

CLEITON PITA DOS SANTOS

**“EFICÁCIA ANESTÉSICA DA ROPIVACAÍNA COMPLEXADA COM
2-HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA EM BLOQUEIO DOS NERVOS
ALVEOLAR INFERIOR E INFRAORBITAL E EM INFILTRAÇÃO
SUBCUTÂNEA EM FERIDA CIRÚRGICA, EM RATOS”**

PIRACICABA

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CLEITON PITA DOS SANTOS

**“EFICÁCIA ANESTÉSICA DA ROPIVACAÍNA COMPLEXADA COM
2-HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA EM BLOQUEIO DOS NERVOS
ALVEOLAR INFERIOR E INFRAORBITAL 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: Prof^ª. Dra. Maria Cristina Volpato
Coorientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno, e orientada pela prof^ª. Dr^ª. 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

Sa59e

Santos, Cleiton Pita dos, 1981-

Eficácia anestésica da ropivacaína com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em bloqueio dos nervos alveolar inferior e infraorbital e em infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, em ratos / Cleiton Pita dos Santos. -- 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. Ciclodextrinas. 3. Odontologia. 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 ropivacaine with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin formulation in infraorbital and inferior alveolar nerve blocks and in surgical wound, in rats

Palavras-chave em Inglês:

Anesthesia, local

Cyclodextrins

Dentistry

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Maria Cristina Volpato [Orientador]

Rogério Heládio Lopes Motta

Carina Denny

Data da defesa: 29-02-2012

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 29 de Fevereiro de 2012, considerou o candidato CLEITON PITA DOS SANTOS aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. Volpato".

Profa. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Rogério Heládio Lopes Motta".

Prof. Dr. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Carina Denny".

Profa. Dra. CARINA DENNY

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais que me educaram e transmitiram o valor da honestidade e perseverança, essenciais para quebrar paradigmas e superar desafios. Agradeço imensamente por todo carinho, empenho e dedicação. Lembrando-os de que a vida é mais que a estabilidade do cotidiano, é a descoberta e aprendizagem de todos os dias.

Agradecimentos

À professora Dr^a. Maria Cristina Volpato e ao professor Dr. Francisco Carlos Groppo que com suas experiências, competência e objetividade me orientaram em mais este passo para o meu crescimento profissional, sendo essenciais para elaboração deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Sr. Diretor Jacks Jorge Jr, que proporcionaram a oportunidade de desenvolver-me rumo ao crescimento científico e profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2009/12009-7) que acreditou e apoiou financeiramente este trabalho, permitindo uma dedicação mais completa ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Eduardo Dias de Andrade, Pedro Luiz Rosalen, Míriam Cavallini, Michele Franz-Montan, Cinthia Tabachoury, Rogério Heládio e Carina Denny, que através de seus conhecimentos e visão aguçada contribuíram para tornar este trabalho mais completo.

Aos profissionais do Instituto de Biologia da UNICAMP em especial a professora Dr^a. Eneida de Paula, coordenadora do projeto temático (2006/00121-9) ao qual o presente trabalho esta vinculado, e aos técnicos Márcio Aparecido Pascoal e Maribel Correia da Silva.

Aos profissionais da área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da FOP-UNICAMP em especial à Eliane, Elisa e José Carlos obrigado pela contribuição.

Aos meus queridos pais Jose e Alzenes os quais se dedicaram muito para que eu realizasse mais esta conquista em nossas vidas. Tenho por vocês um enorme amor e carinho e são os melhores pais do mundo, muito obrigado.

À Juliana Públio companheira e amiga dedicada que sempre me ouviu e esteve ao meu lado, você é especial para mim.

Aos meus amigos de mestrado Ana Paula, Marcos, Marcelo, Cris, Bibi, Salete, Inês e em especial ao Luiz, Bruno Bueno, Camila e Livia com a atenção e empatia de vocês este trabalho tornou se mais completo, vocês são parte desta minha conquista.

Agradeço à Carla responsável por eu alcançar o ensino superior, o meu grande exemplo de dedicação, vontade, superação e disciplina.

À todas as pessoas que participaram, contribuindo para realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

Certamente não construímos nada sozinhos e essas foram algumas pessoas, sem as quais este trabalho não seria completo. Muito obrigado.

RESUMO

Este estudo avaliou comparativamente a eficácia anestésica (tempo de latência, duração e sucesso da anestesia) da ropivacaína 0,5% complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (sistema de liberação controlada de medicamentos), ropivacaína 0,5% sem aditivos e ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000, em três modelos experimentais em ratos: bloqueio do nervo infraorbital (BNIO, anestesia de tecido mole), infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (ISFC, anestesia pós-operatória em tecido inflamado) e em bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI, anestesia pulpar). O estudo foi caracterizado como cego, com formação aleatória dos grupos e aplicação das formulações. No BNIO, 24 ratos (8 por grupo) receberam 0,1mL das formulações anestésicas próximo ao forame infraorbital do lado direito e o respectivo controle (solução de NaCl 0,9% ou de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina) do lado esquerdo. A avaliação da anestesia foi feita pelo pinçamento do lábio superior. Na ISFC, 60 ratos (12 por grupo) foram submetidos à avaliação da sensibilidade basal à força com o analgesímetro de von Frey, sendo em seguida submetidos à incisão e sutura na pata traseira direita. Após 24 horas os animais que apresentavam diminuição de pelo menos 20% na força necessária para retirar a pata, foram submetidos à injeção de 0,1mL de uma das formulações anestésicas ou dos controles ao lado da ferida cirúrgica, sendo então avaliados a cada 5min. No BNAI, após fixação de fios de cobre aos molares inferiores dos animais (15 por grupo), os mesmos foram submetidos à injeção de 0,2mL, próximo ao forame mandibular, das formulações anestésicas do lado direito e do respectivo controle do lado esquerdo. A anestesia pulpar foi avaliada com a aplicação de estímulo elétrico (“pulp tester”) a cada 2min até obtenção da latência e a cada 5min até retorno da percepção ao estímulo elétrico. Os resultados foram submetidos aos testes de Log Rank, Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls e Tukey ($\alpha=5\%$). Não houve diferença entre os grupos com relação à latência no BNAI ($p>0,05$). A ropivacaína com epinefrina proporcionou maior taxa de sucesso e duração da anestesia que as demais formulações em todos os modelos ($p<0,05$). Nos modelos BNIO e ISFC a ropivacaína complexada em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina promoveu maior sucesso e duração da anestesia que a ropivacaína sem aditivos ($p<0,05$), não diferindo desta no BNAI ($p>0,05$). Conclui-se que a complexação com

2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina aumenta a eficácia anestésica da ropivacaína em tecidos moles, na presença ou ausência de inflamação (BNIO e ISFC), podendo ser opção de uso para controle de dor cirúrgica pós-operatória. A epinefrina é mais potente em aumentar a eficácia anestésica em todos os modelos estudados, sendo o único aditivo eficaz para a anestesia pulpar.

Palavras-chave: ropivacaína, anestesia local, hipernocicepção, bloqueio do nervo alveolar inferior, sistemas de liberação de drogas, ciclodextrina.

ABSTRACT

This study evaluated the anesthetic efficacy (success, onset and duration of anesthesia) of 0.5% ropivacaine complexed with 2- hydroxypropil- β -cyclodextrin (a controlled drug release system), plain 0.5% ropivacaine and 0.5% ropivacaine with 1:200,000 epinephrine in three experimental models: infraorbital nerve block (IONB, soft tissue anesthesia), subcutaneous infiltration in surgical wound (SISW, post surgical analgesia in inflamed tissue) and inferior alveolar nerve block (IANB, pulpal anesthesia). The study was blind and the groups and injections were randomized. For IONB 24 rats (8/group) received 0.1mL of the anesthetic formulations next to the right infraorbital foramen, the left side received the respective control formulation (NaCl 0.9% or 2- hydroxypropil- β -cyclodextrin). Anesthesia was evaluated by upper lip pinching. For SISW 60 rats (12/group) were submitted to evaluation of baseline force sensation of the right hind paw (von Frey aesthesiometer) followed by incision and suture. After 24 hours the animals that presented at least 20% decrease in the force for paw withdrawal received an injection of 0.1mL of the anesthetic formulations or controls at the side of the surgical wound and were evaluated each 5min. For IANB, after fixation of copper wires to the mandibular molars, the animals (15/group) were submitted to an injection of 0.2mL of the anesthetic formulations next to right mandibular foramen; the respective control was injected in the left side. Pulpal anesthesia was assessed by electric stimulus (pulp tester) applied each 2min until onset of anesthesia was reached and each 5min until perception of electric stimulus. Data were submitted to Log Rank, Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls and Tukey tests ($\alpha=5\%$). No differences in anesthesia onset were observed among groups ($p>0.05$). Ropivacaine with epinephrine provided higher success rate and duration of anesthesia than the other formulations in all studied models ($p<0.05$). Ropivacaine with 2- hydroxypropil- β -cyclodextrin showed higher success rate and duration of anesthesia than plain ropivacaine in IONB and SISW models ($p<0.05$). No differences between these two formulations were found in the IANB study ($p>0.05$). In conclusion, 2- hydroxypropil- β -cyclodextrin increases ropivacaine anesthetic efficacy in inflamed and non-inflamed soft tissues (IONB and SISW), and could be an option for postoperative surgical pain control. Epinephrine is more potent to improve the anesthetic efficacy

in all studied models being the only effective additive for pulpal anesthesia.

Key-words: ropivacaine, local anesthesia, hypernociception, inferior alveolar nerve block, drug delivery systems, cyclodextrin.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Evolução dos anestésicos locais ao longo das décadas.....	3
2.2 Ropivacaína.....	4
2.3 Uso de aditivos e sistemas de liberação controlada em formulações de anestésicos locais.....	5
3. PROPOSIÇÃO.....	9
4. MATERIAL E MÉTODO.....	10
4.1 Animais.....	10
4.2. Delineamento experimental.....	10
4.3. Material.....	11
4.4. Preparação das formulações anestésicas.....	12
4.4.1. Formulação de ropivacaína 0,5% com 2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina.....	12
4.4.2. Soluções de ropivacaína 0,5% e ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000.....	13
4.4.2.1 Solução de ropivacaína 0,5%.....	13
4.4.2.2 Solução de ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000	13
4.5. Avaliação da eficácia anestésica.....	14
4.5.1. Experimento 1 – Bloqueio do Nervo Infraorbital (BNIO).....	14
4.5.2. Experimento 2 - Infiltração Subcutânea em Ferida Cirúrgica (ISFC).....	15
4.5.3. Experimento 3 - Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior. (BNAI).....	19
4.5.3.1.Técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI).....	22
4.6. Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1 Bloqueio do nervo infraorbital.....	25
5.2 Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica.....	27
5.3 Bloqueio do nervo alveolar inferior.....	29

6	DISCUSSÃO.....	33
7	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS	41
	ANEXO.....	51

1 INTRODUÇÃO

Os anestésicos gerais e locais são fundamentais no controle da dor trans-operatória, sendo os anestésicos locais importantes também para o controle da dor pós-operatória. Entretanto, a ocorrência de reações adversas, especialmente quando do uso de grandes doses em bloqueios anestésicos na área médica limita seu uso (Lafont et al., 1996).

Mesmo com o isolamento de isômeros menos tóxicos, como a levobupivacaína e ropivacaína (de Jong, 1994), alguns casos de toxicidade têm sido relatados na literatura, tanto para a levobupivacaína quanto para a ropivacaína (Curtis et al., 2004; Kimura et al., 2007; Dhir et al., 2007; Foxall et al., 2007).

Paralelamente às alterações na molécula dos anestésicos locais, tem-se buscado alternativas de melhora, alterando os componentes das soluções anestésicas. Assim, sistemas de liberação controlada como lipossomas e ciclodextrinas, entre outros, passaram a ser estudados (de Araújo et al., 2003).

A complexação de um medicamento com ciclodextrinas permite liberação mais lenta de medicamentos, o que pode promover aumento na duração do seu efeito e diminuição da sua toxicidade (Fréville et al., 1996; Karashima et al., 2007; de Paula et al., 2010). Esta complexação pode ser feita com várias classes de medicamentos, como agentes antidiabéticos, anti-inflamatórios e anestésicos locais, permitindo sua administração por diversas vias (subaracnóidea, venosa, muscular, peridural, oral, nasal e dérmica) (Irie & Uekama, 1997; Veiga et al., 2000; Loftsson & Masson, 2001; Dalmora et al., 2001; de Araújo et al., 2008).

Foi demonstrado recentemente que a complexação de ropivacaína com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina promove aumento da duração da anestesia em bloqueio do nervo ciático de camundongos, quando comparada à solução de ropivacaína sem aditivos, podendo assim ser uma formulação promissora. Neste modelo foram avaliados os bloqueios motor e sensitivo, sem presença de inflamação.

O controle da dor pós-cirúrgica é uma preocupação na área médica, bem como a obtenção de anestesia pulpar satisfatória é crucial para o exercício da odontologia. Neste sentido, o presente estudo foi conduzido a fim de avaliar a eficácia anestésica da

formulação de ropivacaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em modelos de anestesia de tecido mole com inflamação (para controle de dor pós-operatória) e de tecidos moles da região perioral e de anestesia pulpar (visando futura aplicação em odontologia).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EVOLUÇÃO DOS ANESTÉSICOS AO LONGO DAS DÉCADAS

Durante muito tempo acreditou-se que a dor era um castigo por parte de Deus, tendo o homem que se submeter, calado, a procedimentos dolorosos. As principais maneiras de controlar a dor e a perda de sangue durante o parto ou outros procedimentos cirúrgicos eram mordendo um pedaço de madeira ou pano e acabando a intervenção cirúrgica no menor tempo possível. Estes procedimentos visavam que o paciente suportasse a dor, portanto qualquer cirurgia era um enorme sofrimento (Collins, 1979; Friedman e Friedland, 2006).

A palavra anestesia vem do grego “aisthesis” e significa “sem capacidade de sentir” e foi usada por Dioscórides, no século I d.C, no sentido de insensibilidade dolorosa. A história concede o título de “pai” da anestesia ao dentista William Thomas Morton, que em 16 de outubro de 1846 em Boston, juntamente com o cirurgião John Collins Warren, demonstrou em público os efeitos anestésicos do éter, quando realizaram uma cirurgia para remoção de um tumor (Friedman e Friedland, 2006).

Desde Morton e Warren, e com a descoberta das propriedades anestésicas da cocaína no olho e em membranas mucosas, por Carl Kôller e Von Anrep, na década de 1880, a anestesia local tem evoluído consideravelmente. A cocaína embora tenha um excelente potencial farmacológico como anestésico local, possui o grande inconveniente de causar dependência, intoxicação e até a morte, o que praticamente inutiliza a sua indicação para fins terapêuticos (Yagiela et al., 2000; Rang & Dale, 2007).

