaCl 0,9%, suspensão lipossomal multilamelar e suspensão lipossomal unilamelar. Os resultados foram submetidos a ANOVA e avaliados pelos testes de Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, Log-Rank e Exato de Fisher, com nível de significância de 5%. No BNIO, a Arti-Epi não diferiu da Arti-MLV ( $p>0,05$ ) na duração e no sucesso da anestesia, porém foi melhor que a Arti-LUV ( $p<0,05$ ) na duração da anestesia. Arti-LUV proporcionou menor ( $p<0,05$ ) sucesso que as demais formulações. No modelo de ISFC, a duração e sucesso da Arti-Epi foram superiores ( $p<0,05$ ) aos das demais formulações. No BNAI, não houve diferença estatística entre as formulações testadas ( $p>0,05$ ) com relação a latência, sucesso e duração da anestesia. Conclui-se que, as formulações lipossomais de articaína apresentaram eficácia anestésica equivalente à da solução contendo epinefrina, podendo ser opção de uso para anestesia pulpar (BNAI) e em tecido mole não inflamado (BNIO, apenas com a formulação

lipossomal multilamelar). Entretanto, a solução contendo epinefrina foi mais potente em aumentar a duração e taxa de sucesso da anestesia em tecidos com hipernocicepção.

**Palavras-chave:** anestesia, articaína, lipossomas, nervo alveolar inferior, nervo infraorbital.

## ABSTRACT

This study assessed the anesthetic efficacy of the following formulations: 4% articaine encapsulated in multilamellar liposomes (Arti-MLV), 4% articaine encapsulated in unilamellar liposomes (Arti-LUV) and 4% articaine with 1:100,000 epinephrine (Arti-Epi), in three animal models: infraorbital nerve block (IONB), subcutaneous infiltration in surgical wound (SISW) and inferior alveolar nerve block (IANB). For IONB, 24 rats (8/group) received 0.1 mL of the anesthetic formulations near the right infraorbital foramen. The duration of anesthesia was assessed by upper lip pinching every 5 minutes. For SISW, 36 animals (6/group) received 0.1 mL of the anesthetic formulations 24 hours after a surgical wound (incision and suture) was performed in the plantar region of the right hind paw. Paw anesthesia was assessed by force application at the side of the wound with electronic von Frey anesthesiometer. For IANB, 45 rats (15/group) received 0.2 mL of the anesthetic formulations near the right mandibular foramen. The success, onset and duration of pulpal anesthesia were assessed by electric stimulus. 0.9% NaCl solution, multilamellar liposomal suspension and unilamellar liposomal suspension were used as negative controls in the three models studied. Data were submitted to ANOVA, Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, Log-Rank, and Fisher's exact tests (5% significance level). For IONB no differences in duration and anesthetic success ( $p>0.05$ ) were observed between Arti-Epi and Arti-MLV; Arti-Epi presented higher anesthesia duration than Arti-LUV ( $p<0.05$ ). Arti-LUV provided lower ( $p<0.05$ ) anesthesia success than other formulations. For SISW, Arti-Epi provided higher success and longer anesthesia duration than the other formulations ( $p<0.05$ ). For BNAI no differences among the formulations were observed in relation to onset, success and anesthesia duration ( $p>0.05$ ). In conclusion, the articaine liposomal formulations presented anesthetic efficacy equivalent to that showed by the solution with epinephrine and could be an option for pulpal (IANB) and soft tissue anesthesia in non-inflamed tissues (IONB - only the multilamellar liposome formulation). However, the solution with epinephrine

was more potent to improve anesthetic success and duration in tissues with hipernociception.

**Key-words:** anesthesia, articaine, liposomes, inferior alveolar nerve, infraorbital nerve

# SUMÁRIO

|                                                                         | Página |
|-------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                      | 1      |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                           | 3      |
| 2.1 Anestésicos locais.....                                             | 3      |
| 2.2 Articaína.....                                                      | 5      |
| 2.3 Sistemas de liberação controlada - formulações lipossomais.....     | 7      |
| 3. PROPOSIÇÃO.....                                                      | 12     |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....                                              | 13     |
| 4.1 Animais.....                                                        | 13     |
| 4.2 Delineamento Experimental.....                                      | 13     |
| 4.3 Material.....                                                       | 15     |
| 4.4 Preparação das suspensões lipossomais.....                          | 16     |
| 4.4.1.Preparação da suspensão lipossomal multilamelar de articaína..... | 16     |
| 4.4.2. Preparação da suspensão lipossomal unilamelar de articaína.....  | 17     |
| 4.5 Avaliação da eficácia anestésica.....                               | 18     |
| 4.5.1 Experimento 1 - Bloqueio do nervo infraorbital .....              | 18     |
| 4.5.2 Experimento 2 - Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica .....  | 19     |
| 4.5.3 Experimento 3 - Bloqueio do nervo alveolar inferior .....         | 21     |
| 4.5.3.1 Fixação de fios de cobre à superfície oclusal dos molares.      | 22     |
| 4.5.3.2 Bloqueio do nervo alveolar inferior.....                        | 23     |
| 4.5.3.3 Avaliação da sensibilidade pulpar a estímulo elétrico.....      | 24     |
| 4.5.3.4 Parâmetros da anestesia.....                                    | 25     |
| 4.6 Análise estatística.....                                            | 26     |
| 5. RESULTADOS.....                                                      | 27     |
| 5.1 Bloqueio do nervo infraorbital.....                                 | 27     |

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| 5.2 Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica..... | 30 |
| 5.3 Bloqueio do nervo alveolar inferior.....        | 33 |
| 6. DISCUSSÃO.....                                   | 37 |
| 7. CONCLUSÕES.....                                  | 45 |
| REFERÊNCIAS .....                                   | 46 |
| ANEXO.....                                          | 56 |

# 1 INTRODUÇÃO

A odontologia está em busca de novas e melhores formas de realizar anestesia local eficaz e indolor. Várias pesquisas concentram-se no desenvolvimento de agulhas e seringas mais seguras, técnicas mais eficazes de bloqueio nervoso e novos fármacos (Malamed, 2005; Clark & Yagiela, 2010).

Sintetizada em 1969 e introduzida posteriormente no mercado, chegando ao Brasil em 1998, a articaína é um anestésico do tipo amida que difere dos demais de seu grupo por apresentar um anel tiofeno e um grupamento éster. Tem se mostrado como anestésico preferido entre os cirurgiões dentistas, sendo alvo de vários estudos, graças as suas características de baixa latência, alta taxa de sucesso e duração anestésica e boa difusibilidade (Paxton & Thome, 2010).

Além do interesse em sais anestésicos mais eficazes e seguros, as pesquisas também têm se voltado para aditivos e sistemas de liberação sustentada que possam melhorar a segurança e a eficácia destas formulações. Dentre os principais carreadores, destacam-se os lipossomas que proporcionam vantagens consideráveis no desenvolvimento de formulações para liberação prolongada de fármacos, com ênfase na diminuição da toxicidade (Boogaerts *et al.*, 1993a; Bucalo *et al.*, 1998; de Araújo *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2005; de Paula *et al.*, 2010; Davidson *et al.*, 2010).

A encapsulação de anestésicos locais em lipossomas tem mostrado aumento do efeito anestésico, em comparação às soluções anestésicas sem aditivos, em vários modelos animais (Grant *et al.*, 1997; Cereda *et al.*, 2004; de Araújo *et al.*, 2004; Cereda *et al.*, 2006; de Araújo *et al.*, 2008; Berto, 2010) e em dois estudos em humanos (Grant *et al.*, 2004; Tofoli *et al.*, 2011).

Entretanto, tem-se observado que formulações de anestésicos locais encapsulados em lipossomas unilamelares promovem menor eficácia anestésica quando comparadas a soluções contendo vasoconstritor (Berto, 2010; Tofoli *et al.*, 2011; Wiziack Zago *et al.*, 2011; Franz-Montan *et al.*, 2011). Por outro lado, dois relatos de caso (Lafont *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1996) e um estudo clínico

(Boogaerts *et al.*, 1994) mostraram que a encapsulação de bupivacaína em lipossomas multilamelares pode aumentar a duração do efeito deste anestésico, quando comparado ao promovido pela solução de bupivacaína associada à epinefrina.

Estes resultados mostram que o aumento do número de bicamadas do lipossoma pode promover liberação mais lenta do anestésico local, prolongando assim seu efeito. A partir destes resultados e do interesse atual crescente no uso da articaína em odontologia, por apresentar maior difusibilidade que os demais anestésicos (Robertson *et al.*, 2007), foi proposto o presente estudo.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia anestésica de duas formulações de articaína encapsulada em lipossomas (lipossomas multilamelares e lipossomas unilamelares com concentração lipídica maior que a utilizada anteriormente por Berto [2010]), em comparação à solução de articaína associada à epinefrina 1:100.000.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 ANESTÉSICOS LOCAIS**

Ao longo dos anos tem-se buscado alternativas de promover anestesia adequada aos procedimentos médicos e odontológicos. O controle da dor durante esses procedimentos, e mesmo no pós-operatório imediato de alguns, é realizado com medicamentos que bloqueiam, de forma temporária, a condução de impulsos nervosos, os anestésicos locais (McLure & Rubin, 2005).

Este bloqueio reversível da condução de impulsos nervosos pelos anestésicos locais ocorre pela inibição da permeabilidade dos neurônios aos íons sódio. Em 1969, Narahashi & Yamada demonstraram, em axônio gigante de lula, que análogos quaternários de anestésicos locais, na forma ionizada, promoviam bloqueio da condução de impulsos quando os mesmos eram aplicados na face interna da membrana axoplasmática, em pH 7,4. Entretanto, esse mecanismo não explicava a ação de anestésicos não ionizados em pH fisiológico, como a benzocaína, bem como a diversidade de estruturas moleculares com capacidade de bloquear canais de sódio.

A teoria mais aceita atualmente é a da afinidade modulada pelo receptor, proposta em 1977 por Hille, na qual a afinidade dos anestésicos locais pela proteína canal de sódio seria modulada pelo estado conformacional do canal, sendo a maior afinidade pelo estado inativo ou em repouso. Essa teoria considera ainda mais de um local de ligação dos anestésicos locais no canal de sódio. A explicação do mecanismo de ação da benzocaína, por sua vez, é dada pela teoria dos lipídeos, segundo a qual esses compostos, ao penetrar na bicamada lipídica, alterariam o arranjo dos lipídeos na bicamada, promovendo deformação na proteína canal de sódio, diminuindo a condutância dos íons sódio (Lee, 1976). A alteração na permeabilidade e fluidez da membrana dependeriam da quantidade de anestésico local ligado à fase lipídica, ligação esta dependente da lipofilicidade de cada anestésico local (Skidmore et al., 1996) e intimamente relacionada à potência do mesmo (de Paula & Schreier, 1996). A interação entre anestésicos

locais não ionizados e a proteína canal de sódio foi demonstrada por Ragsdale *et al.* (1994; 1996).

Embora o bloqueio da sensibilidade já fosse reconhecido pelos nativos do Peru, pelo adormecimento da língua ao mascar folhas de coca e a história da anestesiologia remonte à metade do século XIX, ainda não se chegou à técnica ideal ou à formulação ideal. O primeiro anestésico isolado foi a cocaína, em 1859, por Albert Niemann e seu uso clínico ocorreu anos mais tarde, em administração tópica para cirurgia oftálmica (Koller, 1884, citado por Ruetsch *et al.*, 2001). O uso de cocaína para anestesia local e regional rapidamente se espalhou pela Europa e América, entretanto os primeiros relatos de sua toxicidade sistêmica apareceram quase que simultaneamente às primeiras administrações, demonstrando o potencial tóxico-dependente e baixo índice terapêutico dessa droga (Ruetsch *et al.*, 2001).

A frequência de reações tóxicas centrais e cardiovasculares induziu a classe farmacêutica a buscar novos anestésicos locais, com menor potencial tóxico. A procaína (primeiro anestésico local injetável e usado como padrão) e a tetracaína (anestésico tópico eficaz) surgiram respectivamente em 1905 e 1930 e foram os últimos anestésicos do tipo éster sintetizados até que em 1948 foi introduzida no mercado a lidocaína, um anestésico do tipo amida, que proporcionava menor incidência de alergia que os anestésicos do tipo éster (Ruetsch *et al.*, 2001).

O cloridrato de lidocaína rapidamente tornou-se muito utilizado, devido à sua rápida latência, baixa alergenidade e toxicidade, além da eficácia comprovada para o uso clínico. Assim, tornou-se o padrão-ouro de comparação para todos os outros anestésicos locais (Paxton & Thome, 2010).

Seguindo as características favoráveis da lidocaína, outros anestésicos locais do grupo amida foram sintetizados, como a mepivacaína, prilocaína, bupivacaína, articaína e a ropivacaína (Ruetsch *et al.*, 2001). Dentre estes, o que tem despertado grande interesse na pesquisa e na clínica odontológica é a

articaína (Malamed *et al.*, 2001; Mikesell *et al.*, 2005; Kanaa *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2008; Nizharadze *et al.*, 2011)

## **2.2 ARTICAÍNA**

Sintetizada por Rusching em 1969, introduzida no mercado alemão em 1976 e no Brasil em 1998, o cloridrato de articaína conquistou a classe odontológica e atualmente é um dos mais vendidos no Canadá e Alemanha (Malamed, 2005). Sua estrutura química única, diferente dos demais anestésicos locais do grupo amida atualmente disponíveis, lhe confere menor meia-vida plasmática e maior difusibilidade (Paxton & Thome, 2010).

A primeira característica é proporcionada pelo grupo éster presente na molécula, permitindo que sua metabolização se inicie no plasma pelas esterases plasmáticas, resultando na formação do ácido articaínico, o qual é conjugado com o ácido glicurônico no fígado (Vree & Gielen, 2005). As demais amidas apresentam biotransformação hepática praticamente exclusiva (Becker & Reed, 2006). Assim, a meia-vida plasmática da articaína é relatada na literatura variando de 20 minutos (após bloqueio do nervo mandibular com 80 mg de articaína 4% com epinefrina 1:200.000 – Müller *et al.*, 1991, citado por Vree & Gielen, 2005) a 44 minutos (após injeção intra-oral de 500 mg de articaína 4% com epinefrina 1:100.000 e 1:200.000 - Hersh *et al.*, 2006), enquanto que a da lidocaína é de 182 minutos (avaliada após injeção intra-oral de 144 mg - Moore *et al.*, 2008). A excreção da articaína é feita por via renal, sendo aproximadamente 90% na forma de metabólitos (72% na forma de ácido articaínico e 15% na forma de conjugado) (Vree & Gielen, 2005).

