

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

GIOVANA RADOMILLE TÓFOLI

“Avaliação da reação tecidual e determinação da concentração plasmática da preparação anestésica local lipossomal de mepivacaína - estudo em ratos”

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Odontologia, área de concentração em Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. José Ranali

Co-orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

Piracicaba - SP

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

T571a Tófoli, Giovana Radomille.
Avaliação da reação tecidual e determinação da concentração plasmática da preparação anestésica local lipossomal de mepivacaína - estudo em ratos. / Giovana Radomille Tófoli. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: José Ranali, Eneida de Paula.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Anestesia local. I. Ranali, José. II. Paula, Eneida de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Evaluation of tissue reaction and determination of plasmatic concentration of the liposomal formulation of mepivacaine in rats

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Anesthesia, local

Área de Concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca Examinadora: José Ranali, Rogério Heladio Lopes Motta, Juliana Cama Ramacciato, Daniele Ribeiro de Araújo, Maria Beatriz Duarte Gavião

Data da Defesa: 28-03-2007

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 28 de Março de 2007, considerou a candidata GIOVANA RADOMILLE TÓFOLI aprovada.

A blue ink signature of Prof. Dr. José Ranali, written in a cursive style.

PROF. DR. JOSÉ RANALI

A blue ink signature of Prof. Dr. Rogério Heládio Lopes Motta, written in a cursive style.

PROF. DR. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA

A blue ink signature of Prof. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo, written in a cursive style.

PROFa. DRa. DANIELE RIBEIRO DE ARAÚJO

A blue ink signature of Prof. Dra. Juliana Cama Ramacciato, written in a cursive style.

PROFa. DRa. JULIANA CAMA RAMACCIATO

A blue ink signature of Prof. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião, written in a cursive style.

PROFa. DRa. MARIA BEATRIZ DUARTE GAVIAO

Dedicatória:

A Deus,

Por me fazer enxergar que sempre há um caminho para superar as dificuldades. E por toda a felicidade de vencer mais uma etapa de vida.

Ao meu marido, Nilesh,

Dedico este trabalho a você. Obrigada pelo amor, dedicação, paciência, companheirismo e por estar ao meu lado neste momento tão importante.

Aos meus pais, Antonio e Lúcia,

Obrigada pelo apoio e ensinamentos de hoje e sempre. Obrigada mais uma vez pela participação e ajuda.

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. José Ranali, pela orientação profissional e pessoal, pelos ensinamentos a mim dedicados durante a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Eneida de Paula, obrigada pelas grandes oportunidades e por me receber em seu laboratório com atenção e dedicação.

Aos meus irmãos, Gisele e Gustavo, meus cunhados, Marise e Marcelo, meus sobrinhos, Rafael, Letícia e Gabi, obrigada por estarem sempre presentes.

Aos meus sogros, Valéria e Egídio pela ajuda, principalmente no inglês, pela torcida e carinho e por me fazerem sempre sentir como parte da família.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e à Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, obrigada pela orientação e disponibilidade. Agradeço pelos ensinamentos e pela amizade.

As minhas queridas amigas da Farmacologia: Michelle, Cristiane, Karina, Roberta e Regiane obrigada pelo apoio.

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, pelos ensinamentos no ensino de farmacologia.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP – UNICAMP), por meio do diretor Francisco Haiter Neto. À Universidade Estadual de Campinas, por meio do reitor: José Tadeu Jorge.

À Srta. Maria Elisa dos Santos e à Sra. Eliane Melo Franco pela ajuda em todas as horas, disponibilidade, dedicação, carinho e colaboração.

Aos novos e queridos amigos do laboratório de biomembranas, Cleyton, Fernanda, Giovana Brunetto, André, por me receberem tão bem e por tornarem a rotina do laboratório divertida.

A minha amiga Cíntia, obrigada pela ajuda em todos os momentos, pela amizade e pelas risadas.

Ao Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior, da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, pela colaboração na confecção das lâminas histológicas.

Aos Profs. Drs. Eduardo Meurer e Fábio Barros e a equipe do CORE, pela colaboração na dosagem plasmática dos anestésicos.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

RESUMO:

Este trabalho comparou a reação tecidual provocada por soluções comerciais de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (MVC 2% EPI), mepivacaína 3% sem vasoconstritor (MVC 3%), e preparação lipossomal de mepivacaína 2% (MVC LUV 2%), através do teste de edema de pata, em ratos, avaliado 60, 120 e 180 minutos após a injeção destas formulações. Além disso, a reação tecidual na mucosa oral de ratos provocada pela injeção destas formulações, após 6 horas, 24 horas e 4 dias foi analisada por técnicas histológicas. Os níveis plasmáticos de mepivacaína obtidos após a injeção intra-oral destas formulações em ratos foram determinados com espectrometria de massas (CLAE-EM-EM), após 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360 e 420 minutos da injeção. O teste de edema de pata não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as formulações testadas em nenhum dos tempos analisados ($p > 0,05$). De forma geral, considerando cada um dos tempos em estudo, a avaliação histológica mostrou que a MVC LUV 2% promoveu reação inflamatória de menor intensidade quando comparada com a MVC 2% EPI ($p < 0,05$), mas não mostrou diferenças com relação à MVC 3%. Os níveis plasmáticos obtidos após a injeção de MVC LUV não apresentaram diferença estatisticamente significativa daqueles obtidos após a injeção de MVC 2% EPI ($p > 0,05$), porém a injeção de MVC LUV promoveu concentrações menores que aquelas obtidas após a injeção de MVC 3% até os 240 minutos ($p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que a formulação lipossomal de mepivacaína promoveu reação inflamatória menor que a promovida pela formulação com epinefrina na mucosa oral. Além disso, a encapsulação do anestésico local promoveu níveis plasmáticos de mepivacaína semelhantes aqueles obtidos pela adição de vasoconstritor.

Palavras-chave: anestesia local, formulação lipossomal, mepivacaína.

ABSTRACT:

This study evaluated the tissue reaction induced by commercial solutions of 2% mepivacaine/1:100.000 epinephrine (MVC 2% EPI) and 3% mepivacaine (MVC 3%) and by the liposomal formulation of 2% mepivacaine (MVC LUV), with the "paw edema" test, in rats, observed 60, 120 and 180 minutes after the injections of these formulations. In addition, the tissue reaction in the oral mucosa induced by these formulations was analysed with histological techniques, after 6, 24 hours and 4 days. The plasmatic levels of these formulations were obtained after injection into oral mucosa by using mass spectrometry (HPLC- MS/MS) after 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360 and 420 of the injection. The "paw edema" test did not show statistically significant differences between the local anesthetic formulations tested in all periods ($p>0.05$). The histological evaluation of the oral mucosa, considering each time, showed lower intensity of inflammatory reaction with liposome formulation in comparison to MVC 2% EPI ($p<0.05$), but not with MVC 3% ($p>0.05$). The plasmatic levels obtained after MVC LUV injection did not showed statistically significant differences with the MVC 2% EPI levels considering all times ($p>0.05$). However, the MVC LUV plasmatic levels were significantly lower than the MVC 3% until 240 minutes ($p<0.05$). We concluded that the liposome formulation of mepivacaine induced less inflammatory reaction in oral mucosa than the commercial formulation with epinephrine. Besides, the encapsulation of mepivacaine into liposomes produced plasmatic levels of mepivacaine similar to the vasoconstrictor addition.

Key-words: local anesthesia, liposomal formulation, mepivacaine.

Lista de siglas e abreviaturas:

p - probabilidade

α - nível de confiabilidade

& - e

pH - potencial hidrogênio-iônico

AL - anestésico local

EPI - epinefrina

MVC - mepivacaína

LUV - preparação lipossomal

MVC LUV 2% - preparação de mepivacaína 2% lipossomal

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

EM - Espectrômetro de massas

Tmax - tempo máximo

AUC - área sob a curva

Cmax - concentração máxima

SUMÁRIO:

	página	
1	<i>INTRODUÇÃO</i>	1
2	<i>REVISÃO DE LITERATURA</i>	
2.1.	Controle da Dor e Anestesia Local em Odontologia	4
2.2.	Lipossomas	6
2.3.	Anestésicos locais encapsulados em lipossomas	8
3.	<i>PROPOSIÇÃO</i>	15
4.	<i>MATERIAL E MÉTODO</i>	16
5.	<i>RESULTADOS</i>	28
6	<i>DISCUSSÃO</i>	43
7	<i>CONCLUSÃO</i>	50
8	<i>REFERÊNCIAS</i>	51
9	<i>ANEXOS</i>	61

1. INTRODUÇÃO:

A anestesia local é o método de controle da dor mais empregado em Odontologia. Estima-se que os dentistas brasileiros utilizem cerca de 250 milhões de tubetes anestésicos por ano (RANALI, 2002). Embora seja um método seguro, alguns cuidados são indispensáveis para a sua execução como a escolha correta do anestésico local a ser utilizado, priorizando-se aquele que é mais efetivo na menor concentração tanto do sal anestésico como do vasoconstritor.

Os anestésicos locais podem causar reações adversas pelo bloqueio não específico de canais iônicos das membranas nervosas, sendo o sistema nervoso central e o sistema cardiovascular os locais mais suscetíveis às suas ações (GROBAN, 2003). Em Odontologia, a toxicidade dos anestésicos locais está associada à rápidas injeções intravasculares ou à administração extravascular de grandes doses destes agentes.

O sistema nervoso central é o local mais suscetível aos efeitos tóxicos destas drogas e a toxicidade pode apresentar-se em dois estágios: em baixas concentrações os neurônios inibitórios são bloqueados resultando em convulsões, e em altas concentrações ocorre depressão generalizada (GROBAN, 2003). Além disso, os anestésicos locais são cardiotoxícos exercendo efeitos indiretos mediados centralmente e diretos no miocárdio, relacionados com a interação dos anestésicos com canais iônicos. Ações diretas causam efeitos cronotrópico, dromotrópico e inotrópico negativos (GRAF, 2001) enquanto a cardiotoxicidade indireta produz efeitos iniciais estimulantes, seguidos de depressão com o aumento da dose.

Devido as suas propriedades vasodilatadoras, os anestésicos locais são freqüentemente associados com vasoconstritores para aumentar a duração da anestesia. A adição de vasoconstritores traz várias vantagens clínicas como aumento da duração e da qualidade anestésica, diminuição dos níveis plasmáticos e, conseqüentemente, da probabilidade de ocorrência de efeitos sistêmicos adversos. Além disso, a associação com vasoconstritores reduz a concentração

necessária para anestesia adequada e controla a hemorragia, durante procedimentos cirúrgicos (SISK, 1993).

Para que o risco de reações adversas ao paciente seja o menor possível, na escolha de uma solução anestésica local deve-se optar por aquela que contenha o vasoconstritor na menor concentração e que produza a mesma qualidade anestésica (LIPP *et al.*, 1993; MEECHAN *et al.*, 1994; YAGIELA, 1999; TÓFOLI *et al.*, 2003). Os vasoconstritores do tipo amina simpatomimética, incluindo a epinefrina, interagem com os receptores adrenérgicos (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) resultando em ações simpatomiméticas (HOFFMAN & LEFKOWITZ, 1996). Com o uso de doses excessivas ou com injeção intravascular acidental podem ocorrer manifestações tóxicas devido à ação dos vasoconstritores, tais como, taquicardia, arritmias, hipertensão, tremores e cefaléia (CASSIDY *et al.*, 1986; YAGIELA, 1999), podendo levar ao infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte (TOMLIN, 1974; PEARSON, 1987).

Pacientes saudáveis toleram um aumento de epinefrina no plasma, mas o mesmo pode não ocorrer em pacientes com comprometimento médico, especialmente com problemas cardiovasculares (LIPP *et al.* 1993, LITTLE *et al.*, 1997). Assim, o vasoconstritor pode ser o fator limitante na dose total de anestésicos que um paciente pode receber com segurança.

Várias drogas, incluindo antineoplásicos, antibióticos, antifúngicos e anestésicos locais têm sido encapsuladas em lipossomas ou em outros veículos, como ciclodextrinas ou polímeros sintéticos. As vantagens dessas formulações, com sistema de liberação sustentada incluem aumento na duração do efeito e diminuição da toxicidade da droga (GESZTEZ & MEZEI, 1988; LANGERMAN *et al.*, 1992; BOOGAERTS *et al.*, 1993 a,b; MOWAT *et al.*, 1996; BUCALO *et al.*, 1998; DAVIS & BREWSTER, 2004; ROSE *et al.*, 2005; TORCHILIN, 2005).

O uso de anestésicos locais encapsulados em lipossomas tem como vantagens a liberação lenta da droga, prolongando a duração da anestesia e

reduzindo a toxicidade para o sistema cardiovascular e o sistema nervoso central (GESZTES & MEZEI, 1988; LANGERMAN *et al.*, 1992; BOOGAERTS *et al.*, 1993 a,b; MOWAT *et al.*, 1996; BUCALO *et al.*, 1998; ARAUJO *et al.*, 2003), tanto em relação ao sal anestésico, quanto ao vasoconstritor, já que este poderia estar ausente nesta preparação. Pacientes submetidos a cirurgias que necessitem de controle de dor pós-operatória ou com dores crônicas, que recebem grandes doses e/ou aplicações repetidas destas drogas seriam beneficiados (KUZMA *et al.*, 1997).

O uso clínico do sistema lipossomal de liberação prolongada para anestesia local em Medicina vem confirmando as vantagens terapêuticas com resultados promissores. Em Odontologia, o uso de preparações como as lipossomais, traz a possibilidade de eliminação dos vasoconstritores, sem redução de duração e efetividade anestésica, e isto pode representar um avanço significativo na segurança do tratamento odontológico.

Além disso, as soluções anestésicas para uso odontológico contendo vasoconstritor, segundo a farmacopéia Americana (USP, 1995), devem ter pH entre 3,5 e 5,5. Entretanto, o pH ácido da solução anestésica pode provocar dor ou sensação de ardência (queimação) até uma inflamação tecidual causando desconforto ao paciente durante sua injeção (MEECHAN, 1999), além de retardar o início da anestesia (MALAMED, 2001). Assim, uma solução sem adição de vasoconstritores e com pH próximo ao fisiológico, como a solução lipossomal, causaria menor dor e desconforto durante a injeção anestésica.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1. CONTROLE DA DOR E ANESTESIA LOCAL EM ODONTOLOGIA

Os anestésicos locais têm ampla variedade de aplicações e são as principais substâncias utilizadas para obtenção de analgesia nos períodos trans e pós-operatórios (MCLURE & RUBIN, 2005).

Os anestésicos locais, em contato com fibras nervosas, promovem a interrupção da propagação de impulsos nervosos de maneira reversível (PIPA-VALEJO & GARCIA-POLA-VALLEJO, 2004). A ligação a sítios específicos nos canais de sódio da membrana nervosa resulta em redução ou bloqueio da permeabilidade e do influxo deste íon e, assim, da condução nervosa (VANDERMEULEN, 2000).

A anestesia local é definida como perda da sensibilidade de uma área circunscrita do corpo, causada pela depressão da excitação das terminações nervosas ou pela inibição do processo de condução dos nervos periféricos (MALAMED, 2001). Os agentes que promovem anestesia local são quimicamente similares e bloqueiam reversivelmente a geração e a condução dos impulsos nervosos periféricos (BUTTERWORTH & STRICHARTZ, 1990).

Em relação à estrutura química, os anestésicos locais, tanto do grupo éster quanto do grupo amida têm características em comum: um grupo aromático, responsável pelo caráter lipofílico da molécula, uma extremidade aminoterminal secundária ou terciária, que confere a hidrossolubilidade e uma cadeia intermediária, que proporciona a separação espacial entre as duas extremidades, diferenciando-se pelo tipo de ligação éster ou amida (MALAMED, 2001).