A evolução dos anestésicos passou pela síntese da procaína, tetracaína e benzocaína e outros pertencentes ao grupo dos ésteres, que demonstraram alta incidência de reações alérgicas, causadas pelo seu metabólito, o ácido para-aminobenzóico (PABA) (Eggleston & Lush, 1996).

A introdução clínica de um novo grupo de anestésicos, as amidas, foi iniciada em 1943 com a síntese da lidocaína, continuando posteriormente com a mepivacaína, prilocaína, articaína, bupivacaína e ropivacaína, sendo as duas últimas anestésicos locais de longa duração

de ação (de Jong, 1994; Malamed, 2005; Ruetsch et al., 2001).

A toxicidade sistêmica dos anestésicos locais normalmente está relacionada com a dose excessiva da solução, sendo primeiramente afetado o sistema nervoso central (Malamed, 2005).

A maioria dos anestésicos locais de uso clínico são moléculas quirais, sendo comercializados em sua forma racêmica, ou seja, contendo ambos os isômeros dextro e levorrotatórios [respectivamente, enantiômeros D(+) e S(-)]. Muitas das ações indesejáveis desse grupo de medicamentos podem ser atribuídas ao isômero dextrorrotatório. Assim, a toxicidade cardíaca da bupivacaína, que apresenta ligação rápida aos canais de sódio e desligamento lento (conhecido como “fast-in, slow-out”) é, em grande parte, mediada pelo isômero dextrorrotatório (Denson et al., 1992; Morrison et al., 2000).

Além da própria levobupivacaína (isômero levorrotatório da bupivacaína), outra alternativa para a bupivacaína racêmica é a ropivacaína, que já teve sua eficácia comprovada na área médica e, da mesma forma, também tem sido demonstrada em odontologia, tanto em bloqueio do nervo alveolar inferior, quanto em técnica infiltrativa (Kennedy et al., 2001; Ernberg & Kopp, 2002; Axelsson & Isacson, 2004; Palma, 2004; Oliveira et al., 2006; El-Sharawy & Yagiela, 2006; Buric, 2006).

2.2. ROPIVACAÍNA

A ropivacaína, homólogo n-propil da bupivacaína, é o primeiro anestésico local utilizado exclusivamente na forma levorrotatória, atribuindo-se a esta configuração sua menor toxicidade sobre os sistemas cardiovascular e nervoso central. Além desta vantagem, proporciona ainda recuperação mais rápida do bloqueio motor, mantendo a latência e duração do bloqueio sensitivo comparáveis aos proporcionados pela bupivacaína racêmica (Clarkson et al., 1985; Tsuchiya et al., 2004; Simpson et al., 2005; Zink & Graf, 2008).

Mesmo apresentando menor toxicidade que a bupivacaína, casos de toxicidade com o uso de ropivacaína em bloqueios anestésicos na área médica são relatados na literatura (Curtis et al., 2004; Kimura et al., 2007; Dhir et al., 2007). Nestes relatos incluem-se casos em que houve neurotoxicidade, convulsão, perda da consciência e parada cardíaca.

A ropivacaína está disponível apenas para uso médico, sendo comercializada na forma de frasco ampola, sem adição de vasoconstritor. Assim como a bupivacaína, apresenta latência maior do que os demais anestésicos do grupo amida, por apresentar pka mais elevado, no valor de 8,1. Apresenta elevada ligação às proteínas plasmáticas (90-95%) e sua meia-vida plasmática é de 4,2h (Malamed, 2005; Katz et al., 1990.)

Por ser menos lipofílica que a bupivacaína, a ropivacaína apresenta menor capacidade de penetração nas fibras mielinizadas dos nervos motores, resultando em menor bloqueio motor e portanto maior grau de diferenciação do bloqueio sensorial. Em baixas concentrações (0,2 a 0,5%) a ropivacaína produz preferencialmente bloqueio sensitivo, enquanto que concentrações maiores (0,75% e 1%) não apresentaram diferença entre bloqueio motor e sensitivo (Jeffrey et al., 1990; Zaric, 1991).

Há polêmica sobre a atividade vasoconstritora da ropivacaína, especialmente em bloqueios próximos a artérias terminais (Burke et al., 2000; Wienzek et al., 2007; Keramidas & Rodopoulou, 2007; Jansson, 2008). Alguns estudos mostram que a maior redução do fluxo sanguíneo ocorre com soluções menos concentradas (Cederholm et al., 1992), apresentando resposta bifásica – concentrações mais altas não eliciam vasoconstrição (Gherardini et al., 1995; Nakamura et al., 1993).

Em odontologia tem sido demonstrado que a adição de epinefrina à solução de ropivacaína contribui para aumentar significativamente a duração anestésica. Este aumento foi descrito tanto em estudos de bloqueio no nervo alveolar inferior, quanto em técnica infiltrativa (Kennedy et al., 2001; Bhering, 2010; Franz-Montan et al., 2011). A injeção de ropivacaína associada à epinefrina em outros locais, como na injeção intradérmica, também mostrou aumento da duração da anestesia (Cederholm et al., 1994).

2.3. USO DE ADITIVOS E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA EM FORMULAÇÕES DE ANESTÉSICOS LOCAIS

O emprego de aditivos para aumentar a duração da anestesia é bastante utilizado na odontologia e também tem sido usado na medicina. Os mais utilizados em odontologia são os agonistas α_1 -adrenérgicos (epinefrina, norepinefrina, corbadrina e fenilefrina) e o

agonista de receptores V_1 , felipressina, um dos derivados sintéticos da vasopressina (Malamed, 2005).

Além de aumentar a duração da anestesia, o uso de vasoconstritores e sistemas de liberação controlada de drogas pode também diminuir a toxicidade de formulações anestésicas locais, por permitir absorção mais lenta da solução, proporcionando assim menor pico de concentração plasmática (Boogaerts et al., 1993; Karmakar et al., 2005; de Paula et al., 2010).

A epinefrina é o vasoconstritor mais utilizado em odontologia devido a sua eficácia, mesmo em baixas concentrações. Pela ação em receptores α_1 -adrenérgicos, promove constrição dos vasos no local injetado. A absorção para a corrente sanguínea pode desencadear aumento da pressão arterial, especialmente da pressão sistólica, não apenas pela vasoconstrição, mas pela ação em receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos. Entretanto, este efeito costuma ser transitório, devido a curta meia-vida da epinefrina na corrente sanguínea e ainda por sua ação vasodilatadora, mediada pelos receptores β_2 -adrenérgicos presentes nos vasos da musculatura esquelética, aliada ao estímulo da resposta parassimpática (mediada pelo nervo vago) (Yagiela et al., 2000; Hersh et al., 2006).

Além dos mencionados, outros aditivos têm sido utilizados em associação aos sais anestésicos, como a clonidina (agonista α_2 -adrenérgico) (Brkovic et al., 2005) e os opióides, como o tramadol, um agonista de receptores μ (James et al., 1996; Arcioni et al., 2002; Robaux et al., 2004).

Apesar dos avanços, ainda há um longo caminho a percorrer na busca da solução anestésica ideal, especialmente na área do controle da dor pós-cirúrgica e em pacientes terminais com sintomatologia dolorosa prolongada, para os quais a infusão contínua de anestésico local pode resultar em toxicidade significativa, especialmente quando associados a vasoconstritores. Nesse sentido, a partir da década de 1960 têm sido estudados sistemas de liberação controlada de drogas, como os lipossomas, os biopolímeros e as ciclodextrinas (de Araújo et al., 2003; de Paula et al., 2010).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos com 6 a 8 unidades de glicose, obtidos a partir do amido, (derivado principalmente do milho e de batatas), pela ação das glicosiltransferases presentes em alguns microrganismos e plantas. A estrutura cíclica destes

compostos apresenta grupos hidroxil primários e secundários orientados para o exterior, conferindo um caráter hidrofílico a este, enquanto que a cavidade interna apresenta-se relativamente hidrofóbica. Esta estrutura permite às ciclodextrinas complexarem-se com moléculas que apresentem dimensões compatíveis com sua cavidade, cujo diâmetro varia de 5 a 8Å. Entre as três ciclodextrinas naturais α , β e γ , a mais utilizada para complexação com medicamentos é a β -ciclodextrina (de Araújo et al., 2003; Davis & Brewster 2004).

No entanto, a administração parenteral das ciclodextrinas particularmente da β -ciclodextrina, pode causar nefrotoxicidade devido à formação de um complexo de baixa solubilidade entre a β -ciclodextrina e o colesterol, que precipita e impede a filtração glomerular nos rins (Irie & Uekama, 1997).

Devido à solubilidade aquosa limitada das α , β e γ -ciclodextrinas, respectivamente 13%, 2% e 26% (p/p), modificações foram feitas na estrutura das mesmas, promovendo melhora das propriedades de carreamento e diminuição de seus efeitos tóxicos intrínsecos. A quebra da ligação de hidrogênio entre os grupos secundários de hidroxila da β -ciclodextrina, via molecular, proporciona a síntese de compostos mais solúveis, como a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina que tem solubilidade em água aumentada, chegando até 60% (p/p) (Matioli, 2000; de Araújo et al., 2003; Davis & Brewster, 2004).

Embora, a molécula de ciclodextrina seja hidrofílica, o interior é relativamente apolar e cria um micro ambiente hidrofóbico, estas propriedades são responsáveis pela sua solubilidade em água e capacidade hidrofóbica de encapsular e incorporar moléculas em complexo de inclusão. Estas características são as bases para um equilíbrio dinâmico das ciclodextrinas e base medicamentosa para formar a complexação dos medicamentos (Davis & Brewster, 2004).

A complexação com ciclodextrinas permite melhora nas propriedades dos medicamentos, proporcionando maior estabilidade (evitando a oxidação) e liberação mais lenta, promovendo assim, aumento da duração do efeito e diminuição da toxicidade. O uso das ciclodextrinas tem encontrado muitas aplicações como em agrotóxicos, alimentos, fragrâncias e fármacos. A complexação pode ser feita com várias classes de medicamentos, como agentes antidiabéticos, anti-inflamatórios e anestésicos locais, permitindo sua administração por diversas vias, tais como subaracnóidea, venosa, muscular, peridural, oral,

nasal e dérmica (Irie & Uekama, 1997; Veiga et al., 2000; Loftsson & Masson, 2001; Dalmora et al., 2001; Davis & Brewster, 2004; de Araújo et al., 2008). Alguns medicamentos já são comercializados na Europa, no Japão e nos Estados Unidos, na forma complexada com ciclodextrinas, entre os quais podem ser citados a dexametasona, nimesulida, omeprazol, piroxicam, indometacina e itraconazol (Davis & Brewster, 2004).

Especificamente com relação aos anestésicos locais, a eficácia da complexação com ciclodextrinas em aumentar a duração da anestesia foi demonstrada em animais, com a prilocaina, em bloqueio do nervo infraorbital (Hassan et al., 1985), com a lidocaína, em bloqueio do nervo ciático (Suzuki et al., 2009), com a bupivacaína, em bloqueios epidural, espinhal e do nervo ciático (Fréville et al., 1996; Dollo et al., 2000; Estebe et al., 2002; Karashima et al., 2007) e com a ropivacaína, em bloqueio do nervo ciático (de Araújo et al., 2008).

Neste último trabalho, de Araújo et al. (2008) observaram que a ropivacaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, quando comparada à ropivacaína sem aditivos, apresentou menor latência para o bloqueio motor, sem alterar a duração do mesmo, enquanto que para o bloqueio sensitivo a complexação resultou em aumento de 1,3 a 1,6 vezes na intensidade e duração da analgesia em relação à solução de ropivacaína sem aditivos. Os resultados do ensaio de hemólise do mesmo estudo sugerem que a complexação também pode diminuir a toxicidade dos dois compostos, pois a dose necessária para hemólise foi maior com a ropivacaína complexada do que para cada composto (ropivacaína e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina) isoladamente. Esses resultados mostram que as ciclodextrinas, em particular a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, apresentam grande potencial como sistema liberador de anestésicos locais, sendo necessários mais estudos a fim de avaliar sua atuação em diferentes tipos de bloqueio.

Até o momento, apenas o estudo de Araújo et al., 2008, avaliou esse tipo de complexação com a ropivacaína, em bloqueio sensitivo e motor do nervo ciático, justificando, portanto, a realização de estudos em outros modelos complementares, para a avaliação da anestesia em tecido mole, pulpar e em anestesia pós-operatória, para controle da dor após procedimento cirúrgico.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia anestésica da ropivacaína 0,5% complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, comparando-a à da ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 e ropivacaína 0,5% sem aditivos, em três modelos: bloqueio do nervo infraorbital, infiltração subcutânea em ferida cirúrgica e bloqueio do nervo alveolar inferior, em ratos, para investigar respectivamente anestesia de tecidos moles, anestesia pós-operatória em tecido inflamado e anestesia pulpar.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP) sob Protocolo nº 1935-1 (ANEXO) e foi desenvolvido na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP).

4.1 ANIMAIS

No total foram utilizados 129 ratos, (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos, machos, pesando entre 250-400g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP), os quais foram mantidos no biotério da FOP/UNICAMP em ambiente com temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclos claro-escuro estabelecidos (12/12h), com água e comida a vontade. Os animais receberam uma marcação na calda e foram divididos aleatoriamente em grupos distintos para os três experimentos.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste estudo foi avaliada a eficácia anestésica das formulações de ropivacaína 0,5% complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, ropivacaína 0,5%, ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000. Como controle foram utilizadas soluções de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e cloreto de sódio 0,9%. As formulações foram avaliadas em três modelos experimentais, em ratos: bloqueio do nervo infraorbital (BNIO), infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (ISFC) e bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI). O delineamento dos três experimentos está apresentado na Figura 1. Em todos os experimentos o pesquisador-avaliador não tinha conhecimento da formulação utilizada, permitindo avaliação imparcial, caracterizando os experimentos como cegos.