A maior difusibilidade é provavelmente consequência do anel tiofênico, que não está presente nos demais anestésicos (Lipp & Daublander, 1999; Sloss, 1999 e Robertson *et al.*, 2007). A difusão é também determinada pela lipossolubilidade do anestésico através da membrana lipídica dos axônios, quanto maior o coeficiente lipídio/água, maior a difusão e a potência anestésica (McLure & Rubin, 2005).

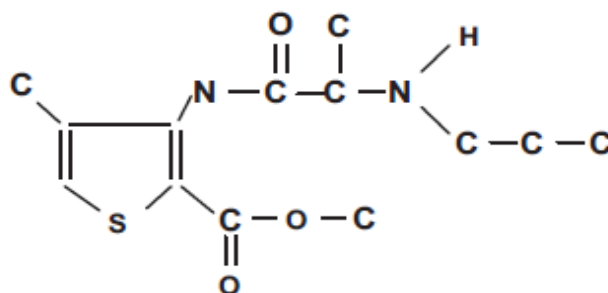


Figura 1 - Estrutura química do cloridrato de articaína.

Fonte: Paxton & Thome, 2010

Outra característica físico-química importante da articaína é a alta taxa de ligação protéica (95%) e potência 1,5 vezes maior que a lidocaína e 1,9 vezes maior que a procaína. A duração anestésica está intimamente relacionada a esta característica, pois corresponde também à afinidade com o receptor de proteína dentro dos canais de sódio, prolongando a presença de anestésico no local de ação (Becker and Reed, 2006).

Além dessas diferenças estruturais e químicas, a articaína é o único anestésico do grupo amida com duração de ação intermediária não disponível comercialmente sem adição de vasoconstritor, aditivo presente na maioria das formulações anestésicas locais de uso odontológico e que permite aumento considerável do tempo de duração do efeito anestésico, devido à diminuição da absorção (Malamed, 2005; Daublander, 2011).

Vários estudos têm evidenciado a maior eficácia da articaína quanto ao sucesso e duração anestésica em técnicas infiltrativas maxilares e mandibulares na região anterior e posterior, comparada à eficácia da lidocaína (Kanaa *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2007) em bloqueio dos nervos incisivo e mentoniano (Batista da Silva *et al.*, 2010) e como técnica suplementar de anestesia (Rosenberg *et al.*, 2007; Meechan, 2010)

Paralelamente às publicações que relatam maior eficácia, há também relatos de parestesia após bloqueio do nervo alveolar inferior e essa ocorrência

parece ser concentração-dependente (Haas & Lennon, 1995; Gaffen & Haas, 2009; Garisto *et al.*, 2010). Outras alterações de sensibilidade, incluindo dor pós-operatória também podem ser observadas após o uso de articaína, sendo geralmente de natureza transitória, com duração de dias ou semanas (Malamed *et al.*, 2001).

Em decorrência da maior eficácia anestésica e ainda dessa maior toxicidade local, provavelmente decorrente da maior concentração em que a articaína é utilizada em relação aos demais anestésicos locais disponíveis, vários estudos tem sido conduzidos no sentido de obter mesma eficácia com concentrações menores ou ainda, como no caso do presente estudo, com sistemas de liberação controlada (Hintze & Paessler, 2006; Potocnik *et al.*, 2006; Berto, 2010).

### **2.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA – FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS**

Sistemas de liberação controlada (lipossomas, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, entre outros) têm sido desenvolvidos com o objetivo de promover aumento da duração de ação e diminuição da toxicidade de medicamentos; em alguns casos esses sistemas tem ainda a finalidade de melhorar a solubilidade dos mesmos (Grant & Bansinath, 2001).

Descobertos por Alec Bangham em 1963, os lipossomas consistem de esferas (vesículas) lipídicas microscópicas, biocompatíveis e biodegradáveis, com tamanho variando de 10 nm a 10  $\mu$ m, que podem ser usadas para encapsular tanto drogas hidrofílicas (no interior aquoso da esfera), quanto lipofílicas (no interior das bicamadas) (Grant, 2002).

De acordo com o número de bicamadas lipídicas podem ser classificados em unilamelares (uma única camada), multilamelares (várias camadas) e, ainda, oligolamelares (entre os unilamelares e os multilamelares). Cada um destes tipos pode ainda ser subdividido, de acordo com o tamanho, em pequenos, médios e grandes. Além destes, são relatados também os lipossomas

multivesiculares, no qual várias vesículas são encapsuladas por outra vesícula maior (Lasic & Needham, 1995).

O interesse em se estudar lipossomas parte do princípio de que com eles é possível modificar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos medicamentos já existentes, melhorando assim as taxas de sucesso (Hung 2006). Os parâmetros farmacocinéticos e dinâmicos das suspensões lipossomais foram estudados por vários autores (Yu HY *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2006; Davidson *et al.*, 2010; Tofoli *et al.*, 2010; Tofoli *et al.*, 2012).

Especificamente com relação aos anestésicos locais, vários estudos, tanto em animais, quanto em humanos, comprovam aumento da duração da anestesia (Boogaerts *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 1997; Yu HY *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2003; Grant *et al.*, 2004), bem como diminuição da toxicidade do sal anestésico, quando incorporados em lipossomas (Boogaerts *et al.*, 1993a, b; Boogaerts *et al.*, 1995; Lafont *et al.*, 1996; Malinovsky *et al.*, 1997; Davidson *et al.*, 2010).

Cereda *et al.*, 2006 constataram, em modelo animal de bloqueio do nervo infraorbital, maior eficácia anestésica da lidocaína, mepivacaína e prilocaína encapsuladas em lipossomas unilamelares, quando comparadas com os mesmos sais anestésicos na forma não encapsulada e sem aditivos. Berto, 2010 observou, no mesmo modelo animal, que a articaína encapsulada em lipossomas unilamelares é mais eficaz que a articaína sem aditivos, tanto na concentração 3% quanto na de 4%. No mesmo modelo experimental, a ropivacaína (nas concentrações de 0,125%, 0,25% e 0,5%) e a mepivacaína (0,5%, 1% e 2%) também apresentaram aumento de eficácia, quando encapsuladas em lipossomas unilamelares, comparativamente aos sais anestésicos livres de aditivos (de Araújo, 2005).

Em modelo de avaliação da anestesia pulpar com estímulo elétrico, Berto (2010) avaliou a duração da anestesia após bloqueio do nervo alveolar inferior, em ratos, com articaína 4% associada à epinefrina 1:100.000, articaína 3% e 4% encapsulada em lipossomas unilamelares e articaína 3% e 4% sem

aditivos. Não houve diferença estatística na duração da anestesia promovida pelas suspensões lipossomais de articaína, mas estas foram significativamente maiores que as formulações sem aditivos. A formulação de articaína associada à epinefrina, entretanto, foi a que apresentou maior duração de efeito pulpar.

Em humanos, a eficácia da anestesia pulpar, após infiltração de formulações de anestésico local encapsulado em lipossomas unilamelares na região de canino superior, foi avaliada em três estudos. Tofoli *et al.* (2011) observaram que a mepivacaína 2% encapsulada em lipossomas unilamelares apresentava mesma duração de anestesia que a solução comercial de mepivacaína 3% sem aditivos, enquanto a mepivacaína a 3% encapsulada em lipossomas unilamelares apresentava maior duração que a solução comercial mencionada. Entretanto, as formulações lipossomais não conseguiram promover tempo de anestesia comparável ao promovido pela solução comercial de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000, que apresentou maior duração de anestesia pulpar.

No mesmo modelo experimental, Wiziack Zago *et al.*, 2011, compararam prilocaína 3% com felipressina 0,03 UI/mL, prilocaína 3% encapsulada em lipossomas unilamelares e prilocaína 3% sem aditivos. A suspensão lipossomal de prilocaína apresentou eficácia anestésica semelhante à prilocaína sem aditivos e menor eficácia em comparação com a prilocaína associada à felipressina.

A ropivacaína encapsulada em lipossomas unilamelares também foi estudada neste modelo, apresentando resultados similares aos observados para a mepivacaína e prilocaína (Tofoli *et al.*, 2011; Wiziack Zago *et al.*, 2011). Franz-Montan *et al.*, 2011 compararam a ropivacaína 0,5% encapsulada em lipossomas com as soluções de ropivacaína 0,5% sem aditivos, ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 e lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000 e observaram maior eficácia anestésica com as formulações contendo epinefrina em relação às demais.

Os resultados obtidos nestes estudos com anestésicos locais encapsulados em lipossomas unilamelares grandes de 400 nm (Tofoli *et al.*, 2011; Wiziack-Zago *et al.*, 2011; Berto, 2010, Franz-Montan *et al.*, 2011) ainda não atingiram o ideal, pois ainda se busca eficácia maior ou equivalente à obtida com as formulações comerciais de anestésicos locais associados a vasoconstritor. Nesse sentido, os caminhos possíveis para se conseguir maior eficácia seriam o aumento da concentração lipídica nos lipossomas unilamelares, pois aumentando a concentração lipídica, poderia ser aumentada a quantidade de anestésico encapsulado, promovendo assim uma liberação mais lenta do anestésico ou ainda o uso de lipossomas multilamelares, aumentando assim a capacidade de encapsulação e o tempo de permanência dos lipossomas no local injetado (Grant & Bansinath, 2001).

A encapsulação de bupivacaína em lipossomas multilamelares tem mostrado resultados positivos em vários estudos realizados em animais (Grant *et al.*, 1997; Yu HY *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2003) e também em humanos (Boogaerts *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 2004).

Em ratos, Grant *et al.* (1997) observaram aumento da duração da anestesia após injeção, por via subcutânea no abdômen, de bupivacaína 2% encapsulada em lipossomas multilamelares em relação à bupivacaína 0,5% sem aditivos (180 min e 23 min, respectivamente). Também foi observado aumento da duração da anestesia após infiltração na cauda de ratos com 1 mg de bupivacaína encapsulada em lipossomas multilamelares em comparação à mesma dose de bupivacaína sem aditivos (447 min versus 87 min) (Yu HY *et al.*, 2002).

Em camundongos, no mesmo modelo utilizado por Grant *et al.* (1997), a encapsulação de bupivacaína 0,5%, 1% e 2% em lipossomas multilamelares resultou em aumento significativo da duração da anestesia em relação ao observado com a injeção de bupivacaína 0,5% sem aditivos, sendo relatados tempos de 3 h, 6 h, 26 h e 1h, respectivamente (Grant *et al.*, 2003).

Em humanos, além de dois relatos de casos clínicos (Lafont *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1996) um estudo clínico em voluntários (Boogaerts *et al.*, 1994)

mostrou aumento da duração do período de analgesia (ausência de dor) com a encapsulação de bupivacaína em lipossomas multilamelares em comparação a solução de bupivacaína associada à epinefrina. Neste estudo foi avaliada a dor pós-operatória em vários tipos de cirurgia.

Ainda em humanos, Grant *et al.* (2004) observaram aumento da duração da anestesia para 19 h, 38 h e 48 h, respectivamente com formulações lipossomais multilamelares de bupivacaína nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%, enquanto que a bupivacaína sem aditivos apresentou média de duração de apenas 1 h. Neste estudo as formulações foram injetadas por via subcutânea na região lombar de seis voluntários.

Além do aumento da eficácia anestésica, também foi demonstrada diminuição da toxicidade da bupivacaína com a encapsulação em lipossomas multilamelares. Usando a mesma metodologia de Grant *et al.* (2004), Davidson *et al.* (2010) avaliaram a concentração máxima plasmática de bupivacaína após injeção subcutânea, em oito voluntários, de 20 mL de bupivacaína 0,5% sem aditivos e o mesmo volume bupivacaína 2% encapsulada em lipossomas multilamelares, constatando ausência de diferença entre as duas formulações, embora a formulação lipossomal contivesse concentração anestésica quatro vezes maior que a solução de bupivacaína.

As características favoráveis da articaína (Paxton & Thome, 2010), bem como o aumento da sua eficácia com a encapsulação em lipossomas unilamelares (Berto, 2010) e ainda os resultados promissores obtidos com a encapsulação da bupivacaína em lipossomas multilamelares em comparação à formulação contendo epinefrina (Boogaerts *et al.*, 1994), motivaram a realização do presente estudo.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Este estudo teve como objetivo comparar a eficácia anestésica de duas formulações de articaína 4%, encapsulada em lipossomas unilamelares e em lipossomas multilamelares, com a promovida pela solução comercial de articaína 4% com epinefrina 1:100.000, em três modelos, bloqueio do nervo infraorbital, bloqueio do nervo alveolar inferior e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, sendo todos realizados em ratos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP (protocolo nº 1938-1, Anexo 1), este trabalho utilizou 105 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos, machos, pesando entre 250-350g. Os animais foram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP), e permaneceram em ambiente com temperatura controlada ( $22^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ), ciclos claro-escuro estabelecidos (12/12h), com água e comida *ad libitum*. Os animais permaneceram por pelo menos 20 dias no Biotério da FOP até que fosse atingido peso adequado para realização dos estudos.

### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos distintos de acordo com a formulação anestésica utilizada. Para cada formulação anestésica foi utilizada formulação controle apropriada, conforme descrição a seguir:

Formulações anestésicas:

- **Arti-LUV**: Suspensão lipossomal unilamelar de articaína 4%
- **Arti-MLV**: suspensão lipossomal multilamelar de articaína 4%
- **Arti-Epi**: solução de articaína 4% com epinefrina 1:100.000

Formulações controle negativo:

- **LUV**: suspensão lipossomal unilamelar
- **MLV**: suspensão lipossomal multilamelar
- **NaCl 0,9%**: solução de cloreto de sódio 0,9%

A Figura 2 mostra o resumo do delineamento experimental do presente trabalho. As formulações foram avaliadas em três modelos experimentais, em ratos:

- Bloqueio do nervo infraorbital – **BNIO** – (Fink *et al.*, 1975);
- Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica – **ISFC** – (Grant *et al.*, 1997);
- Bloqueio do nervo alveolar inferior – **BNAI** – (Silva *et al.*, 2009).