Os anestésicos do tipo amida, devido a sua menor toxicidade e potencial alergênico, são os únicos disponíveis na forma injetável no Brasil, como tubetes para uso odontológico. Várias são as formulações anestésicas locais hoje disponíveis para anestesia odontológica. As mais comuns são as que contêm como sal anestésico, a lidocaína, a prilocaína e a mepivacaína, considerados anestésicos locais de potência e duração de ação intermediárias (COVINO & GIDDON, 1981),

além da bupivacaína de longa duração (ANDRADE, 1999). Esses anestésicos apresentam-se em concentrações variáveis de 2 a 3% e associados à vasoconstritores adrenérgicos, com exceção da prilocaína que é associada à felipressina, um derivado da vasopressina (RANALI *et al.*, 1996).

As soluções anestésicas possuem características próprias em relação ao período de latência, potência e duração da anestesia, assim a escolha da solução depende do tipo de procedimento a ser realizado e do estado geral de saúde do paciente (SOARES, 2002). As características físico-químicas dos sais anestésicos, como a atividade vasodilatadora, influenciam no seu efeito terapêutico.

A atividade vasodilatadora dos sais anestésicos influencia a duração do efeito anestésico. Todos os sais anestésicos locais apresentam algum grau de atividade vasodilatadora, quanto mais significativa for essa atividade, mais rápido o anestésico será retirado do local anestesiado, reduzindo a duração anestésica e elevando o nível sanguíneo do composto, o que pode aumentar o risco de produzir reações tóxicas no organismo (BENNETT, 1989).

Devido à propriedade vasodilatadora discreta, a mepivacaína 3% sem vasoconstritor pode ser utilizada clinicamente e produz um período de anestesia pulpar de 40 minutos nos bloqueios anestésicos, e de 20 minutos nas infiltrações. Assim, em intervenções rápidas, que não exijam anestesia pulpar prolongada, e em pacientes que não devem utilizar vasoconstritores é recomendado o uso desta solução sem vasoconstritor (MALAMED, 2001). A pequena propriedade vasodilatadora da mepivacaína poderia ser vantajosa nas formulações lipossomais, que poderiam promover uma anestesia pulpar com maior duração e sem adição de vasoconstritores, beneficiando pacientes que apresentam comprometimento médico, que restringe o uso de vasoconstritores, proporcionando controle eficaz de dor por um período de tempo mais prolongado.

2.2. LIPOSSOMAS:

Atualmente, várias formulações com sistemas de liberação sustentada, têm sido utilizadas com drogas como: antineoplásicos, antibióticos, antifúngicos e anestésicos locais. O uso destas preparações, encapsuladas em lipossomas ou em outros veículos, como ciclodextrinas ou polímeros sintéticos, incluem aumento na duração do efeito e diminuição da toxicidade da droga (GESZTEZ & MEZEI, 1988; LANGERMAN *et al.*, 1992; BOOGAERTS *et al.*, 1993 a,b; MOWAT *et al.*, 1996; BUCALO *et al.*, 1998; DAVIS & BREWSTER, 2004; ROSE *et al.*, 2005; TORCHILIN, 2005; VISCUSI, 2005).

Além de atuarem como sistemas de liberação sustentada para drogas, os lipossomas são utilizados em várias áreas da clínica médica, como: diagnóstico por imagens em vários órgãos, aplicação tópica de medicamentos, aplicação inalatória de medicamentos, terapia contra artrite, lipossomas alvo para células específicas no tratamento de neoplasias, vacinas lipossomais, lipossomas carreadores de proteínas e peptídeos e utilizados para liberação de genes (BANERJEE, 2001; TORCHILIN, 2005).

Dentre os diversos veículos para liberação lenta de drogas os lipossomas têm gerado grande interesse devido a sua versatilidade (KSHIRSAGAR *et al.*, 2005). Estes veículos foram desenvolvidos há mais de 30 anos para liberação sustentada de drogas (ROSE *et al.*, 2005). Os lipossomas são formados pela interação de lipídios anfifílicos com uma fase aquosa (BANERJEE, 2001) e consistem de esferas micro ou nanométricas de uma ou mais bicamadas de lipídios cujas caudas hidrofóbicas estão voltadas para o interior e as cabeças polares para o exterior da bicamada, em contato com a fase aquosa (RANADE, 1989; TORCHILIN, 2005).

Os lipossomas são formulados tipicamente pela dissolução de lipídios em um solvente que será posteriormente evaporado deixando um filme lipídico. Drogas lipofílicas são dissolvidas com os fosfolipídios, enquanto drogas aquosas são

utilizadas para reconstituir o filme lipídico e ficam armazenadas entre as camadas destes (ROSE et al., 2005).

A encapsulação de drogas nos lipossomas é orientada pela hidro ou lipofilicidade das mesmas, já que compostos hidrofílicos têm tendência a permanecer no compartimento aquoso e compostos hidrofóbicos inserem-se na bicamada lipídica (SHARATA & KATZ, 1996; ARAÚJO et al., 2003). Drogas anfipáticas, como os anestésicos locais, são encapsuladas dentro da bicamada lipídica e/ou do compartimento aquoso (ROSE *et al.*, 2005). Desta forma, os lipossomas são capazes de proteger os princípios ativos encapsulados da metabolização, fazendo com que alcancem o seu sítio de ação em concentrações efetivas maiores (ARAÚJO et al., 2003).

Os lipídios constituintes da bicamada são materiais biocompatíveis de ocorrência natural, como fosfolipídios e colesterol, assim estas vesículas lipídicas são semelhantes às membranas biológicas e são biodegradáveis além de apresentarem baixa toxicidade e imunogenicidade reduzida ou inexistente (KUZMA *et al.*, 1997; KSHIRSAGAR et al., 2005).

A similaridade dos monômeros constituintes dos lipossomas com o das membranas biológicas elimina o risco de antigenicidade ou de lesões histológicas (MALINOVSKY *et al.*, 1997) após sua administração. A literatura relata também que lipossomas com carga neutra não promovem a lise de eritrócitos (YOSHIHARA & NAKAE, 1986; PARNHAM & WETZIG, 1993; STENSRUD *et al.*, 1999) e não possuem efeito pró-agregante. Ao contrário, tem sido demonstrado que a formulação lipossomal de AL tem maior efeito na inibição da agregação plaquetária induzida por ADP e outros agentes indutores do que quando os ALs são utilizados isoladamente (PINTO *et al.*, 2004). Lipossomas puros não têm atividade farmacológica inerente (GRANT et al., 1994)

As preparações lipossomais são classificadas como vesículas multi ou unilamelares, de acordo com o número de bicamadas. Os lipossomas ideais devem

ter a habilidade de encapsular drogas em altas concentrações, de serem eliminados lentamente do local da injeção e de maximizar a liberação da droga encapsulada (MOWAT et al., 1996). O tamanho dos lipossomas afeta sua biodistribuição, pois lipossomas menores que 120 nm atravessam rapidamente os capilares, enquanto que os maiores tendem a permanecer no sítio da injeção (GRANT & BANSINATH, 2001). Umbrain *et al.* (1995) observaram a biodistribuição de lipossomas multilamelares grandes e unilamelares pequenas em ratos e coelhos após a injeção extradural por imagens cintilográficas. As vesículas multilamelares grandes formaram um depósito no local da injeção, enquanto que as vesículas unilamelares pequenas atingiram a circulação sistêmica 30 minutos após a injeção. Estes resultados levaram à seleção de vesículas grandes para estudos clínicos com lipossomas associados a anestésicos locais.

Depois da liberação da droga os lipossomas são removidos do local da injeção por macrófagos e pelo sistema linfático. Lipossomas intravasculares são eliminados por uma combinação de processos que incluem a participação de monócitos circulantes, sistema reticular endotelial e proteínas de alta densidade (MASHIMO et al., 1992; GREGORIARIDIS & FLORENCE, 1992).

2.3. ANESTÉSICOS LOCAIS ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS:

Lipossomas são esferas microscópicas constituídas por bicamadas de fosfolipídios, dentro destas esferas, anestésicos locais podem ser encapsulados (MCLURE & RUBIN, 2005). Os anestésicos locais são lentamente liberados da formulação lipossomal prevenindo altos picos plasmáticos, prolongando a duração de ação do bloqueio nervoso e reduzindo o risco de toxicidade sistêmica (GESZTES & MEZEI, 1988; LANGERMAN *et al.*, 1992; BOOGAERTS *et al.*, 1993 a,b; MOWAT *et al.*, 1996; BUCALO *et al.*, 1998; ARAUJO *et al.*, 2003).

Lipossomas têm sido utilizados, em estudos em animais e em voluntários, para prolongar o efeito anestésico e diminuir efeitos tóxicos de diversos

anestésicos como: bupivacaína, mepivacaína, lidocaína e prilocaína.

MALINOVSKY *et al.* (1997) aplicaram bupivacaína 0,5%, bupivacaína lipossomal 0,5%, lipossomas vazios e solução salina isotônica, intracisternamente em coelhos. A formulação de bupivacaína lipossomal provocou anestesia de maior duração quando comparada com a bupivacaína livre na mesma concentração. Além disso, os autores realizaram avaliação histopatológica do cordão espinhal depois de sete dias da aplicação dos anestésicos e não observaram diferenças significativas entre os grupos avaliados.

O prolongamento da analgesia provocado pela administração subcutânea de bupivacaína lipossomal foi observado em camundongos por GRANT *et al.* (2001). Os animais receberam injeções de bupivacaína 0,5% e de bupivacaína lipossomal 0,5%; 1% e 2%. Os animais que receberam bupivacaína lipossomal apresentaram maior duração de efeito anestésico e a droga permaneceu por até 96h no local da injeção.

A maior permanência no local da injeção e uma menor taxa de absorção do anestésico local encapsulado em lipossomas têm sido demonstradas em diversos estudos. BOOGAERTS *et al.* (1993) compararam concentrações plasmáticas de bupivacaína obtidas depois da administração de bupivacaína livre ou complexada com lipossomas multilamelares durante o bloqueio axilar em coelhos. Os animais que receberam bupivacaína lipossomal apresentaram níveis plasmáticos mais baixos nos primeiros 10 minutos e mais altos depois de 24 horas, o que mostra a liberação lenta do anestésico responsável pelo aumento na sua duração de ação.

MASHIMO *et al.* (1992) estudaram a farmacocinética da lidocaína livre e encapsulada em 20 cães após a administração epidural. O tempo de recuperação após a aplicação da lidocaína encapsulada foi cerca de 3 vezes maior quando comparado com a lidocaína livre. As áreas sobre a curva (AUC) e o tempo máximo (Tmax) foram maiores nos animais que receberam lidocaína encapsulada, o que sugere que o prolongamento da anestesia é causado pela liberação lenta da droga

dos lipossomas.

A maior eficácia anestésica e menor toxicidade têm sido demonstradas em animais com preparações lipossomais de diversos anestésicos locais. A toxicidade aguda no sistema nervoso central (SNC) e no sistema cardiovascular (SCV) provocadas após a injeção intravascular de bupivacaína 0,25% foi comparada com a da formulação lipossomal de bupivacaína na mesma concentração em coelhos. A dose necessária para indução de convulsões e taquicardia ventricular foi significativamente maior com a bupivacaína encapsulada em lipossomas, o que mostra a redução de toxicidade sistêmica após a infusão intravenosa de anestésico local lipossomal (BOOGAERTS *et al.*, 1993).

O uso de bupivacaína em lipossomas e da mesma solução não encapsulada foi avaliado por YU HY *et al.* (2002) em ratos Wistar aplicando o teste de "tail-flick". A solução encapsulada mostrou um nível plasmático constante, além de um efeito anestésico maior durante o mesmo período. Assim, os autores concluíram que a preparação lipossomal aumentou a intensidade e prolongou a duração do efeito da bupivacaína, além de reduzir a taxa de absorção sistêmica do anestésico.

A mepivacaína 2% foi avaliada nas formas encapsulada e não encapsulada, com relação à latência e duração da anestesia em bloqueio motor e sensitivo, em camundongos, tendo sido observada potencialização do efeito analgésico em relação à amplitude e ao tempo de duração da anestesia para a forma encapsulada. Para o bloqueio motor não foi observada diferença estatística entre as duas formas (ARAÚJO *et al.*, 2004).

O efeito antinociceptivo de formulações lipossomais de lidocaína, prilocaína e mepivacaína 2% foi comparado com o efeito produzido pelas soluções puras destes três anestésicos em ratos após o bloqueio do nervo infra-orbital. As formulações encapsuladas aumentaram a intensidade de efeito anestésico quando comparadas com a forma livre dos mesmos anestésicos. A mepivacaína foi o anestésico mais beneficiado pela adição de lipossomas, enquanto que a lidocaína

foi a menos beneficiada (CEREDA *et al.*, 2006).

Anestésicos encapsulados em lipossomas para aplicação tópica já foram avaliados em diversos estudos com voluntários. GESZTES & MEZEI (1988) avaliaram a tetracaína 1% isolada e a tetracaína 0,5% encapsulada em lipossomas multilamelares para anestesia tópica da pele intacta de 24 voluntários através de teste de "pin-prick". Os resultados mostraram anestesia de pelo menos 4 horas de duração para a tetracaína encapsulada em lipossomas, enquanto a tetracaína isolada não promoveu anestesia efetiva.

FOLDVARI (1994), em estudo realizado *in vitro*, observou a quantidade de tetracaína liberada em células humanas por duas formulações lipossomais e por duas formulações convencionais, todas com a mesma concentração de tetracaína (2%). Observou que a concentração de tetracaína obtida nas células foi de 1,5 a 4 vezes maior quando a droga estava associada a lipossomas. A mesma autora testou as quatro formulações, e mais uma formulação placebo somente com lipossomas, em voluntários e avaliou a atividade anestésica com teste de "pin-prick". A anestesia tópica proporcionada pela associação de tetracaína e lipossomas foi mais profunda e mostrou tempo de latência menor nos voluntários avaliados.

SINGH & VYAS (1996) avaliaram a eficácia de suspensões lipossomais com benzocaína, incorporadas em creme ou gel, após a aplicação tópica em pele de cadáveres (*in vitro*) e em humanos (*in vivo*). No estudo *in vitro* com pele de cadáver humano foi verificada a difusão das fórmulas creme e gel de benzocaína encapsulada ou não em lipossomas. As formulações lipossomais apresentaram liberação constante e localizada. No estudo *in vivo*, os voluntários receberam aplicações tópicas de gel e creme de benzocaína lipossomal no antebraço direito, o antebraço esquerdo recebeu creme e gel de benzocaína como controle. O tempo de latência e a duração da anestesia foram verificados com o teste de "pin-prick" e as formulações lipossomais exibiram maior duração e latência.

FISCHER *et al.* (1998), em estudo duplo-cego e cruzado, compararam a capacidade de produzir anestesia tópica em pele intacta, da tetracaína 5% encapsulada em lipossomas em relação à mistura eutética de anestésicos locais (EMLA – lidocaína 2,5% e prilocaína 2,5%), na anestesia tópica em pele íntegra de 40 voluntários. Os autores observaram uma anestesia mais efetiva, através de testes de “pin-prick” e escala analógica visual, e, além disso, uma preferência dos voluntários pela anestesia proporcionada pela tetracaína encapsulada em lipossomas.

FRIEDMAN *et al.* (1999) compararam a profundidade e duração da anestesia produzida por quatro anestésicos tópicos: EMLA, ELA-Max (lidocaína 4% em veículo lipossomal), betacaína-LA (lidocaína + prilocaína + vasoconstritor) e tetracaína 4% em gel. Os testes foram realizados em 10 locais do antebraço de 12 voluntários, através de estimulação com laser. Os resultados mostraram superioridade do EMLA e da lidocaína lipossomal na promoção da anestesia em relação às outras preparações.