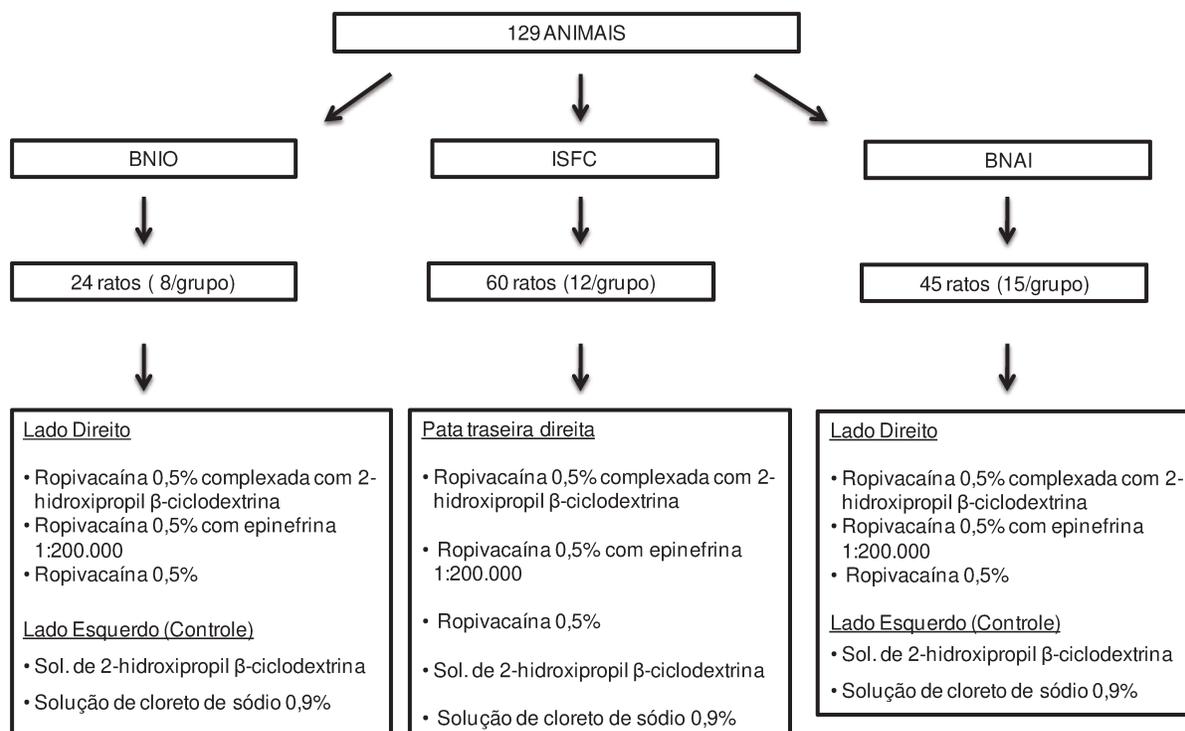


Figura 1. Delineamento geral dos três experimentos.

4.3 MATERIAL

Para a preparação das formulações de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina e de ropivacaína foram utilizados cloridrato de ropivacaína (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Roquette Serv. Tech. Lab., França), tampão HEPES 20mM com NaCl 154 mM (Q-biogene), solução de cloreto de sódio 0,9% (Equiplex Ind. Farm., Brasil) e solução de epinefrina 1mg/mL (Drenalin®, Ariston Ind. Quím. Farm. Ltda.).

No experimento de bloqueio do nervo alveolar inferior foram utilizados ketamina (Dopalen®) e xilazina (Rompun®) para anestesia geral dos animais e tiopental (Thiopentax® injetável, Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda) para sedação dos mesmos. Este último também foi utilizado no experimento de bloqueio do nervo infraorbital. No experimento de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica foi utilizado para anestesia geral Isoflurano (Isoforine®, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil).

Foram utilizadas agulhas descartáveis 13 x 4,5 (BD Precison Glide[®] - 26G, Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR, Brasil), acopladas a seringas centesimais de 1mL (BD[®]) para a injeção das preparações anestésicas e agulhas descartáveis 25 X 7 (BD PrecisonGlide[®] - 22G, Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR, Brasil) para a anestesia geral e sedação.

Também foram utilizados lâmina de bisturi descartável n. 10, cabo de bisturi, porta-agulha Mayo-Hegar, tesoura Metzembraum curva 15 cm, fio de sutura de nylon monofilamento preto 6-0 agulhado (BRASUTURE Ind Com Imp Exp Ltda, São Sebastião da Grama, SP, Brasil), pinça dente de rato, pinça clínica para algodão, gaze estéril, algodão, mesa cirúrgica para ratos, solução a base de ácido fosfórico a 37% em forma de gel (MAGIC ACID Gel, Vigodente[®]), adesivo fotopolimerizável (MAGIC BOND, Vigodente[®]), pincel com cerdas macias, resina fotopolimerizável (Z100, 3M ESPE[®]), espátula para resina composta, aparelho Fotopolimerizador (Gnatus[®]), gaiolas para analgesímetro de von Frey (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e capela para exaustão de gases (Ideoxima Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto-SP).

Para avaliação da eficácia anestésica no bloqueio do nervo alveolar inferior foi utilizado o aparelho emissor de impulsos elétricos “pulp tester” elétrico Vitality Scanner modelo 2006 (Analytic Technology, Redmond, EUA) e para avaliação da anestesia na pata no modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica foi usado o analgesímetro digital von Frey (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

4.4 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES ANESTÉSICAS

4.4.1 Formulação de Ropivacaína com 2-Hidroxiopropil- β -Ciclodextrina

A formulação de ropivacaína complexada com 2- hidroxipropil- β -ciclodextrina foi preparada no laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob orientação da professora Dra. Eneida de Paula.

O complexo de inclusão sólido foi obtido misturando-se 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e ropivacaína em água, tal que a razão molar fosse de 1:1 (de Araújo

et al., 2008). A amostra foi deixada sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente para que houvesse completa dissolução e o sistema atingisse o equilíbrio. Em seguida foi congelada em nitrogênio líquido e levada para liofilização e armazenada em freezer a -20°C para posterior uso (Loftsson & Masson, 2001; Moraes et al., 2007).

O complexo liofilizado foi pesado em quantidade suficiente para obter a concentração final de ropivacaína 0,5% e em seguida foi dissolvido em tampão (HEPES 20 mM pH 7,4 com NaCl 154 mM). Após o preparo das soluções foi verificado o pH da solução.

4.4.2 Soluções de Ropivacaína 0,5% e Ropivacaína 0,5% com Epinefrina 1:200.000

Em virtude da apresentação de ropivacaína comercial ser na forma de frasco ampola e haver diferença de concentração e composição entre as soluções propostas no estudo, foi realizada a manipulação da ropivacaína comercial, conforme descrições abaixo. As soluções de ropivacaína 0,5% e ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 foram preparadas no laboratório de Microbiologia da área de Farmacologia da FOP/UNICAMP, em ambiente estéril, imediatamente antes do uso, não sendo guardadas para uso posterior.

4.4.2.1 Solução de ropivacaína 0,5%

Foram pipetados 5 mL da solução de ropivacaína 1% e 5 mL da solução de cloreto de sódio 0,9%, os quais foram colocados em um béquer esterilizado.

4.4.2.2 Solução de ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000

Em frasco esterilizado foram adicionados 4,95 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril à 5 mL de ropivacaína 1% e 0,05 mL de epinefrina 1:1.000 (sendo cada solução previamente pipetada), obtendo-se assim a solução de ropivacaína na concentração de 0,5% com epinefrina 1:200.000.

Previamente às injeções anestésicas, os pHs das formulações foram aferidos em

pHmetro (ORION[®], modelo 290^a) acoplado a um micro-eletrodo (LAZAR BNC). 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

4.5.1 Experimento 1 - Bloqueio do Nervo Infraorbital (BNIO)

O nervo infraorbital emerge do forame homônimo, logo abaixo da órbita e é responsável pela inervação do lábio superior e pele desta região. No rato o forame infraorbital localiza-se no espaço entre os molares e o dente incisivo de cada lado da maxila do animal. O bloqueio deste nervo é realizado pela injeção de formulação anestésica próximo ao forame, promovendo anestesia apenas de tecidos moles (Fink *et al*, 1975; Cereda *et al*, 2006).

No presente estudo este experimento foi realizado preliminarmente a fim de constatar a eficácia das formulações a serem testadas, uma vez que este modelo é de fácil execução e promove resultados reprodutíveis (Cereda *et al.*, 2006).

Foram utilizados neste experimento 24 ratos, sendo três grupos com 8 animais para cada preparação anestésica testada e seu respectivo controle. Os animais receberam sedação leve com tiopental, injetado na dose de 25 mg/kg por via intraperitoneal e após 5 minutos foi realizado o pinçamento do lábio superior em ambos os lados, direito e esquerdo, para testar a responsividade do animal ao estímulo doloroso (Cereda *et al*, 2006). Em seguida, cada rato recebeu 0,1 mL de formulação próximo ao forame infraorbital, logo abaixo da órbita, como mostrado na Figura 2A. Cada animal foi seu próprio controle, recebendo no lado direito uma das formulações com ropivacaína e no lado esquerdo a respectiva formulação controle, conforme especificado a seguir.

	<u>Lado Direito</u>	<u>Lado Esquerdo</u>
<u>Grupo 1:</u>	Ropivacaína 0,5% complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina	2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina
<u>Grupo 2:</u>	Ropivacaína 0,5%	Solução de cloreto de sódio 0,9%
<u>Grupo 3:</u>	Ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000	Solução de cloreto de sódio 0,9%

A avaliação da anestesia foi testada pelo pinçamento do lábio do animal (Figura 2B), sendo atribuído os escores 0 para presença de resposta aversiva e 1 para ausência de resposta. O teste foi repetido a cada 5 minutos até que fosse observada resposta aversiva do animal, caracterizada por vocalização ou movimentação no lado injetado com a formulação contendo ropivacaína. Animais que não apresentavam esse tipo de resposta no lado direito em até 10 minutos após a injeção eram considerados como sucesso da anestesia. O período de tempo no qual o animal permanecia sem resposta ao estímulo aversivo foi considerado como duração da anestesia.

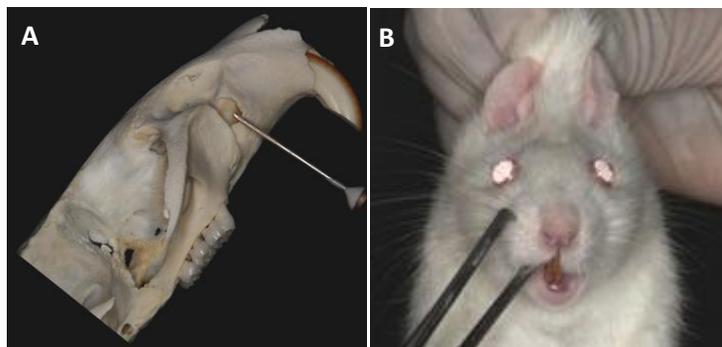


Figura 2. A. Localização do forame infraorbital; B. Avaliação do BNIO através do pinçamento do lábio.

4.5.2 Experimento 2 - Infiltração Subcutânea em Ferida Cirúrgica (ISFC)

Este modelo experimental foi descrito por Vandermeulen et al. (1994) e Brennan et al. (1996), sendo posteriormente modificado por Grant et al. (1997). Baseia-se na indução de inflamação na pata por meio de uma ferida cirúrgica (incisão e sutura), sendo a

nociceção avaliada com a aplicação de força crescente com filamentos de von Frey.

No presente estudo foi utilizado o último modelo descrito, porém ao invés dos filamentos, foi utilizado um analgesímetro de von Frey eletrônico. Além desta modificação, foi também alterado o volume de injeção. Grant et al. (1997) usaram 0,3 mL; no presente estudo foi utilizado o volume de 0,1 mL, pois no estudo-piloto o volume maior apresentava extravasamento para fora dos tecidos.

A ausência de resposta aversiva ao estímulo de força após a injeção da formulação anestésica caracteriza a eficácia do anestésico, podendo ser avaliadas a taxa de sucesso e a duração do efeito anestésico. A sequência do modelo utilizado no presente estudo está representada na Figura 3.

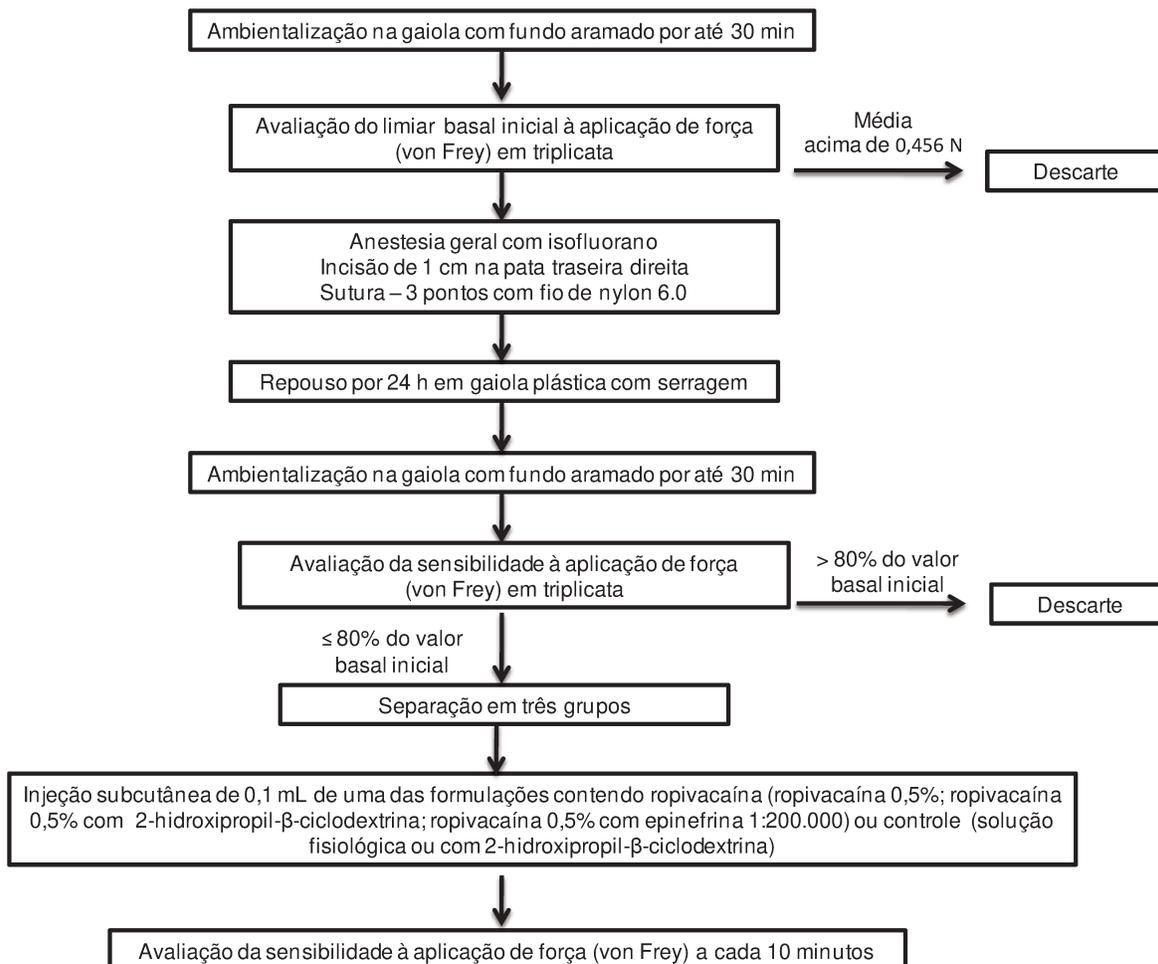


Figura 3. Fluxograma do experimento de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica.