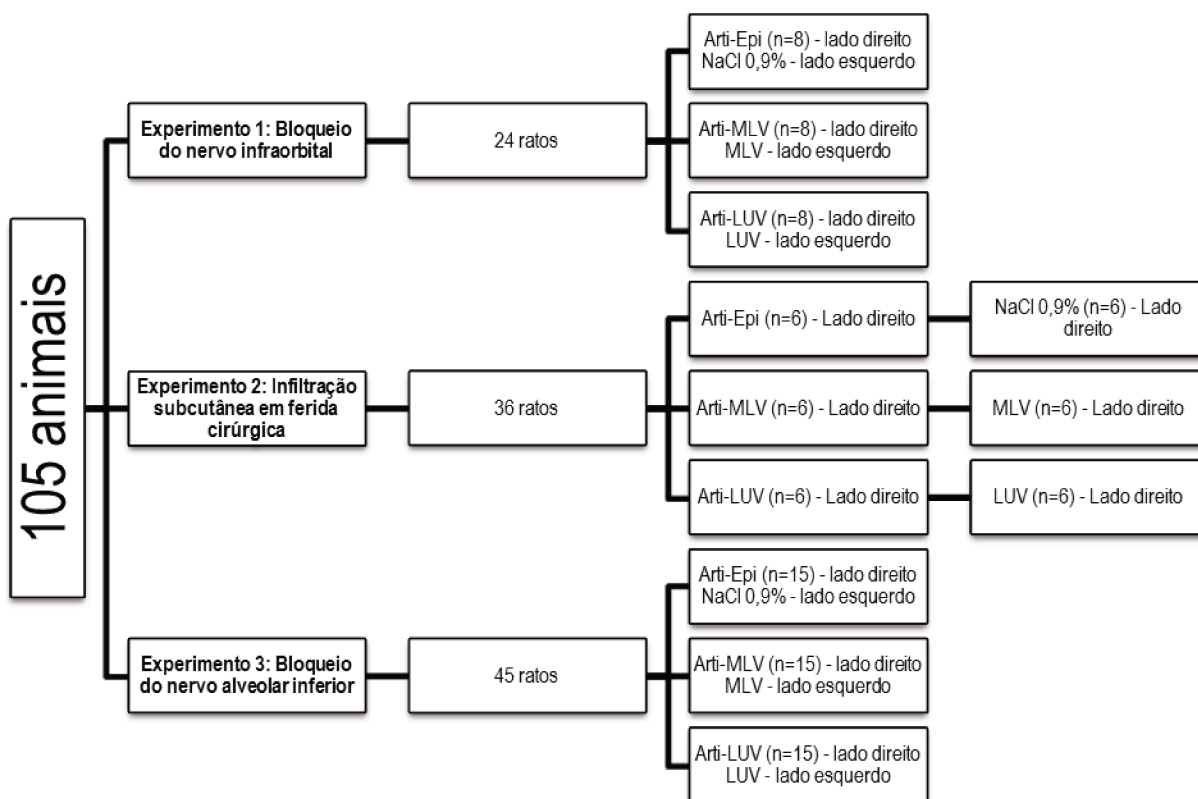


Figura 2 - Resumo do delineamento experimental.

Todos os ensaios foram caracterizados como cegos, ou seja, a avaliação dos parâmetros de anestesia foi realizada por pesquisador que não tinha conhecimento de qual formulação havia sido aplicada. Um único pesquisador realizou todas as injeções de cada experimento.

Para o bloqueio do nervo infraorbital 24 ratos foram divididos em 3 grupos (8 animais por grupo) e para o bloqueio do nervo alveolar inferior foram utilizados 45 animais, sendo 15 animais por grupo. Nos dois modelos experimentais cada animal recebeu uma das formulações contendo articaína no lado direito e a respectiva formulação controle negativo do lado esquerdo.

No modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, 36 ratos foram divididos em 6 grupos de 6 animais cada. Em cada grupo os animais receberam uma das formulações, contendo articaína ou controle, na pata traseira direita.

### **4.3 MATERIAL**

Neste estudo foram utilizadas solução articaína a 4% com epinefrina 1:100.000 (Articaine® com epinefrina 1:100.000 – DFL Ind. Com. SA, Rio de Janeiro, Brasil) e solução de cloreto de sódio 0,9% (Equiplex Ind. Farm., Brasil) (NaCl 0,9%). Para a preparação das formulações lipossomais (descrita no item 4.4) foram utilizados cloridrato de articaína (DFL Ind. Com. SA, Rio de Janeiro, Brasil), acetato de  $\alpha$ -tocoferol, fosfatidilcolina de ovo e colesterol (Sigma Chem. Co.) e tampão HEPES 20 mM com NaCl 154 mM (Q-biogene).

Para promover sedação nos animais foi utilizado tiopental sódico (Tionembutal®, Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda); para a anestesia geral foram utilizados xilazina (Rompun®) e ketamina (Dopalen®) no experimento de bloqueio do nervo alveolar inferior e Isoflurano (Isoforine, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil) no modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica.

A administração de todas as substâncias injetadas nos animais (formulações anestésicas locais, formulações controle, anestésico geral e agente para sedação) foram realizadas com agulhas descartáveis 13 X 4,5 (BD PrecisionGlide® - 26G, Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR, Brasil), acopladas a seringas centesimais de 1 mL (BD® Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR, Brasil).

Para a avaliação da anestesia na técnica de bloqueio do nervo infraorbital foi utilizada pinça dente de rato (Golgran®). Para o experimento de bloqueio do nervo alveolar inferior foram utilizados fios de cobre desencapados nas duas extremidades para fixação à superfície oclusal dos molares inferiores dos ratos, solução a base de ácido fosfórico a 37% em forma de gel (MAGIC ACID

Gel, Vigodente®), algodão, pinça clínica para algodão (Golgran®), adesivo fotopolimerizável (MAGIC BOND, Vigodente®), pincel com cerdas macias, resina fotopolimerizável (Z100, 3M ESPE®), espátula para inserção de resina composta e aparelho Fotopolimerizador (Gnatus®).

No experimento de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica foram utilizados: lâmina de bisturi descartável nº10, cabo de bisturi, porta-agulhas de Mayo-Hegar, tesoura de Metzembaum curva, 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, algodão e béquer.

Além desses materiais, foram ainda utilizados: mesas clínicas para imobilização dos animais, aparelho emissor de impulsos elétricos pulp tester elétrico Vitality Scanner modelo 2006 (Analytic Technology, Redmond, EUA), gaiolas plásticas específicas para analgesímetro de von Frey (23 x 20 x 18 cm - largura x profundidade x altura), com fundo aramado (trama de 0,5 x 0,5 cm) acopladas a espelho angulado abaixo do fundo aramado (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e aparelho para aplicação de força com intensidade controlada analgesímetro digital von Frey (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

#### **4.4 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES LIPOSSOMAIS**

As suspensões lipossomais foram preparadas no laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob orientação da Profa. Dra. Eneida de Paula.

##### **4.4.1 Preparação da suspensão lipossomal multilamelar de articaína**

Os lipossomas multilamelares foram preparados pelo método de hidratação de filme seco. Para a obtenção deste filme seco foram utilizadas alíquotas das soluções de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e alfa tocoferol na proporção de 4:3:0,07. Solução de fosfatidilcolina de ovo em clorofórmio foi colocada em um tubo de ensaio e submetida a evaporação sob fluxo de

nitrogênio. Em seguida, foi adicionada ao tubo solução de colesterol em clorofórmio, sendo a mesma submetida ao mesmo processo de evaporação descrito para a solução de fosfatidilcolina de ovo em clorofórmio. Após este procedimento, foi colocada no tubo solução de alfa tocoferol em clorofórmio, sendo submetida ao mesmo procedimento de evaporação descrito para as soluções de fosfatidilcolina de ovo e colesterol. Após evaporação das três soluções sob fluxo de nitrogênio o tubo foi levado à vácuo durante 2 h à temperatura ambiente formando então o filme lipídico seco. (Boogaerts *et al.*, 1993 a,b; Fraceto *et al.*, 2002).

Este filme seco foi então hidratado com tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 com NaCl 154 mM, sendo a dispersão submetida a agitação em vórtex durante 5 minutos. Com este procedimento formaram-se lipossomas multilamelares, com concentração lipídica de 8 mM. A essa preparação foi incorporado cloridrato de articaína, atingindo concentração final de 4%. A preparação sem anestésico foi utilizada como controle em todos os experimentos.

#### **4.4.2 Preparação da suspensão lipossomal unilamelar de articaína**

Após a obtenção dos lipossomas multilamelares, estes foram passados em um extrusor (Extrusor Lipex Biomembranes Inc.), sob pressão de nitrogênio, à temperatura ambiente, através de um disco de drenagem e duas membranas de polycarbonato (Poretics) com poros de 0,4  $\mu\text{m}$ , por 12 vezes. Esse processo permitiu a obtenção de lipossomas unilamelares de 0,4  $\mu\text{m}$  (400 nm). Após este procedimento, a suspensão lipossomal unilamelar foi mantida em repouso por 2 horas para o intumescimento dos lipossomas e o sal de cloridrato de articaína foi adicionado, proporcionando concentração final de 4%. Da mesma forma que para a preparação multilamelar, a suspensão sem anestésico foi utilizada como controle em todos os experimentos e a concentração lipídica foi de 8 mM.

Todas as preparações foram submetidas à aferição de pH (pHmetro ORION®, modelo 290<sup>a</sup> 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.

#### **4.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANESTÉSICA**

A eficácia anestésica foi avaliada em 3 modelos animais: BNIO, com o objetivo de avaliar anestesia de tecido mole da região perioral; ISFC, para avaliar anestesia em tecido mole inflamado; e BNAI, como a finalidade de avaliar anestesia em tecido pulpar.

##### **4.5.1 Experimento 1 - Bloqueio do Nervo Infraorbital**

Descrito pela primeira vez por Fink *et al.*, 1975, este modelo é altamente reprodutível e confiável. O nervo infraorbital do rato é homólogo ao humano, sendo responsável pela inervação do lábio superior e pele desta região. Emerge do crânio pelo forame infraorbital situado logo abaixo da órbita, no espaço entre os molares e o dente incisivo de cada lado da maxila do animal, sendo este o local de deposição das soluções (Figura 3A) (Cereda *et al.*, 2006).

O experimento foi realizado após sedação dos animais com tiopental sódico (25mg/kg) e comprovação de que o animal encontrava-se responsivo a estimulação dolorosa (preensão da cauda e pinçamento do lábio). A agulha foi introduzida no fórnice do vestíbulo, aproximadamente na metade da distância entre o incisivo e o primeiro molar superior, sendo direcionada ao forame infraorbital, onde foi injetado 0,1 mL da formulação contendo articaína no lado direito (Figuras 3A e 3B) e da respectiva formulação controle no lado esquerdo.

Cinco minutos após as injeções foi iniciada a avaliação da anestesia, por pinçamento do lábio do animal, sendo atribuído os escores “0” para presença de resposta aversiva e “1” para ausência de resposta aversiva. Este teste foi realizado a cada 5 minutos até que fosse obtido o primeiro sinal de resposta aversiva do animal, podendo ser movimentação brusca da cabeça ou dos membros dianteiros e/ou traseiros (Cereda *et al.*, 2004).

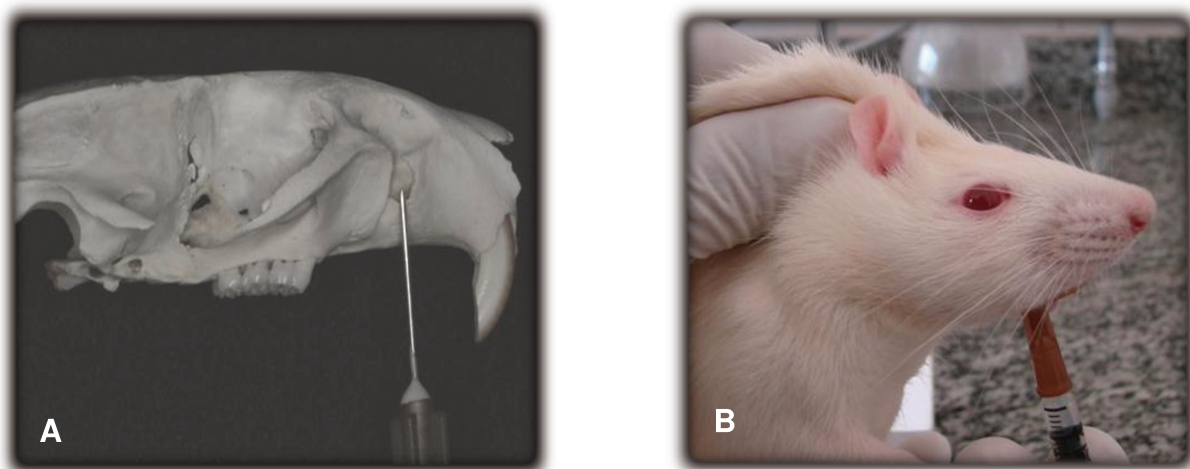


Figura 3 - **A:** Posição do forame infraorbital; **B:** Local de injeção do anestésico para bloqueio do nervo infraorbital.

#### 4.5.2 Experimento 2 – Infiltração Subcutânea em Ferida Cirúrgica

Este experimento utilizou o modelo de resposta de retirada da pata a estímulo nociceptivo (aplicação de força com filamentos de von Frey) após desenvolvimento de inflamação em ferida cirúrgica, gerando hipernocicepção. Foi utilizado o modelo descrito por Vandermeulen *et al.*, (1994) e Brennan *et al.*, (1996), modificado por Grant *et al.*, 1997. No presente estudo foi utilizado um analgesímetro eletrônico.

No primeiro dia do experimento, os ratos foram colocados em gaiolas específicas, com fundo aramado, que permitem a aplicação de força com o analgesímetro de von Frey, por 15 a 30 minutos para ambientalização.

Em seguida, foi avaliada a sensibilidade basal da pata traseira direita pela aplicação de força com intensidade crescente, de acordo com Grant *et al.*, 1997 (variando de 0,0073 N a 0,456 N, equivalente a 0,73 g a 45,6 g, mostrado no visor do aparelho) 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 frente ao estímulo aplicado. A aplicação do estímulo foi realizada por três vezes, com intervalos de 5 minutos entre as aplicações, sendo a média das três medidas considerada como a sensibilidade basal da pata do animal.