Em estudo duplo cego, cruzado, com 120 crianças, foi demonstrado que a aplicação tópica de lidocaína lipossomal por 30 minutos, sem curativo oclusivo, apresentou a mesma segurança e eficácia para melhora da dor à punção de agulhas que a mistura eutética de lidocaína e prilocaína (EMLA) aplicada por 60 minutos, com curativo oclusivo (EICHENFIELD *et al.*,2002).

A absorção e a toxicidade potencial da lidocaína lipossomal tópica foi avaliada em 8 voluntários que receberam 30 ou 60g deste anestésico com aplicação tópica através de curativos oclusivos. Os níveis sanguíneos de lidocaína e de seu metabólito monoetilglicinaxilidida (MEGX) foram observados após 1; 2; 6 e 24h da aplicação. Os níveis observados foram menores que 0,5 µg/mL. Os autores concluíram que em pequenas quantidades a lidocaína aplicada com curativos oclusivos é segura, pois não houve sinais clínicos de intoxicação e baixos níveis sanguíneos de lidocaína e de seu metabólito foram encontrados (NESTOR, 2006).

Outros autores relataram o uso injetável de suspensões lipossomais com anestésicos locais em voluntários. Bupivacaína 0,25% encapsulada em lipossomas foi administrada em um paciente ASA I com dores crônicas no braço. O paciente recebeu anestesia infiltrativa no plexo braquial com bupivacaína 0,25% associada à epinefrina 1:200.000, e em outra ocasião recebeu a suspensão lipossomal de bupivacaína 0,25%. Esta preparação promoveu analgesia sem bloqueio motor, alívio da dor por 40 horas e após este período ocorreu dor leve tolerada pelo paciente sem que fosse necessário o uso de analgésicos orais. Foram realizadas três injeções, com intervalo de 2 semanas entre estas, e depois da terceira administração a dor desapareceu completamente (LAFONT *et al.*, 1994).

BOOGAERTS *et al.* (1994) observaram, em humanos, a influência da formulação lipossomal na farmacodinâmica da bupivacaína 0,5% e a eficácia desta nova formulação para analgesia pós-cirúrgica. Foram selecionados 26 pacientes que sofreram cirurgias maiores, os quais receberam bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 (n=12) ou suspensão lipossomal multilamelar de bupivacaína a 0,5% (n=14) através de um cateter peridural. Os autores concluíram que a formulação lipossomal promoveu aumento na duração da analgesia sem promover bloqueio motor e efeitos adversos.

A suspensão lipossomal multilamelar de bupivacaína 0,25%, foi administrada a um paciente com dores devido a uma neoplasia pulmonar. O mesmo paciente recebeu uma anestesia peridural de bupivacaína na mesma concentração 48 horas depois. A suspensão lipossomal promoveu alívio da dor após 15 minutos e durante 11 horas, não sendo observado bloqueio motor das pernas. Além disso, a pressão arterial e a frequência cardíaca permaneceram estáveis. A solução de bupivacaína de mesma concentração com epinefrina 1:200.000 promoveu alívio da dor por 4 horas, bloqueio motor nível 1 de acordo com a escala de Bromage, decréscimo de 20% da frequência cardíaca e de 30% da pressão arterial, sendo necessária a administração de um vasopressor (LAFONT

et al., 1996).

GRANT *et al.* (2004) aplicaram, em seis voluntários, injeções intradérmicas nas costas, de bupivacaína lipossomal 0,5%, 1% e 2%, bupivacaína 0,5%, solução de NaCl 0,9% e lipossomal sem o anestésico. Analgesia foi testada com o teste de "pinprick", frio e toque suave por um investigador que não sabia qual solução estava sendo utilizada. As soluções com bupivacaína lipossomal promoveram uma anestesia de maior duração e de forma dose dependente, pois a formulação com grandes lipossomas é removida lentamente do local da injeção. Desta maneira é possível manter concentrações teciduais baixas e impedir a rápida redistribuição tecidual e, conseqüentemente, diminuir a toxicidade sistêmica dos anestésicos locais.

3. PROPOSIÇÃO:

Os objetivos deste estudo foram determinar, em ratos, a reação tecidual e os níveis plasmáticos obtidos após a injeção de formulações comerciais e lipossomal de mepivacaína. Foram realizados três ensaios:

1. Teste de edema de pata para avaliar a compatibilidade biológica das formulações anestésicas a base de mepivacaína;
2. Avaliação histológica da mucosa oral para verificar a intensidade da reação inflamatória promovida pela injeção intra-oral de formulações anestésicas a base de mepivacaína;
3. Determinação dos níveis plasmáticos após a injeção intra-oral destas formulações.

4. MATERIAL E MÉTODO:

Solução anestésica , seringa e agulha anestésica.

Foram utilizadas as seguintes soluções anestésicas: solução comercial de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre[®]-DFL; lote nº 0408011) e solução comercial de mepivacaína 3% (MepiSV[®]-DFL; lote nº 0407A09). Para formular a suspensão lipossomal de mepivacaína 2% foram utilizados: sal de cloridrato de mepivacaína (doada pela Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda.), acetato de α -tocoferol, fosfatidilcolina de ovo e colesterol (Sigma Chem. Co.) e tampão HEPES 20mM com NaCl 0,9% (Q-biogene).

Seringas de 1; 3 e 5 mL (BD[®]) e agulhas de 30G e 22G (BD[®]) foram utilizadas para indução de anestesia geral e para realização das injeções anestésicas infiltrativas. Para a indução de anestesia geral foram utilizados: Tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália Ind. Quím. Farm.), alfa-cloralose e uretano (Sigma Chem. Co.).

Preparação das soluções:

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

As vesículas multilamelares foram preparadas pelo método de hidratação de filme seco retirando-se alíquotas de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol (na proporção molar de 4:3:0,07) de uma solução estoque em clorofórmio e evaporando-se sob fluxo de N₂ seguido de vácuo por 2h, à temperatura ambiente (BOOGAERTS *et al.*, 1993 a,b; FRACETO *et al.*, 2002). Após a secagem foi adicionado o tampão HEPES 20mM, pH 7,4 com NaCl 150 mM, sendo a dispersão agitada por 5 minutos em vórtex, passando a apresentar vesículas multilamelares concêntricas, separadas por cavidades aquosas.

As vesículas lipossomais unilamelares de 0,4 μ m foram preparadas por extrusão das vesículas multilamelares descritas anteriormente (Extrusor Lipex Biomembranes Inc.). Assim, sob pressão de nitrogênio, à temperatura ambiente, a amostra de vesículas multilamelares foi passada por um disco de drenagem e duas membranas de policarbonato (Poretics) com poros de tamanho controlado (0,4 μ m), por 12 vezes. Os lipossomas foram mantidos em repouso, por pelo menos 2h, para o intumescimento das vesículas. A formulação dos lipossomas apresentava concentração lipídica de 5 mM.

Após a preparação das vesículas foi incorporado anestésico local cloridrato de mepivacaína (cedido pela Cristália[®]). A concentração total de anestésico foi 2%, ou seja, a mesma da preparação comercial com vasoconstritor (70,4mM).

As formulações foram preparadas em câmara de fluxo laminar e posteriormente foram esterilizadas em autoclave (CEREDA *et al.*, 2006). Todas as suspensões lipossomais utilizadas eram estéreis e livres de pirogênio. O teste de pirogênio foi conduzido pela Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda.

Segundo ARAÚJO *et al.* (2002), a formulação lipossomal produzida como descrito, apresenta uma percentagem de encapsulação da mepivacaína de 18,4 % (\pm 3,9 %). As formulações lipossomais eram utilizadas em até no máximo uma semana após sua produção, pois segundo ARAÚJO *et al.* (2004), vesículas lipossomais armazenadas a 4°C por até duas semanas do seu preparo não apresentam mudanças no seu diâmetro.

Previamente às injeções anestésicas, o pH das soluções foi aferido através de pHmetro ORION[®], modelo 290A, 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.

Animais

O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP (protocolos números: 816-1; 871-1; 1067-1). Foram utilizados 138 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, wistar), adultos, machos, spf ("specific pathogen free" - livres de patógenos específicos), provenientes do CEMIB-UNICAMP. Os animais utilizados apresentavam idade entre 6 e 8 semanas e peso entre 250-350g.

Os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada e com ciclo claro-escuros mantidos, com água e comida *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos distintos para os diferentes experimentos.

Edema de pata:

O teste de edema de pata induzido por carragenina foi adaptado de Winter *et al.* (1962) e tem sido utilizado para determinar atividade anti e pró-inflamatórias de vários fármacos (CAMPOS & CALIXTO, 1995; HAYASHI *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2003; POSADAS *et al.*, 2004; DUHGAONKAR *et al.*, 2006). Este modelo foi utilizado no presente estudo para avaliar uma possível atividade pró-inflamatória das preparações anestésicas comerciais e lipossomais a base de mepivacaína.

A carragenina é um polissacarídeo complexo, formado por monômeros repetidos de galactose. Este composto existe em três formas principais: lambda, kappa, e iota. A forma lambda é o agente de escolha para indução de respostas inflamatórias, pois estimula o processo inflamatório sem efeitos sistêmicos, permitindo um alto grau de reprodutibilidade (WINTER *et al.*, 1962, MORRIS, 2003). A metodologia empregada foi similar a de trabalhos que também avaliaram a reação provocada por carragenina, que no presente estudo foi utilizada como controle positivo, e outras substâncias na indução de edema de pata (FRANCISCHI *et al.*, 2002; POURPAK *et al.*, 2004).

Neste ensaio, foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, wistar), adultos, machos, spf ("specific pathogen free" - livres de patógenos específicos), divididos em seis grupos de seis animais cada. As formulações testadas foram: carragenina 1% (controle positivo); solução de NaCl 0,9%; suspensão lipossomal 5 mM (LUV); solução comercial de mepivacaína 3% (MVC 3%); solução comercial de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (MVC 2% EPI); e suspensão lipossomal de mepivacaína a 2% (MVC LUV).

Previamente à injeção intraplantar de 0,1 mL das substâncias testadas, foi realizada a indução da anestesia geral nos animais com tiopental sódico na dose de 40mg/kg. Em seguida as patas traseiras foram marcadas para garantir que estas fossem imersas no pletismômetro sempre da mesma maneira (POSADAS *et al.*, 2004).

Utilizando um pletismômetro (Ugo Basile 7140) o volume das patas traseiras foi medido antes e 60, 120 e 180 min após a injeção intraplantar de carragenina a 1% e das formulações testes. O edema induzido pela carragenina é gradual, podendo ser medido após uma hora e atinge o seu efeito máximo após três horas da injeção (GOULART *et al.*, 2005) e, assim, as medidas no presente estudo foram feitas a partir de 1 hora até 3 horas depois da injeção das substâncias em teste. O edema de pata, expresso em mL, foi calculado subtraindo-se o volume registrado antes da injeção, do volume registrado após a injeção (POURPAK *et al.*, 2004). A **Figura 1** mostra a marcação na pata traseira, o pletismômetro utilizado, a injeção intraplantar e a medida de volume realizada durante os testes.

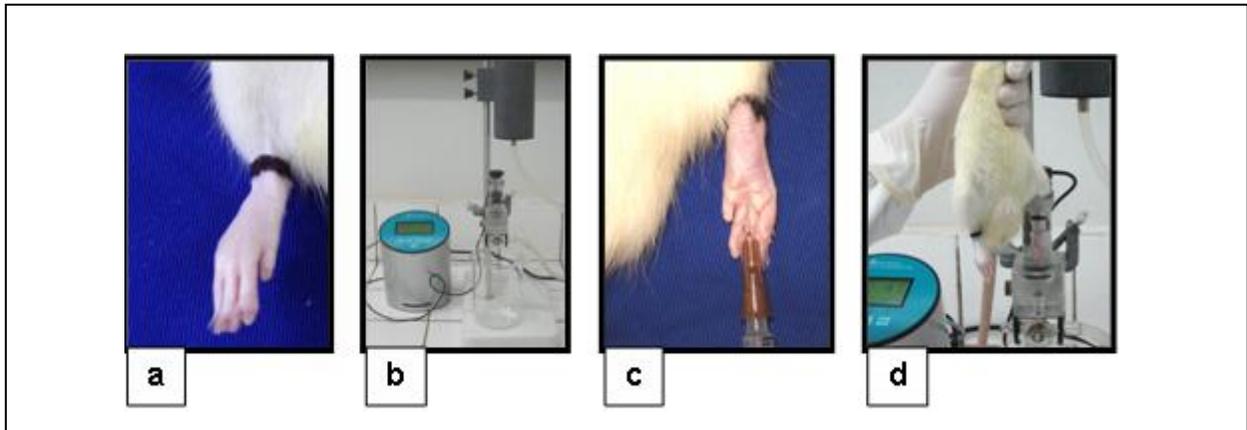


Figura 1: Teste de edema de pata; **(a)** Delimitação da pata; **(b)** pletismômetro Ugo-Basile – 7140; **(c)** Injeção intraplantar; **(d)** Medidas de volume.

Avaliação histológica:

Foram utilizados 90 animais (ratos da mesma espécie previamente descrita) distribuídos aleatoriamente em cinco grupos e nestes foram feitos os seguintes tratamentos: **Grupo 1:** punção da agulha; **Grupo 2:** administração de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (MVC 2% EPI); **Grupo 3:** administração de preparação anestésica local lipossomal de mepivacaína 2% (MVC LUV); **Grupo 4:** administração de preparação lipossomal sem anestésico local (LUV); **Grupo 5:** administração de mepivacaína 3% (MVC 3%).

Neste ensaio, cada animal recebeu 0,1 mL de uma das soluções dos grupos 2, 3, 4 ou 5 na região do fórnice do vestíbulo do 1º molar superior direito. Além disso, todos os animais receberam 0,1 mL de solução de NaCl 0,9% contralateralmente, sendo considerado este procedimento como grupo controle.

Previamente à administração das soluções foi realizada a indução da anestesia geral com tiopental na dose de 40mg/kg. Decorridas 6 horas da administração das soluções, seis animais de cada grupo, escolhidos ao acaso, foram sacrificados e o fragmento da maxila com o tecido mole aderido, foi

removido. Após 24 horas e após 4 dias das administrações, este procedimento se repetiu para os animais restantes.

Os fragmentos foram fixados em solução de Bowin, por 24 horas e, posteriormente, em solução de formol a 10%, por 48 horas. Em seguida, as peças foram lavadas em água destilada/deionizada e armazenadas em solução de EDTA titriplex (Merck KGaA) até que a desmineralização permitisse o corte das peças. A partir destes fragmentos de maxila foram obtidos cortes histológicos com espessura de 6 μm , em cinco profundidades, diferindo estas entre si em 40 μm .

Todas as peças foram cortadas do lado esquerdo para que durante a análise das lâminas fosse possível distinguir o lado da aplicação da solução de NaCl 0,9% do lado tratado (**Figura 2**).

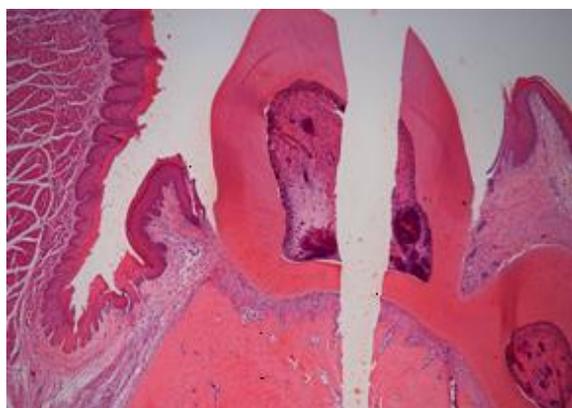


Figura 2: Corte do lado esquerdo das peças para possibilitar a identificação do lado tratado e do lado controle (solução de NaCl 0,9%).