No total foram utilizados neste experimento 60 ratos sendo 12 animais por grupo de estudo. No primeiro dia do experimento cada animal foi colocado individualmente por 30 minutos em gaiola plástica com fundo aramado (trama de 0,5 x 0,5 cm) para ambientalização. As gaiolas utilizadas são específicas para o experimento, pois apresentam um espelho angulado abaixo do fundo aramado que permite a observação do animal. A trama do fundo da gaiola, por sua vez, permite a passagem da ponta ativa do analgesímetro de von Frey para aplicação da força na pata do animal.

Após o período de ambientalização, cada animal foi submetido à avaliação da sensibilidade basal da pata traseira direita pela aplicação de força com intensidade crescente (variando de 0,0073N a 0,456N) do analgesímetro de von Frey. Foram realizadas três aplicações de força (triplicata), com intervalo de 5 minutos entre as aplicações. A aplicação foi realizada pela parte inferior da gaiola, sendo interrompida quando o animal levantava a pata ao estímulo ou quando o mesmo não respondia ao estímulo máximo (0,456N) considerado para aplicação, de acordo com o descrito por Grant et al. (1997). Foi considerada como sensibilidade basal a média das forças aferidas nas três aplicações.

Em seguida os animais foram colocados em uma capela com exaustão e anestesiados com isoflurano. Para esta anestesia, 1 mL de isoflurano foi colocado no fundo de um béquer com algodão, sendo o béquer mantido próximo às narinas do animal. Sob anestesia geral assim descrita, foi realizada uma incisão de 1cm de extensão por 3 mm de profundidade com lâmina de bisturi n.10 na superfície plantar da pata traseira direita, com posterior sutura (3 pontos simples com fio de nylon 6-0) (Figuras 4A e 4B). A extensão da incisão foi medida diretamente na pata; a profundidade foi estabelecida, mantendo 1 mm do chanfro da lâmina de bisturi para fora dos tecidos. A largura do chanfro é de aproximadamente 4 mm.

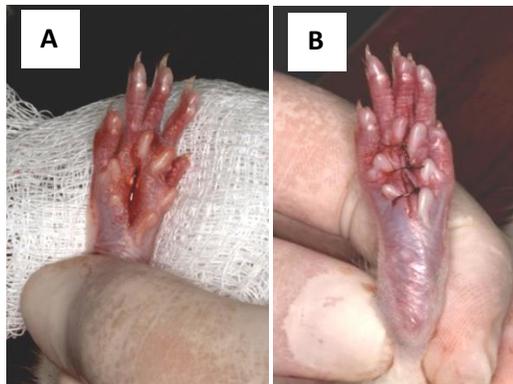


Figura 4. A. Incisão na pata traseira direita, B. Sutura simples

Após estes procedimentos os animais ficaram em gaiolas plásticas com cama de maravalha por 24 h, com água e ração a vontade. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico os animais foram novamente colocados nas gaiolas com fundo aramado, onde permaneceram por até 30 minutos para ambientalização. Em seguida, a sensibilidade da pata traseira direita foi testada em intervalos de 5 minutos com aplicação de força por meio do analgesímetro de von Frey (com intensidade crescente variando de 0,0073N a 0,456N), lateralmente à incisão, em triplicata. A resposta foi considerada como hipernocicepção quando a retirada da pata ocorreu com a aplicação de força no mínimo 20% menor do que a observada na sensibilidade basal (Grant et al., 1997). Todos os animais apresentaram hipernocicepção e não precisaram ser descartados do estudo.

Os ratos com hipernocicepção foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (12 animais/grupo), os quais receberam, ao lado da incisão, a injeção de 0,1mL (Figura 4C) de:

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

Cinco minutos após a infiltração das soluções foi iniciada a avaliação com o analgesímetro de von Frey da forma já descrita, com força crescente até o animal apresentar o reflexo de retirada da pata ou até a aplicação da força máxima de 0,456N. A aplicação da força foi realizada lateralmente à incisão, ou seja, no local de aplicação das

preparações. Os testes foram aplicados a cada 10 minutos até que o animal voltasse a apresentar retirada da pata em resposta à força com intensidade inferior a 0,456N.

A ausência de retirada da pata (elevação da pata) foi considerada como anestesia. A duração da anestesia foi considerada como o tempo decorrido entre a infiltração da formulação na ferida até o último tempo no qual o animal não apresentou retirada da pata com força igual a 0,456N.

4.5.3 Experimento 3 - Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior (BNAI)

Este experimento foi desenvolvido de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 5. Conforme apresentado no fluxograma, os animais foram submetidos à anestesia geral para fixação de fios de cobre aos molares inferiores para permitir a aplicação do estímulo elétrico aos mesmos. Após retorno da anestesia geral, os animais responsivos ao estímulo doloroso de pressão na cauda foram sedados e testados com o estímulo elétrico para avaliação do limiar basal de resposta. Os que respondiam a este estímulo continuavam no estudo e eram submetidos ao bloqueio do nervo alveolar inferior, obtendo-se os parâmetros de sucesso, latência e duração da anestesia. A seguir é feita a descrição detalhada deste experimento.

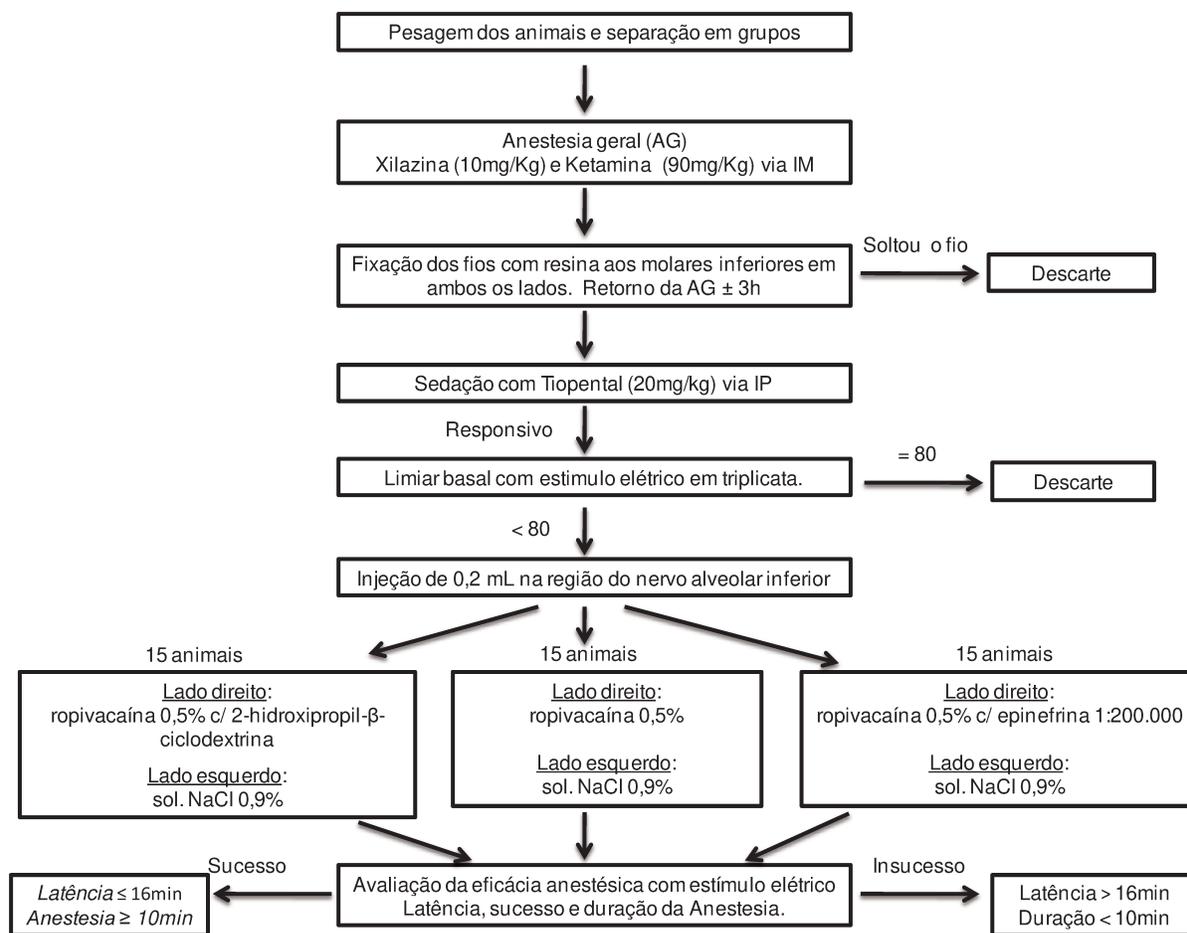


Figura 5. Fluxograma do experimento de bloqueio do nervo alveolar inferior.

Foram utilizados 45 ratos, divididos aleatoriamente em 3 grupos de 15 animais, constituindo os mesmos grupos descritos no experimento de bloqueio do nervo infraorbital (experimento 1). Como descrito no experimento 1, cada animal foi seu próprio controle, recebendo no lado direito uma das formulações com ropivacaína e no lado esquerdo a respectiva formulação controle.

Os animais foram submetidos à anestesia geral com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (90 mg/kg) administradas por via intramuscular e colocados na mesa cirúrgica (Figura 6A) para fixação dos fios de cobre sobre a face oclusal dos molares inferiores, sendo um fio de cada lado (Figura 6B).

Para permitir a condução do impulso nervoso apenas para os dentes, apenas as

extremidades dos fios foram desencapadas, mantendo o restante com a capa plástica. Foi realizado então o condicionamento do esmalte dental da superfície oclusal dos molares com o gel de ácido fosfórico a 37% por 30 segundos, seguido de lavagem e remoção do gel. Após secagem da região, foi aplicado o adesivo, o qual foi polimerizado com aplicação de luz pelo fotopolimerizador. Em seguida os fios foram fixados pela aplicação de resina fotopolimerizável, recobrindo toda porção desencapada do fio, a qual manteve contato apenas com o esmalte dental e a resina. A resina foi polimerizada com o fotopolimerizador e os animais ficaram em repouso até retorno da anestesia geral. A fixação dos fios de cobre foi realizada dos dois lados da mandíbula, sendo utilizado um fio de cada cor para cada lado (Figura 6C), a fim de facilitar a identificação do fio para posterior aplicação do estímulo elétrico. As extremidades dos fios que ficaram fora da cavidade bucal, apresentavam-se desencapadas permitindo assim a aplicação do estímulo elétrico.

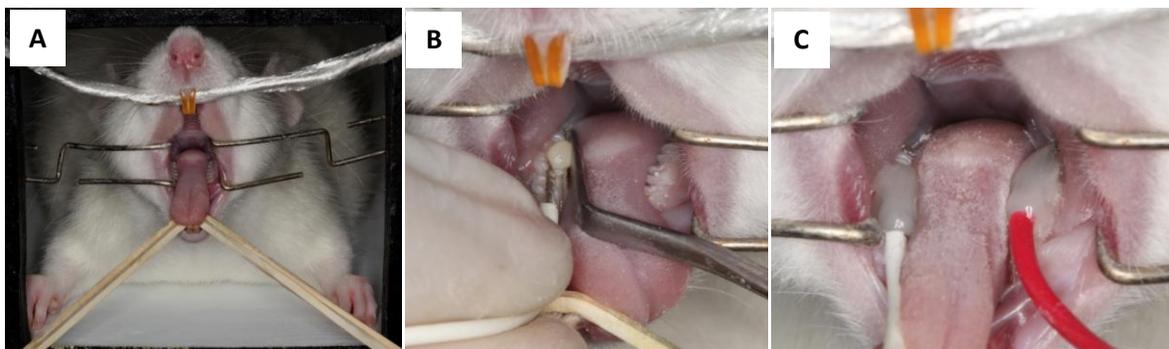


Figura 6. A. Posição na mesa cirúrgica; B. Colocação da resina sobre a superfície oclusal e C. Fios fixados sobre a oclusal dos molares inferiores dos ratos.

Após retorno da anestesia geral (aproximadamente 3 h após a injeção de ketamina e xilazina) os animais foram sedados com tiopental (25 mg/kg), por via intraperitoneal e, uma vez constatada responsividade do animal à preensão da cauda, os molares de cada lado foram testados com aplicação de estímulo elétrico com o aparelho emissor de impulsos elétricos “pulp tester” na extremidade do fio externa à cavidade oral do animal. A aplicação do estímulo elétrico em cada lado foi feita por três vezes (triplicata), com intervalo de 2 min entre cada aplicação, a fim de evitar a acomodação das fibras nervosas (Dreven et al., 1987; Bender et al., 1989; Dal Santo et al., 1992;). O limiar basal foi estabelecido pela média das três aplicações

(separadamente para cada lado). Para continuar no estudo, o animal precisava apresentar resposta aversiva com medida inferior à amperagem máxima emitida pelo aparelho (80). A resposta do animal era caracterizada por movimentos dos músculos faciais, da cabeça ou das vibríças, sendo esses sincronizados com a emissão dos impulsos, que ocorre de forma intermitente.

O “pulp tester” apresenta uma unidade de produção de impulsos elétricos, emitidos de forma gradual, crescente e intermitente, até o máximo de 300 V. O aumento da intensidade dos impulsos pode ser visto no visor do aparelho em uma escala arbitrária que varia de 0 a 80. O impulso é transmitido ao eletrodo, que é colocado em contato direto com o dente em experimentos com humanos, e em contato com um fio condutor em experimentos com animais. A corrente emitida pelo “pulp tester” consegue chegar às fibras sensoriais pulpares, as quais uma vez estimuladas propiciam sensação que é descrita por humanos como formigamento, vibração ou dor (Cooley et al, 1984; Certosimo & Archer, 1996). No rato essa percepção é detectada pelo movimento sincronizado, já descrito. Assim que a movimentação do animal era percebida, o eletrodo era afastado do fio condutor, cessando a aplicação do estímulo.

Em seguida à avaliação do limiar basal de resposta pulpar foram realizadas as injeções para bloqueio do nervo alveolar inferior.

4.5.3.1 Técnica de Bloqueio do Nervo Aveolar Inferior (BNAI)

A técnica utilizada foi desenvolvida por Silva et al. (2009), a partir da descrição do trajeto dos nervos que suprem os dentes mandibulares no rato (Naftel et al., 1999).

Com o animal imobilizado, foi feita a palpação do ângulo da mandíbula, sendo então introduzidos de 11 a 13 mm da agulha (13 mm x 4,5 mm) pela face medial da mandíbula, na região do ângulo mandibular, formando um ângulo de 30° a 45° com a base da mandíbula. A agulha foi introduzida tangenciando o ramo mandibular até a posição final de injeção, próximo ao forame mandibular, onde a formulação foi depositada. A Figura 7 mostra a posição de injeção da formulação nesta técnica. No lado direito foram injetados 0,2 mL de uma das formulações contendo ropivacaína e no lado esquerdo o mesmo volume da

formulação controle correspondente.

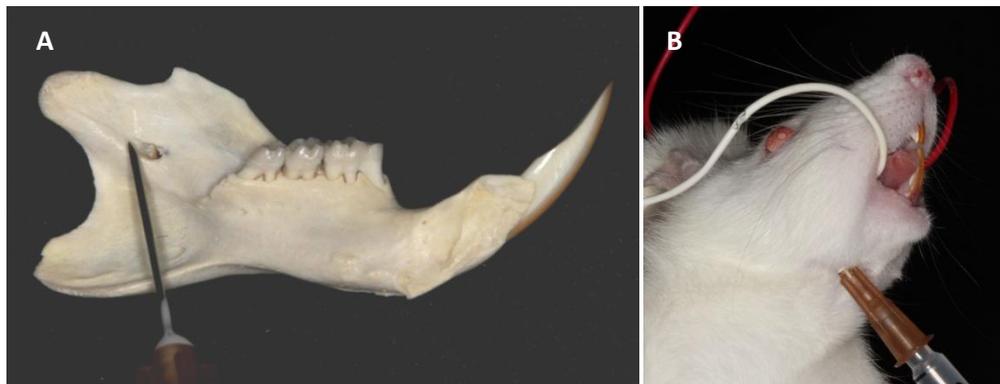


Figura 7. A. Forame mandibular na mandíbula do rato, com a posição da agulha para injeção; B. Bloqueio do nervo alveolar inferior no rato.

Após a injeção, os estímulos elétricos foram aplicados a cada 2 minutos para estabelecer o tempo de latência das formulações, durante o tempo máximo de 16 minutos. Em humanos, vários estudos consideram como um dos critérios de sucesso, o tempo máximo de latência de 15 min (Fernandez et al., 2005; Mikesell et al., 2005). No presente estudo foi considerado como 16 min devido a avaliação ser feita a cada 2 min e por ser a ropivacaína um anestésico local com pKa elevado, que pode apresentar latência mais longa (Malamed, 2005). Os animais que continuaram a apresentar resposta aversiva (movimentação) com a aplicação de estímulo elétrico no lado direito após 16 minutos foram considerados como insucesso da anestesia. Os animais que apresentaram ausência de resposta aversiva neste lado continuaram a receber aplicação de estímulo elétrico a cada 5 minutos até a observação de movimentação (resposta aversiva) neste lado. Estas injeções foram consideradas como sucesso da anestesia. O lado esquerdo serviu como controle de funcionamento adequado do “pulp tester” e da responsividade do animal ao estímulo. A aplicação de estímulo elétrico neste lado devia eliciar resposta aversiva no animal. Caso isso não ocorresse, o animal era descartado do estudo.

Parâmetros avaliados

Os parâmetros avaliados foram latência, duração e sucesso da anestesia, conforme descrição:

- Tempo de latência: intervalo de tempo entre o final da injeção da formulação anestésica e o início de ausência de resposta ao teste elétrico.
- Duração da anestesia: tempo entre o início da anestesia e o tempo imediatamente anterior ao de obtenção de duas respostas aversivas consecutivas, ou seja, intervalo de tempo no qual o animal não apresentava resposta ao estímulo elétrico máximo emitido pelo aparelho.
- Sucesso da anestesia: foi considerado quando o animal apresentava latência de no máximo 16 minutos e permanecia anestesiado por pelo menos 10 minutos.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados foi conduzida com auxílio do software de uso livre BioEstat 5.0 para Windows® (Instituto Mamirauá, Belém, PA); os gráficos foram feitos com os softwares Microsoft Office Excel 2007 e GraphPad Prism versão 5.03, para os quais a Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica apresenta licença de uso. O nível de significância considerado foi 5%.

Os resultados de sucesso da anestesia nos três modelos estudados foram avaliados pelo teste de Log-Rank. A duração da anestesia no modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica e no bloqueio do nervo alveolar inferior, bem como a latência neste último bloqueio foram avaliados pelos testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls; a duração da anestesia no bloqueio do nervo infraorbital foi comparada pelo teste de Tukey.

5 RESULTADOS

A média (\pm desvio padrão) de pH das formulações utilizadas foi de 5,12 ($\pm 0,12$) para a ropivacaína 0,5%, 5,02 ($\pm 0,18$) para a ropivacaína 0,5% associada à epinefrina, 6,89 ($\pm 0,1$) para a ropivacaína 0,5% com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, 6,91 ($\pm 0,1$) para 2-hifroxipropil- β -ciclodextrina e 7,0 ($\pm 0,03$) para a solução de cloreto de sódio 0,9% (solução fisiológica).

Em todos os modelos estudados as formulações controle, que não continham ropivacaína não promoveram anestesia. Os animais continuaram a apresentar estímulo aversivo (movimentação e vocalização nos modelos de bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior e elevação da pata no modelo de ferida cirúrgica) quando da aplicação do estímulo doloroso (pinçamento do lábio superior no modelo de bloqueio do nervo infraorbital, estímulo elétrico no bloqueio do nervo alveolar inferior e força no tecido inflamado no modelo de ferida cirúrgica na pata).

5.1 BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL

Em todos os animais o lado injetado com formulação anestésica apresentou anestesia de tecido mole, ou seja, ausência de resposta aversiva ao estímulo doloroso (pinçamento do lábio superior no lado injetado) no primeiro tempo de avaliação, sendo assim considerado como anestesia imediata.

Os resultados de sucesso da anestesia são mostrados na Figura 8. A formulação contendo epinefrina (Ropi-Epi) apresentou maior taxa de sucesso (Log-Rank; $p < 0,0001$) que as formulações sem aditivos (Ropi) e complexada em 2-hifroxipropil- β -ciclodextrina (Ropi-HP-BCD). Esta última formulação também apresentou maior taxa de sucesso ($p < 0,0001$) que a formulação sem aditivos (Ropi).

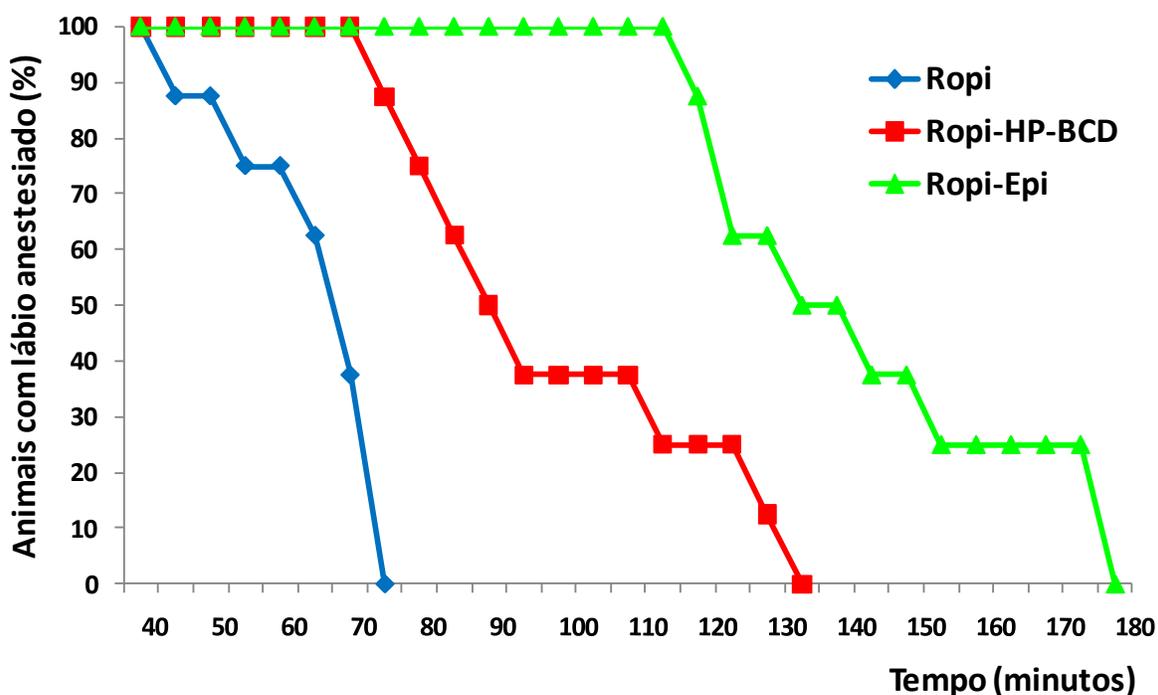


Figura 8. Porcentagem de sucesso da anestesia no lábio superior em função do tempo, após bloqueio do nervo infraorbital em ratos com formulações de ropivacaína 0,5% sem aditivos (Ropi), com epinefrina 1:200.000 (Ropi-Epi) e complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Ropi-HP-BCD) (n=8 ratos/grupo; Log-Rank; $p < 0,0001$).

Semelhante ao que foi observado em relação à taxa de sucesso da anestesia, também para a duração da anestesia a solução de ropivacaína com epinefrina apresentou valores maiores que as demais soluções (Tukey; $p < 0,01$). A ropivacaína complexada com 2-hifroxipropil- β -ciclodextrina (Ropi-HP-BCD), por sua vez, apresentou maior duração de anestesia que a solução de ropivacaína sem aditivos. Os resultados de duração da anestesia no lábio superior após bloqueio do nervo infraorbital podem ser vistos na Figura 9.

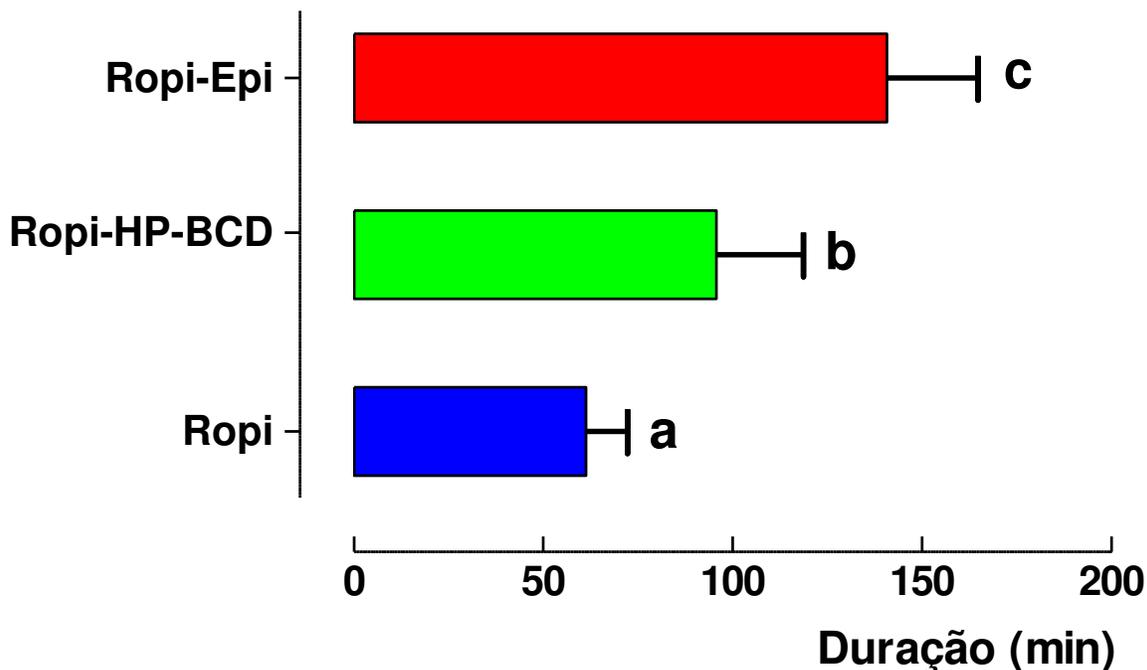


Figura 9. Duração da anestesia (média e desvio padrão, em minutos) após bloqueio do nervo infraorbital, em ratos, com formulações de ropivacaína 0,5% sem aditivos (Ropi), com epinefrina 1:200.000 (Ropi-Epi) e complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Ropi-HP-BCD). (n=8 ratos/grupo; Tukey; Letras distintas: p<0,01).

5.2 INFILTRAÇÃO SUBCUTÂNEA EM FERIDA CIRÚRGICA

Neste modelo, como ocorreu com o bloqueio do nervo infraorbital, que também avaliou anestesia em tecido mole, todos os animais apresentaram anestesia no local injetado com as formulações contendo ropivacaína no primeiro tempo de avaliação após a injeção.

Como pode ser visto na Figura 10, a formulação contendo epinefrina associada à ropivacaína apresentou maior taxa de sucesso (Log-Rank; p<0,0001) que as formulações de ropivacaína sem aditivos e de ropivacaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina.

Esta última também apresentou maior taxa de sucesso (Log-Rank; $p < 0,0001$) que a ropivacaína sem aditivos.

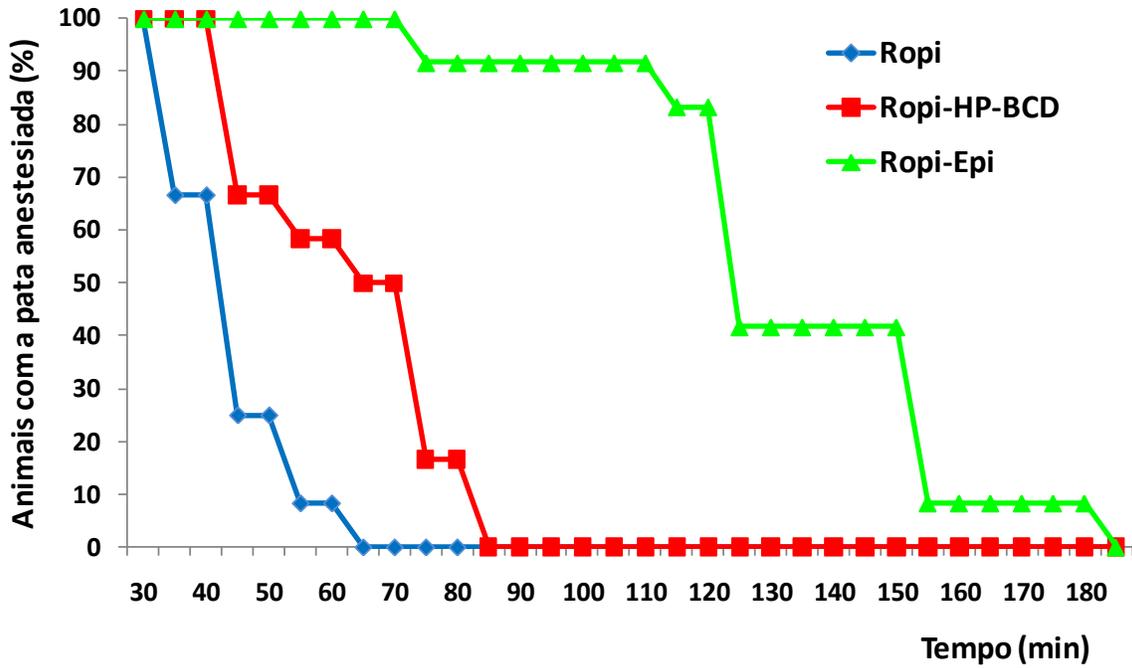


Figura 10. Porcentagem de animais com a pata anestesiada após infiltração subcutânea em ferida cirúrgica com formulações de ropivacaína 0,5% sem aditivos (Ropi), com epinefrina 1:200.000 (Ropi-Epi) e complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Ropi-HP-BCD). (n=12 ratos/grupo; Log-Rank; $p < 0,0001$).

Os resultados de duração da anestesia após infiltração das formulações nas patas submetidas à hipernocicepção são mostrados na Figura 11. Como pode ser visto nesta Figura, a formulação contendo epinefrina apresentou maior duração da anestesia (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls; $p < 0,01$) que as demais formulações. A formulação de ropivacaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, por sua vez, apresentou maior duração de anestesia ($p < 0,05$) que a formulação sem aditivos.

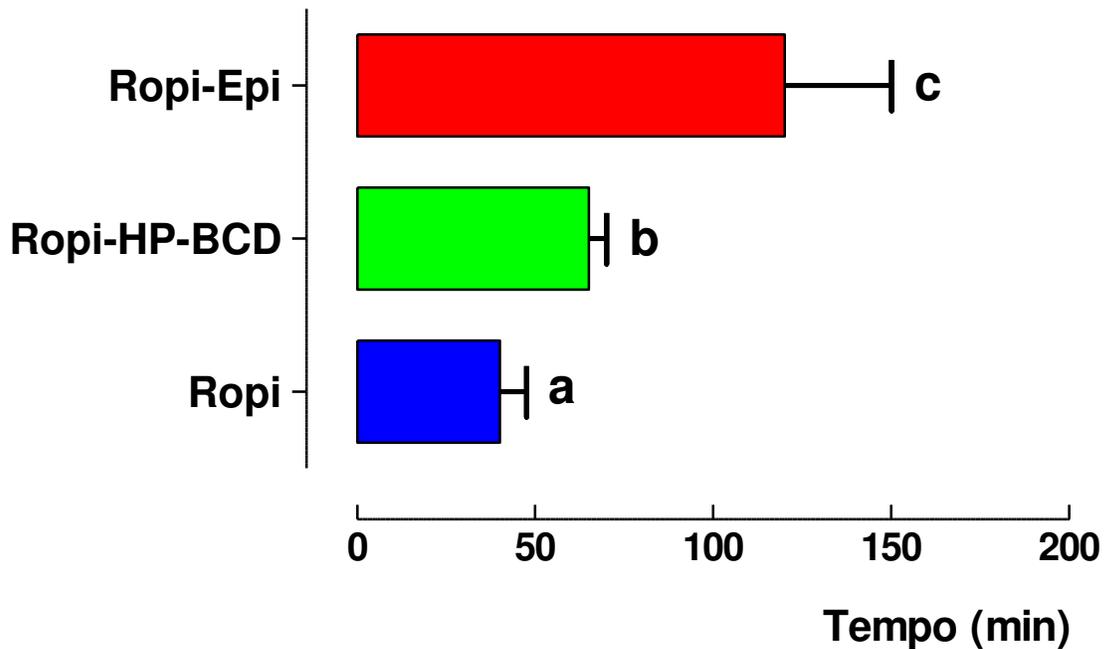


Figura 11. Duração da anestesia (mediana e desvio interquartilico, em minutos) após injeção das formulações de ropivacaína 0,5% sem aditivos (Ropi), com epinefrina 1:200.000 (Ropi-Epi) e complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Ropi-HP-BCD) nas patas submetidas a procedimento cirúrgico. (Letras distintas = $p < 0,05$). (n=12 ratos/grupo; Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls; $p < 0,01$ entre Ropi-Epi e as demais; $p < 0,05$ entre Ropi-HP-BCD e Ropi).

5.3 BLOQUEIO DO NERVO ALVEOLAR INFERIOR

Não foram observadas diferenças no tempo de latência (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$) entre as formulações estudadas. Os resultados de latência, em minutos, no bloqueio do nervo alveolar inferior são mostrados na Figura 12.

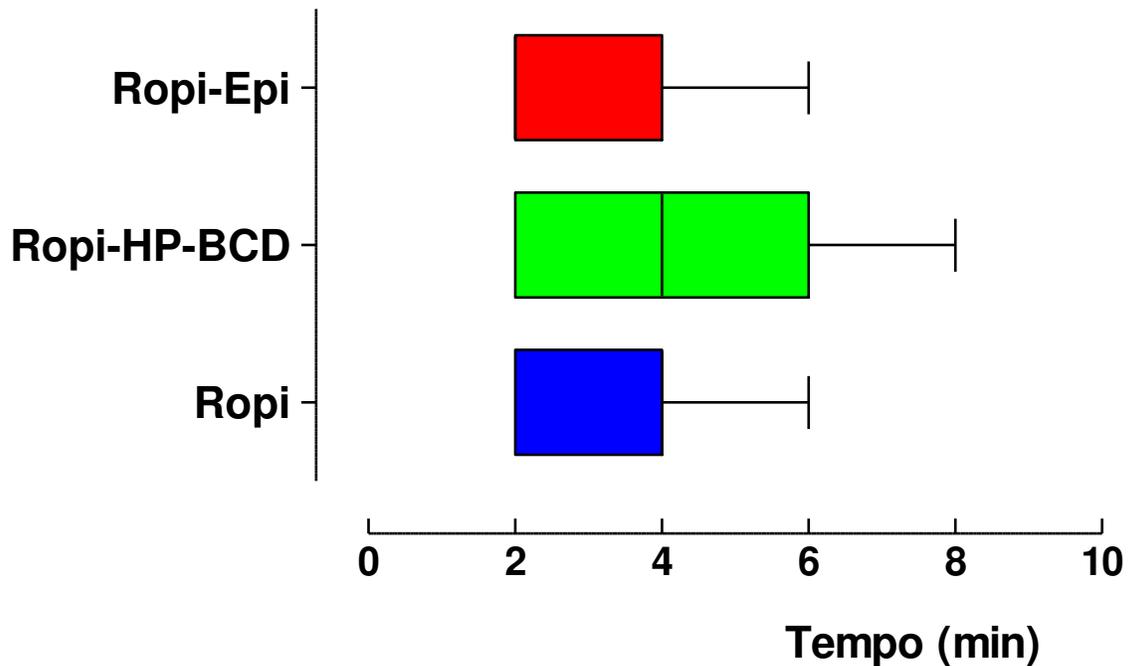


Figura 12. Latência da anestesia (em minutos) nos molares inferiores, após bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos com formulações de ropivacaína 0,5% sem aditivos (Ropi), com epinefrina 1:200.000 (Ropi-Epi) e complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Ropi-HP-BCD). Linha central: mediana; caixa: 1^o e 3^o quartis; suíças: valores máximos e mínimos. (n=15 ratos/grupo; Kruskal-Wallis; $p>0,05$).

Os resultados de sucesso da anestesia (em porcentagem de animais com os molares anestesiados em função do tempo) são mostrados na Figura 13. A formulação contendo epinefrina apresentou maior porcentagem de sucesso (Log-Rank; $p<0,0001$) que as formulações sem aditivos e complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, sendo que estas últimas não diferiram entre si ($p>0,05$).

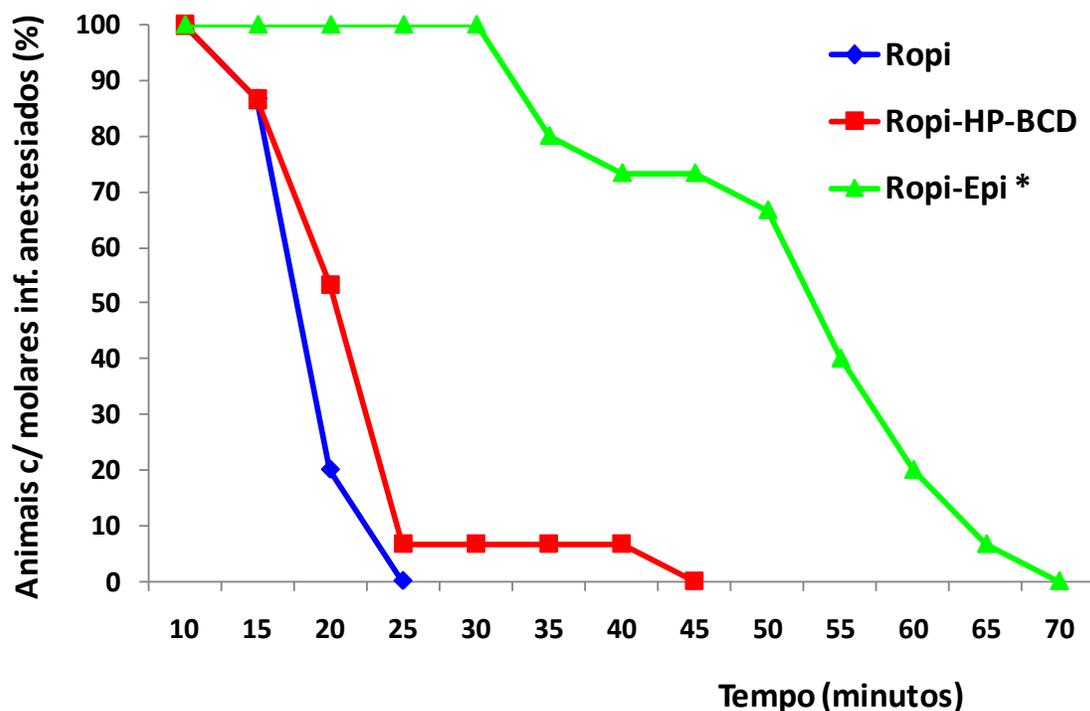


Figura 13. Porcentagem de animais com molares inferiores anestesiados após bloqueio do nervo alveolar inferior com formulações de ropivacaína 0,5% sem aditivos (Ropi), com epinefrina 1:200.000 (Ropi-Epi) e complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Ropi-HP-BCD). (n=15 ratos/grupo; Log-Rank; * = p<0,0001).

Quanto à duração da anestesia, observa-se na Figura 14 que a formulação contendo epinefrina apresentou maior duração (Log-Rank; p<0,0001) que as formulações sem aditivos e complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, não havendo diferenças entre estas duas últimas formulações (p>0,05).

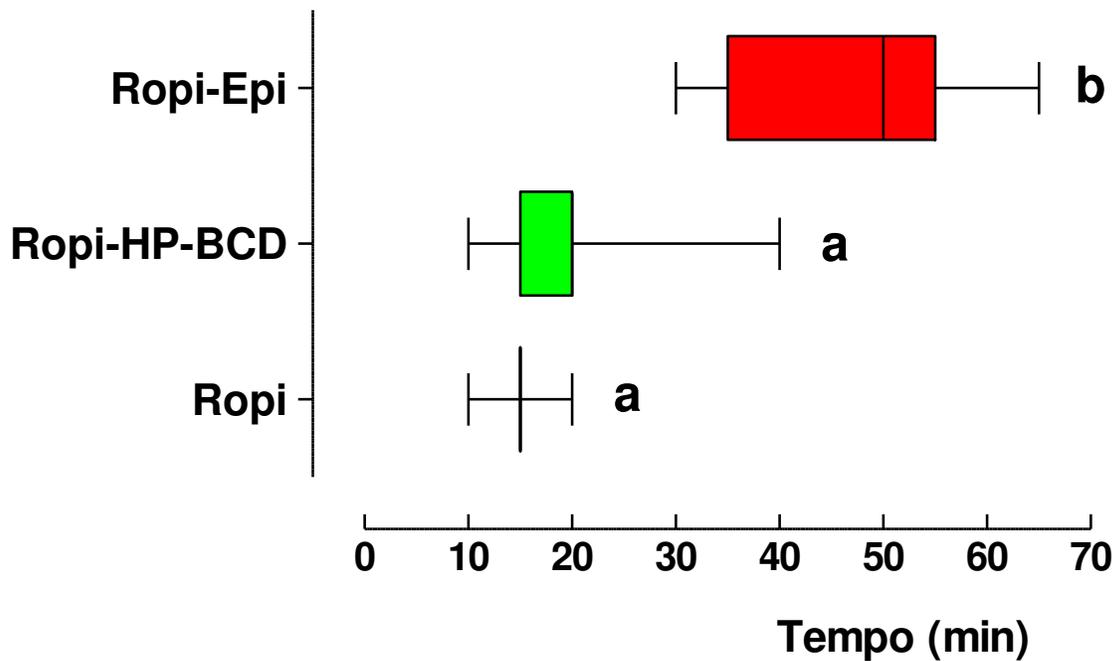


Figura 14. Duração da anestesia (em minutos) nos molares inferiores de ratos, após bloqueio do nervo alveolar inferior com formulações de ropivacaína 0,5% sem aditivos (Ropi), com epinefrina 1:200.000 (Ropi-Epi) e complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Ropi-HP-BCD). Linha central: mediana; caixa: 1^o e 3^o quartis; suíças: valores máximos e mínimos. (n=15 ratos/grupo; Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls; letras distintas: $p < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar se o sistema carreador de liberação controlada de medicamentos, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, em complexação com a ropivacaína 0,5%, aumenta o efeito anestésico desta, em três modelos experimentais.

O modelo de bloqueio do nervo infraorbital foi proposto por Fink et al. (1975), que descreveram anatomicamente o nervo infraorbital do rato e após comparação concluíram que o mesmo é equivalente ao do ser humano em termos de localização e região de inervação; desta maneira este modelo se coloca como um importante instrumento de pesquisa, com a vantagem de poder ser reproduzido facilmente.

Em 1980, Ready & Fink avaliaram a duração de sete anestésicos locais, entre ésteres (procaína, tetracaína e cloroprocaína) e amidas (lidocaína, mepivacaína, bupivacaína e etidocaína), em várias concentrações, no modelo de bloqueio do nervo infraorbital. Observaram que a bupivacaína, na concentração de 0,5%, proporcionou maior duração anestésica, com média de 100 minutos, em relação às demais soluções avaliadas.

No presente estudo a ropivacaína 0,5% sem aditivos proporcionou duração menor (61 minutos) que a observada por Ready & Fink (1980) para a bupivacaína. A literatura traz resultados diversos em vários tipos de bloqueio em humanos (anestesia intratecal, epidural, espinhal e bloqueio do nervo femoral), com estudos mostrando eficácia equivalente destes dois sais anestésicos (Ngan et al., 2010; Wulf et al., 2010) e de maior eficácia para a bupivacaína, como mistura racêmica (Ingelmo et al., 2006; Luck et al., 2008; Lee et al., 2009), relatando que a presença do isômero dextrorrotatório pode conferir maior potência anestésica em relação à ropivacaína, que é comercializada como isômero levorrotatório puro.