Depois de obtido o limiar basal, os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica, dentro de uma capela com exaustão e anestesiados com isofluorano (colocado em um algodão no fundo de um béquer), sendo então submetidos à incisão, com lâmina de bisturi nº 10, na superfície plantar da pata traseira direita. A profundidade da incisão foi estabelecida em 3 mm e mensurada a partir das dimensões da lâmina, que apresenta chanfro de 4 mm. Desta forma, a incisão foi feita mantendo 1 mm do chanfro da lâmina fora dos tecidos. A extensão da incisão foi estabelecida em 1 cm, demarcada na pata do animal com auxílio de um paquímetro. Em seguida, a incisão foi suturada com fio de nylon 6-0 com três pontos isolados (Figura 4). Nas 24 horas seguintes os animais permaneceram em gaiolas plásticas com cama de maravalha, recebendo água e alimentação à vontade.

Após este período de repouso, os animais foram novamente colocados nas gaiolas com fundo aramado já descritas, por 15 a 30 minutos para ambientalização, sendo, em seguida, avaliada a sensibilidade da pata traseira direita, por meio da aplicação da ponta do analgesímetro lateralmente à ferida cirúrgica. Conforme descrito anteriormente a avaliação foi realizada três vezes, em intervalos de 5 minutos, com aplicação de força crescente variando de 0,0073N a 0,456N (equivalente a 0,73g a 45,6g). Neste experimento foram utilizados apenas animais que apresentaram hipernocicepção ao estímulo, ou seja, aqueles que apresentaram a média das três medidas de força necessária para promover a retirada da pata 20% menor que a observada antes da realização da ferida cirúrgica (basal), conforme estabelecido por Grant *et al.* (1997).

Os ratos que apresentaram resposta hipernociceptiva foram divididos aleatoriamente em 6 grupos, com 6 animais em cada grupo, e receberam ao lado da incisão, a injeção de 0,1 mL da formulação contendo anestésico ou da formulação controle (Figura 4).



Figura 4. Infiltração subcutânea na ferida cirúrgica

Decorridos cinco minutos desse procedimento, foi iniciada a avaliação do efeito anestésico pela aplicação de força com o analgesímetro de von Frey lateralmente à incisão, ou seja, no local de aplicação das formulações, a cada 10 minutos, da forma já descrita.

A anestesia foi considerada como ausência de reflexo de retirada da pata (elevação da pata) frente a estímulo de 0,457N (45,7g no visor) e a duração da anestesia como o tempo decorrido entre a infiltração das formulações na ferida até o último tempo no qual o animal não apresentou o reflexo de retirada da pata.

#### **4.5.3 Experimento 3 - Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior**

O modelo de bloqueio do nervo alveolar inferior utilizado neste estudo foi descrito por Silva *et al.*, 2009, idealizado a partir da descrição da inervação da mandíbula e dos dentes inferiores no rato feita por Naftel *et al.*, 1999 e já utilizado por Gayoso, 2009; Berto, 2010; Bhering, 2010

Neste modelo a avaliação da anestesia pulpar é realizada pela aplicação de estímulo elétrico a fios de cobre fixados na superfície oclusal dos

molares inferiores do animal, observando-se a presença ou não de resposta aversiva do animal (descrita no item 4.5.3.2).

A sequência resumida do estudo consta da anestesia geral do animal, fixação dos fios de cobre à superfície oclusal dos molares inferiores, retorno da anestesia geral, sedação dos animais, avaliação da sensibilidade basal pulpar a estímulo elétrico, bloqueio do nervo alveolar inferior e avaliação dos parâmetros da anestesia com a aplicação de estímulo elétrico.

#### *4.5.3.1 Fixação de fios de cobre à superfície oclusal dos molares*

A primeira etapa consta da fixação dos fios de cobre à superfície oclusal dos molares inferiores do rato. Para esta etapa os animais foram submetidos à anestesia geral com uso de xilazina (10 mg/kg) e ketamina (90 mg/kg) administrados por via intramuscular. Sob efeito da anestesia geral, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica de modo que a boca pudesse permanecer aberta para a fixação dos fios de cobre.

A fixação dos fios de cobre aos dentes foi realizada com resina fotopolimerizável, utilizada para restaurações dentais, adaptada às dimensões da cavidade bucal do animal. A técnica consistiu da aplicação de ácido fosfórico a 37% na superfície oclusal dos molares inferiores por 20 segundos, seguida de remoção do mesmo com algodão embebido em água e secagem da superfície oclusal com algodão seco. A aplicação do ácido foi realizada a fim de condicionar a superfície do esmalte dental para permitir a adesão da resina e fixação dos fios de cobre. Logo após, foi aplicado o adesivo com um pincel de cerdas macias, seguido da fotopolimerização por 20 segundos. Com auxílio da espátula de inserção, a resina composta foi aplicada sobre os fios de cobre posicionados sobre a oclusal dos molares inferiores (um fio de cada lado), sendo em seguida submetida à fotopolimerização. As extremidades dos fios encontravam-se desencapadas, ficando assim uma extremidade em contato com os molares inferiores e a outra fora da cavidade oral.

#### 4.5.3.2 Bloqueio do nervo alveolar inferior

Após retorno da anestesia geral (cerca de duas a três horas) e estando os animais completamente responsivos a estimulação dolorosa (observado através de resposta do animal à preensão da cauda), iniciou-se a segunda etapa do experimento.

Os animais foram sedados com 25 mg/Kg de tiopental sódico a 2% por via intraperitoneal, mantendo reação a estímulos dolorosos. Foi então testada a sensibilidade pulpar dos molares de cada lado por meio da aplicação de estímulo elétrico, conforme descrito no item 4.5.3.3.

Obtido o limiar basal dos animais, foi feita palpação do ângulo da mandíbula para que se delimitasse o local da injeção. Aproximadamente 11 a 13 mm da agulha descartável (13 x 4,5), acoplada a seringa centesimal de 1 mL, foi introduzida em ângulo de 30 a 45° com a base do ângulo da mandíbula do animal, pela face interna. A agulha foi introduzida com bisel voltado para o osso, até que fosse sentida resistência óssea, sendo esta a posição final de injeção, onde foram depositados 0,2 mL da formulação contendo articaína (lado direito) ou controle (lado esquerdo) (Figura 5). Após a injeção das formulações foram avaliados os parâmetros da anestesia com a aplicação de estímulo elétrico, conforme descrição no item 4.5.3.3.

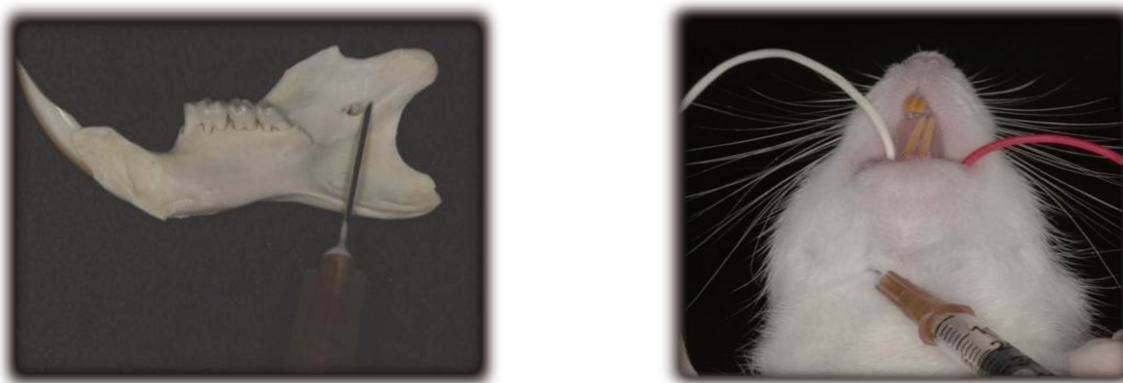


Figura 5 - **A:** Posição do forame mandibular; **B:** local de injeção do anestésico para bloqueio do nervo alveolar inferior

#### 4.5.3.3 Avaliação da sensibilidade pulpar a estímulo elétrico

A avaliação da sensibilidade pulpar a estímulo elétrico é feita com o aparelho “pulp tester”, o qual é utilizado para verificação da vitalidade pulpar em endodontia e na avaliação da anestesia pulpar em experimentos com anestésicos em humanos e animais (Tortamano *et al.*, 2009; Silva, *et.al.*, 2009; Nuzum *et al.*, 2010; Batista da Silva *et al.*, 2010; Meechan *et al.*, 2011; Tofoli *et al.*, 2011; Wiziack Zago *et al.*, 2011; Franz-Montan *et al.*, 2011).

Este aparelho emite impulsos elétricos de forma intermitente e progressiva até atingir o máximo de 300V. No visor do aparelho o aumento da voltagem é mostrado em uma escala arbitrária de 0 a 80, sendo este o limite máximo do aparelho. O aparelho consta de uma unidade geradora de impulsos elétricos, um fio condutor com um eletrodo na extremidade, o qual é aplicado diretamente ao dente (no caso de experimentos em humanos) ou ao fio de cobre em contato com os dentes (no caso de ratos), além de um fio terra.

Ao ser transmitida ao dente, a corrente estimula as fibras sensoriais de condução rápida da junção dentina-polpa, sendo percebida pelo animal ou humano (Certosimo & Archer, 1996). Em experimentos com ratos a percepção do estímulo elicia resposta aversiva do animal que apresenta reação repetitiva, sincronizada com o estímulo elétrico do aparelho, não observada na ausência do estímulo. Esta reação repetitiva pode manifestar-se como movimentação da cabeça e/ou dos músculos faciais, das vibrações ou dos membros superiores.

Em estudos de avaliação da eficácia anestésica pulpar primeiramente é avaliada a sensibilidade basal de resposta pulpar, por meio de três medidas com o pulp tester, sendo a média destas medidas considerada como a resposta basal. Após a injeção da formulação anestésica, a ausência de percepção do estímulo máximo emitido pelo aparelho é considerada como anestesia pulpar.

No presente estudo os molares de cada lado foram testados por meio da aplicação do estímulo elétrico na extremidade do fio de cobre externa à cavidade oral do animal. Assim que a resposta aversiva era observada, o eletrodo era afastado do fio de cobre conectado ao dente e o valor que aparecia no visor

do aparelho era anotado. A média dos valores das três medidas foi considerada como o limiar basal (avaliado separadamente para cada lado do animal). O intervalo entre cada medida foi de 2 minutos.

Para a avaliação da eficácia anestésica das formulações, a aplicação de estímulo elétrico foi iniciada 2 min após a injeção das mesmas. O estímulo elétrico foi aplicado a cada 2 minutos durante os primeiros 10 minutos, para estabelecer o tempo de latência das preparações. Os animais que apresentaram resposta aversiva ao estímulo elétrico (conforme descrito anteriormente) após esse período, no lado em que foi injetada formulação anestésica (lado direito), foram considerados como insucesso da anestesia. Já os que apresentaram ausência de resposta aversiva ao estímulo máximo emitido pelo aparelho, continuaram a receber aplicação de estímulo elétrico a cada 5 minutos até a observação de retorno de resposta aversiva do animal, ou seja, final da anestesia e retorno à sensibilidade.

A aplicação do estímulo elétrico também foi realizada do lado esquerdo, no qual foram aplicadas as formulações controle, para garantir o funcionamento correto do aparelho e a responsividade do animal.

#### *4.5.3.4 Parâmetros da anestesia*

A eficácia anestésica das formulações foi avaliada de acordo com os seguintes parâmetros:

- Tempo de latência: intervalo de tempo entre o final da injeção da solução anestésica e o início de ausência de resposta aversiva 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 10 minutos e permaneceu

anestesiado por pelo menos 10 minutos (Kanaa *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2008; Wiziack Zago *et al.*, 2011; Franz-Montan *et al.*; 2011)

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise dos resultados foi realizada com uso do software BioEstat 5.0 para Windows® (Instituto Mamirauá, Belém, PA), sendo estabelecido nível de significância de 5%.

Os resultados de duração da anestesia nos modelos de bloqueio do nervo infraorbital e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica e de latência da anestesia no bloqueio do nervo alveolar inferior foram comparados pelos testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls; a duração da anestesia no bloqueio do nervo alveolar inferior foi submetida à ANOVA; o sucesso da anestesia nos modelos de bloqueio do nervo infraorbital e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica foi avaliado pelo teste de Log-Rank. O sucesso da anestesia no bloqueio do nervo alveolar inferior foi comparado pelo teste Exato de Fisher.

## 5 RESULTADOS

Os pHs (média  $\pm$  desvio padrão) das formulações de articaína com epinefrina, articaína lipossomal unilamelar e articaína lipossomal multilamelar foram, respectivamente,  $3,7 \pm 0,3$ ;  $6,6 \pm 0,3$  e  $6,7 \pm 0,2$ .

### 5.1 BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL

O bloqueio do nervo infraorbital proporcionou anestesia da metade do lábio superior no lado injetado com as formulações anestésicas, em todos os animais. A anestesia foi observada já na primeira avaliação após a injeção. O lado injetado com as formulações controle permaneceu responsivo ao estímulo aversivo e, portanto, essas formulações não apresentaram efeito anestésico.

As porcentagens de sucesso da anestesia em função do tempo são mostradas na Figura 6. Nela é possível observar que 100% dos animais que receberam Arti-Epi permaneceram anestesiados por no mínimo 145 minutos, enquanto os que receberam Arti-MLV permaneceram anestesiados por no mínimo 95 minutos e aqueles que receberam Arti-LUV permaneceram anestesiados por no mínimo 75 minutos. A formulação lipossomal unilamelar de articaína (Arti-LUV) apresentou menor taxa de sucesso (Log-Rank;  $p < 0,05$ ) que as demais formulações (articaína com epinefrina – Arti-Epi e formulação lipossomal multilamelar de articaína – Arti-MLV), não sendo observada diferença entre estas ( $p > 0,05$ ).

A Figura 7 mostra a duração da anestesia proporcionada pelas três formulações estudadas. Os tempos de duração (mediana e desvio interquartilico, em minutos) após BNIO foram respectivamente: Arti-Epi  $163 \pm 17,5$ ; Arti-MLV  $140 \pm 62,5$  e Arti-LUV  $140 \pm 31,25$ . A formulação contendo epinefrina apresentou maior duração (Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls;  $p < 0,05$ ) que a formulação lipossomal unilamelar. A formulação multilamelar não diferiu das demais ( $p > 0,05$ ).