Os cortes foram processados e corados com hematoxilina/eosina (HE) e analisados qualitativamente em relação ao aspecto inflamatório do tecido. A análise foi feita a partir de fotografias dos cortes, com aumento de 100 vezes, capturadas pelo fotomicroscópio (Zeiss-AXIOSKOP2-PLUS).

A região do corte histológico analisada foi padronizada, conforme demonstrado na **Figura 3**. A tomada fotográfica compreendeu a região de tecido conjuntivo na porção mais interna do fundo de sulco vestibular (fundo de sulco gengival), ou seja, o local de injeção das diferentes formulações testadas.

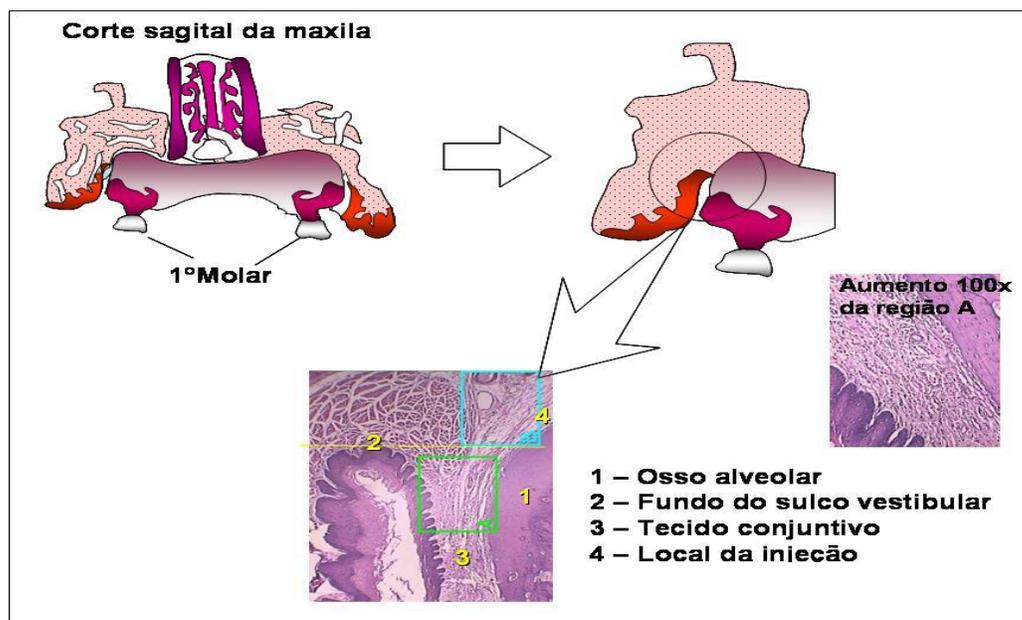


Figura 3: Padronização da região dos cortes histológicos que foram submetidas ao procedimento de classificação da reação inflamatória por escore.

As imagens foram codificadas por um terceiro participante e dois avaliadores classificaram as imagens de acordo com um escore determinado previamente (SHIPPER *et al.*, 2005), sem saber qual das soluções anestésicas foi empregada. A replicabilidade do método de classificação por escores entre os dois examinadores foi calculada pelo teste de correlação intraclassa para dados contínuos. Foram observados aspectos tais como migração de células inflamatórias e concentração aparente destas na região da injeção, alteração da vascularização local e possíveis regiões de necrose tecidual. O escore foi definido de acordo com as descrições a seguir:

- (1) Sem infiltrado inflamatório

- (2) Infiltrado inflamatório leve
- (3) Infiltrado inflamatório moderado
- (4) Infiltrado inflamatório intenso
- (5) Infiltrado inflamatório intenso com áreas de necrose

A **Figura 4** mostra os escores de infiltrados inflamatórios observados no presente estudo.

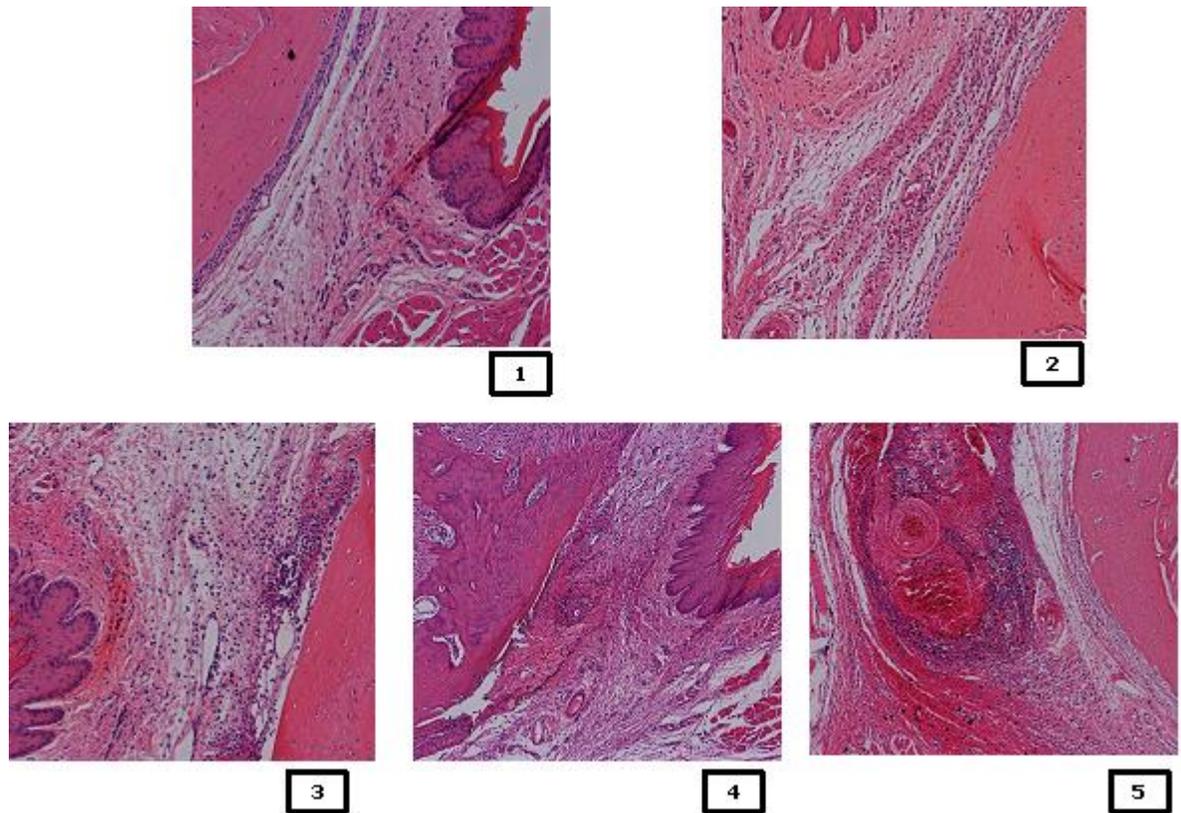


Figura 4: Escores de infiltrados inflamatórios (x100 vezes): (1) Sem infiltrado inflamatório; (2) Infiltrado inflamatório leve; (3) Infiltrado inflamatório moderado; (4) Infiltrado inflamatório intenso; (5) Infiltrado inflamatório intenso com áreas de necrose.

Determinação da concentração plasmática:

Foram utilizados 12 animais (ratos da mesma espécie anteriormente descrita) distribuídos aleatoriamente em três grupos e nestes foram administradas as seguintes soluções: **Grupo 1:** mepivacaína 3% (MVC 3%); **Grupo 2:** mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (MVC 2% EPI) e **Grupo 3:** preparação anestésica local lipossomal de mepivacaína 2% (MVC LUV).

Cada animal recebeu 0,1 mL de uma das soluções dos **grupos 1, 2 e 3** na região do fórnice do vestíbulo do 1º molar superior direito. Previamente à administração das soluções foi realizada a indução da anestesia geral com α -cloralose (50mg/kg) e uretano (1g/kg). Antes da realização do presente estudo, foi realizado ensaio piloto para verificar a possível influência do uso destas drogas na dosagem de mepivacaína. Neste ensaio piloto, realizado em um "pool" de plasma com e sem as mesmas drogas usadas para anestesia geral, foi verificado que o uso destes anestésicos gerais não provocou alterações na dosagem de mepivacaína.

Logo após a indução da anestesia geral, foi realizada a instalação de um cateter intravascular na veia femoral como via de acesso venoso. Foram coletadas amostras de 0,4 mL de sangue nos seguintes tempos: 0 - antes da injeção anestésica ("baseline"), 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360 e 420 minutos. Este esquema de progressão geométrica é comumente utilizado e fornece informações sobre a disposição da droga (BOURNE, 1995). Logo após a colheita, a cânula foi lavada com uma mistura de anticoagulante (heparina sódica) e soro fisiológico, para evitar coagulação do sangue e obstrução da via de acesso. As amostras foram transferidas para tubos de microcentrifuga (eppendorf®) heparinizados e o plasma separado foi armazenado a -18°C até a análise.

O equipamento utilizado para a obtenção das concentrações plasmáticas de mepivacaína foi um espectrômetro de massas triplo-quadrupolar em seqüência com fonte de ionização por eletrospray (Quattro Premier XE) com um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) 2795 (Waters®) acoplado. Os dados

foram adquiridos e analisados pelo software MassLynx 4.1 (Waters®). As análises foram realizadas no laboratório CORE (Clinical Research), pelos Profs. Drs. Fábio Barros e Eduardo Meurer.

A espectrometria de massas é uma técnica que envolve a fragmentação de moléculas alvo, seguida da separação e da medida de massa dos fragmentos individuais (ULLMAN *et al.*, 1998). O resultado final de todas as análises feitas por espectrômetro de massa, independente do tipo de ionização ou de características de desempenho dos sistemas, é o fornecimento de um espectro que fornece a relação massa-carga no eixo *x* *versus* o fluxo de íons detectados no eixo *y* (GILLETTE *et al.*, 2005). O equipamento utilizado neste estudo ainda fornece cromatograma de íons selecionados (modo MRM), integrando a área deste cromatograma é possível determinar a quantidade do anestésico analisado.

As amostras de plasma (100µL) obtidas foram misturadas com o padrão interno (PI) de venlafaxina previamente a extração. O PI foi obtido com a diluição de 25 µL de venlafaxina em metanol na concentração de 200 ng/mL. As amostras misturadas com o PI foram agitadas por 1 minuto para garantir solubilização do PI no plasma. Em seguida foram adicionados 50 µL de NaOH (1M) e novamente a mistura foi agitada por 1 minuto. Foram adicionados a mistura, 1000 µL de hexano/acetato de etila (1:1), seguida de agitação e centrifugação por 5 minutos cada. Foram retirados 800 µL da fase orgânica, esta solução foi transferida para outro eppendorf e seca em fluxo de ar comprimido. O resíduo foi dissolvido em 100 µL de fase móvel e em seguida a mistura foi agitada por 2 minutos previamente a injeção no sistema CLAE – EM/EM.

Foram injetados 5 µL desta mistura no CLAE–EM/EM. Foi utilizada uma coluna Polaris C₁₈ de 5µm (50x2 mm). A fase móvel utilizada foi composta de acetonitrila e água (80:20 v/v) com adição de 0,1% de ácido fórmico. O tempo de corrida foi de 3 minutos, sendo o tempo de retenção da mepivacaína de 1,03 min e 1,04 min para o PI.

A detecção foi feita pelo monitoramento de reações múltiplas (MRM), que consiste na separação no primeiro analisador (Q1) da molécula alvo ionizada e fragmentação no segundo analisador (q2), seguida da análise do fragmento específico no terceiro analisador (Q3). A amostra de mepivacaína foi monitorada MRM 247,5>150,5, e a venlafaxina MRM 278,1>215,31.

Análise estatística:

Os dados obtidos com o teste de edema de pata foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer com nível de significância de 5%. Os diferentes tempos observados (60, 120 e 180 min) foram analisados separadamente considerando todas as substâncias testadas (carragenina 1%, mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000, mepivacaína 3%, mepivacaína 2% lipossomal, suspensão lipossomal, solução de NaCl 0,9%). Além disso, as formulações testadas foram comparadas entre si, sem o grupo carragenina.

Os dados obtidos com a avaliação histológica, numa primeira análise, foram comparados através do teste de Kruskal–Wallis e teste Student-Newman-Keuls (post-hoc) com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), para comparação entre vários grupos, sem considerar cada animal de maneira independente. A análise considerou primeiramente os escores obtidos com os cinco tratamentos estudados (mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000, mepivacaína 3%, mepivacaína 2% lipossomal, suspensão lipossomal, punção da agulha). Além disso, os escores obtidos com a administração de solução de NaCl 0,9% também foram analisados com o teste de Kruskal–Wallis e teste Student-Newman-Keuls (post-hoc) com nível de significância de 5%. Os diferentes tempos observados (6h, 24 h e 4 dias) foram analisados separadamente.

Os cinco tratamentos foram analisados, em uma nova distribuição de populações, considerando cada animal de maneira independente. Nestes testes, a injeção de solução de NaCl 0,9% (controle) foi comparada com as soluções

injetadas no lado contra lateral da maxila dos animais. Os dados foram analisados com teste de Wilcoxon pareado nos três tempos observados.

A concentração de mepivacaína encontrada no plasma dos animais nos diferentes tempos observados foi analisada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer com nível de significância de 5%, comparando-se os três grupos considerando cada tempo separadamente.

5. RESULTADOS:

Valores de pH das formulações testadas:

Previamente aos testes de edema e da avaliação histológica da mucosa oral, o pH das formulações utilizadas foi aferido. A **tabela 1** mostra a média dos valores de pH obtidos.

Tabela1: Valores médios de pH das formulações testadas

Formulações (teste de edema de pata)	pH
Mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000	3,84
Mepivacaína 3%	5,52
Mepivacaína 2% lipossomal	7,15
Solução de NaCl 0,9%	5,84
Suspensão lipossomal	7,38

Teste de edema:

O teste de edema de pata mostrou diferenças estatisticamente significantes entre o edema provocado pela carragenina e o provocado pelas outras formulações testadas em todos os tempos analisados ($p < 0,001$). As formulações testadas não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre si ($p > 0,05$) em nenhum dos períodos de tempo testados (60, 120 e 180 minutos). A **tabela 2** mostra o aumento de volume médio (mL) nos diferentes tempos medidos após a injeção das substâncias testadas. A **Figura 5** mostra o gráfico com o aumento de volume médio e o desvio padrão provocado pelas substâncias testadas em função do tempo.

Tabela 2: Aumento de volume médio nos diferentes tempos medidos após a injeção das substâncias testadas.