A duração da anestesia pode ser influenciada pela lipossolubilidade (facilitando a penetração através da membrana axoplasmática), pelo grau de ligação a proteínas (aumentando o tempo de ligação ao canal de sódio) e ainda pela vasoatividade do sal anestésico (Malamed, 2005).

Embora vários anestésicos possam apresentar atividade vasoconstritora em concentrações muito pequenas, nas concentrações clinicamente utilizadas mostram atividade vasodilatadora expressiva (Gerke et al., 1976; Gerke et al., 1977). A ropivacaína, embora

partilhe desta resposta bifásica (Cederholm et al., 1992; Nakamura et al., 1993; Gherardini et al., 1995), parece ter atividade vasoconstritora mais acentuada, especialmente em bloqueios próximos a artérias terminais (Burke et al., 2000; Wienzek et al., 2007; Keramidas & Rodopoulou, 2007; Jansson, 2008).

Em bloqueios anestésicos na área médica é expressivo o uso de anestésicos locais sem aditivos; o mesmo não acontece na odontologia, pela atuação em região altamente vascularizada (Malamed, 2005).

No presente estudo foi observado que a associação a aditivos pode melhorar significativamente a duração da anestesia com a ropivacaína. Desta forma, foi observada maior duração de anestesia com a ropivacaína associada à epinefrina (141min) no lábio superior, após BNIO. Este resultado corrobora os encontrados por Kennedy et al. (2001), os quais observaram maior duração de anestesia no lábio superior, em técnica infiltrativa na maxila, em humanos, quando a ropivacaína era associada à epinefrina do que quando a mesma era injetada sem aditivos.

Da mesma forma, a complexação da ropivacaína com 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina também foi efetiva em aumentar a duração da anestesia em relação à solução sem aditivos. Resultados semelhantes também foram relatados por de Araújo et al. (2008), os quais observaram aumento significativo da intensidade (1,3 vezes) e duração (1,6 vezes) da analgesia após bloqueio do nervo ciático em camundongos. Embora o presente estudo e o realizado por de Araújo et al. (2008) sejam os únicos a avaliar a ropivacaína complexada com a 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina, vários estudos já comprovaram a eficácia de ciclodextrinas em aumentar o bloqueio sensitivo de anestésicos locais, como a levobupivacaína (Karashima et al., 2007) e lidocaína (Suzuki et al., 2009) complexadas com maltosil- β -ciclodextrina e tetracaína (Franco de Lima et al., 2011) e bupivacaína (de Araújo et al., 2005) complexadas com 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina, comparados com as respectivas soluções sem aditivos.

Entretanto, quando são comparados os resultados obtidos no bloqueio do nervo infraorbital com o uso de epinefrina e com a complexação com 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina, observa-se que a epinefrina é mais potente em aumentar o efeito anestésico,

tanto em termos da taxa de sucesso da anestesia, quanto da duração da mesma (Figuras 8 e 9, respectivamente).

De forma similar ao que foi observado no bloqueio do nervo infraorbital, no modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica as formulações de ropivacaína complexada com 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina e com epinefrina também foram mais eficazes, promovendo maior taxa de sucesso e duração da anestesia que a ropivacaína sem aditivos (Figuras 10 e 11, respectivamente).

Comparando ao BNIO, entretanto, na ISFC foram observadas menor taxa de sucesso da anestesia para todas as formulações e menor duração da anestesia com as soluções de ropivacaína e ropivacaína complexada com 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina, o que era esperado, uma vez que o tecido foi submetido a um trauma cirúrgico, promovendo inflamação e hipernocicepção no local. A duração da solução de ropivacaína com epinefrina não teve alteração significativa entre os modelos. Foi observada duração de anestesia, respectivamente para a ropivacaína, ropivacaína complexada com 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina e ropivacaína com epinefrina, de 61 min, 96 min e 141 min no bloqueio do nervo infraorbital e de 39 min, 59 min e 130 min no modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica. Desta forma, houve redução de cerca de 39%, 36% e 8%, respectivamente, para cada uma destas soluções no modelo com inflamação.

A maior potência da epinefrina em aumentar a eficácia anestésica da ropivacaína também no modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, no qual há inflamação, e de não ter a duração da anestesia afetada por esta condição pode ser explicada por sua ação vasoconstritora.

O processo inflamatório ocorre em uma sequência de eventos, com o fim último de promover a cura dos tecidos. Logo após a injúria tecidual, há liberação de histamina, a qual promove vasodilatação e, como consequência, extravasamento de plasma e estase sanguínea, facilitando a migração de leucócitos para o local da injúria (Kumar et al., 2010). A vasodilatação pode aumentar a passagem de anestésico local do tecido para a corrente sanguínea (Malamed, 2005); desta forma, formulações que contém vasoconstritor podem ser beneficiadas, sofrendo menor interferência do processo inflamatório, como observado para a solução de ropivacaína associada à epinefrina.

Conforme observado no modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, a ação vasoconstritora da ropivacaína, especialmente quando aplicada próximo a artérias terminais, não foi suficiente para evitar a redução na duração da anestesia neste modelo.

É digno de nota que, mesmo não tendo ação específica sobre o calibre dos vasos, a complexação com 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina aumentou de forma significativa a taxa de sucesso e a duração da anestesia da ropivacaína no modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica. Porém, a ação específica da epinefrina sobre a musculatura lisa dos vasos parece ser determinante para o aumento da duração da anestesia.

Além da histamina, no processo inflamatório outros mediadores são liberados, como as citocinas, começando pela TNF- α , que por sua vez estimula a liberação de IL-1 β , seguindo-se uma sequência, que pode variar, dependendo do agente agressor e da espécie estudada (Cunha et al., 2005). A lise tecidual também estimula a síntese de prostaglandinas (a partir do ácido aracdônico) e de aminas simpatomiméticas, que podem sensibilizar os nociceptores, levando à hiperalgesia (sensibilidade aumentada a estímulos dolorosos) e alodnia (percepção de dor a estímulos não nociceptivos) (Brennan et al., 2005). Esta sensibilidade aumentada também pode explicar a menor eficácia anestésica em tecidos inflamados. Em animais, como não é possível discernir a hiperalgesia da alodnia, foi proposto o uso do termo hipernocicepção (Parada et al., 2003).

A anestesia pulpar parece oferecer um desafio ainda maior, mostrando menor taxa de sucesso e de duração da anestesia que a observada nos modelos de BNIO e ISFC, enquanto que a latência não é afetada, tendo variado de 2 a 4 minutos no modelo de bloqueio do nervo alveolar inferior. Embora nos modelos de BNIO e ISFC não tenha sido avaliada a latência, por ser necessário um tempo de espera de 5 min (na ISFC para ambientalização do animal na gaiola e no BNIO para evitar que a reação de coçar a região de depósito da solução logo após a injeção, que alguns animais apresentam, seja confundida com resposta aversiva), no primeiro tempo de avaliação todos os animais apresentavam anestesia no local avaliado.

Os tempos de latência observados no presente estudo após o BNAI foram similares aos relatados por Bhering (2010) no mesmo modelo em ratos. Esta autora obteve latência de 2 min para a ropivacaína e ropivacaína com epinefrina e 4 min para a ropivacaína encapsulada em lipossomas. Estes tempos de latência, bem como os do presente estudo

também são similares aos observados em bloqueio do nervo alveolar inferior em humanos com a ropivacaína (Ernberg & Koop, 2002; Axelsson & Isacsson, 2004; El-Sharrawy & Yagiela, 2006).

Com relação à taxa de sucesso e duração da anestesia, enquanto nos dois modelos de anestesia em tecidos moles estudados (bloqueio do nervo infraorbital e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica) 100% dos animais permaneceram anestesiados por 30 a 40 minutos (Figuras 8 e 10, respectivamente), no modelo de bloqueio do nervo alveolar inferior, apenas a solução de ropivacaína com epinefrina propiciou anestesia sustentada em 100% dos animais por 30 minutos (Figura 13), tendo as demais formulações apresentado redução na porcentagem de animais anestesiados já em 15 minutos após a injeção.

Essa maior dificuldade na anestesia pulpar também é relatada em bloqueio do nervo alveolar inferior em humanos, sendo observado sucesso em 40 a 50% dos casos, dependendo do volume e da concentração de ropivacaína utilizados (Ernberg & Koop, 2002; Axelsson & Isacsson, 2004). Esta dificuldade não é exclusiva de anestésicos de longa duração como a ropivacaína, mas ocorre com todos os demais de uso odontológico (McLean et al., 1993; Nusstein et al., 2002; Fernandez et al., 2005; Mikesell et al., 2005; Jung et al., 2008; Kanaa et al., 2006).

Mesmo em técnica infiltrativa na maxila de humanos, na qual há maior facilidade em conseguir anestesia pulpar em comparação à mandíbula, Franz-Montan et al. (2011) não obtiveram 100% de sucesso de anestesia com nenhuma das formulações de ropivacaína testadas, sendo que a formulação contendo epinefrina foi a que apresentou maior taxa de sucesso (83%) e de duração da anestesia. O mesmo ocorreu no estudo de Kennedy et al. (2001) que obtiveram 75% de sucesso com a ropivacaína associada à epinefrina e 68% com a ropivacaína sem aditivos após infiltração maxilar na região do incisivo lateral, em humanos.

A técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos utilizada no presente estudo foi proposta por Silva et al. (2009) e a exemplo da avaliação da anestesia pulpar em humanos, também utiliza o estímulo elétrico para avaliar a eficácia da anestesia na polpa dental de ratos.

Neste modelo em ratos, Bhering (2010) obteve tempo de anestesia pulpar maior com a formulação de ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 em relação à observada

com ropivacaína 0,5% sem aditivos; estes resultados foram semelhantes aos observados no presente estudo.

Em todos os estudos que avaliaram anestesia pulpar, tanto em humanos, quanto em ratos, os sistemas de liberação controlada, lipossomas (Bhering, 2010; Franz-Montan et al., 2011) e 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina (presente estudo), não conseguiram aumentar a eficácia anestésica da ropivacaína.

De forma similar ao que foi observado por Franz-Montan et al. (2011) em técnica infiltrativa em humanos e ainda ao observado por Bhering (2010) em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos, a ropivacaína se beneficiou com a associação à epinefrina, passando a apresentar maior taxa de sucesso e duração da anestesia pulpar em relação à solução sem aditivos (Figuras 13 e 14, respectivamente).

Embora alguns estudos mostrem que é possível o uso de ropivacaína sem aditivos para procedimentos odontológicos, conforme relatos de Krzeminski et al. (2011) comparando a ropivacaína sem aditivos à articaína 4% com epinefrina 1:100.000 em infiltração na maxila, e de El-Sharrawy & Yagiela (2006) comparando diversas concentrações de ropivacaína sem aditivos em bloqueio do nervo alveolar inferior, a adição de epinefrina aumenta significativamente a taxa de sucesso e a duração da anestesia, o que foi demonstrado nos estudos de Kennedy et al. (2001), Bhering (2010), Franz-Montan et al. (2011) e no presente estudo.

Assim, no presente estudo a complexação do anestésico local ropivacaína 0,5% em 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina mostrou-se uma boa alternativa para aumentar a duração anestésica em modelos que envolveram tecido mole, saudável e com inflamação. Porém, quando avaliado em modelo de bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos, a adição de epinefrina 1:200.000 mostrou maior eficácia que a 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina em aumentar a duração e a taxa de sucesso da ropivacaína na concentração de 0,5%, permanecendo como aditivo eficaz para uso odontológico.

Estes resultados mostram que estudos futuros com a formulação de ropivacaína complexada em 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina devem voltar-se para o controle da dor pós-operatória na área médica, pois neste caso pode trazer contribuição significativa, especialmente para pacientes que necessitem receber doses elevadas de ropivacaína

(próximas da dose máxima recomendável) e que apresentem alterações cardiovasculares que configurem em restrição ao uso de epinefrina.

7 CONCLUSÕES

1. A complexação com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina é eficaz em aumentar a taxa de sucesso e duração de anestesia da ropivacaína em tecidos moles, tanto saudáveis, quanto inflamados e, desta forma, podem ser uma alternativa para controle da dor no pós-operatório de procedimentos cirúrgicos na área médica, especialmente quando houver necessidade de uso de doses maiores, nos quais a epinefrina possa interferir de forma significativa nos parâmetros cardiovasculares.
2. A epinefrina promove aumento significativo da taxa de sucesso e de duração da anestesia da ropivacaína em tecidos moles e na polpa dental, sendo mais efetiva que a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Especificamente com relação à polpa dental, a epinefrina foi o único aditivo a aumentar a duração da anestesia, permanecendo como o mais eficaz para uso odontológico.

REFERÊNCIAS*

1. Arcioni R, della Rocca M, Romanò S, Romano R, Pietropaoli, Gasparetto A. Ondansetron inhibits the analgesic effects of tramadol: a possible 5-HT(3) spinal receptor involvement in acute pain in humans. *Anesth Analg*. 2002;94(6):1553-7.
2. Axelsson S, Isacson G. The efficacy of ropivacaine as a dental local anaesthetic. *Swed Dent J*. 2004; 28(2): 85-91.
3. Bender IB, Landau MA, Fonseca S, Trowbridge HO. The optimum placement-site of the electrode in electric pulp testing of the 12 anterior teeth. *J Am Dent Assoc*. 1989; 118(3): 305-10.
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 22]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000784594>
5. 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* 1993; 40: 1201-1204.
6. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996 Mar;64(3):493-501.
7. Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Mechanisms of Incisional Pain. *Anesthesiology Clin N Am*. 2005; 23: 1-20.
8. Brkovic B, Todorovic L, Stojic D. Comparison of clonidine and epinephrine in lidocaine anaesthesia for lower third molar surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 34(4):401-6.
9. Buric N. The assessment of anesthetic efficacy of ropivacaine in oral surgery. *NY State Dent J*. 2006;72(3):36-9.

* 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.

10. Burke D, Joypaul V, Thomson MF. Circumcision supplemented by dorsal penile nerve block with 0.75% ropivacaine: a complication. *Reg Anesth Pain Med.* 2000; 25(4):424-7.¹
 11. Cederholm I, Akerman B, Evers H. Local analgesic and vascular effects of intradermal ropivacaine and bupivacaine in various concentrations with and without addition of adrenaline in man. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1994; 38(4):322-7.
 12. Cederholm I, Evers H, Löfström JB. Skin blood flow after intradermal injection of ropivacaine in various concentrations with and without epinephrine evaluated by laser Doppler flowmetry. *Reg Anesth.* 1992; 17(6):322-8.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Cooley RL, Stille L, Lubow RM. Evaluation of a digital pulp tester. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 58(4):437-442.
 16. Clarkson CW, Hondeghem LM. Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. *Anesthesiology* 1985 Apr;62(4):396-405.
 17. Collins V. *História da Anestesiologia.* Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.1979.
 18. 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.
 19. Curtis FG, Furlani R, Castiglia YM. Accidental intravascular injection of 0.5% ropivacaine during thoracic epidural anesthesia: case reports. *Rev Bras Anesthesiol.* 2004;54(6):802-8.
 20. Dalmora ME, Dalmora SL, Oliveira AG. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. *In vitro drug release*
-

- and in vivo topical anti-inflammatory effect. *Int J Pharm.* 2001; 222(1):45-55.
21. Dal Santo FB, Throckmorton GS, Ellis III E. Reproducibility of data from a handheld digital pulp tester used on teeth and oral soft tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992; 73(1): 103-8.
 22. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. 2004; 3(12):1023-35.
 23. de Araújo DR, Fraceto FL, Braga AFA, de Paula E. Sistemas de Liberação Controlada com Bupivacaína Racêmica (S50-R50) e Mistura Enantiomérica de Bupivacaína (S75-R25): Efeitos da Complexação com Ciclodextrinas no Bloqueio do Nervo Ciático em Camundongos. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2005; 55(3): 316-28.
 24. 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.
 25. de Araujo DR, Tsuneda SS, Cereda CM, Del G F Carvalho F, Preté PS, Fernandes SA, Yokaichiya F, Franco MK, Mazzaro I, Fraceto LF, de F A Braga A, de Paula E. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. *Eur J Pharm Sci.* 2008;33(1):60-71.
 26. de Jong RH. *Local anesthetics*, 1. ed, St Louis: Mosby -Year Book, 1994.
 27. Denson DD, Behbehani MM, Gregg RV. Enantiomer-specific effects of an intravenously administered arrhythmogenic dose of bupivacaine on neurons of the nucleus tractus solitarius and the cardiovascular system in the anesthetized rat. *Reg Anesth.* 1992; 17(6):311-6.
 28. 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.
 29. Dhir S, Ganapathy S, Lindsay P, Athwal GS. Case report: ropivacaine neurotoxicity at clinical doses in interscalene brachial plexus block. *Can J Anaesth.* 2007; 54(11):912-6.
 30. Dollo G, Le Corre P, Fréville JC, Chevanne F, Leverage R. Biopharmaceutics of

- local anesthetic-cyclodextrin complexes following loco-regional administration. *Ann Pharm Fr.* 2000;58(6):425-32.
31. 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;13:233-8.
 32. Eggleston ST, Lush LW. Understanding allergic reactions to local anesthetics. *Ann Pharmacother*, 1996. July/Aug; 30(7): 851-7.
 33. El-Sharrawy E, Yagiela JA. Anesthetic efficacy of different ropivacaine concentrations for inferior alveolar nerve block. *Anesth Prog.* 2006;53(1):3-7.
 34. Ernberg M, Kopp S. Ropivacaine for dental anesthesia: a dose-finding study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60(9): 1004-10.
 35. Estebe JP, Ecoffey C, Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Bupivacaine pharmacokinetics and motor blockade following epidural administration of the bupivacaine-sulphobutylether 7-beta-cyclodextrin complex in sheep. *Eur J Anaesthesiol.* 2002;19(4):308-10.
 36. 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.
 37. 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.
 38. Foxall G, McCahon R, Lamb J, Hardman JG, Bedfordth NM. Levobupivacaine-induced seizures and cardiovascular collapse treated with Intralipid. *Anaesthesia.* 2007;62(5):516-8.
 39. Franco de Lima RA, de Jesus MB, Saia Cereda CM, Tofoli GR, Cabeça LF, Mazzaro I, Fraceto LF, Paula ED. Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrins. *J Drug Target.* 2011. No prelo.
 40. Franz-Montan M; de Paula E; Groppo FC; Ranali J; Volpato MC. Efficacy of liposome-encapsulated 0.5% ropivacaine in maxillary dental anaesthesia. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2011. No prelo.
 41. Fréville JC, Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Controlled systemic absorption and increased anesthetic effect of bupivacaine following epidural

- administration of bupivacaine-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. *Pharm Res.* 1996;13(10):1576-80.
42. Friedman M, Friedland GW. *As dez maiores descobertas da medicina.* São Paulo: Companhia das letras. 2006.
43. Garzon E. Estado de mal epiléptico. *J. epilepsy clin. neurophysiol.* 2008;14(Suppl2):7-11. [acesso em 2012 Jan 24]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-26492008000600002&lng=en.
44. Gerke DC, Frewin DB, Frost BR. The effect of local anaesthetics on the vasoconstrictor response of the isolated perfused artery to adrenaline and noradrenaline. *Eur J Pharmacol.* 1976; 38(2):243-52.
45. Gerke DC, Frewin DB, Waterson JG. The effects of commercial local anaesthetic solutions on the isolated rabbit ear artery. *Aust Dent J.* 1977; 22(4):289-94.
46. Gherardini G, Samuelson U, Jernbeck J, Aberg B, Sjöstrand N. Comparison of vascular effects of ropivacaine and lidocaine on isolated rings of human arteries. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1995; 39(6):765-8.
47. 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.
48. Herman RJ, Wilkinson GR. Disposition of diazepam in young and elderly subjects after acute and chronic dosing. *Br J Clin Pharmacol.* 1996;42(2):147-55.
49. Hersh EV, Giannakopoulos H, Levin LM, Secreto S, Moore PA, Peterson C, Hutcheson M, Bouhajib M, Mosenkis A, Townsend RR. 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): 1562-1571.
50. Hassan HG, Renck H, Lindberg B, Lindquist B, Akerman B. Effects of adjuvants to local anaesthetics on their duration. II. Studies of some substituted dextrans and other macromolecules in rat infraorbital nerve block. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1985; 29(4):380-3.
51. Ingelmo PM, Locatelli BG, Sonzogni V, Gattoni C, Cadisco A, Lorini M, Sora GN,

- Fumagalli R. Caudal 0.2% ropivacaine is less effective during surgery than 0.2% levobupivacaine and 0.2% bupivacaine: a double-blind, randomized, controlled trial. *Paediatr Anaesth.* 2006; 16(9):955-61.
52. Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci.* 1997;86(2):147-62.
53. James MF, Heijke SA, Gordon PC. Intravenous tramadol versus epidural morphine for postthoracotomy pain relief: a placebo-controlled double-blind trial. *Anesth Analg.* 1996;83(1):87-91.
54. Jansson JR. Vasoactivity of ropivacaine. *Reg Anesth Pain Med.* 2008; 33(1):90-1.
55. Jeffrey AK, Philip OB. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of epidural ropivacaine in humans. *Anesth Analg.* 1990; 70:16-21.
56. 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.
57. Kanaa MD, Meechan JG, Corbett IP, Whitworth JM. Speed of injection influences efficacy of inferior alveolar nerve blocks: a double-blind randomized controlled trial in volunteers. *J Endod.* 2006 ;32(10):919-23.
58. Karashima K, Taniguchi M, Nakamura T, Takasaki M, Matsuo K, Irikura M, Irie T. Prolongation of intrathecal and sciatic nerve blocks using a complex of levobupivacaine with maltosyl-beta-cyclodextrin in rats. *Anesth Analg.* 2007;104(5):1121-8.
59. Karmakar MK, Ho AM, Law BK, Wong AS, Shafer SL, Gin T. Arterial and venous pharmacokinetics of ropivacaine with and without epinephrine after thoracic paravertebral block. *Anesthesiology.* 2005;103(4):704-11.
60. Katz JA, Bridenbaugh PO, Knarr DC, Helton SH, Denson DD. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of epidural ropivacaine in humans. *Anesth Analg.* 1990;70(1):16-21.
61. Kennedy M, Reader A, Beck M, Weaver J. Anesthetic efficacy of ropivacaine in maxillary anterior infiltration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(4):406-12.

62. Keramidas EG, Rodopoulou SG. Ropivacaine versus lidocaine in digital nerve blocks: a prospective study. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 119(7):2148-52.
63. Kimura Y, Kamada Y, Kimura A, Orimo K. Ropivacaine-induced toxicity with overdose suspected after axillary brachial plexus block. *J Anesth.* 2007;21(3):413-6.
64. Krzemiński TF, Gilowski L, Wiench R, Płocica I, Kondzielnik P, Sielańczyk A. Comparison of ropivacaine and articaine with epinephrine for infiltration anaesthesia in dentistry - a randomized study. *Int Endod J.* 2011;44(8):746-51.
65. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins & Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
66. Lee YY, Ngan Kee WD, Fong SY, Liu JT, Gin T. The median effective dose of bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine after intrathecal injection in lower limb surgery. *Anesth Analg.* 2009; 109(4):1331-4.
67. Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm.* 2001; 225(1-2):15-30.
68. Luck JF, Fettes PD, Wildsmith JA. Spinal anaesthesia for elective surgery: a comparison of hyperbaric solutions of racemic bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine. *Br J Anaesth.* 2008; 101(5):705-10.
69. Malamed SF. Manual de anestesia local. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
70. Matioli G - Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. 1. ed. Maringá: Eduem, 2000.
71. McLean C, Reader A, Beck M, Meryers WJ. An evaluation of 4% prilocaine and 3% mepivacaine compared with 2% lidocaine (1:100,000 epinephrine) for inferior alveolar nerve block. *J Endod.* 1993;19(3):146-50.
72. 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.
73. Moraes CM, Abrami P, Araujo DR, Braga AFA, Issa MG, Ferraz HG, de Paula E, Fraceto LF. Characterization of lidocaine:hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2007; 57(1-4): 313-316.

74. Morrison SG, Dominguez JJ, Frascarolo P, Reiz S. A comparison of the electrocardiographic cardiotoxic effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized swine. *Anesth Analg.* 2000; 90(6):1308-14.
75. 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.
76. Nakamura K, Toda H, Kakuyama M, Nishiwada M, Yamamoto M, Hatano Y, Mori K. Direct vascular effect of ropivacaine in femoral artery and vein of the dog. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1993; 37(3):269-73.
77. Ngan Kee WD, Ng FF, Khaw KS, Lee A, Gin T. Determination and comparison of graded dose-response curves for epidural bupivacaine and ropivacaine for analgesia in laboring nulliparous women. *Anesthesiology.* 2010; 113(2):445-53.
78. Nusstein J, Reader A, Beck M. Anesthetic efficacy of different volumes of lidocaine with epinephrine for inferior alveolar nerve blocks. *Gen Dent.* 2002; 50(4):372-5.
79. Oliveira NE, Lima Filho NS, Lima EG, Vasquez EC. Effects of regional anesthesia with ropivacaine on arterial pressure and heart rate in healthy subjects. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(1):27-32.
80. Palma FR. Atividade anestésica da bupivacaína e ropivacaína em bloqueio do nervo alveolar inferior para cirurgias de terceiros molares inclusos [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004 [Acesso 2011 Out 15]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000358964>
81. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia*, 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
82. Ready LB, Fink BR. Experimental evaluation of local anaesthetic solutions using rat infraorbital nerve block. *Canad. Anaesth. Soc. J.* 1980; 27(1):58-61.
83. Ritchie JM, Ritchie BR. Local anesthetics: effect of pH on activity. *Science.* 1968; 162(860); 1394-1395.
84. Robaux S, Blunt C, Viel E, Cuvillon P, Nougouier P, Dautel G, Boileau S, Girard F, Bouaziz H. Tramadol added to 1.5% mepivacaine for axillary brachial plexus block improves postoperative analgesia dose-dependently. *Anesth Analg.* 2004;98(4):1172-7.

85. Ruetsch YA, Böni T, Borgeat A. From Cocaine to Ropivacaine: The History of Local Anesthetic Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001; 1(3):175-182
86. 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>.
87. Simpson D, Curran MP, Oldfield V, Keating GM. Ropivacaine: a review of its use in regional anaesthesia and acute pain management. *Drugs*. 2005; 65(18):2675-717.
88. Suzuki R, Arai YC, Hamayasu K, Fujita K, Hara K, Yamaguchi T, Sasaguri S. Complex of branched cyclodextrin and lidocaine prolonged the duration of peripheral nerve block. *J Anesth*. 2009; 23(2):295-7.
89. Tsuchiya N, Ichizawa M. Comparison of ropivacaine with bupivacaine and lidocaine for ilioinguinal block after ambulatory inguinal hernia repair in children. *Paediatr Anaesth*. 2004; 14(6):468-70.
90. Vandermeulen E, Gebhart GF, Brennan TJ. Effect of pre-emptive bupivacaine infiltration on animal model of incisional pain (Abstract). *Anesthesiology* 1994; 81: A986.
91. Veiga F, Fernandes C, Teixeira F. Oral bioavailability and hypoglycaemic activity of tolbutamide/cyclodextrin inclusion complexes. *Int J Pharm*. 2000; 202(1-2):165-71.
92. Wienzek H, Freise H, Giesler I, Van Aken HK, Sielenkaemper AW. Altered blood flow in terminal vessels after local application of ropivacaine and prilocaine. *Reg Anesth Pain Med*. 2007; 32(3):233-9.
93. Wulf H, Löwe J, Gnutzmann KH, Steinfeldt T. Femoral nerve block with ropivacaine or bupivacaine in day case anterior crucial ligament reconstruction. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2010; 54(4):414-20.
94. Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. *Farmacologia e Terapêutica para Dentistas*. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

95. Zaric D, Axelsson K, Nydahl PA, Philipsson L, Larsson P, Jansson JR. Sensory and motor blockade during epidural analgesia with 1%, 0.75%, and 0.5% ropivacaine--a double-blind study. *Anesth Analg.* 1991;72 (4):509-15.
96. Zink W, Graf BM. The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2008;21(5):645-50.

ANEXO

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEEA/UNICAMP)



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

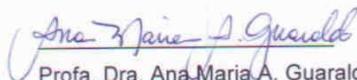
CERTIFICADO

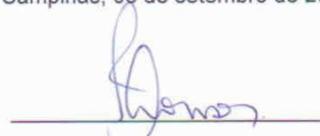
Certificamos que o Protocolo nº 1935-1, sobre "Eficácia anestésica da preparação de ropivacaina com hidroxipropil beta-ciclodextrina em bloqueio do nervo alveolar inferior e em ferida cirúrgica, em ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Volpato / Cleiton Pita dos Santos, está de 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 – CEEA/Unicamp em 03 de setembro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1935-1, entitled "Anesthetic efficacy of ropivacaine with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin formulation in infraorbital and inferior alveolar nerve blocks and surgical wound, in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 3, 2009.

Campinas, 03 de setembro de 2009.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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