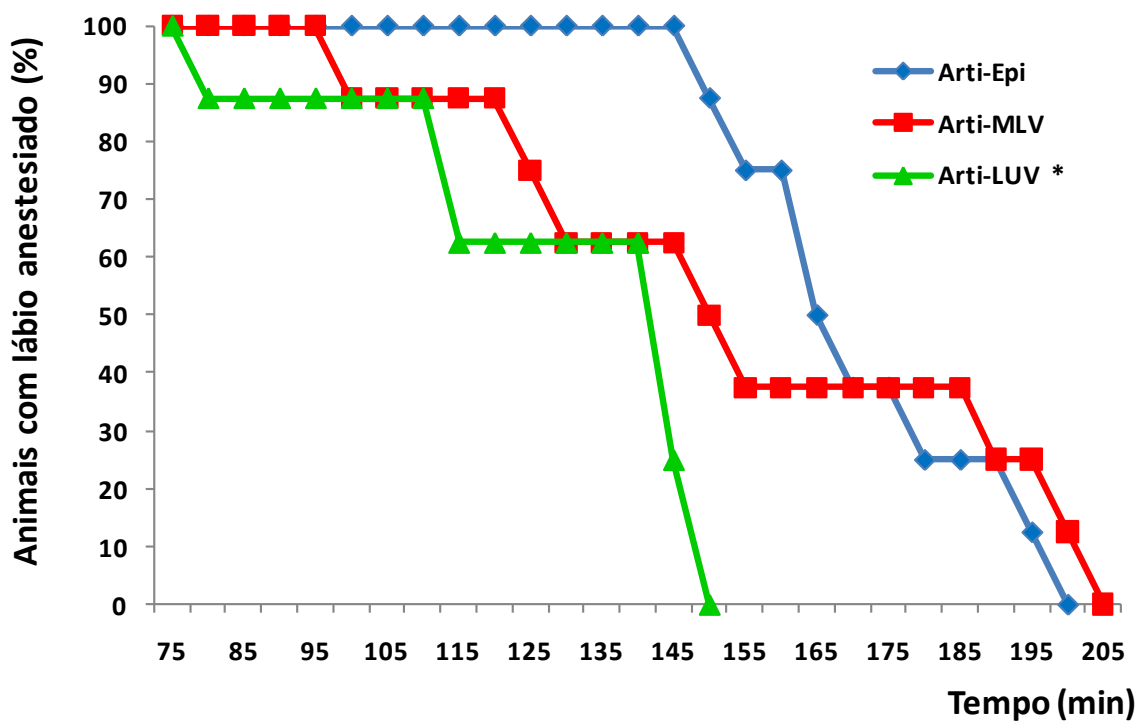


Figura 6 - Sucesso da anestesia (% de animais com o lábio superior anestesiado) após bloqueio do nervo infraorbital com formulações de articaína (articaína com epinefrina - Arti-Epi, articaína lipossomal multilamelar - Arti-MLV e articaína lipossomal unilamelar – Arti-LUV) (n=8 ratos/grupo; Log-Rank; \* p<0,05 em relação às demais formulações).

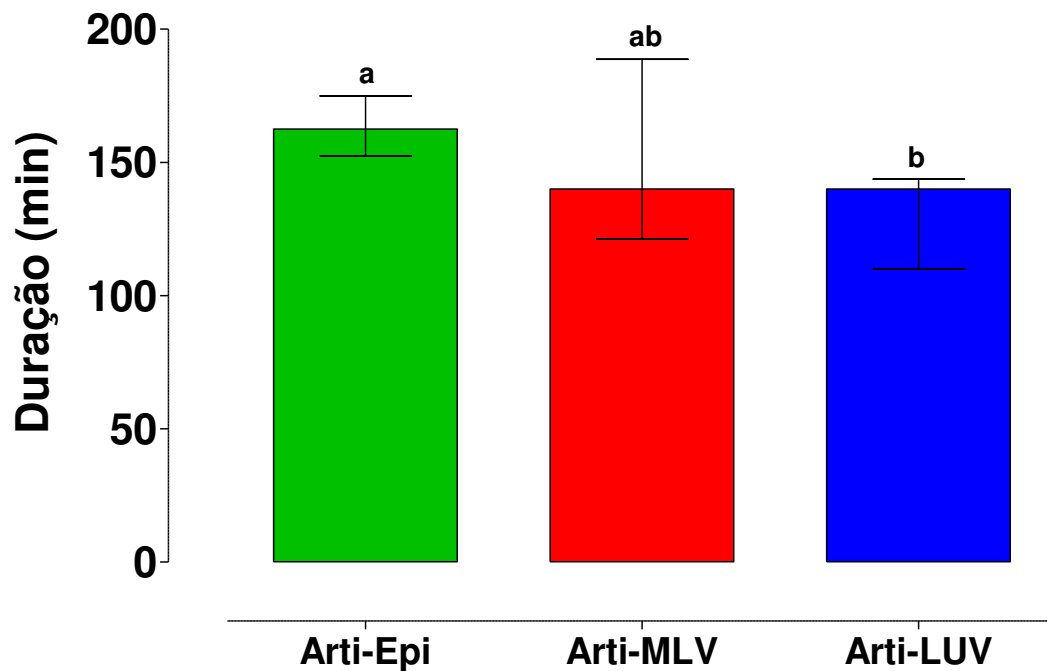


Figura 7 - Duração da anestesia (mediana e desvio interquartilico, em minutos) no lábio superior após bloqueio do nervo infraorbital, em ratos, com formulações de articaína (articaína com epinefrina - Arti-Epi, articaína lipossomal multilamelar - Arti-MLV e articaína lipossomal unilamelar – Arti-LUV). (n= 8 ratos/grupo; Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls; letras distintas indicam  $p < 0,05$ ).

## 5.2 INFILTRAÇÃO SUBCUTÂNEA EM FERIDA CIRÚRGICA

Todos os animais que se submeteram ao procedimento cirúrgico apresentaram diminuição de pelo menos 20% no limiar de sensibilidade ao estímulo do von Frey e, portanto, não houve necessidade de descarte de nenhum animal.

O sucesso da anestesia após injeção das formulações anestésicas nas patas está mostrado na Figura 8, sendo que 100% dos animais que receberam Arti-Epi permaneceram anestesiados por no mínimo 120 minutos, enquanto os que receberam Arti-MLV permaneceram anestesiados por no mínimo 60 minutos e os que receberam Arti-LUV permaneceram anestesiados por no mínimo 40 minutos. Neste modelo, a solução contendo articaína com epinefrina mostrou maior taxa de sucesso ( $p < 0,05$ ) que as formulações lipossomais, as quais não apresentaram diferença entre si ( $p > 0,05$ ).

Os tempos de duração (mediana e desvio interquartilico, em minutos) após injeção das formulações anestésicas nas patas foram respectivamente: Arti-Epi  $150 \pm 67,50$ ; Arti-MLV  $65 \pm 17,50$  e Arti-LUV  $55 \pm 17,50$  e estão mostrados na figura 9. A solução contendo articaína com epinefrina mostrou maior tempo de duração ( $p < 0,05$ ) que as formulações lipossomais, as quais não apresentaram diferença entre si ( $p > 0,05$ ).

Da mesma forma que no modelo de bloqueio do nervo infraorbital, todos os animais apresentaram ausência de resposta ao estímulo aversivo na pata a partir do primeiro tempo de avaliação após a injeção das formulações anestésicas. As formulações controle não promoveram anestesia após infiltração na pata dos animais.

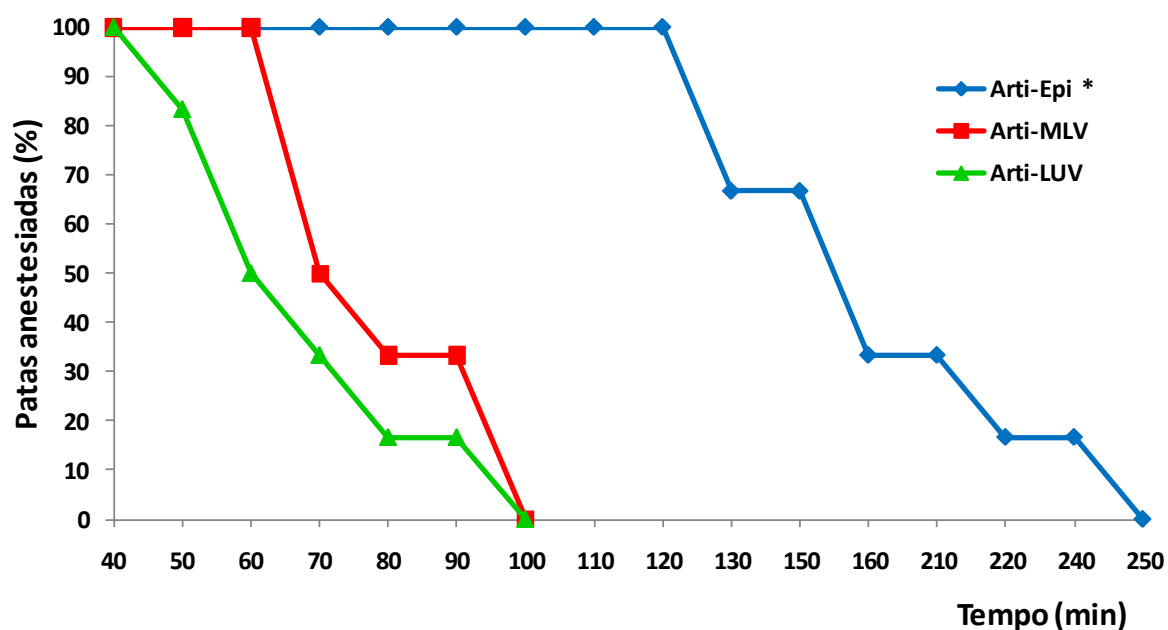


Figura 8 - Porcentagem de animais com anestesia na pata submetida a inflamação por incisão cirúrgica, após infiltração com formulações de articaína (articaína com epinefrina - Arti-Epi, articaína lipossomal multilamelar - Arti-MLV e articaína lipossomal unilamelar – Arti-LUV). (n= 6 ratos/grupo; Log-Rank; \*  $p < 0,05$  em relação às demais formulações).

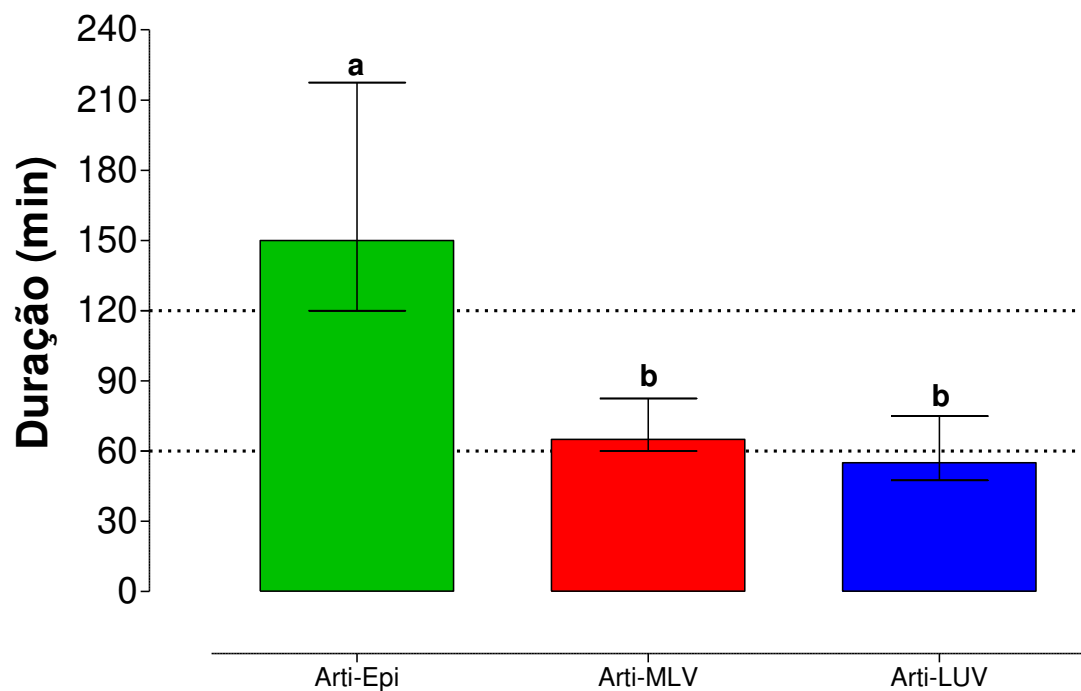


Figura 9 - Duração da anestesia (mediana e desvio interquartilico, em minutos) nas patas submetidas a inflamação por incisão cirúrgica, após injeção com as formulações (articaína com epinefrina - Arti-Epi, articaína lipossomal multilamelar - Arti-MLV e articaína lipossomal unilamelar - Arti-LUV). (n= 6 ratos/grupo; Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls; letras distintas indicam  $p<0,05$ ).

### 5.3 BLOQUEIO DO NERVO ALVEOLAR INFERIOR

Neste experimento não foi observada diferença entre as formulações contendo anestésico local com relação à latência (Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ), ao sucesso (teste Exato de Fisher  $p>0,05$ ) e à duração da anestesia (ANOVA;  $p>0,05$ ). As formulações controle não mostraram efeito anestésico.

Os resultados de latência (mediana e desvio interquartilico, em minutos) após bloqueio do nervo alveolar inferior foram respectivamente: Arti-Epi  $2 \pm 0$ , Arti-MLV  $4 \pm 0$  e Arti-LUV  $4 \pm 2$  (Figura 10).

Os resultados de sucesso da anestesia, obtidos no bloqueio do nervo alveolar inferior com as formulações contendo articaína, são mostrados na Figura 11.

Os resultados de duração (media e desvio padrão, em minutos) após BNAI foram respectivamente: Arti-Epi  $35 \pm 14,4$ ; Arti-MLV  $27,3 \pm 13,2$  e Arti-LUV  $34,2 \pm 17,9$  e estão mostrados na Figura 12.

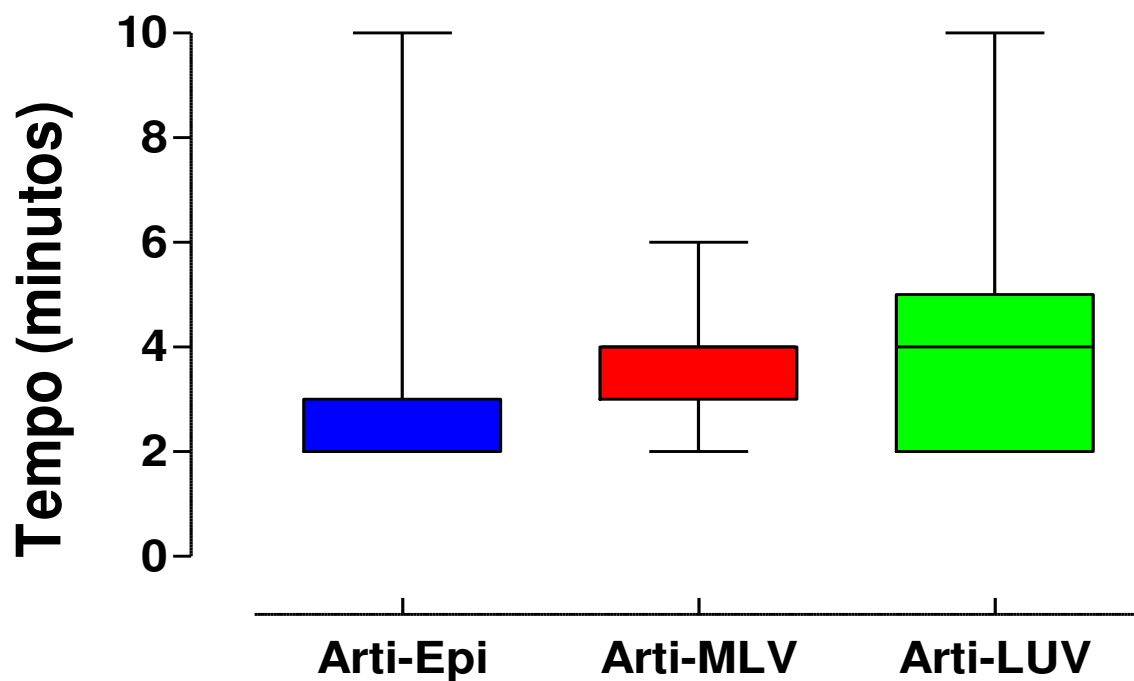


Figura 10 - Latência da anestesia (em minutos) após bloqueio do nervo alveolar inferior, em ratos, com formulações de articaína (articaína com epinefrina - Arti-Epi, articaína lipossomal multilamelar - Arti-MLV e articaína lipossomal unilamelar – Arti-LUV). (Linha central: mediana; caixa: 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartis; suíças: valores máximo e mínimo) (n=15 ratos/grupo; Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ).

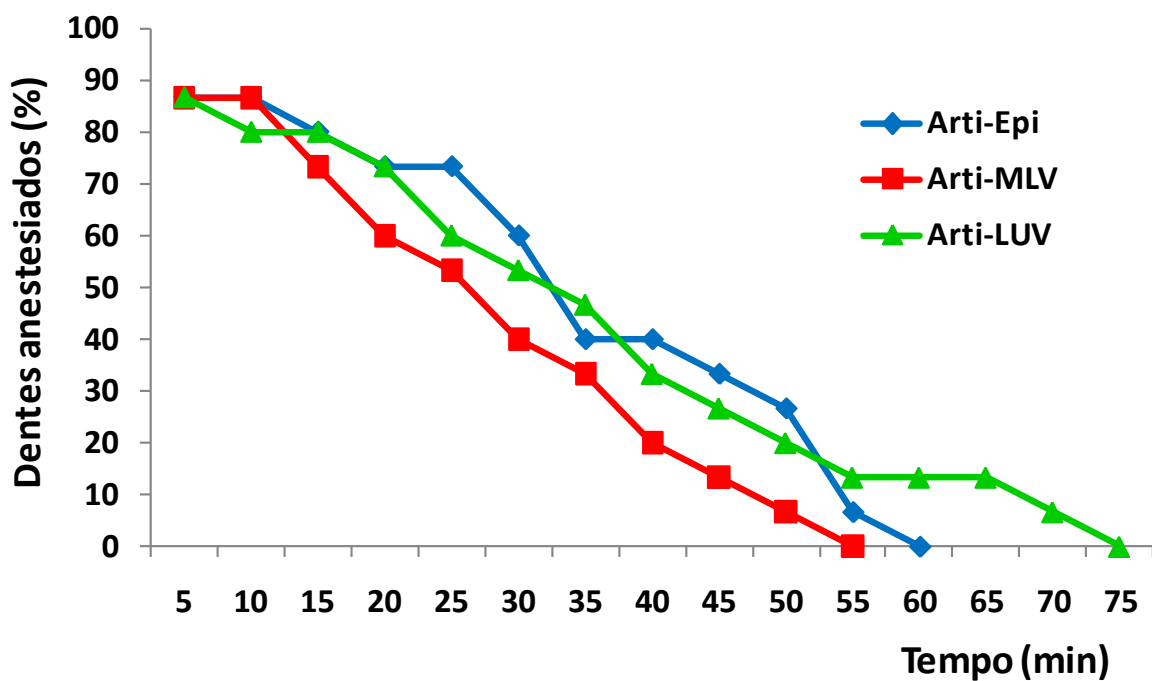


Figura 11 - Sucesso da anestesia (em %) nos molares inferiores após bloqueio do nervo alveolar inferior com formulações de articaína (articaína com epinefrina - Arti-Epi, articaína lipossomal multilamelar - Arti-MLV e articaína lipossomal unilamelar – Arti-LUV). (n= 15 ratos/grupo; Teste Exato de Fisher;  $p>0,05$ ).

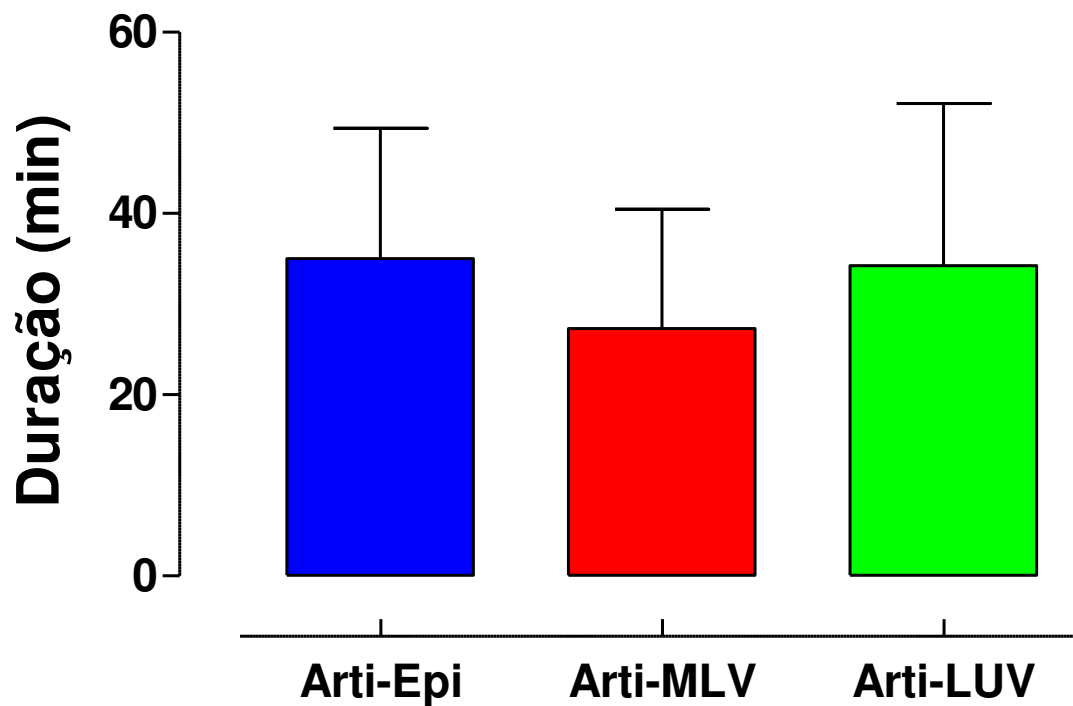


Figura 12 - Duração da anestesia (média e desvio padrão, em minutos) nos molares inferiores após bloqueio do nervo alveolar inferior com formulações de articaína (articaína com epinefrina - Arti-Epi, articaína lipossomal multilamelar - Arti-MLV e articaína lipossomal unilamelar – Arti-LUV). (n= 15 ratos/grupo; ANOVA;  $p>0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

A anestesia local constitui a base das técnicas de controle da dor em odontologia. Dentre os inúmeros agentes anestésicos disponíveis, a articaína 4% apresenta alto nível de potência anestésica e baixa toxicidade sistêmica (Nizharadze *et al.*, 2011). Apesar da baixa toxicidade sistêmica, a articaína tem atraído a atenção de clínicos e pesquisadores pelos relatos de parestesia, após bloqueio do nervo alveolar inferior (Haas & Lennon, 1995; Gaffen & Haas, 2009; Garisto *et al.*, 2010).

A epinefrina, bem como os demais vasoconstritores, ao tornar mais lenta a absorção do sal anestésico, reduz a dose necessária deste para o bloqueio, podendo aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade sistêmica do anestésico (Volpato & Ranali, 2011). Entretanto, não consegue impedir a toxicidade local, uma vez que o anestésico está livre na solução para exercer efeito. A redução na toxicidade local poderia então ser conseguida pela diminuição da concentração do sal anestésico na solução ou por meio do uso de sistemas de liberação controlada de medicamentos, como os lipossomas testados no presente estudo.

O nervo infraorbital fornece inervação sensitiva para a pele e as mucosas do lábio superior e pálpebra inferior e para a pele da região lateral do nariz (Scot, 1989, citado por Bösenberg & Kimble, 1995), sendo assim útil para avaliar formulações anestésicas, como já demonstrado por vários autores (Cereda *et al.*, 2004; Ready & Fink, 1980; Hassan *et al.*, 1985 a;b).

Neste modelo de bloqueio do nervo infraorbital, foi observado que a encapsulação em lipossomas unilamelares promove aumento da duração da anestesia de vários sais, como prilocaína, lidocaína, mepivacaína, ropivacaína e articaína, quando comparado ao efeito promovido pelas soluções anestésicas sem aditivos (Cereda *et al.*, 2004; Cereda *et al.*, 2006; de Araújo, 2005; Berto, 2010).

Especificamente para a articaína, Berto (2010) comparou a duração da anestesia no lábio superior com cinco formulações: articaína 4% com epinefrina

1:100.000, articaína 3% encapsulada em lipossomas unilamelares (4 mM), articaína 4% encapsulada em lipossomas unilamelares (4 mM), articaína 3% sem aditivos e articaína 4% sem aditivos, não tendo observado diferença estatística entre a articaína com epinefrina e as formulações de articaína encapsulada em lipossomas unilamelares.

Contrariamente ao observado por Berto (2010), no presente estudo a formulação de articaína 4% encapsulada em lipossomas unilamelares apresentou menor duração de anestesia que a formulação de articaína contendo epinefrina ( $p < 0,05$ ). Apesar da diferença na conclusão de ambos os estudos, a duração da anestesia observada com as formulações lipossomal unilamelar e contendo epinefrina nos estudos foram bastante próximas, respectivamente 128 min e 146 min (média) no estudo de Berto (2010) e 140 min e 163 min (mediana) no presente estudo.

A formulação multilamelar de articaína não apresentou diferença em relação à unilamelar em relação à duração da anestesia, mas apresentou maior taxa de sucesso que esta. Para ambos os parâmetros estudados, a formulação de articaína encapsulada em lipossomas multilamelares não apresentou diferenças em relação à formulação de articaína associada à epinefrina. Estes resultados sugerem que o maior número de bicamadas dos lipossomas multilamelares, proporcionando maior permanência no local injetado (Grant & Bansinath, 2001), pode promover liberação mais lenta do anestésico, aumentando desta forma a taxa de sucesso da anestesia para a articaína.

A alta taxa de sucesso da anestesia, 100% com as três formulações estudadas já no primeiro tempo de avaliação, mostra que o pH das formulações não interferiu no início da anestesia. Assim, o próprio sistema de tamponamento tecidual foi suficiente para que um número mínimo de moléculas de articaína pudesse ficar na forma não ionizada e assim penetrar no axônio, podendo exercer ação (após o retorno do equilíbrio entre as formas não ionizadas e ionizadas, ligando-se esta última ao canal de sódio). Resultados semelhantes foram observados por Cereda *et al.* (2004 e 2006), que avaliaram formulações de

lidocaína, prilocaína e mepivacaína encapsuladas em lipossomas unilamelares e sem aditivos, em bloqueio do nervo infraorbital.

Além da avaliação da eficácia anestésica em tecidos moles da região perioral, por meio do bloqueio do nervo infraorbital, foi também avaliada a eficácia anestésica em tecido mole no qual foi desenvolvida resposta hipernociceptiva, característica de dor inflamatória aguda, com sensibilização dos nociceptores (Cunha *et al.*, 2005).

Após o estímulo inflamatório inicial, ocorre a liberação de histamina, um dos primeiros mediadores da inflamação, promovendo dilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade das vênulas, com extravasamento de fluido rico em proteína para os tecidos, o que promove diminuição do fluxo sanguíneo no local, facilitando a adesão de leucócitos ao endotélio e sua migração ao local injuriado. Neste local estas células atuam na eliminação do agente agressor e de restos de tecido necrótico, possibilitando o processo de reparo tecidual (Kumar *et al.*, 2010).

A inflamação envolve a liberação de uma série de mediadores, incluindo várias citocinas, as quais são liberadas em sequência, constituindo uma cascata, de acordo com Cunha *et al.* (2005). A primeira citocina liberada é a TNF- $\alpha$ , a qual por sua vez estimula a liberação de IL-1 $\beta$ . Dependendo do tipo de agente causador da inflamação e ainda da espécie animal estudada, a sequência de liberação das citocinas pode variar (Cunha *et al.*, 2005).

Ao final dessa cascata são liberadas as prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas, responsáveis pelo aumento da excitabilidade neuronal. As alterações neuronais ocorrem tanto no local inflamado, com sensibilização dos nociceptores, quanto em nível central, aumentando a excitabilidade dos neurônios do corno dorsal (Brennan *et al.*, 2005).

A sensibilização dos nociceptores leva aos fenômenos de hiperalgesia, na qual o indivíduo passa a perceber dor mais intensa a estímulos nociceptivos, e de alodinia, na qual estímulos que normalmente não promovem dor passam a ser percebidos como estímulos dolorosos (Brennan *et al.*, 2005).

Como não é possível a distinção entre hiperalgesia e alodnia na resposta do animal frente à aplicação de força com o analgesímetro de von Frey, Parada *et al.* (2003) propuseram o uso do termo hipernocicepção.

No presente estudo, a infiltração das formulações anestésicas na pata apresentando hipernocicepção resultou em anestesia em 100% dos animais no primeiro tempo de avaliação, da mesma forma que no bloqueio do nervo infraorbital. Assim, tanto o pH das formulações, quanto a presença de inflamação no local da injeção, não interferiram no início da anestesia, considerando o tempo de espera para o início da avaliação (5 min).

Comparando a duração da anestesia nestes dois experimentos, bloqueio do nervo infraorbital (Figura 7) e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (Figura 9), observa-se que a formulação contendo epinefrina não apresentou diferença de duração (163 min e 150 min, respectivamente;  $p>0,05$ ; teste de Student-Neuman-Keuls), enquanto que as formulações lipossomais apresentaram redução significativa (140 min e 65 min, respectivamente para articaína lipossomal multilamelar e 140min e 55min, respectivamente para articaína lipossomal unilamelar;  $p<0,05$ , teste de Student-Neuman-Keuls). O mesmo pode ser observado na comparação dos tempos em que 100% dos animais ainda apresentavam anestesia no local avaliado (Figuras 6 e 8).

Estes resultados mostram que a ação vasoconstritora da epinefrina é fundamental para aumentar a duração da anestesia no local, especialmente em tecido inflamado, no qual o pH está acidificado (em torno de 6,0, de acordo com Malamed, 2005) e há vasodilatação, o que pode favorecer a passagem do anestésico local para a corrente sanguínea. Como os lipossomas não apresentam ação sobre os vasos sanguíneos, uma vez que as moléculas de anestésico local são liberadas dos mesmos, podem exercer ação vasodilatadora, aumentando sua absorção para a corrente sanguínea.

Especificamente nas patas inflamadas, foram observadas maior duração e taxa de sucesso da anestesia com a formulação contendo epinefrina do

que com as formulações de articaína encapsulada em lipossomas unilamelares e multilamelares, as quais não apresentaram diferença entre si.

Embora a encapsulação de anestésicos, como a bupivacaína, em lipossomas multilamelares possa aumentar o tempo de anestesia em tecidos inflamados em relação à formulação sem aditivos, como observado por Grant *et al.*, 1997, quando a comparação é feita com uma solução contendo vasoconstritor, como a epinefrina no presente estudo, a duração é maior com esta última formulação.

Comparações entre anestésicos encapsulados em lipossomas multilamelares e formulações associadas a vasoconstritor restringem-se a um estudo (Boogaerts *et al.*, 1994), no qual foi observada maior duração do período sem dor pós-operatória com o bloqueio epidural feito com bupivacaína 0,5% encapsulada em lipossoma multilamelar em comparação com a bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000. Entretanto, este estudo consistiu de uma avaliação inicial, comparando de forma não randomizada e sem cegamento a dor pós-operatória de procedimentos cirúrgicos diversos (abdominal, torácico e ortopédico, entre outros), sendo que as cirurgias variavam dentro de um mesmo grupo e entre os grupos, podendo implicar em dor de intensidade distinta.

Avaliando espécie e sal anestésico distintos, no presente estudo a superioridade da formulação lipossomal multilamelar não pode ser comprovada para a articaína no modelo de tecido inflamado (infiltração subcutânea na superfície plantar submetida a incisão cirúrgica e sutura).

O terceiro modelo utilizado no presente estudo avaliou a anestesia pulpar após bloqueio do nervo alveolar inferior. Vários estudos descrevem o uso da corrente elétrica emitida pelo *pulp tester* para avaliação da eficácia anestésica, pois é um método seguro e preciso para avaliar anestesia pulpar em humanos . A ausência de percepção ao estímulo máximo emitido pelo aparelho é amplamente usada como critério de anestesia pulpar (Dreven *et al.*, 1987; Certosimo & Archer, 1996; Corbett *et al.*, 2008; Brunetto *et al.*, 2008; Weisleder *et al.*, 2009; Batista da Silva *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2011).

Em 1999, Naftel *et al.* demonstraram o trajeto dos nervos que suprem os dentes mandibulares em ratos, assim como seus tecidos periodontais. Foi a partir desses achados que Silva *et al.* (2009) propuseram o modelo de bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos, servindo como base para este e outros estudos (Bhering, 2010; Gayoso, 2009; Berto, 2010).

No presente estudo não foram observadas diferenças na latência entre as formulações, para o bloqueio do nervo alveolar inferior, sendo obtidos valores de 2 min, 4 min e 4min (mediana), respectivamente para as formulações de articaína com epinefrina, articaína lipossomal multilamelar e articaína lipossomal unilamelar.

Utilizando o mesmo modelo (Gayoso, 2009) e (Bhering, 2010) também não encontraram diferenças na latência entre formulações lipossomais, associadas a vasoconstritor e sem aditivos. Gayoso (2009) avaliou formulações de prilocaína, enquanto Bhering comparou formulações de ropivacaína. Nestes estudos a concentração lipídica dos lipossomas unilamelares foi de 5 mM (Gayoso (2009) e 4 mM (Bhering, 2010).

Contrariamente aos resultados de Gayoso, (2009), Bhering, (2010) e aos do presente estudo, Berto (2010) observou diferença significativa na latência entre a articaína associada à epinefrina e articaína lipossomal unilamelar (com concentração lipídica 4 mM). Entretanto, as médias obtidas por Berto (2010) com estas duas formulações (2,2 min para a articaína associada à epinefrina e 4,7 min para a articaína lipossomal unilamelar) não foram diferentes das medianas obtidas no presente estudo (2 min e 4 min, para a articaína com epinefrina e articaína encapsulada em lipossomas unilamelares com concentração lipídica 8mM). Resultados semelhantes, dentro da mesma faixa (entre 2 e 4 minutos), foram obtidos por (Gayoso, 2009) e (Bhering, 2010) para formulações de prilocaína e ropivacaína, respectivamente.

O bloqueio do nervo alveolar inferior é uma das técnicas mais utilizadas na Odontologia quando se quer intervir em dentes posteriores na mandíbula. Entretanto, o insucesso dessa técnica é frequente (Palti *et al.*, 2011). Em humanos

são relatadas taxas de sucesso variando de 29% a 84% em dentes posteriores da mandíbula após bloqueio do nervo alveolar inferior com soluções de lidocaína 2% e articaína 4% associadas à epinefrina 1:100.000 (Mikesell *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2008). Diferenças na definição de sucesso (com base no tempo máximo de latência aceitável e tempo mínimo de duração) e variabilidade anatômica na posição do forame mandibular, entre outros fatores, podem afetar o grau de sucesso relatado (Desantis & Liebow, 1996).

No presente estudo as taxas de sucesso no bloqueio do nervo alveolar inferior variaram de 80 a 87%, dentro da faixa observada por Bhering (2010) para formulações a base de ropivacaína (80 a 90%) e próximas das obtidas por Gayoso (2009) para formulações com prilocaína (50 a 70%), no mesmo modelo em ratos.

Com relação à duração da anestesia foram observadas no presente estudo médias de 35 min, 27 min e 34 min, respectivamente para a articaína com epinefrina, articaína lipossomal multilamelar e articaína lipossomal unilamelar, sem diferenças entre as formulações. Esses resultados são compatíveis com os obtidos por Berto (2010) que observou médias de duração de anestesia pulpar, no mesmo modelo, de 39 min e 24 min, respectivamente para a articaína com epinefrina e articaína lipossomal unilamelar, embora esta autora tenha observado diferença significativa entre as formulações, com a solução contendo epinefrina apresentando maior duração que a formulação lipossomal.

No presente estudo não foram observadas diferenças entre as formulações, tanto para o sucesso, quanto para a duração da anestesia no bloqueio do nervo alveolar inferior.

Em conjunto, estes resultados mostram que as formulações lipossomais de articaína podem ser opção de uso para anestesia pulpar e de tecido mole não inflamado (apenas a formulação lipossomal multilamelar). Em tecidos submetidos a processo inflamatório a solução contendo epinefrina mostra-se mais eficaz, proporcionando maior duração e taxa de sucesso da anestesia.

Atualmente, entretanto, a maior estabilidade das formulações comerciais contendo epinefrina, com tempo de estocagem mínimo de 12 meses

(Ramacciato, 2003), em comparação ao observado para formulações lipossomais (1 mês, de acordo com Cereda *et al.*, 2008), pode ainda limitar o uso destas formulações. O processo de esterilização dessas formulações ainda precisa ser melhorado para uso em escala industrial (de Paula *et al.*, 2010).

A articaína, por sua fórmula estrutural peculiar, diferente dos demais anestésicos, ainda deve ser alvo de estudos futuros associada a outros sistemas de liberação de drogas, como polímeros, por exemplo.

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Nos modelos experimentais sem inflamação a eficácia anestésica das suspensões lipossomais não diferiu da observada com a solução contendo epinefrina (com exceção da suspensão lipossomal unilamelar que apresentou menor eficácia que a solução de articaína com epinefrina no bloqueio do nervo infraorbital). Desta forma, estas suspensões poderiam ser uma opção ao uso da solução contendo epinefrina.
- No modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, no qual havia presença de inflamação e hiperalgesia, a solução contendo epinefrina foi mais potente em aumentar a duração e taxa de sucesso da anestesia que as formulações lipossomais.

## REFERÊNCIAS\*

1. Batista da Silva C, Berto LA, Volpato MC, Ramacciato JC, Motta RH, Ranali J *et al.* Anesthetic efficacy of articaine and lidocaine for incisive/mental nerve block. J Endod. 2010;36(3):438-41.
2. Becker DE, Reed KL. Essentials of local anesthetic pharmacology. Anesth.Prog 2006;53(3):98-108; quiz 109-10.
3. Berto LA. Eficácia anestésica da formulação lipossomal de articaina em ratos [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010 [Acesso 2011 Out 15]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000478868&fd=y>.
4. Bhering CLB. Eficácia anestésica da preparação lipossomal de ropivacaína em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos [monografia]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010 [Acesso 2011 Out 15]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000784594>
5. Boogaerts J, Declercq A, Lafont N, Benameur H, Akodad EM, Dupont JC *et al.*, Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. Anesth Analg. 1993a;76(3):553-5.
6. Boogaerts JG, Lafont ND, Luo H, Legros FJ. Plasma concentrations of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome-associated and plain solutions to rabbits. Can J Anaesth. 1993b;40(12):1201-4.
7. Boogaerts JG, Lafont ND, Declercq AG, Luo HC, Gravet ET, Bianchi JA, Legros FJ. Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. J Clin Anesth. 1994; 6(4):315-20.

---

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

8. Boogaerts J, Lafont N, Donnay M, Luo H, Legros FJ. Motor blockade and absence of local nerve toxicity induced by liposomal bupivacaine injected into the brachial plexus of rabbits. *Acta Anaesthesiol Belg.* 1995; 46(1):19-24.
9. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain.* 1996; 64(3):493-501.
10. Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Mechanisms of Incisional Pain. *Anesthesiology Clin N Am.* 2005; 23(1):1-20.
11. Brunetto PC, Ranali J, Ambrosano GM, de Oliveira PC, Groppo FC, Meechan JG, Volpato MC. Anesthetic efficacy of 3 volumes of lidocaine with epinephrine in maxillary infiltration anesthesia. *Anesth Prog.* 2008;55(2):29-34.
12. Bucalo BD, Mirikitani EJ, Moy RJ. Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine, and EMLA using 30-minute application time. *Dermatol Surg.* 1998; 24(5): 537-541.
13. Cereda CM, de Araújo DR, Brunetto GB, de Paula E. Liposomal prilocaine: preparation, characterization and in vivo evaluation. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2004;7(2):235–40.
14. Cereda CM, Brunetto GB, de Araujo DR, de Paula E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. *Can J Anaesth.* 2006;53(11):1092-7.
15. Cereda CM, Tofoli GR, de Brito Junior RB, de Jesus MB, Fraceto LF, Groppo FC, *et al.*. Stability and local toxicity evaluation of a liposomal prilocaine formulation. *J Liposome Res.* 2008;18(4):329-39.
16. Certosimo AJ, Archer RD. A clinical evaluation of the electric pulp tester as an indicator of local anesthesia. *Oper Dent.* 1996;21(1):25-30.
17. Clark TM, Yagiela JA. Advanced techniques and armamentarium for dental local anesthesia. *Dent Clin North Am.* 2010;54(4):757-68.
18. Corbett IP, Kanaa MD, Whitworth JM, Meechan JG. Articaine infiltration for anesthesia of mandibular first molars. *J Endod.* 2008;34(5):514-8

- 19.Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005;102(5):1755-60.
- 20.Davidson EM, Barenholz Y, Cohen R, Haroutiunian S, Kagan L, Ginosar Y. High dose bupivacaine remotely loaded into multivesicular liposomes demonstrates slow drug release without systemictoxic plasma concentrations after subcutaneous administration in humans. *Anesth Analg*. 2010 ;110(4):1018-23
- 21.Daublander MM. Need for a change? Articaine vs. lidocaine. *J Ir Dent Assoc*. 2011;57(5):265-7.
- 22.de Araújo DR, Pinto LMA, Braga AFA, de Paula E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: Aplicações Terapêuticas, *Rev. Bras. Anesthesiol*. 2003; 53(5): 653-61.
- 23.de Araújo DR, Cereda CM, Brunetto GB, Pinto LM, Santana MH, de Paula E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. *Can J Anesth*. 2004;51(6):566-72.
- 24.de Araújo DR, Cereda CM, Brunetto GB, Vomero VU, Pierucci A, Neto HS, Oliveira ALR, Fraceto LF, Braga AFA, de Paula E. Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. *J Pharm Pharmacol*. 2008; 60(11): 1449-57.
- 25.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.
- 26.de Paula E, Schreier S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(7):877-94.
- 27.DeSantis JL, Liebow C. Four common mandibular nerve anomalies that lead to local anesthesia failures. *J Am Dent Assoc*. 1996;127(7):1081-6.
- 28.Dreven LJ, Reader A, Beck M, Meyers WJ, Weaver J. An evaluation of an electric pulp tester as a measure of analgesia in human vital teeth. *J Endod* 1987;13(5):233– 8.

29. Fernandez C, Reader A, Beck M, Nusstein J. A prospective, randomized, double-blind comparison of bupivacaine and lidocaine for inferior alveolar nerve blocks. *J Endod.* 2005; 31(7):499-503.
30. Fink BR, Aasheim G, Kish SJ, Croley TS. Neurokinetics of lidocaine in the infraorbital nerve of the rat in vivo: Relation to sensory block. *Anesthesiology.* 1975;42(6):731-6.
31. Fraceto LF, Pinto Lde M, Franzoni L, Braga AA, Spisni A, Schreier S *et al.* Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys Chem.* 2002;99(3):229-43.
32. Franz-Montan M, de Paula E, Groppo FC, Ranali J, Volpato MC. Efficacy of liposome-encapsulated 0.5% ropivacaine in maxillary dental anaesthesia. *BR J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Aug 8.
33. Gaffen AS, Haas DA. Retrospective review of voluntary reports of nonsurgical paresthesia in dentistry. *J Can Dent Assoc* 2009;75(8):579.
34. Garisto GA, Gaffen AS, Lawrence HP, Tenenbaum HC, Haas DA. Occurrence of paresthesia after dental local anesthetic administration in the United States. *J Am Dent Assoc* 2010; 141(7):836-44.
35. Gayoso GR. Eficácia anestésica da prilocaína 3% lipossomal em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos [monografia]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009 [Acesso 2011 Out 15]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000771919>
36. Gong JH, Liu Y, Tang LH, Xu XJ, Zhang XN. An Alternative lidocaine hydrochloride liposomal gel formulation: preparation, percutaneous permeation, and release kinetics. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2006;60(4):259-63.
37. Grant GJ, Lax J, Susser L, Zakowski M, Weissman TE, Turndorf H. Wound infiltration with liposomal bupivacaine prolongs analgesia in rats. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1997; 41(2):204-7.
38. Grant GJ, Bansinath M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med.* 2001;26(1):61-3.

39. Grant SA. The Holy Grail: long-acting local anaesthetics and liposomes. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2002;16(2):345-52.
40. Grant GJ, Piskoun B, Bansinath M. Analgesic duration and kinetics of liposomal bupivacaine after subcutaneous injection in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(12):966-8.
41. 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.
42. Haas DA, Lennon D. A 21 year retrospective study of reports of paresthesia following local anesthetic administration. *J Can Dent Assoc* 1995; 61(4):319–30.
43. Hassan HG, Renck H, Lindberg B, Åkerman B, Hellquist R. Effects of adjuvants to local anaesthetics on their duration. I. Studies of dextrans of widely vary-ing molecular weight and adrenaline in rat infraorbital nerve block. *Acta Anaesthesiol Scand* 1985a; 29(4):375–9.
44. Hassan HG, Renck H, Lindberg B, Lindquist B, Åkerman B. Effects of adjuvants to local anaesthetics on their duration. II. Studies of some substituted dex-trans and other macromolecules in rat infraorbital nerve block. *Acta Anaesthesiol Scand* 1985b;29(4):380–3.
45. Hersh EV, Giannakopoulos H, Levin LM, Secreto S, Moore PA, Peterson C, *et al*. The pharmacokinetics and cardiovascular effects of high-dose articaine with 1:100,000 and 1:200,000 epinephrine. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(11):1562-71.
46. Hintze A, Paessler L. Comparative investigations on the efficacy of articaine 4% (epinephrine 1:200,000) and articaine 2% (epinephrine 1:200,000) in local infiltration anaesthesia in dentistry--a randomised double-blind study. *Clin Oral Investig*. 2006; 10(2):145-50.
47. Hung O. Drug transformation: Advances in drug delivery systems. *Can J Anaesth*. 2006; 53(11):1074-7.

48. Jung IY, Kim JH, Kim ES, Lee CY, Lee SJ. An evaluation of buccal infiltrations and inferior alveolar nerve blocks in pulpal anesthesia for mandibular first molars J Endod. 2008;34(1):11-3.
49. Kanaa MD, Whitworth JM, Corbett IP, Meechan JG. Articaine and lidocaine mandibular buccal infiltration anesthesia: a prospective randomized double-blind cross-over study. J Endod. 2006; 32(4):296-8.
50. Koller, C. Wien Med. Wochenschr, 1884, 34, 1276. Apud Ruetsch YA, Böni T, Borgeat A. From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. Curr Top Med Chem. 2001;1(3):175-82.
51. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins & Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
52. Lafont ND, Boogaerts JG, Legros FJ. Use of liposome-associated bupivacaine for the management of a chronic pain syndrome. Anesth Analg. 1994;79(4):818.
53. Lafont ND, Legros FJ, Boogaerts JG. Use of liposome-associated bupivacaine in a cancer pain syndrome. Anaesthesia. 1996;51(6):578-9.
54. Lasic DD, Needham D. The “Stealth” Liposome: A Prototypical Biomaterial. Chemical Reviews. 1995; 95(8): 2601–2628
55. Lee AG. Interactions between anaesthetics and lipid mixtures. Amines. Biochim Biophys Acta. 1976;448(1):34-44.
56. Lipp M, Daublander M. The German experience of articaine. In: The London international symposium on local analgesia in dentistry. Proceedings... London: Faculty of General Dental Practitioners, 1999: 21-22.
57. Malamed SF, Gagnon S, Leblanc D. Articaine hydrochloride: a study of the safety of a new amide local anesthetic. J Am Dent Assoc. 2001;132(2): 177–85.
58. Malamed SF. Manual de anestesia local. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier Ltda; 2005.

59. Malinovsky JM, Benhamou D, Alafandy M, Mussini JM, Coussaert C, Couarraze G *et al.* Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. *Anesth Analg.* 1997;85(6):1331-6.
60. Martin M, Nusstein J, Drum M, Reader A, Beck M. Anesthetic efficacy of 1.8 mL versus 3.6 mL of 4% articaine with 1:100,000 epinephrine as a primary buccal infiltration of the mandibular first molar. *J Endod.* 2011;37(5):588-92.
61. McLure HA, Rubin AP. Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol.* 2005;71(3):59-74.
62. Meechan JG. Infiltration anesthesia in the mandible. *Dent Clin North Am.* 2010;54(4):621-9.
63. Meechan JG, Jaber AA, Corbett IP, Whitworth JM. Buccal versus lingual articaine infiltration for mandibular tooth anaesthesia: a randomized controlled trial. *Int Endod J.* 2011;44(7):676-81.
64. Mikesell P, Nusstein J, Reader A, Beck M, Weaver J. A comparison of articaine and lidocaine for inferior alveolar nerve blocks. *J Endod.* 2005;31(4):265-70.
65. Moore PA, Hersh EV, Papas AS, Goodson JM, Yagiela JA, Rutherford B, *et al.* Pharmacokinetics of lidocaine with epinephrine following local anesthesia reversal with phentolamine mesylate. *Anesth Prog.* 2008;55(2):40-8.
66. Müller WP, Weiser P & Scholler KL. Pharmakokinetik von Articain bei der Nervus mandibularis-Blockade. [Pharmacokinetics of articaine in mandibular nerve block]. *Regional-Anaesth.* (Berlin) 1991; 14(3): 52–55. Apud Vree TB, Gielen MJ. Clinical pharmacology and the use of articaine for local and regional anaesthesia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2005;19(2):293-308.
67. Naftel JP, Richards LP, Pan M, Bernanke JM. Course and composition of the nerves that supply the mandibular teeth of the rat. *Anat Rec* 1999;256(4):433-47.

68. Nizharadze N, Mamaladze M, Chipashvili N, Vadachkoria D. Articaine - the best choice of local anesthetic in contemporary dentistry. *Georgian Med News*. 2011;(190):15-23.
69. Nuzum FM, Drum M, Nusstein J, Reader A, Beck M. Anesthetic efficacy of articaine for combination labial plus lingual infiltrations versus labial infiltration in the mandibular lateral incisor. *J Endod*. 2010;36(6):952-6.
70. Palti DG, Almeida CM, Rodrigues Ade C, Andreo JC, Lima JE. Anesthetic technique for inferior alveolar nerve block: a new approach. *J Appl Oral Sci* 2011;19(1):11-5
71. 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 U S A*. 2003;100(5):2923-8.
72. Paxton K, Thome DE. Efficacy of articaine formulations: quantitative reviews. *Dent Clin North Am*. 2010;54(4):643-53
73. Potocnik I, Tomsic M, Sketelj J, Bajrovic FF. Articaine is more effective than lidocaine or mepivacaine in rat sensory nerve conduction block in vitro. *J Dent Res*. 2006;85(2):162-6.
74. Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of state-dependent block of Na<sup>+</sup> channels by local anesthetics. *Science*. 1994;265(5179):1724-8.
75. Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(17):9270-5.
76. Ramacciato JC. Avaliação da estabilidade química das soluções anestésicas locais comerciais e das propriedades físicas dos tubetes sob diferentes condições de armazenamento Ramacciato [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2003 [Acesso 2012 Jan 11]. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=000299551>.

77. Ready LB, Fink BR. Experimental evaluation of local anaesthetic solutions using rat infraorbital nerve block. *Can Anaesth Soc J.* 1980;27(1):58-61.
78. Robertson D, Nusstein J, Reader A, Beck M, McCartney M. The anesthetic efficacy of articaine in buccal infiltration of mandibular posterior teeth. *J Am Dent Assoc.* 2007; 138(8):1104-12.
79. Rose JS, Neal JM, Kopacz DJ. Extended-duration analgesia: Update on microspheres and liposomes. *Reg Anesth Pain Med.* 2005;30(3): 275-285.
80. Rosenberg PA, Amin KG, Zibari Y, *et al.* Comparison of 4% articaine with 1:100,000 epinephrine and 2% lidocaine with 1:100,000 epinephrine when used as a supplemental anesthetic. *J Endod* 2007;33(4):403–5.
81. Ruetsch YA, Böni T, Borgeat A. From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. *Curr Top Med Chem.* 2001;1(3):175-82.
82. Scott DB. Regional anaesthesia of head and neck. In: Scott DB, ed. *Techniques of Regional Anaesthesia.* Switzerland: Mediglobe SA, 1989; 64. Apud Bösenberg AT, Kimble FW. Infraorbital nerve block in neonates for cleft lip repair: anatomical study and clinical application. *Br J Anaesth.* 1995;74(5):506-8.
83. Silva RAP, Berto LA, Volpato MC, Ranali J, Paula ED, Groppo FC. Experimental model of inferior alveolar nerve block in rats. 87th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2009, Abstract 706. <http://iadr.confex.com/iadr/2009miami/webprogram/Paper116911.html>.
84. Skidmore RA, Patterson JD, Tomsick RS. Local anesthetics. *Dermatol Surg.* 1996;22(6):511-24.
85. Sloss DR. Articaine in dental practice. In: *The London international symposium on local analgesia in dentistry. Proceedings...* London: Faculty of General Dental Practitioners 1999: 23-24.
86. Tofoli GR, Cereda CM, de Araujo DR, de Paula E, Brito RB Jr, Pedrazzoli J Jr, Meurer E, Barros FA, Groppo FC, Volpato MC, Ranali J.

- Pharmacokinetic and local toxicity studies of liposome-encapsulated and plain mepivacaine solutions in rats. *Drug Deliv.* 2010;17(2):68-76.
87. Tofoli GR, Cereda CM, Groppo FC, Volpato MC, Franz-Montan M, Ranali J *et al.* Efficacy of liposome-encapsulated mepivacaine for infiltrative anesthesia in volunteers. *J Liposome Res.* 2011;21(1):88-94.
  88. Tofoli GR, Cereda CM, Araújo DR, Franz-Montan M, Groppo FC, Quaglio D, Pedrazzoli Junior J, Calafatti SA, Barros FA, de Paula E. Pharmacokinetic study of liposome-encapsulated and plain mepivacaine formulations injected intra-orally in volunteers. *J Pharm Pharmacol.* 2012;64(3):397-403.
  89. Tortamano IP, Siviero M, Costa CG, Buscariolo IA, Armonia PL. A comparison of the anesthetic efficacy of articaine and lidocaine in patients with irreversible pulpitis. *J Endod.* 2009;35(2):165-8.
  90. Vandermeulen E, Gebhart GF, Brennan TJ. Effect of pre-emptive bupivacaine infiltration on animal model of incisional pain [Abstract A-986]. *Anesthesiology* 1994; 81: A986.
  91. Volpato MC, Ranali J. Reações à superdosagem das soluções anestésicas locais. In: Andrade ED, Ranali J. *Emergências médicas em odontologia*. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2011. p. 131-7.
  92. Vree TB, Gielen MJ. Clinical pharmacology and the use of articaine for local and regional anaesthesia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2005;19(2):293-308.
  93. Weisleder R, Yamauchi S, Caplan DJ, Trope M, Teixeira FB. The validity of pulp testing: a clinical study. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(8):1013-7.
  94. Wiziack Zago PM, Baroni DB, Groppo FC, de Paula E, Ranali J, Volpato MC. Anesthetic efficacy of liposomal prilocaine in maxillary infiltration anesthesia. *J Liposome Res.* 2011;21(1):81-7.
  95. Yu HY, Li SD, Sun P. Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54(9):1221-7.

## ANEXO

### ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA/UNICAMP)



CEE/Unicamp

#### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEE/Unicamp

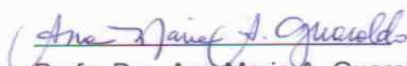
#### CERTIFICADO

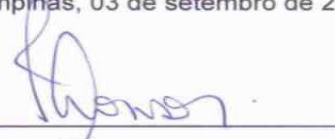
Certificamos que o Protocolo nº 1938-1, sobre "Eficácia anestésica das preparações lipossomais uni e multilamelar de articaína, em bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior e em ferida cirúrgica, em ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Volpato / Camila Batista da Silva, 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 – CEE/Unicamp em 03 de setembro de 2009.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1938-1, entitled "Anesthetic efficacy of uni and multilamelar liposomal artcaine formulations 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.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEE – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>