Média do aumento de volume (mL) \pm SD						
Tempo (min)	Carragenina 1%	LUV	NaCl 0,9%	MVC 2% EPI	MVC 3%	MVC LUV
60	0,63 \pm 0,15 b	0,05 \pm 0,05 a	0,11 \pm 0,14 a	0,06 \pm 0,07 a	0,03 \pm 0,08 a	0,08 \pm 0,05 a
120	0,68 \pm 0,23 b	0,06 \pm 0,06 a	0,05 \pm 0,04 a	0,11 \pm 0,06 a	0,03 \pm 0,04 a	0,07 \pm 0,06 a
180	0,54 \pm 0,18 b	0,02 \pm 0,04 a	0,09 \pm 0,08 a	0,07 \pm 0,09 a	0,03 \pm 0,02 a	0,01 \pm 0,01 a

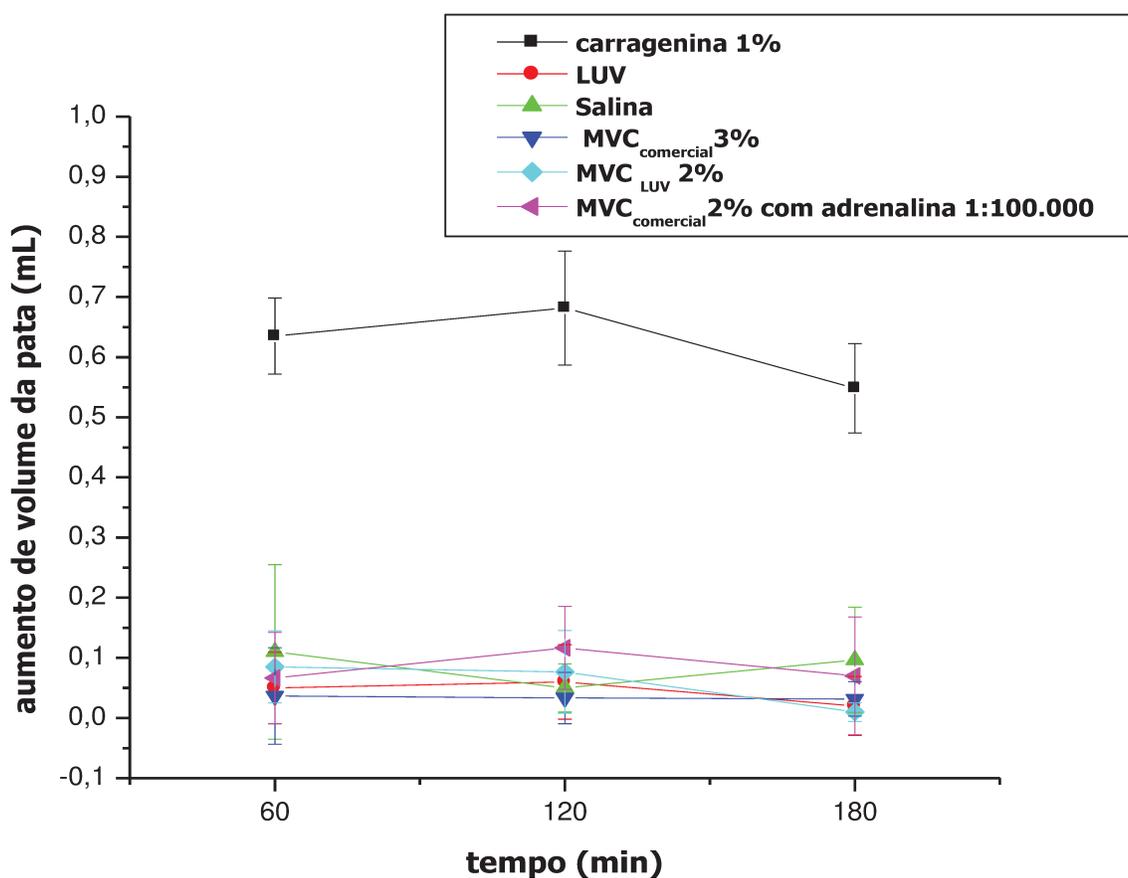


Figura 5: Aumento de volume (mL) médio e o desvio padrão provocado pelas substâncias testadas em função do tempo (min).

Avaliação Histológica da Mucosa Oral:

O teste de correlação intraclasse para dados contínuos mostrou um índice de correlação de 0,9677 ($p < 0,0001$), ou seja, a replicabilidade entre os dois avaliadores que examinaram as lâminas histológicas foi alta.

Considerando a análise inter-grupos com o teste de Kruskal-Wallis no tempo de 6 horas, os valores de escores obtidos após a administração de MVC LUV 2%, apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação aos valores obtidos com a injeção de MVC 2% com epinefrina 1:100.000. No entanto, a administração de MVC 3%, suspensão lipossomal pura (LUV) e da punção da agulha não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas à injeção de MVC LUV 2% ($p > 0,05$). A injeção da LUV provocou infiltrado inflamatório que não diferiu estatisticamente daqueles provocados pela punção da agulha e pelas injeções de MVC LUV e MVC 3% ($p > 0,005$), porém diferiu estatisticamente da inflamação provocada pela injeção de MVC 2% com epinefrina 1:100.000 ($p < 0,01$). A **tabela 3** mostra as medianas dos escores obtidos com estes tratamentos no tempo de 6 horas.

Tabela 3: Medianas dos escores obtidos com os tratamentos testados após 6 horas da sua aplicação.

Tratamento	Mediana (\pm desvio interquartilico)
MVC LUV 2%	2.5 (\pm 0.80) a,c
MVC 2% com epinefrina 1:100.000	2.5 (\pm 0.50) b
MVC 3%	2.1 (\pm 0.35) a,b
LUV	2.4 (\pm 0.75) a,c
Punção da agulha	2.0 (\pm 0.30) c

A **Figura 6** mostra o aspecto das lâminas obtidas com a aplicação de MVC LUV 2%, MVC 2% com epinefrina 1:100.000, MVC 3% e LUV após 6 horas.

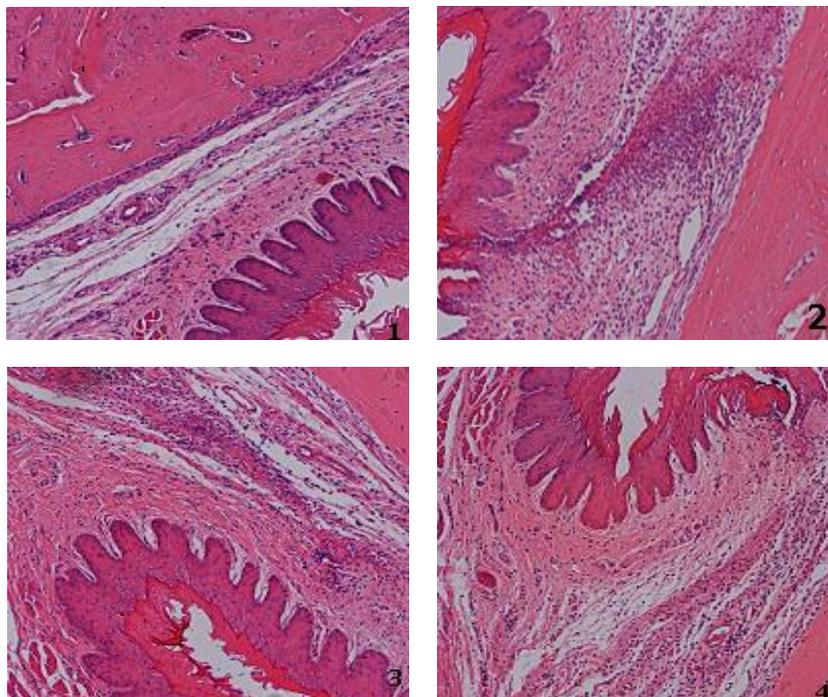


Figura 6: Imagens obtidas com a aplicação de (x100 vezes): 1) MVC LUV 2%; 2) MVC 2% com epinefrina 1:100.000; 3) MVC 3% e 4) LUV após 6 horas.

Após 24 horas da aplicação dos mesmos tratamentos, os infiltrados inflamatórios observados e os resultados foram semelhantes aos apresentados após 6 horas da aplicação dos tratamentos. O grupo MVC LUV 2% apresenta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores obtidos com a injeção de MVC 2% com epinefrina 1:100.000. Porém, o infiltrado inflamatório provocado pela injeção de MVC LUV não diferiu estatisticamente da administração de MVC 3%, de LUV e da punção da agulha ($p > 0,05$). Assim como no tempo de 6 horas, a injeção da LUV provocou infiltrado inflamatório que não diferiu estatisticamente daqueles provocados pela punção da agulha e pelas

injeções de MVC LUV e MVC 3% ($p > 0,005$), porém diferiu estatisticamente da inflamação provocada pela injeção de MVC 2% com epinefrina 1:100.000 ($p < 0,05$). A **tabela 4** mostra as medianas dos escores obtidos com estes tratamentos no tempo de 24 horas.

Tabela 4: Medianas dos escores obtidos com os tratamentos testados após 24 horas da aplicação dos tratamentos.

Tratamento	Mediana (\pm desvio interquartilico)
MVC LUV 2%	2.0 (\pm 0.3) a,c
MVC 2% com epinefrina 1:100.000	4.0 (\pm 0.0) b
MVC 3%	3.0 (\pm 0.3) a,b
LUV	2.1 (\pm 0.2) a,c
Punção da agulha	1.5 (\pm 1.0) c

A **Figura 7** mostra o aspecto das lâminas obtidas com a aplicação de MVC LUV 2%, MVC 2% com epinefrina 1:100.000, MVC 3% e LUV após 24 horas.

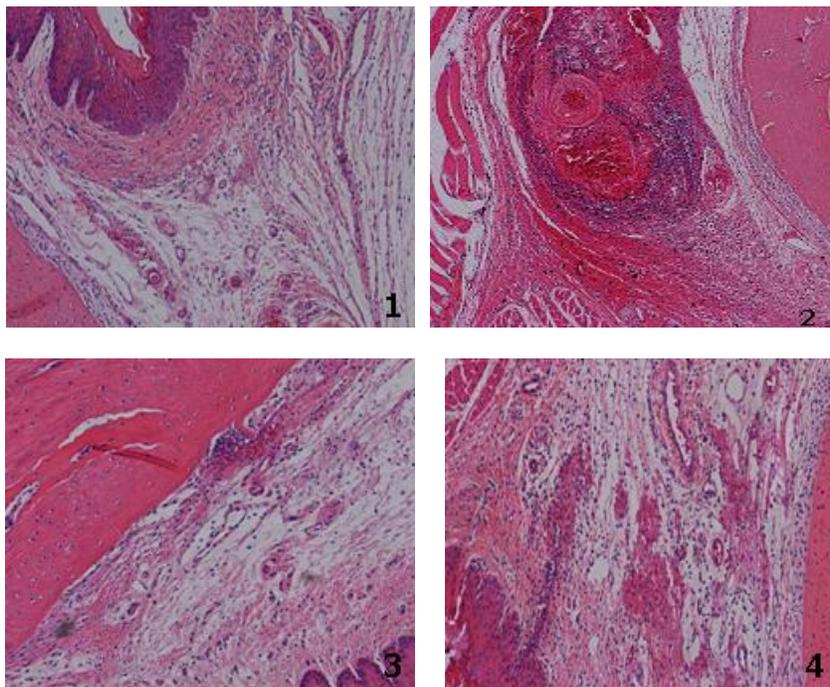


Figura 7: Imagens obtidas com a aplicação de (x100 vezes): 1) MVC LUV 2%; 2) MVC 2% com epinefrina 1:100.000; 3) MVC 3% e 4) LUV após 24 horas.

Quatro dias após a aplicação dos tratamentos, os escores obtidos com os tratamentos testados não diferiram estatisticamente entre si, com exceção da MVC 2% com epinefrina, quando comparada com a punção da agulha ($p < 0,01$). A **tabela 5** mostra as medianas dos escores obtidos com os tratamentos testados após 4 dias.

Tabela 5: Medianas dos escores obtidos com os tratamentos testados após 4 dias da sua aplicação.

Tratamento	Mediana (\pm desvio interquartílico)
MVC LUV 2%	1.3 (\pm 0.9) a,b
MVC 2% com epinefrina 1:100.000	2.5 (\pm 1.0) a
MVC 3%	2.0 (\pm 0.0) a,b
LUV	2.0 (\pm 0.3) a,b
Punção da agulha	1.2 (\pm 0.0) b

A **Figura 8** mostra o aspecto das lâminas obtidas com a aplicação de MVC LUV 2%, MVC 2% com epinefrina 1:100.000, MVC 3% e LUV após 4 dias.

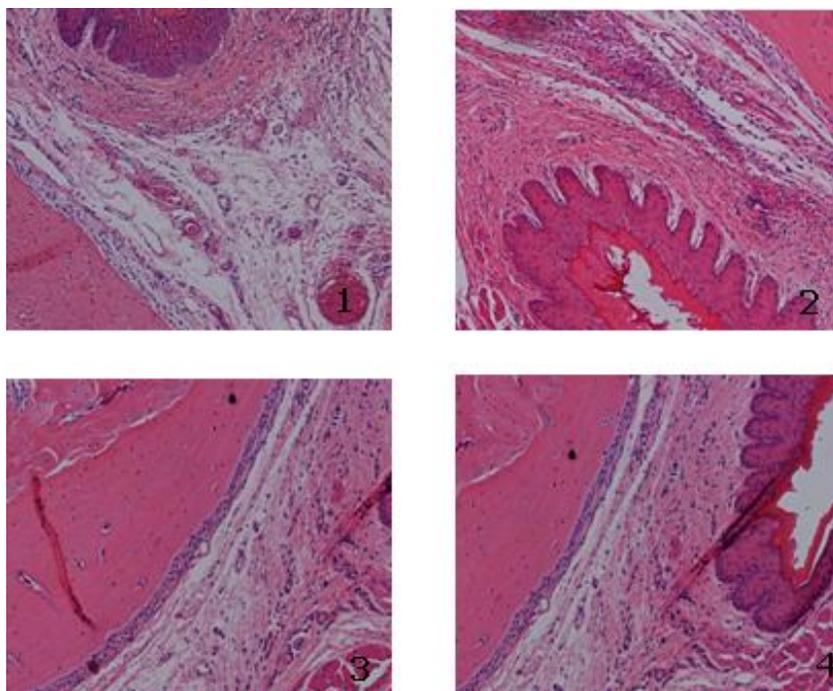


Figura 8: Imagens obtidas com a aplicação de (x100 vezes): 1) MVC LUV 2%; 2) MVC 2% com epinefrina 1:100.000; 3) MVC 3% e 4) LUV após 4 dias.

Após 6 horas, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os escores obtidos com a aplicação de solução de NaCl 0,9% considerando todos os grupos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). O mesmo ocorreu com a aplicação de solução de NaCl 0,9% observada depois de 24 horas e 4 dias.

Considerando a análise intra-grupo, feita com o teste de Wilcoxon pareado, em relação ao tempo de 6 horas, o grupo MVC 2% com epinefrina 1:100.000 e o MVC 3% apresentaram escores maiores ($p < 0,05$) que os seus grupos controles (solução de NaCl 0,9%). Já os grupos MVC 2% LUV, LUV e punção da agulha não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) em relação a

injeção de de NaCl 0,9%. A **tabela 6** mostra as medianas dos escores dos grupos tratados e de seus controles após 6 horas.

Tabela 6: Medianas \pm desvio interquartilico (DI) dos escores dos grupos tratados e de seus controles após 6 horas.

Grupos	Mediana\pmDI dos escores do lado tratado	Mediana\pmDI dos escores do lado controle
MVC 2% com epinefrina 1:100.000	4.8 (\pm 0.40) a	2.5 (\pm 0.50) b
MVC 3%	3.3 (\pm 0.60) a	2.1 (\pm 0.35) b
MVC 2% LUV	2.5 (\pm 0.65) a	2.5 (\pm 0.80) a
LUV	2.3 (\pm 0.60) a	2.4 (\pm 0.75) a
Punção da agulha	2.0 (\pm 0.30) a	2.0 (\pm 0.30) a

Em relação aos resultados obtidos após 24 horas da aplicação das soluções testes e controle, não houve diferença estatisticamente significativa entre os escores obtidos nos grupos MVC 2% LUV, LUV e punção da agulha. Porém, os grupos MVC 2% EPI e MVC 3% apresentaram escores maiores que o grupo controle ($p < 0,05$). A **tabela 7** mostra as medianas dos escores dos grupos tratados e de seus controles após 24 horas.

Tabela 7: Medianas dos escores dos grupos tratados e de seus controles após 24 horas.

Grupos	Mediana±DI dos escores do lado tratado	Mediana±DI dos escores do lado controle
MVC 2% com epinefrina 1:100.000	4.0 (± 0.0) a	2.0 (± 0.0) b
MVC 3%	3.0 (± 0.3) a	2.0 (± 0.0) b
MVC 2% LUV	2.0 (± 0.3) a	2.1 (± 0.5) a
LUV	2.1 (± 0.2) a	2.0 (± 0.0) a
Punção da agulha	1.5 (± 1.0) a	2.0 (± 0.0) a

Na análise realizada 4 dias após os tratamentos, o grupo MVC 2% com epinefrina apresentou escore maior que o seu grupo controle ($p=0,0313$). O grupo punção da agulha apresentou escore menor que seu grupo controle ($p=0,0313$) e os demais grupos não diferiram estatisticamente de seus controles ($p>0,05$). A **tabela 8** mostra as medianas dos escores dos grupos tratados e de seus controles após 4 dias.

Tabela 8: Medianas dos escores dos grupos tratados e de seus controles após 4 dias.

Grupos	Mediana±DI dos escores do lado tratado	Mediana±DI dos escores do lado controle
MVC 2% com epinefrina 1:100.000	2.5 (± 1.0) a	1.7 (± 0.90) b
MVC 3%	2.0 (± 0.0) a	1.6 (± 0.15) a
MVC 2% LUV	1.3 (± 0.9) a	1.6 (± 0.45) a
LUV	2.0 (± 0.3) a	1.9 (± 0.35) a
Punção da agulha	1.2 (± 0.0) a	1.6 (± 0.00) b

A **Figura 9** mostra as medianas dos escores obtidos com os cinco tratamentos e seus controles nos três tempos observados neste estudo.

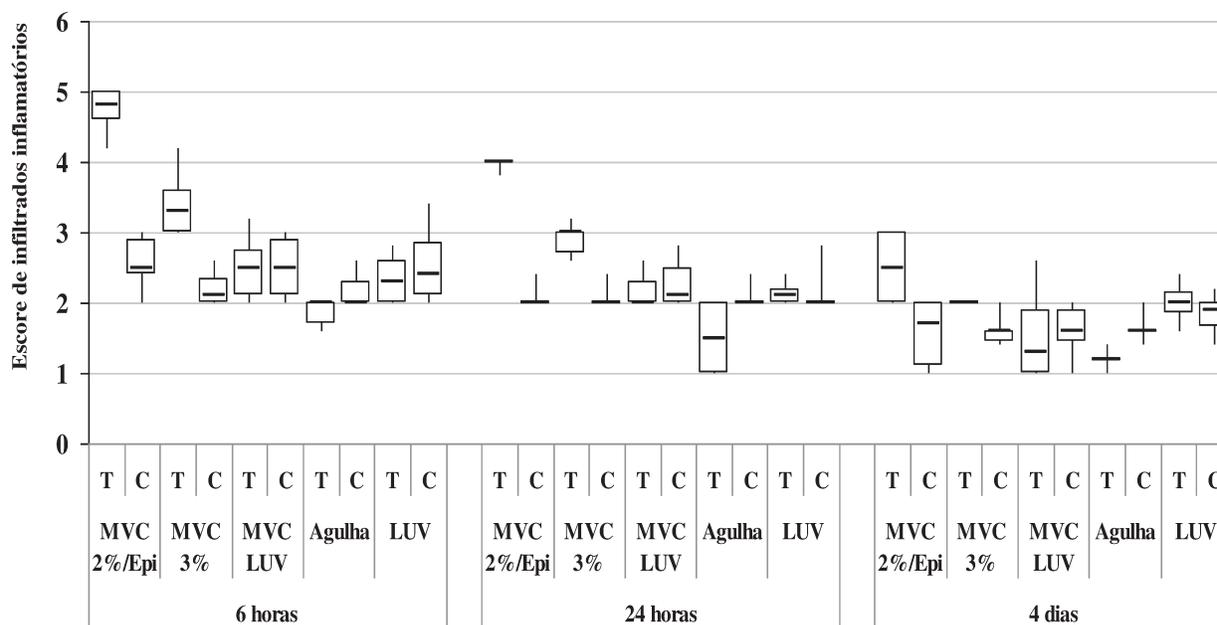


Figura 9: Medianas dos escores obtidos com os cinco tratamentos (T) e seus controles (C) nos tempos 6 e 24 horas e 4 dias. A linha central representa a

mediana, a caixa representa o primeiro e terceiro quartis e as suíças representam os valores máximos e mínimos.

Determinação da concentração plasmática:

O tamanho da amostra em cada um dos três grupos (quatro animais), permitiu à ANOVA um poder de 98% para detectar um nível de diferença de 5% nas médias, considerando, por exemplo, os resultados obtidos nos tempos de 60 ou 120 minutos (NQuery for Windows).

A concentração plasmática obtida após a injeção de MVC 2% EPI não apresentou diferença estatisticamente significativa da obtida após a injeção de MVC LUV em todos os tempos analisados ($p > 0,05$). A injeção de MVC LUV promoveu concentrações menores que as obtidas após a injeção de MVC 3% até os 240 minutos ($p < 0,05$), após este período não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas formulações ($p > 0,05$). As duas formulações comerciais analisadas não apresentaram concentrações plasmáticas distintas de 30 a 60 minutos, e nos períodos de 240 a 420 minutos ($p > 0,05$) após a injeção. A **tabela 9** mostra a concentração de mepivacaína (ng/mL) obtida após a injeção das formulações nos 12 animais testados.

Tabela 9: Concentração de mepivacaína (ng/mL) obtida após a injeção das formulações (MVC 2% EPI, MVC 3% e MVC LUV 2%).

Tempo (min)	MVC 2% EPI	MVC 3%	MVC LUV 2%
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
15	89,77 ± 82,73 a	302,53 ± 142,3 b	92,02 ± 66,8 a
30	228,85 ± 113,68 a,b	350 ± 123,59 b	137,1 ± 55,44 a
45	267,11 ± 194,46 a,b	449,25 ± 98,58 b	146,6 ± 72,92 a
60	381,93 ± 151,01 a,b	428,95 ± 88,46 b	172,93 ± 62,08 a
120	354,73 ± 169,34 a	1767,7 ± 930,16 b	233,63 ± 61,38 a
180	236,38 ± 117,45 a	465,95 ± 59,41 b	243,68 ± 56,88 a
240	211,13 ± 164,25 a	431,78 ± 87,54 b	248,35 ± 92,23 a
300	179,83 ± 134,86 a	269,3 ± 210,21 a	240,9 ± 88,09 a
360	153,05 ± 141,65 a	197,15 ± 183,89 a	237,98 ± 85,66 a
420	218,3 ± 228,17 a	265,28 ± 265,38 a	238,7 ± 84,38 a

A **Figura 10** mostra o espectro de massas da mepivacaína no modo seqüencial de m/z 247,48; gerando íon fragmento de m/z 150,57 a uma energia de colisão de 20 eV.

A **Figura 11** mostra os cromatogramas de íons selecionados (modo MRM) da mepivacaína e da venlafaxina.

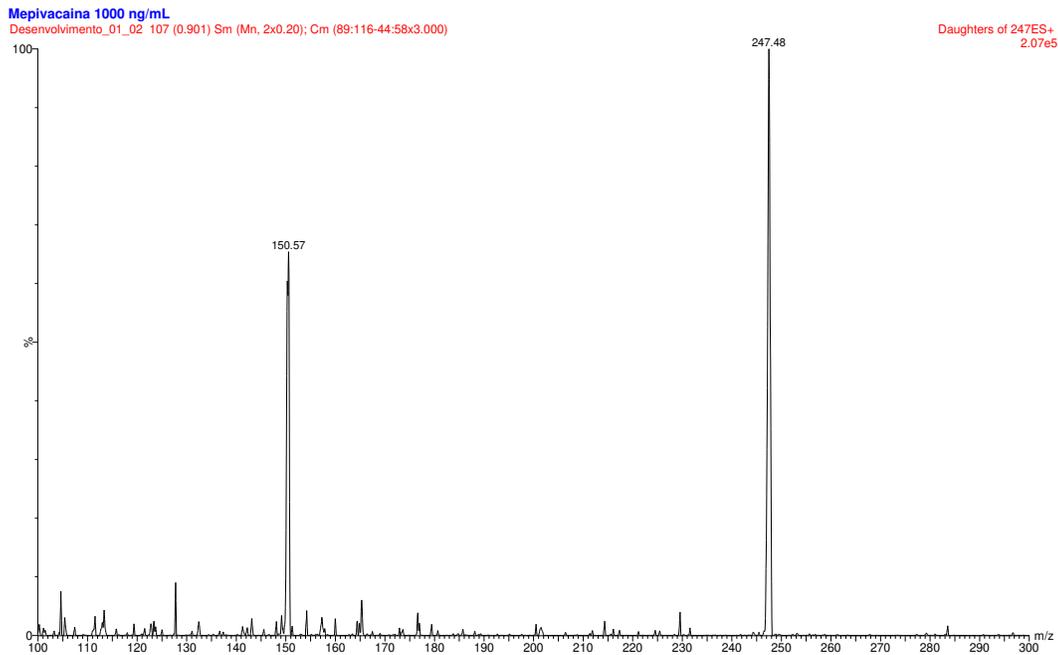


Figura 10: Espectro de massas sequencial, íons produto de m/z 247. Energia de colisão 20 eV.

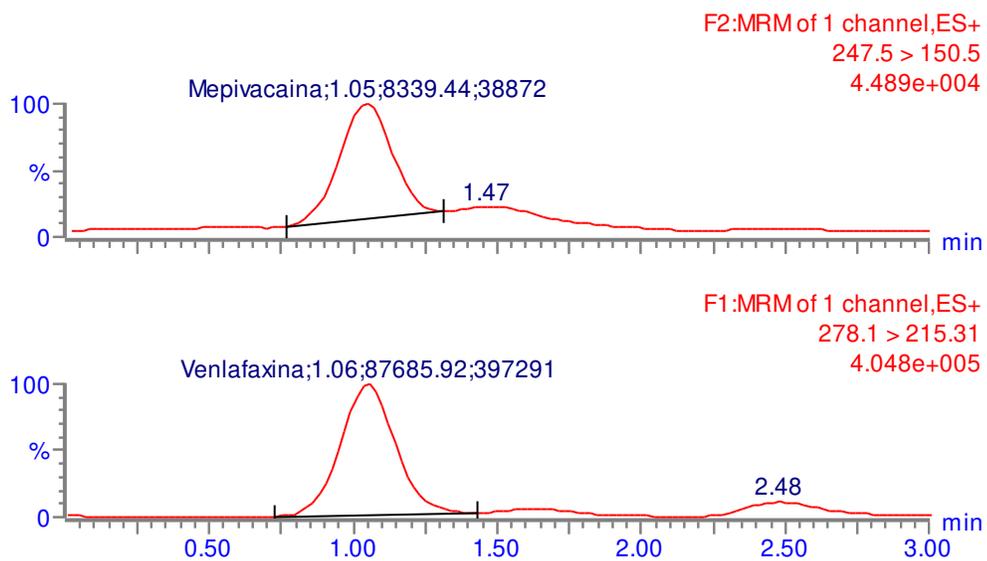


Figura 11: Cromatogramas de íons selecionados (modo MRM) da mepivacaína e da venlafaxina.

A **Figura 12** mostra o gráfico de concentração plasmática média *versus* tempo após a injeção de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000, mepivacaína 3% e mepivacaína lipossomal 2%.

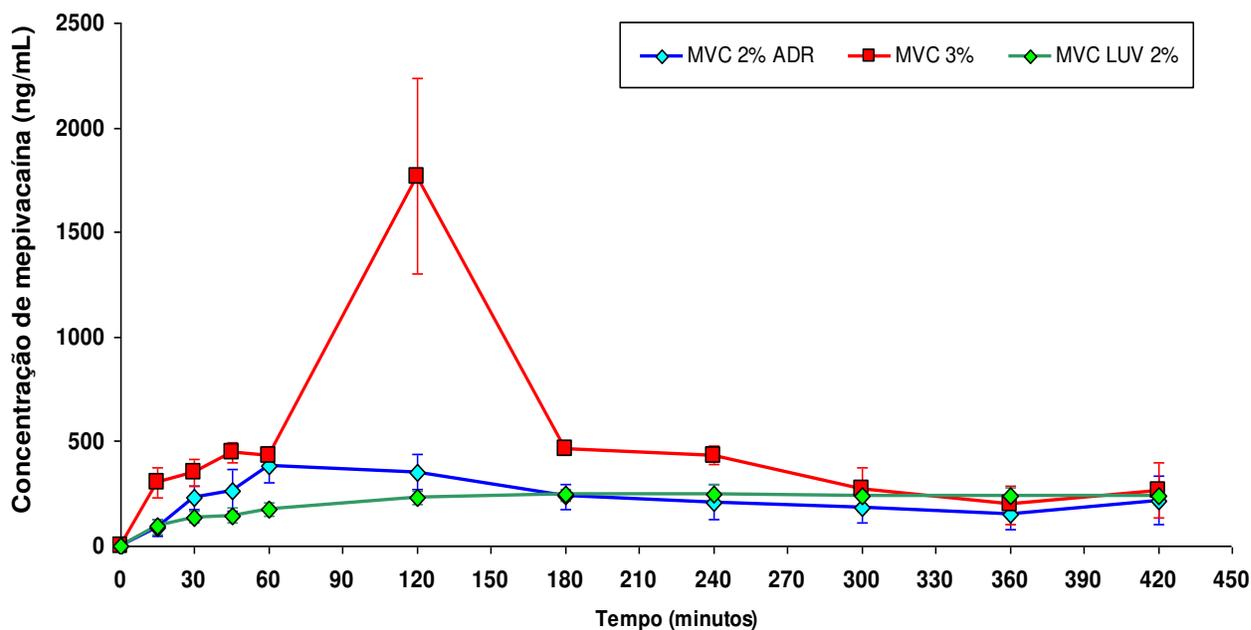


Figura 12: Gráfico da concentração plasmática média *versus* tempo após a injeção de MVC 2% com epinefrina 1:100.000; mepivacaína 3% e mepivacaína lipossomal 2%.

A **Tabela 10** representa os valores dos parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , t_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf}) obtidos com os valores de concentração plasmática obtidos em cada grupo.

Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos após a injeção de MVC 2% EPI, MVC LUV, MVC 3%.

	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	T_{max} (min)	AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$)	AUC_{0-inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$)
MVC 2%	0,47 (0,42 - 0,52)	90 (60 - 195)	85,1 (63,94 - 118,92)	98,43 (79,85 - 101,11)
ADR	a, b	a	a	a
MVC 3%	1,9 (1,24 - 2,42)	120 (120 - 120)	241,37 (220,97 - 248,88)	210,26 (133,38 - 308,57)
	a	a	b	a
MVC LUV	0,27 (0,21 - 0,33)	150 (120 - 195)	92,65 (72,26 - 111,94)	2419,23 (1407,83 - 3207)
2%	b	a	a	a

6. DISCUSSÃO:

O presente estudo teve por objetivo estudar a compatibilidade biológica de uma formulação lipossomal de mepivacaína. Para tanto, a metodologia empregada utilizou a análise da reação inflamatória provocada pela administração de soluções anestésicas a base de mepivacaína na mucosa oral e também pela avaliação da atividade pró-inflamatória destas preparações anestésicas no modelo do teste de edema de pata induzido pela carragenina.

Outros estudos avaliaram a influência de anestésicos locais no edema de pata induzido por carragenina, porém nestes, os anestésicos locais foram aplicados através de bloqueio do nervo ciático, na pata contralateral ou na mesma pata da injeção de carragenina (BURITOVA *et al.*, 1996; BILEVICIUTE-LJUNGAR *et al.*, 2000; ESTEBE *et al.*, 2002; LEDUC *et al.*, 2002; BELOEIL *et al.*, 2006) com o intuito de avaliar a capacidade das soluções em atenuar a reação inflamatória, o edema e a hiperalgesia induzida pela carragenina. O presente estudo, de forma diferente, utilizou o modelo para observar a atividade pró-inflamatória das formulações testadas. O edema provocado pela carragenina foi compatível com aquele observado em outros estudos (FRANCISCHI *et al.*, 2002; POURPAK *et al.*, 2004) demonstrando que o teste foi válido.

O edema de pata provocado pelas soluções anestésicas foi sempre de menor volume quando comparado com o edema de pata proveniente da ação da carragenina, indicando que as mesmas seriam menos flogísticas. A atividade antiinflamatória dos anestésicos locais já foi comprovada, sendo em alguns casos superior a atividade de agentes corticoesteróides e não-esteroidais (CASSUTO *et al.*, 2006). Este fato poderia explicar a ausência de edema ocorrida após a injeção das formulações anestésicas testadas. Este teste também mostrou, no presente estudo, que a injeção de uma suspensão lipossomal pura e do anestésico local encapsulado em lipossomas não provoca nenhuma reação inflamatória local significativa, o que reforça a segurança deste veículo.

Estudos prévios já demonstraram a segurança do uso dos lipossomas como veículo. Os lipossomas utilizados no presente estudo são compostos de materiais biocompatíveis e de ocorrência natural, semelhantes àqueles presentes nas membranas biológicas. Assim, estas vesículas lipídicas são biodegradáveis, além de apresentarem baixa toxicidade e imunogenicidade reduzida ou inexistente (MALINOVSKY *et al.*, 1997; KUZMA *et al.*, 1997; KSHIRSAGAR *et al.*, 2005).

A reação tecidual, analisada através de microscopia óptica, provocada pelas formulações mostrou-se similar aos achados de MALINOVSKY *et al.* (1997), que avaliaram histologicamente o cordão espinhal de coelhos após sete dias da aplicação de bupivacaína a 0,5%, bupivacaína lipossomal a 0,5%, lipossomas vazios e solução de NaCl 0,9%. Apesar destas diferenças metodológicas, o presente estudo, mostrou que a aplicação de anestésico local encapsulado em lipossomas (MVC LUV 2%) não promoveu reação inflamatória mais intensa que a promovida pela injeção do mesmo anestésico livre (MVC 3%), de solução de NaCl 0,9% ou de lipossomas vazios. MALINOVSKY *et al.* (1997), diferentemente do presente estudo, não utilizaram nenhuma formulação com vasoconstritor.

As formulações que contêm vasoconstritores do tipo amina simpatomimética (epinefrina, norepinefrina, levonordefrina e fenilefrina) usualmente têm pH mais baixo, entre 3,5 e 5,5 (MEECHAN, 1999; USP, 1999). O objetivo do pH reduzido nestas soluções é retardar a oxidação do vasoconstritor, que é instável em pH fisiológico (MURAKAMI *et al.*, 1994). O pH das soluções utilizadas neste estudo foi aferido previamente a sua aplicação. A literatura relata efeitos adversos devido ao uso de soluções ácidas (com baixo pH), que vão desde uma leve ardência até a inflamação tecidual (SCHMIDT, 1976), causando invariavelmente desconforto ao paciente e dor durante a injeção, além de retardar o início da anestesia (OIKARINEN *et al.*, 1975; MURAKAMI *et al.*, 1994; MEECHAN, 1999, BURNS *et al.*, 2006). A maioria das soluções comerciais de anestésicos locais sem vasoconstritor tem pH entre 5,5 e 7, ou seja, mais próximos ao pH fisiológico.

Estes achados são compatíveis com os resultados do presente estudo, pois a formulação comercial de mepivacaína com epinefrina, a qual apresentava um pH baixo (3,84), promoveu a reação inflamatória mais intensa depois de 6 e 24 horas. Em contrapartida, as formulações lipossomais com pH mais próximos ao fisiológico, não promoveram reação inflamatória maior do que a simples punção da agulha ou do que a injeção de solução de NaCl 0,9%. A formulação comercial de mepivacaína a 3%, a qual mostrou um pH maior que a formulação com epinefrina e menor do que aquele das outras formulações testadas, foi capaz de promover reação inflamatória maior que a punção da agulha e maior que a injeção de solução de NaCl 0,9%. Assim, o pH baixo e a maior concentração do sal anestésico podem ter influenciado a resposta inflamatória.

Entretanto, quatro dias após os tratamentos, todos os grupos, exceto o grupo MVC 2% com epinefrina, não mostraram sinais de inflamação significativos, indicando que houve cicatrização. Estes resultados reforçam a idéia da segurança do uso de formulações com anestésicos encapsulados em lipossomas, uma vez que estas formulações promoveram inflamação de mesma intensidade que aquela provocada pela injeção de solução de NaCl 0,9% e pela punção da agulha.

RIBEIRO *et al.* (2003) avaliaram reações teciduais provocadas por vários anestésicos locais comerciais (lidocaína 2%, bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:100.000, mepivacaína 2% e articaína 4% ambas com epinefrina 1:100.000) utilizando solução de cloreto de sódio 0.9% como controle. Estes autores utilizaram tubos de polietileno com anestésicos locais no seu interior implantados na região dorsal de ratos subcutaneamente. Segundo os mesmos, esta técnica permitiria um contato mais prolongado dos anestésicos locais com os tecidos e também favoreceria a localização da área estudada microscopicamente. De maneira diferente, o presente estudo utilizou a injeção na mucosa oral de ratos na região de primeiro molar da maxila. Este local foi escolhido, pois além de simular possíveis reações que ocorreriam em um local comumente utilizado para injeção em seres humanos,

também permitiu utilizar o dente molar como ponto de referência para obtenção das lâminas histológicas.

Assim como o presente estudo, RIBEIRO *et al.* (2003) também observaram a capacidade de soluções de anestésicos locais provocarem reações inflamatórias. Os resultados obtidos por estes autores mostraram que as soluções de mepivacaína e articaína promoveram inflamação menos intensa que a de bupivacaína, e a solução de lidocaína sem vasoconstritor promoveu menor inflamação que o soro utilizado como controle. Os autores atribuem estes resultados às características farmacológicas da lidocaína que possui efeito vasodilatador, o que provocaria absorção e eliminação mais rápidas do local de aplicação.

No presente estudo, as soluções de mepivacaína comercial com epinefrina também provocaram inflamação mais intensa que a injeção de solução de NaCl 0,9%, utilizada como controle. Porém, a solução de mepivacaína, mesmo sem vasoconstritor, provocou inflamação mais intensa que o seu controle, este resultado pode ser diferente do observado pelos autores, pois este anestésico possui uma menor propriedade vasodilatadora.

Os resultados da avaliação histológica da mucosa oral mostraram que a encapsulação da mepivacaína em lipossomas protegeu o tecido contra reação inflamatória local, pois o dano tecidual maior foi o provocado pelas formas não encapsuladas deste anestésico.

A determinação da concentração de fármacos nos fluídos biológicos fornece informações fundamentais durante o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas (ALTUN *et al.*, 2004), como as preparações lipossomais de anestésicos locais. Além disso, a determinação de parâmetros farmacocinéticos é fundamental para a prática clínica (ADAMS *et al.*, 1989). Embora existam vários métodos para quantificação de fármacos, a cromatografia líquida com espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) é considerada a técnica de escolha para análise em fluídos biológicos (COBB &

ANDERSSON, 2005). O sistema CLAE-EM/EM, que foi utilizado neste estudo, é uma das ferramentas analíticas mais utilizadas para determinação dos parâmetros farmacocinéticos de uma droga, mostrando-se altamente preciso e confiável (KORFMACHER, 2005).

Não existem relatos prévios comparando a absorção de anestésicos locais livres e encapsulados em lipossomas após a injeção intra-oral destas formulações. Vários estudos avaliaram a absorção de anestésicos locais encapsulados em lipossomas após a injeção: epidural em cães (MASHIMO *et al.*, 1992), intra-articular em coelhos (HOU & YU, 1997), subcutânea em ratos (YU *et al.*, 2002) e durante o bloqueio axilar em coelhos (BOOGAERTS *et al.*, 1993). Apesar destas diferenças metodológicas, os resultados obtidos no presente estudo são compatíveis com os resultados obtidos por estes autores.

HOU & YU (1997) avaliaram a farmacocinética da lidocaína aquosa e lipossomal após a injeção intra-articular no joelho de coelhos. Estes autores observaram uma menor absorção sistêmica da droga lipossomal quando comparada com a lidocaína sem vasoconstritor, assim como no presente estudo. Este fenômeno pode ter ocorrido devido à lenta liberação do anestésico pelos lipossomas o que diminui a sua velocidade de absorção.

BOOGAERTS *et al.* (1993) compararam as concentrações plasmáticas de bupivacaína obtidas depois da administração de bupivacaína livre ou complexada com lipossomas multilamelares durante o bloqueio axilar em coelhos. Os animais que receberam bupivacaína lipossomal apresentaram níveis plasmáticos mais baixos nos primeiros 10 minutos e mais altos depois de 24 horas, o que mostra a liberação lenta do anestésico responsável pelo aumento na sua duração de ação. No presente estudo, o anestésico foi analisado por 420 minutos, pois não foi possível prolongar o tempo de coleta de sangue devido ao volume de sangue coletado em cada tempo (0,4 mL). Porém, a análise mostrou que os níveis plasmáticos obtidos com a solução

aquosa de mepivacaína foram maiores que os obtidos com a formulação lipossomal, resultado semelhante ao obtido por BOOGAERTS *et al.* (1993).

MASHIMO *et al.* (1992) estudaram a farmacocinética da lidocaína livre e encapsulada em cães após a administração epidural. As áreas sob a curva (AUC) e o T_{max} foram maiores nos animais que receberam lidocaína encapsulada, ao contrário do presente estudo, que observou parâmetros menores para formulação lipossomal quando comparada com a formulação livre de anestésico local. Diferenças metodológicas poderiam explicar estes resultados distintos. O presente estudo utilizou formulações de mepivacaína com concentrações distintas e com a adição de vasoconstritor, pois as formulações comerciais à base de mepivacaína deste estudo são as mesmas utilizadas na clinica odontológica. Além disso, as diferentes vias de administração podem ter contribuído para estas diferenças. De acordo com MASHIMO *et al.* (1992), a encapsulação de anestésicos promove maiores níveis plasmáticos, o que sugere que o prolongamento da anestesia é causado pela liberação lenta da droga dos lipossomas e não pela redução da fração de droga absorvida, diferentemente da adição de vasoconstritores. No presente estudo, a C_{max} atingida após a injeção de MVC LUV foi similar à obtida após a injeção de MVC 2% EPI, o que mostra que a encapsulação do anestésico em lipossomas foi equivalente a adição de um vasoconstritor, pois ambas as formas apresentaram uma menor fração de droga absorvida.

YU HY *et al.* (2002) estudaram a farmacocinética de bupivacaína livre e lipossomal após a injeção destas formulações na base da cauda de ratos. Neste estudo, os animais tiveram sangue coletado de uma em uma hora por 480 minutos. Estes autores observaram uma C_{max} cinco vezes maior para o anestésico não encapsulado. No presente estudo, o C_{max} obtido após a injeção de MVC 3% foi cerca de sete vezes maior que o obtido após a injeção de MVC LUV. Assim como no presente estudo, YU HY *et al.* (2002), obtiveram AUC menores para a formulação lipossomal. A área sob a curva (AUC_{0-t}) da formulação lipossomal foi menos da

metade da obtida após a injeção de MVC 3%, provavelmente esta grande diferença ocorreu não só pela encapsulação do anestésico, mas também pelas diferentes concentrações de mepivacaína destas formulações. Diferentemente dos achados de YU HY et al. (2002), as diferentes formulações de anestésicos apresentaram T_{max} distintos, sendo o maior o da formulação lipossomal. Apesar das diferenças metodológicas, os resultados obtidos no presente estudo são similares aos obtidos por YU HY et al. (2002), pois a preparação lipossomal de anestésico manteve um nível plasmático constante quando comparada à solução de anestésico comum não encapsulado e sem vasoconstritor.

Os resultados obtidos no presente estudo e a eficácia anestésica já comprovada destas formulações lipossomais de mepivacaína (ARAUJO *et al.*, 2004; CEREDA *et al.*, 2006), apontam para um uso promissor destas formulações. Apesar dos benefícios já comprovados e dos esforços em pesquisas de desenvolvimento de formulações lipossomais, o uso clínico destas formulações ainda é limitado. Este fato pode ser explicado pelo alto custo da produção em larga escala e pela instabilidade física e química dos lipossomas (MOZAFARI, 2005). Preparações aquosas de lipossomas não têm estabilidade adequada, pois nestas preparações ocorre agregação, peroxidação e hidrólise de lipídios (ALEXPOULOU *et al.*, 2006). Novos métodos, como a liofilização dos lipossomas, vêm sendo desenvolvidos para minimizar a instabilidade e possibilitar a produção e o uso de formulações lipossomais em grande escala.

7. CONCLUSÃO:

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que a encapsulação de mepivacaína em lipossomas:

1) não proporcionou reação inflamatória local significativa, pois o dano tecidual maior foi o provocado pelas formas não encapsuladas deste anestésico.

2) mostrou um padrão de absorção semelhante à adição de vasoconstritor ao anestésico local, pois os níveis plasmáticos obtidos após a injeção da formulação lipossomal e daquela com vasoconstritor foram próximos.

8. REFERÊNCIAS*:

1. Alexopoulou E, Georgopoulos A, Kagkadis KA, Demetzos C Preparation and characterization of lyophilized liposomes with incorporated quercetin. *J Liposome Res.* 2006; 16(1):17-25.
2. Andrade ED. *Terapêutica Medicamentosa em Odontologia.* São Paulo: Artes Médicas; 1999.
3. Araújo DR. Tese de mestrado – Formulações de liberação controlada com anestésicos locais - bupivacaína e mepivacaína: preparação, caracterização e ensaios farmacológicos. [dissertação] Campinas: UNICAMP/IB; 2002.
4. Araújo DR, Pinto LMA, Braga AFA, de Paula E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: Aplicações Terapêuticas. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2003; 53(5): 653-661.
5. Araújo DR, Cereda CMS, Brunetto GB, Pinto LMA, Santana MHA, de Paula E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. *Can J Anesth.* 2004; 51: 566-572.
6. Banerjee R. Liposomes: applications in medicine. *J Biomater Appl.* 2001; 16(1):3-21.
7. Beloeil H, Ababneh Z, Chung R, Zurakowski D, Mulkern RV, Berde CB. Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (Part 1): hyperalgesia, edema, and systemic cytokines. *Anesthesiology.* 2006; 105(1):128-38.
8. Bennett CR. *MONHEIM. Anestesia local e controle da dor na prática dentária.* 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1989.

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

9. Bileviciute-Ljungar I, Lundeberg T. Contralateral but not systemic administration of bupivacaine reduces acute inflammation in the rat hindpaw. *Somatosens Mot Res.* 2000; 17(3):285-93.
10. Boogaerts JG *et al.* Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison of plain solutions. *Anesth Analg.* 1993; 76:553-555, a.
11. Boogaerts JG *et al.* Plasma concentration of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome associated and pain solutions to rabbits. *Can J. Anesth.* 1993; 40:1201-1204, b.
12. Boogaerts JG *et al.* Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. *J Clin Anesth.* 1994; 6(4):315-20.
13. Bourne DWA. *Mathematical modeling of pharmacokinetic data.* Lancaster: Technomic Publishing AG; 1995.
14. Bucalo BD, Mirikitani EJ, Moy RL. Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine, and EMLA using 30-minute application time. *Dermatol Surg.* 1998; 24(5):537-41.
15. Butterworth JF4th, Strichartz GR. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology.* 1990; 72(4): 711-34.
16. Buritova J, Fletcher D, Honore P, Besson JM. Effects of local anaesthetics on carrageenan-evoked inflammatory nociceptive processing in the rat. *Br J Anaesth.* 1996; 77(5):645-52.
17. Burns CA, Ferris G, Feng C, Cooper JZ, Brown MD. Decreasing the pain of local anesthesia: a prospective, double-blind comparison of buffered, premixed 1% lidocaine with epinephrine versus 1% lidocaine freshly mixed with epinephrine. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 54(1):128-31.
18. Campos MM, Calixto JB. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br J Pharmacol.* 1995; 114: 1005-13.

19. Cassidy JP, Phero JC, Grau WH. Epinephrine: systemic effects and varying concentrations in local anesthesia. *Anesth Prog.* 1986; 33(6):289-297.
20. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006; 50(3):265-82.
21. Cereda CMS, Brunetto GB, de Araujo DR, de Paula E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration: [Des preparacions liposomiques de prilocaine, de lidocaine et de mepivacaine prolongent la duree de l'analgesie]. *Can J Anaesth.* 2006; 53(11):1092-7.
22. Cereda CMS, Tofoli GR, Paschoal MA, Fraceto LF, Araujo DR, Paula E. Liposomal prilocaine formulation: sterility, stability and local toxicity evaluation . In: *CSPS 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, J Pharm Pharmaceut Sci.* 2006; 9(2).
23. Covino BG, Giddon DB. Pharmacology of local anesthetic agents. *J Dent Res.* 1981; 60(8): 1454-9.
24. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(12):1023-35.
25. Duhgaonkar SP, Tandan SK, Bhat AS, Jadhav SH, Kumar D. Synergistic anti-inflammatory interaction between meloxicam and aminoguanidine hydrochloride in carrageenan-induced acute inflammation in rats. *Life Sci.* 2006; 78(10):1044-1048.
26. Eichenfield LF, Funk A, Fallon-Friedlander S, Cunningham BB. A clinical study to evaluate the efficacy of ELA-Max (4% liposomal lidocaine) as compared with eutectic mixture of local anesthetics cream for pain reduction of venipuncture in children. *Pediatrics.* 2002; 109(6):1093-9.
27. Estebe JP, Gentili ME, Le Corre P, Le Verge R, Moulinoux JP, Ecoffey C. Sciatic nerve block with bupivacaine-loaded microspheres prevents hyperalgesia in an inflammatory animal model. *Can J Anaesth.* 2002; 49(7):690-3

28. Fernandes ES *et al.* Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of Kinin B1 receptors in the rat paw. *Br J Pharmacol.* 2003; 139: 973-981
29. Fisher R, Hung O, Mezei M, Stewart R. Topical anaesthesia of intact skin: liposome-encapsulated tetracaine vs EMLA. *Br J Anaesth.* 1998; 81(6):972-3
30. Foldvari M. In vitro cutaneous and percutaneous delivery and in vivo efficacy of tetracaine from liposomal and conventional vehicles. *Pharm Res.* 1994; 11 (11): 1593-98.
31. Fraceto LF *et al.* Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys Chem.* 2002; 6(99):229-43.
32. Francischi JN *et al.* Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *Br J Pharmacol.* 2002; 137(6): 837-844
33. Friedman PM. Comparative study of the efficacy of four topical anesthetics. *Dermatol Surg.*1999; 25 (12): 950-4.
34. Gesztes A, Mezei M. Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine. *Anesth Analg.* 1988; 67: 1079-1081.
35. Gillette MA, Mani DR, Carr SA. Place of pattern in proteomic biomarker discovery. *J Proteome Res.* 2005; 4(4):1143-54.
36. Goulart AC, Correia FA, Sousa SC, Luz JG. Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. *Pesqui Odontol Bras.* 2005; 19(2):99-105.
37. Graf BM. The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1(3):207-14.
38. Grant GJ, Vermeulen K, Langerman L, Zakowski M, Turndorf H. Prolonged analgesia with liposomal bupivacaine in a mouse model. *Reg Anesth.* 1994; 19(4):264-9

39. Grant GJ, Bansinath M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med.* 2001; 26: 61-63.
40. Grant GJ, Piskoun B, Bansinath M. Analgesic duration and kinetics of liposomal bupivacaine after subcutaneous injection in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003; 30(12):966-8.
41. Grant GJ, Barenholz Y, Bolotin EM, Bansinath M, Turndorf H, Piskoun B, Davidson EM. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiology.* 2004; 101(1):133-7.
42. Gregoriadis G, Florence AT. Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs.* 1993; 45:15-28.
43. Groban L. Central nervous system and cardiac effects from long-acting amide local anesthetic toxicity in the intact animal model. *Reg Anesth Pain Med.* 2003;28(1):3-11.
44. Hayashi I, Ishihara K, Kumagai Y, Majima M. Proinflammatory characteristics of a nonpeptide bradykinin mimic, FR190997, in vivo. *Br J Pharmacol* 2001; 133(8):1296-306.
45. Hoffman BD, Lefkowitz RJ. Catecolaminas, drogas simpatomiméticas e antagonistas dos receptores adrenérgicos. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. G. *Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica.* 9 ed. México- DF:Mcgraw-Hill Interamericana Editores, 1996.cap.60,p.1103-1125.
46. Hou SM, Yu HY. Comparison of systemic absorption of aqueous and liposomal lidocaine following intra-articular injection in rabbits. *J Formos Med Assoc.* 1997; 96(2):141-3.
47. Korfmacher WA. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today.* 2005; 10(20):1357-67.
48. Kshirsagar NA, Pandya SK, Kirodian BG, Sanath S. Liposomal drug delivery system from laboratory to clinic. *J Postgrad Med* 2005;51:5-15

49. Kuzma PJ *et al.* Progress in the development of ultra- long-acting local anesthetics. *Reg Anesth.* 1997; 22: 543-551.
50. Langerman L, Grant GJ, Zakowski M, Golomb E, Ramanathan S, Turndorf H. Prolongation of epidural anesthesia using a lipid drug carrier with procaine, lidocaine, and tetracaine. *Anesth Analg.* 1992;75(6):900-5
51. Lafont ND, Boogaerts JG, Legros MD. Use of liposome associated bupivacaine for the management of a chronic pain syndrome. *Anesth Analg.* 1994; 79(4): 818.
52. Lafont ND, Legros MD, Boogaerts JG. Use of liposome associated bupivacaine in a cancer pain syndrome. *Anaesthesia.* 1996;51(6): 578-579.
53. Leduc C, Gentili ME, Estebe JP, Le Corre P, Moulinoux JP, Ecoffey C. The effect of local anesthetics and amitriptyline on peroxidation in vivo in an inflammatory rat model: preliminary reports. *Anesth Analg.* 2002; 95(4):992-6.
54. Lipp M, Dick W, Daublander M, Fuder H, Stanton-Hicks M. Exogenous and endogenous plasma levels of epinephrine during dental treatment under local anesthesia. *Reg Anesth.* 1993; 18(1):6-12.
55. Little JW, Falace DA, Miller CS, Rhodus NL: Hypertension. In: Little JW, Falace DA, Miller CS, Rhodus NL, eds: *Dental Management of medically compromised patient.* 5th ed. St Louis Mosby, p.176-196,1997.
56. Malamed SF. *Manual de anestesia local.* 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
57. Malinovsky JM *et al.* Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. *Anesth Analg.* 1997; 85(6):1331-6.
58. Mashimo T *et al.* Prolongation of canine epidural anesthesia by liposome encapsulation of lidocaine. *Anesth Analg.* 1992; 74(6):827-34
59. McLure HA, Rubin AP. Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol.* 2005; 71(3):59-74.

60. Meechan JG, Jastak JT, Donaldson D. The use of epinephrine in dentistry. *J Can Dent Assoc.* 1994; 60(9):825-8; 831-4.
61. Meechan JG. Bespoke Analgesia for the young, the old and the unfit. *The London International Symposium on Local Analgesia in Dentistry.* 1999: 14-16.
62. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol.* 2003; 225:115-21.
63. Mowat JJ, Mok MJ, MacLeod BA, Madden TD. Liposomal bupivacaine. Extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient. *Anesthesiology.* 1996; 85(3):635-43
64. Mozafari MR. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell Mol Biol Lett.* 2005; 10(4):711-9.
65. Murakami CS, Odland PB, Ross BK. Buffered local anesthetics and epinephrine degradation. *J Dermatol Surg Oncol.* 1994; 20(3):192-5.
66. Nestor MS. Safety of occluded 4% liposomal lidocaine cream. *J Drugs Dermatol.* 2006; 5(7):618-20.
67. Oikarinen VJ, Ylipaavalniemi P, Evers H. Pain and temperature sensations related to local analgesia. *Int J Oral Surg.* 1975; 4(4):151-6.
68. Parnham MJ, Wetzig H. Toxicity screening of liposomes. *Chem Phys Lipids.* 1993; 64(1): 263-74.
69. Pearson AC, Labovitz AJ, Kern MJ. Accelerated hypertension complicated by myocardial infarction after use of a local anesthetic/vasoconstrictor preparation. *Am Heart J.* 1987; 114(3):662-3.
70. Pinto LM, Pereira R, de Paula E, de Nucci G, Santana MH, Donato JL. Influence of liposomal local anesthetics on platelet aggregation in vitro. *J Liposome Res.* 2004; 14(1-2):51-9.

71. Pipa-Vallejo A, Garcia-Pola-Vallejo MJ. Local anesthetics in dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004; 9(5):440-3; 438-40
72. Posadas I *et al*. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol*. 2004; 142(2):331-8.
73. Pourpak Z, Ahmadiani A, Alebouyeh M. Involvement of interleukin-1beta in systemic morphine effects on paw oedema in a mouse model of acute inflammation. *Scand J Immunol*. 2004; 59(3):273-7.
74. Ranade VV. Drug delivery systems. 1. site-specific drug delivery using liposomes as carriers. *J Clin Pharmacol*. 1989; 29(8):685-94.
75. Ranali J, Andrade ED, Volpato MC. Profilaxia, tratamento e controle do paciente com doença sistêmica ou que requer cuidados especiais. In: *Atualização na Clínica Odontológica*, Artes Médicas, São Paulo, 1996.
76. Ranali J. Terapêutica Medicamentosa. In: *Opinion Makers*. 1.ed., São Paulo. VM Comunicações, 2002, p.60-75.
77. Ribeiro PD Jr, Sanches MG, Okamoto T. Comparative analysis of tissue reactions to anesthetic solutions: histological analysis in subcutaneous tissue of rats. *Anesth Prog*. 2003; 50(4):169-80
78. Rose JS, Neal JM, Kopacz DJ. Extended-duration analgesia: update on microspheres and liposomes. *Reg Anesth Pain Med*. 2005; 30(3):275-85.
79. Schmidt K, Heller W, Schorer R. Studies on the stability of local anaesthetics containing EPIenaline. *Anaesthesist*. 1976; 25(7): 342-344.
80. Sharata HH, Katz KH. Liposomes. *Int J Dermatol*. 1996; 35(11): 761-769.
81. Shipper G, Teixeira FB, Arnold RR, Trope M. Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or resilon. *J Endod*. 2005; 31(2):91-6.
82. Singh R & Vyas, S.P. Topical liposomal system for localized and controlled drug delivery. *J Dermatol Sci.*, 1996; 13(2):107-11.

83. Sisk AL. Vasoconstrictors in local anesthesia for dentistry. *Anesth Prog.* 1993; 39(6):187-193.
84. Soares PCO. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares pré, trans e pós anestesia local em pacientes normotensos. [dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2002.
85. Stensrud G. et al. Toxicity of gamma irradiated liposomes. 1. In vitro interactions with blood components. *Int J Pharm.* 1999; 178 (1): 33-46.
86. Tofoli GR, Ramacciato JC, de Oliveira PC, Volpato MC, Groppo FC, Ranali J. Comparison of effectiveness of 4% articaine associated with 1: 100,000 or 1: 200,000 epinephrine in inferior alveolar nerve block. *Anesth Prog.* 2003; 50(4):164-8.
87. Tomlin PJ. Death in outpatient dental anaesthetic practice. *Anaesthesia* 1974;29 (5):551-570.
88. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev. Drug-Discovery* 2005; 4: 145-160.
89. Ullman MD, Bowers LD, Burtis CA. Cromatografia. In: Burtis CA, Ashwood ER Tietz Fundamentos de química clínica. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap.8, p.103-120.
90. Umbrain V *et al.* Biodistribution of liposomes after extradural administration in rodents. *Br J Anaesth.* 1995; 75(3):311-8.
91. United States Pharmacopeia XXII. The national formulary XVII, Rockville, 1995.
92. Vandermeulen E. Pain perception, mechanisms of action of local anesthetics and possible causes of failure. *Rev Belge Med Dent.* 2000; 55(1):29-40.
93. Viscusi ER. Liposomal drug delivery for postoperative pain management. *Reg Anesth Pain Med.* 2005;30(5):491-6

94. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Proceedings of Society for Biology and Medicine*, 1962; 3: 544-546
95. Yagiela JA. Adverse drug reactions in dental practice: interactions associated with vasoconstrictors. *J Am Dent Assoc* 1999; 130(5):701-709.
96. Yoshihara E, Nakae T. Cytolytic activity of liposomes containing stearylamine. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 16 (854-1): 93-101.
97. Yu HY, Li SD, Sun P. Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2002; 54(9):1221-1227.

9. Anexos:



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 816-1, sobre "FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DO ANESTÉSICO LOCAL PRILOCAÍNA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E TESTES BIOLÓGICOS" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula/Cintia Maria Saia Cereda 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)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de maio de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 816-1, entitled "CONTROLLED RELEASE OF THE LOCAL ANESTHETIC PRILOCAINE FORMULATIONS: PREPARATION, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL TESTS", 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 May 4, 2005.

Campinas, 04 de maio de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

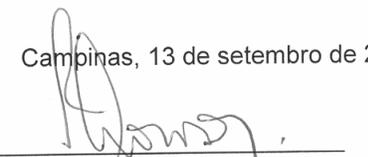
Certificamos que o Protocolo nº 871-1, sobre "FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ANESTÉSICOS LOCAIS: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, TESTES DE ATIVIDADE ANESTÉSICA E ESTUDO HISTOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA TOXIDADE LOCAL" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula / Cíntia Maria Saia Cereda / Giovana Randomille Tófoli 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)-IB-UNICAMP em reunião de 13 de setembro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 871-1, entitled "CONTROLLED RELEASE FORMULATIONS OF LOCAL ANESTHETICS: PREPARATION, CHARACTERIZATION, LOCAL ANESTHETIC ACTIVITY TESTS, AND LOCAL TOXICITY EVALUATION BY HISTOLOGICAL STUDY", 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 13, 2005.

Campinas, 13 de setembro de 2005.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guardab
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP


Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

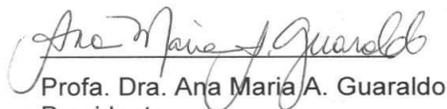
Certificamos que o Protocolo nº 1067-1, sobre "FORMULAÇÕES DA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ANESTÉSICOS LOCAIS: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA APÓS INJEÇÃO INTRA-ORAL", sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Ranali / Giovana Radomille Tofoli, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 31 de julho de 2006.

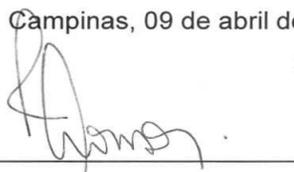
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1067-1, entitled "CONTROLLED RELEASE FORMULATIONS OF LOCAL ANESTHESICS: DETERMINATION OF PLASMA CONCENTRATION AFTER INTRA ORAL INJECTION", 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 July 31, 2006.

Campinas, 09 de abril de 2007.

2ª. VIA


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva