

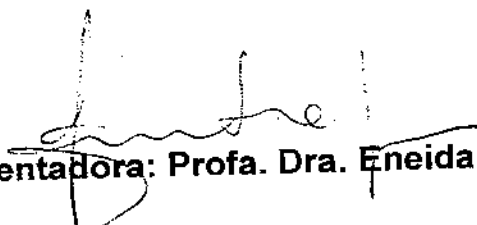
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FERNANDA DEL GROSSI FERRAZ CARVALHO

“ AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE UMA PRÉ-  
FORMULAÇÃO DE ROPIVACAÍNA EM HIDROXIPROPIL-  
BETA-CICLODEXTRINA PRODUZIDA EM PROCESSO  
ESCALONÁVEL ”

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biologia para obtenção  
do Título de Mestre em Biologia  
Funcional e Molecular, na área de  
Bioquímica.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
FERNANDA DEL GROSSI FERRAZ  
CARVALHO  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

  
Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

Campinas, 2007

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
CEAR LATTES  
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

UNIDADE BC

Nº CHAMADA:

T/UNICAMP C2530u

V. \_\_\_\_\_ EX. \_\_\_\_\_

TOMBO BCCL 73856

PROC 16.145-07

C \_\_\_\_\_ D \_\_\_\_\_

PREÇO 11,00

DATA 28.8.07

BIB-ID 424144

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP /

C2530<sup>u</sup>

Carvalho, Fernanda Del Grossi Ferraz  
Avaliação biológica de uma pré-formulação de Ropivacaína em Hidroxipropil-beta-ciclodextrina produzida em processo escalonável / Fernanda Del Grossi Ferraz Carvalho. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Eneida de Paula.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

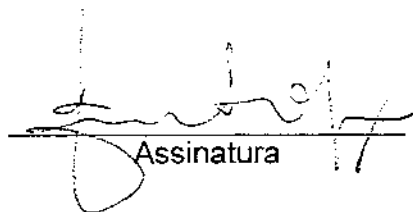
1. Anestesia local. 2. Ciclodextrinas. 3. Ropivacaína.  
I. Paula, Eneida de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Biological evaluation of a Ropivacaine formulation in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin prepared in a scaled up process.  
**Palavras-chave em inglês:** Local anesthesia; Cyclodextrins; Ropivacaine.  
**Área de concentração:** Bioquímica.  
**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.  
**Banca examinadora:** Eneida de Paula, Francisco Benedito Teixeira Pessine, Adriana Raffin Pohimann.  
**Data da defesa:** 26/02/2007.  
**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

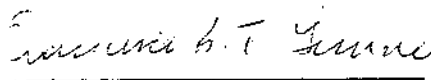
Campinas, 26 de fevereiro de 2007

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Eneida de Paula (Orientadora)**

  
Assinatura

**Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine**

  
Assinatura

**Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann**

  
Assinatura

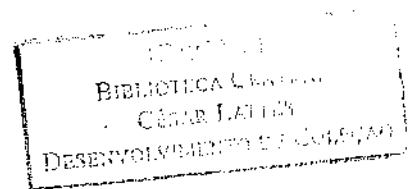
**Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero**

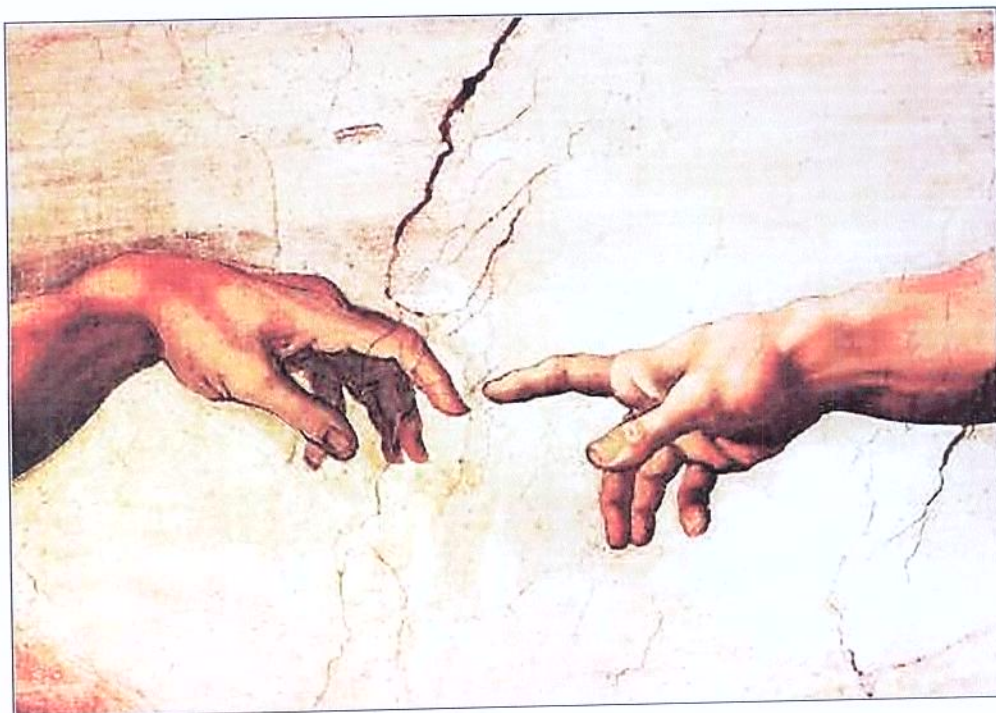
\_\_\_\_\_  
Assinatura

**Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo**

\_\_\_\_\_  
Assinatura

2007-04-11 09





**Detalhe da obra “A Criação do Homem”, de Michelangelo.**

**Agradeço a Deus, por tornar tudo possível, e por dar sentido a todas as coisas....**

*"Há coisas que um bom espírito não estuda, mas as que ele estudar não devem ser abandonadas antes que ele as conheça bem. Há coisas sobre as quais ele não medita, mas se o faz não as abandona sem lhes encontrar explicação. Há coisas sobre as quais ele não as interroga, mas se o faz não as abandona sem antes as haver compreendido. Há coisas que ele não procura distinguir, mas as que ele quer distinguir não as abandona sem que lhes tenha fixado a diferença" (Confúcio)*

**Aos meus pais, Heloisa e Walter.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Heloisa e Walter**, por todo o amor, paciência e dedicação; pela ajuda incondicional, em todos os sentidos;

À minha avó, **Margarida**, por ter contribuído sempre na minha caminhada;

À **Flávia** (Dra. Flávia de Jesus), por me ajudar nos primeiros passos para a escolha do Mestrado;

À Universidade Estadual de Campinas, **UNICAMP**, pela estrutura de Ensino e Pesquisa;

À Dra. **Eneida de Paula**, pela competência e orientação do trabalho;

A todos do **Departamento de Bioquímica** do Instituto de Biologia, alunos e funcionários, pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho;

Às secretárias **Andréia Vigilato e Marina Andresa**, pela eficiência, amizade, paciência e bom humor;

À **Capes**, pela ajuda financeira;

À **Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda**, por ceder fármacos e equipamentos;

Aos Drs. **Sérgio Antônio Fernandes e Leonardo Fraceto**, pela colaboração com os experimentos de RMN;

À Dra. **Giuliana Piovesan Alves** pelo auxílio no escalonamento do processo de obtenção do Complexo;

À Dra. **Andréa Grabbe Guimarães**, pela colaboração com os ensaios de cardiotoxicidade;

Aos Drs. **Miguel A. Areas** e **Jayme Contes**, pelo auxílio na interpretação dos eletrocardiogramas;

Aos Drs. **Francisco Pessine**, **Maria Helena Andrade Santana** e **Leonardo Fraceto**, membros da banca do exame de Qualificação, pela contribuição ao trabalho;

À **Ana Cláudia Pedreira**, pelo auxílio na Técnica do Bloqueio do Nervo Infraorbital;

Ao **Laboratório de Biomembranas** e “agregados”, por tornarem os meus dias sempre especiais:

- ❖ Gi (Giovana Brunetto), por ser minha amiga “de coração” e de todos os dias, que nunca me deixou só, muito menos para comer um doce (rs)...
- ❖ Cíntia (Cíntia Cereda), por ser a “mãe” do “lab”... sempre presente e alegre...
- ❖ Gi (Giovana Tófoli), por ser minha amiga “chic”, que me ensinou a ser uma pessoa mais elegante...
- ❖ Ana Cláudia (Ana Cláudia Pedreira), pelas longas conversas...
- ❖ Dani (Dra. Daniele Araújo), pela amizade e por toda a ajuda, desde o começo...
- ❖ Bispo (Marcelo Bispo), por todo o “suporte técnico” com os computadores, e por sempre querer saber “se eu estava nervosa”...
- ❖ Cleyton (Cleyton Domingues), por ser a alegria do “lab”, grande compositor, cantor e animador de nossas tardes;

- ❖ André (André Rotolo), por sempre “levantar” minha auto-estima e me fazer sentir a mulher mais linda do mundo (rs)...
- ❖ Paulinho (Paulo Castilho), por todo o charme, alegria e abraços...
- ❖ Josi (Josiane Ferreira), por toda a meiguice...
- ❖ Beth (Elizabeth Cunha), por ser a “Bethhhh”, sempre sincera e pronta a ajudar...
- ❖ Carol (Carolina Moraes), por ter me ajudado sempre que precisei...
- ❖ Márcio (Márcio Paschoal), por manter tudo em ordem e ajudar a todos...
- ❖ Maribel (Maribel C. da Silva), por me ajudar sempre...
- ❖ D. Cidinha (Maria Aparecida Martins), por cuidar de tudo com carinho, pelo cafezinhoquentinho e por tratar tão bem de nossos ratinhos...
- ❖ Ao Neto (João B. Fabrin Neto) e Paulinho (Paulo Baldasso), por serem sempre solícitos...
- ❖ A Ju (Juliana Matoso), por ser minha “terapeuta” e confidente de todos os dias....

À **Dani**, (Daniela Melo), minha companheira de viagens;

Ao **Márcio**, (Pe. Márcio Fernandes), por sempre me incentivar e me ouvir;

Ao **Marco Aurélio**, (Dr. Marco Aurélio Galletta), por toda ajuda e paciência, por se fazer sempre presente com amor e ternura; por ser tão importante para a minha vida, minha alma e meu coração.



## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xvi
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xx

### I. INTRODUÇÃO

1.1. Anestésicos Locais.....	1
1.1.1. Mecanismo de ação.....	5
1.1.2. Toxicidade dos Anestésicos Locais.....	6
1.1.2.1. Toxicidade ao Sistema Nervoso Central.....	7
1.1.2.2. Toxicidade ao Sistema Cardiovascular.....	7
1.1.2.3. Toxicidade Local.....	9
1.1.3. Ropivacaína.....	10
1.2. Ciclodextrinas.....	14
1.2.1. HP- $\beta$ -CD: Avaliação da Toxicidade.....	17
1.2.2. HP- $\beta$ -CD: Perfil Farmacocinético.....	19
1.3. Complexação de Anestésicos locais em ciclodextrinas.....	20

II. OBJETIVOS.....	24
--------------------	----

### III. MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. Reagentes.....	25
3.2. Equipamentos.....	25
3.3. Animais.....	25

3.4. Determinação da estequiometria do Complexo por Absorbância.....	26
3.5. Preparo do Complexo.....	27
3.5.1. Secagem por atomização.....	27
3.6. Caracterização da Complexação.....	28
3.6.1. Calorimetria Diferencial de Varredura.....	28
3.6.2. Difração de Raios-X.....	29
3.6.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear.....	30
3.6.3.1. Titulação por RMN.....	30
3.6.3.2. Efeito Overhauser Nuclear.....	31
3.7. Testes <i>in vivo</i> .....	33
3.7.1. Avaliação do Bloqueio do nervo infraorbital em ratos.....	33
3.7.2. Avaliação da toxicidade cardíaca.....	35
3.7.2.1. Avaliação do Eletrocardiograma.....	35
3.7.2.2. Noções de eletrofisiologia cardíaca.....	39
3.8. Análise Estatística.....	42

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da estequiometria do Complexo por absorbância.....	43
4.2. Caracterização da Complexação.....	44
4.2.1. Calorimetria Diferencial de Varredura.....	44
4.2.2. Difração de Raios-X.....	47
4.2.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear.....	50
4.2.3.1. Titulação por RMN.....	50
4.2.3.2. Efeito Overhauser Nuclear.....	51
4.3. Testes <i>in vivo</i> .....	55
4.3.1. Avaliação do Bloqueio do nervo infraorbital em ratos.....	55
4.3.2. Avaliação da toxicidade cardíaca.....	59
4.3.2.1. Traçados Eletrocardiográficos.....	59
4.3.2.2. Avaliação do tempo de Injeção.....	67

V.CONCLUSÕES.....	81
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS.....	96

## Lista de Figuras

Figura 1. Anestésico local típico. A. Tipo éster. B. Tipo amida.....	1
Figura 2. Fórmula estrutural da S-Ropivacaina, na forma de cloridrato.....	11
Figura 3. Representação esquemática da $\beta$ -CD, mostrando as hidroxilas primárias e secundárias.....	14
Figura 4. Estruturas Gerais das ciclodextrinas naturais, $\alpha$ -ciclodextrina, $\beta$ -ciclodextrina e $\gamma$ -ciclodextrina.....	15
Figura 5. Representação esquemática da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	17
Figura 6. Etapas do processo de Secagem por atomização.....	28
Figura 7. Titulação por RMN de $^1\text{H}$ : a) método com variação contínua de um dos componentes e b) método de Job.....	31
Figura 8. Representação esquemática da região do nervo infraorbital e local das injeções das formulações anestésicas em ratos.....	33
Figura 9. Registro Eletrocardiográfico normal.....	36
Figura 10. Esquema representativo do Triângulo de Eithoven.....	37
Figura 11. Foto do animal, após implantação dos eletrodos.....	38
Figura 12. Potencial de ação de uma célula miocárdica.....	40
Figura 13. Nódulo Sinusal e Sistema Purkinje do coração, mostrando o nódulo A-V, as vias internodais atriais e os ramos ventriculares do eixo A-V.....	41
Figura 14. Gráfico da Variação Contínua (Job Plot) do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD. por absorção no UV, a 25°C, em água.....	44
Figura 15. Termogramas de DSC de RVC, HP- $\beta$ -CD, Mistura Física RVC/HP- $\beta$ -CD e Complexo RVC:HP- $\beta$ -CD.....	45
Figura 16. Difratoogramas de Raios X de RVC, HP- $\beta$ -CD, Mistura Física RVC/HP- $\beta$ -CD e Complexo RVC:HP- $\beta$ -CD.....	49
Figura 17. Gráfico de variação contínua (Job plot) do complexo RVC : HP- $\beta$ -CD, por RMN, a 25°C, pH 7,4.....	51

Figura 18. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD (A). Efeito NOE após irradiação seletiva do anel aromático da RVC (B). No detalhe: representação esquemática dos hidrogênios da ciclodextrina.....	53
Figura 19. Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD (A). Efeito NOE após irradiação seletiva dos hidrogênios da metila orto-aromática da RVC (B).....	54
Figura 20. Representação esquemática da inserção proposta para a RVC na cavidade da HP- $\beta$ -CD, no complexo 1:1 formado.....	55
Figura 21. Teste de Bloqueio do nervo infraorbital.....	58
Figura 22. Perfil normal de ECG para ratos nesta metodologia empregada.....	68
Figura 23. Alterações cardíacas observadas segundos após a injeção para os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD: Perfil de Bloqueio de 2° grau.....	69
Figura 24. Alterações cardíacas observadas segundos após a injeção para os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD: Perfil de Bloqueio de 1° grau.....	70
Figura 25. Alterações cardíacas observadas segundos após a injeção para os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD: Perfil de Bloqueio de Ramo.....	70
Figura 26. Alterações cardíacas observadas segundos após a injeção para os grupos RVC: Perfil de Bloqueio Total.....	71

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Propriedades dos anestésicos locais.....	3
<b>Tabela 2.</b> Estrutura química de alguns anestésicos locais de uso clínico, aminoésteres (TTC, PRC) e aminoamidas (LDC, MVC, RVC, BVC).....	4
<b>Tabela 3.</b> Produtos comercializados em vários mercados mundiais, contendo ciclodextrinas naturais ( $\alpha$ , $\beta$ ), e modificadas (Metil- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD e HP- $\gamma$ -CD).....	23
<b>Tabela 4.</b> Valores de temperatura e variação e Entalpia ( $\Delta H$ ) dos picos observados nos termogramas de DSC para RVC, HP- $\beta$ -CD, mistura-física RVC/HP- $\beta$ -CD e complexo sólido RVC:HP- $\beta$ -CD, na razão molar de 1:1.....	46
<b>Tabela 5.</b> Tempo de recuperação e efeito total do bloqueio sensorial induzido pelas formulações de RVC livre e complexada RVC:HP- $\beta$ -CD, durante o bloqueio do nervo infraorbital em ratos.....	59
<b>Tabela 6.</b> Variação dos intervalos PR, QRS, RR, e da frequência cardíaca (FC) nos grupos Tampão, HP- $\beta$ -CD, RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD.....	64
<b>Tabela 7.</b> Variação dos Intervalos QT e QTc nos grupos Tampão, HP- $\beta$ -CD, RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD.....	65
<b>Tabela 8.</b> Variação da Pressão Sistólica (PAS) e Diastólica (PAD) nos grupos Tampão, HP- $\beta$ -CD, RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD.....	67
<b>Tabela 9.</b> Perfil de alterações cardíacas observadas em cada animal, segundos após a injeção de ropivacaina livre (RVC).....	73
<b>Tabela 10.</b> Perfil de alterações cardíacas observadas em cada animal, segundos após a injeção de ropivacaina complexada (RVC: HP- $\beta$ -CD).....	74
<b>Tabela 11.</b> Valores absolutos da largura do Pico da Onda Q (cm) do Complexo QRS segundos após a injeção de RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD.....	76
<b>Tabela 12.</b> Valores absolutos (s) e de variação (%) do intervalo RR, segundos após a injeção de RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD.....	78

**Tabela 13.** Valores absolutos (bpm) e de variação (%) da frequência cardíaca, segundos após a injeção de RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD.....79

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\alpha$ -CD. Alfa-ciclodextrina  
AL. Anestésico Local  
ASC. Área sob a Curva  
ATP. Adenosina tri-fosfato  
AMPc. Adenosina Monofosfato cíclica  
BAV. Bloqueio Átrio-ventricular  
BAVT. Bloqueio Átrio-ventricular Total  
 $\beta$ -CD. Beta-ciclodextrina  
bpm. Batimentos por minuto  
BVC. Bupivacaína  
CD. Ciclodextrina  
DSC. Calorimetria Diferencial de Varredura  
ECG. Eletrocardiograma  
 $\gamma$ -CD. Gama –Ciclodextrina  
FC. Frequência cardíaca  
HEPES. Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico  
HP- $\beta$ -CD. Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina  
Kc. Constante de associação fármaco/ciclodextrina  
LDC. Lidocaína  
MVC. Mepivacaína  
NOE. Efeito overhouser Nuclear  
PAS. Pressão arterial sistólica  
PAD. Pressão arterial diastólica  
PRC. Procaína  
RMN. Ressonância Magnética Nuclear  
RVC. Ropivacaína  
RVC/HP- $\beta$ -CD. Mistura Física de Ropivacaína e Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina  
RVC:HP- $\beta$ -CD. Complexo de Ropivacaína em Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina  
SCV. Sistema Cardiovascular



SNC. Sistema Nervoso Central

TTC. Tretacaína

UV/VIS. Ultravioleta/Visível

$V_{max}$ . Velocidade de despolarização máxima do potencial de ação cardíaco.

$\Delta H$ . Variação da Entalpia

$\lambda$ . Comprimento de onda

## RESUMO

Anestésicos locais de longa duração são mundialmente empregados, especialmente em procedimentos cirúrgicos. A Ropivacaina (RVC) é um novo anestésico, considerado de longa duração e que apresenta maior segurança em relação a efeitos adversos como toxicidade ao sistema cardiovascular. A veiculação de anestésicos locais em ciclodextrinas tem sido avaliada como uma maneira de prolongar o tempo de duração da anestesia e diminuir a toxicidade sistêmica destes fármacos. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos capazes de formar complexos de inclusão com moléculas "convidadas", em geral aumentando a solubilidade aquosa destas. Este trabalho descreve o preparo, a caracterização físico-química e a avaliação do efeito biológico de um complexo de inclusão entre a RVC e a hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD). O complexo foi preparado misturando-se quantidades apropriadas de HP- $\beta$ -CD e RVC, na proporção molar de 1:1, sob agitação em meio aquoso; após secagem em spray-dryer o complexo sólido foi ressuscendido em tampão Hepes 20 mM e NaCl 150 mM, pH 7,4. A estequiometria do complexo (1:1) foi determinada através do Método de Variação Contínua. A formação do complexo de inclusão foi confirmada pelas técnicas de Calorimetria Diferencial de Varredura, Raios-X e RMN. O efeito anestésico do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD (0,125%, 0,25 e 0,5%) foi avaliado em relação à RVC livre (comercial), em iguais concentrações através do teste de bloqueio do nervo infraorbital, em ratos. Os resultados mostraram aumento no efeito anestésico total (54,5%, 53,3% e 20,0%, respectivamente) e no tempo para recuperação (42,9%, 44,4% e 18,8%, respectivamente) pelo complexo em relação à RVC comercial. A cardiotoxicidade foi avaliada através de medidas de eletrocardiograma, em ratos. Os resultados mostraram que o complexo RVC:HP- $\beta$ -CD não aumentou o efeito tóxico da RVC livre, apesar de a complexação ter aumentado a quantidade de RVC solúvel em água e o efeito anestésico. Em conclusão: em animais, o complexo da RVC em HP- $\beta$ -CD mostrou-se uma formulação anestésica de longa duração promissora, possibilitando o uso de

doses sub-clínicas e com efeitos similares aos da RVC 0,5% ou ainda como alternativa ao uso da bupivacaína, o anestésico de escolha em bloqueios de longa duração, mas também o mais cardiotoxico. Estes resultados foram obtidos em escala prévia à escala piloto, mostrando que a produção do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD foi adequadamente escalonada para as etapas subseqüentes de desenvolvimento farmacêutico.

## ABSTRACT

Long-acting local anesthetics (LA) are worldwide used, mainly for surgical procedures. Ropivacaine (RVC) is a new, long-acting LA, with increased cardiovascular safety, in comparison to other anesthetics. The delivery of LA in carriers such as cyclodextrins has been investigated in order to increase the nonceptive action and to reduce the systemic toxicity of these compounds. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides with a somewhat lipophilic central cavity that is able to form inclusion complexes with guest molecules, increasing their water solubility. Here we report the preparation, physicochemical characterization and evaluation of the biological activity of an inclusion complex, formed between RVC and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-β-CD). The complex was obtained by mixing appropriate amounts of HP-β-CD and RVC (1:1, molar ratio) in water; the solution was spray-dried and the solid complexes were suspended in 20mM HEPES buffer with 150mM NaCl, pH 7.4. The 1:1 stoichiometry of the complex was determined through the Continuous Variation Method. Differential Scanning Calorimetry, X-Rays and the NMR analysis confirmed the formation of the inclusion complex. The anesthetic effect of the RVC:HP-β-CD complex (0,125%, 0,25 e 0,5%) was compared to that elicited by plain RVC solutions of equivalent concentrations, using the infraorbital nerve-blockade test in rats. The results show that the RVC:HP-β-CD complex improved both the total anesthetic effect (54.5%, 53.3% and 20.0%, respectively) and the time for recovery (42.9%, 44.4% and 18.8%, respectively), in comparison to RVC solutions. The cardiotoxicity was evaluated by electrocardiography, in rats. The results show no enhancement of the heart toxic effect of RVC under complexation, in spite of the increased amount of available (water soluble) RVC and improved anesthetic effect. *Ιν χονχλυσιον: ωε φουνδ ιν ρατο τηατ τηε P<sub>5</sub>X:HII-β-CD complex is a promising long-acting anesthetic formulation, allowing the use of sub-clinic doses that reach the same anesthetic effects of 0.5% RVC or even – at the therapeutic doses of 0.5% - to replace Bupivacaine, the drug-of-choice in long term anesthesia, but also the more toxic. Finally, these results were obtained in a scale*

previous the pilot scale and show the feasibility of the scale up procedure adopted, looking forward the technologic development of a pharmaceutical product.

# I. INTRODUÇÃO

## 1.1. ANESTÉSICOS LOCAIS

Os anestésicos locais (AL) são compostos químicos que evitam ou aliviam a dor, interrompendo a condução nervosa (Strichartz & Covino, 1993; Catterall & Mackie, 1996; McLure & Rubin, 2005). A atividade farmacológica envolve a inibição dos processos de excitação-condução das fibras nervosas (Covino, 1986). Em geral, os AL possuem um grupo amino (amina terciária), separado de um grupo aromático por uma cadeia intermediária, que pode ser um éster ou uma amida, de onde vem sua classificação como aminoésteres ou aminoamidas, respectivamente (Figura 1) (Narahashi et al., 1970, Covino, 1986; Strichartz & Covino, 1993, McLure & Rubin, 2005). A principal diferença entre ésteres e amidas está relacionada à estabilidade química. Os ésteres são facilmente hidrolisados pela colinesterase plasmática enquanto as amidas sofrem degradação enzimática hepática, sendo muito mais estáveis (Covino, 1986).

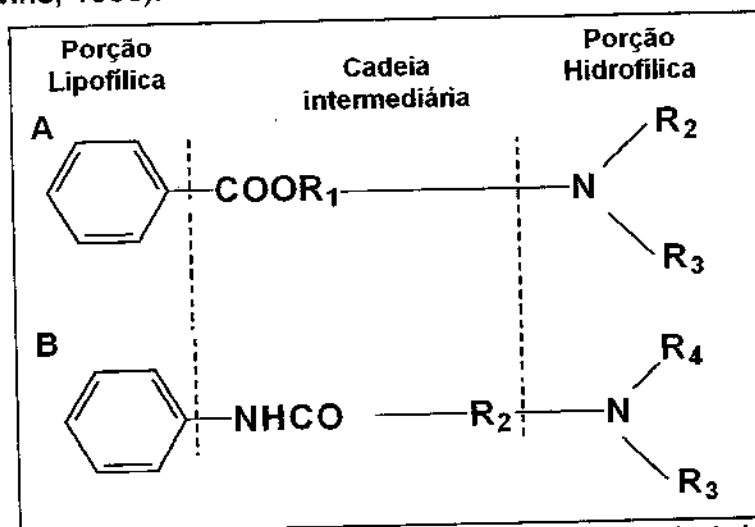


Figura 1. Anestésico local típico. A. Tipo éster. B. Tipo amida (Adaptado de Malamed, 2001).

O primeiro composto utilizado como AL foi a cocaína, um alcalóide isolado das folhas de *Erithroxylon coca*, introduzido na prática clínica para uso oftalmológico em 1884 por Koller. Devido aos efeitos tóxicos da cocaína, que incluíam dependência

química e psíquica, outros agentes foram introduzidos. A Procaína foi o primeiro AL sintético injetável de valor clínico, introduzida em 1905 por Einhor (Covino, 1986). Em 1943, a Lidocaina sintetizada por Lofgren, representou o primeiro anestésico do grupo das amidas e a partir dela, outros AL amino-amidas foram introduzidos, como a mepivacaina, prilocaína, bupivacaína e ropivacaína (Tabela 2) (Covino, 1986, Malamed, 2001).

O sucesso da anestesia local exige o conhecimento das propriedades farmacológicas dos vários anestésicos e da habilidade técnica na execução do bloqueio em questão. As doses necessárias de cada anestésico local variam consideravelmente, dependendo do tipo de bloqueio e estado do paciente (Strichartz & Covino, 1993; McLure & Rubin, 2005). As características desejáveis dos AL incluem longa duração da ação, baixas toxicidade local e sistêmica e seletividade para os bloqueio nervoso e sensorial (Covino, 1986; Kuzma et al., 1997).

As características clinicamente importantes dos AL incluem potência (relacionada à concentração plasmática necessária para produzir um determinado efeito), velocidade de início do bloqueio, duração da anestesia e bloqueio diferencial sensorial/motor. Estas estão relacionadas às propriedades físico-químicas dos fármacos (Tabela 1) (Strichartz & Covino, 1993). A hidrofobicidade parece ser o determinante primário da potência anestésica, embora fatores como a capacidade de provocar vasodilatação e redistribuição nos tecidos, devam ser levados em consideração, para comparação entre os fármacos (Strichartz & Covino, 1993). A ligação às proteínas plasmáticas se relaciona com a duração da anestesia e o pKa (constante de dissociação) está correlacionado com o início da ação (Covino, 1986). A latência da ação do fármaco se relaciona com a dose ou concentração do anestésico utilizado, enquanto que a duração da ação é bastante influenciada pelos efeitos vasculares periféricos causados pelos anestésicos locais (Strichartz & Covino, 1993).

A **Tabela 1** mostra alguns parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos dos anestésicos locais de uso clínico. A Potência é referenciada à da Procaína, o primeiro AL sintetizado. A **Tabela 2** revela suas estruturas químicas.

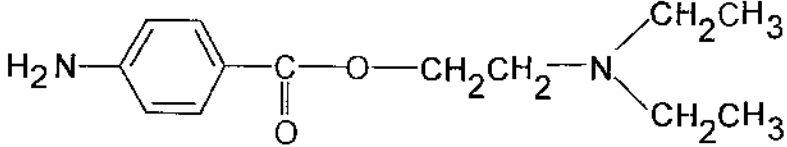
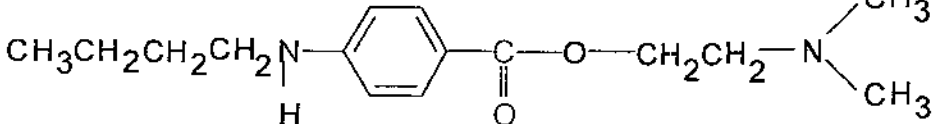
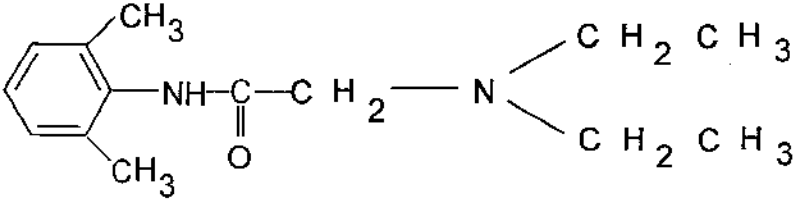
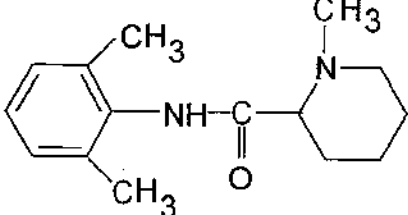
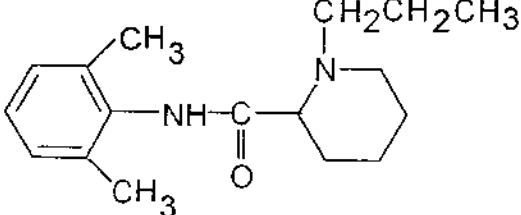
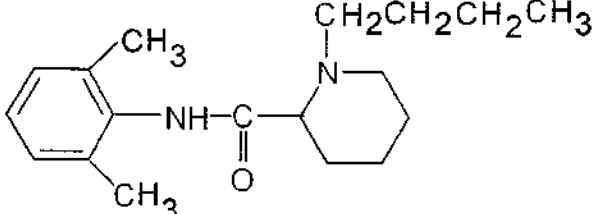
**Tabela 1. Propriedades dos Anestésicos Locais**

AL	Coef.Partição (pH 7,4)	pKa (25° C)	Potência <sup>c</sup>	% Ligação às proteínas plasmáticas <sup>d</sup>	Meia-vida plasmática (i.v. infusão) (h) <sup>c</sup>
Procaína	67 <sup>a</sup>	9,2 <sup>e</sup>	1	6	0,1
Tretacaína	236 <sup>a</sup>	8,5 <sup>f</sup>	16	76	2,5
Lidocaína	76 <sup>a</sup>	7,7 <sup>d,f</sup>	4	64	1,5
Mepivacaína	93 <sup>b</sup>	7,6 <sup>e, h</sup>	2	77	1,5
Ropivacaína	132 <sup>b</sup>	8,1 <sup>d,h</sup>	10 <sup>b</sup>	94	1,9 <sup>g</sup>
Bupivacaína	136 <sup>b</sup>	8,1 <sup>e,d</sup>	16	95	2,5

<sup>a</sup> Coeficiente de partição entre lipossomas de fosfatidilcolina de ovo e tampão BPS, pH 7,4, segundo Malheiros et al., 2004; <sup>b</sup> Araújo, 2005 (tese de doutorado); <sup>c</sup>(Covino & Vassalo, 1985); <sup>d</sup> Mclure & Rubin, 2005; <sup>e</sup> Covino, 1996, <sup>f</sup> Wildsmith et al., 1987, <sup>g</sup> Mclure, 1996; <sup>h</sup> Whiteside & Wildsmith, 2001.



Tabela 2. Estrutura química de alguns Anestésicos Locais de uso clínico: aminoésteres (TTC, PRC) e aminoamidas (LDC, MVC, RVC, BVC).

ANESTÉSICO LOCAL	ESTRUTURA
<i>Procaína (PRC)</i>	
<i>Tetracaína (TTC)</i>	
<i>Lidocaína (LDC)</i>	
<i>Mepivacaína (MVC)</i>	
<i>Ropivacaína (RVC)</i>	
<i>Bupivacaína (BVC)</i>	

### 1.1.1. MECANISMO DE AÇÃO

Os AL impedem a propagação do impulso nervoso, através do bloqueio de canais de sódio voltagem-dependente de axônios, inibindo a entrada de sódio nas células e a despolarização da membrana (Butterworth & Strichartz, 1990). Acredita-se que tanto a forma carregada quanto a neutra dos AL são importantes para a ação anestésica (Fraceto et al., 2006). A ligação dos AL é dependente do estado do canal, sendo favorecido pelo canal aberto ou inativado (Hille, 1977; Nau, 2004). Há também uma relação com a frequência da estimulação do nervo, aumentando o grau de bloqueio com o aumento da frequência de estimulação (Courtney, 1975).

Os AL bloqueiam a condução nervosa pela ligação reversível à subunidade  $\alpha$  do canal de sódio voltagem-dependente (Fraceto et al., 2006). Para que o anestésico possa atingir seu sítio de ação, ele deve atravessar a membrana e, para isto, sua forma neutra é favorecida, uma vez que esta tem maior coeficiente de partição que a forma protonada. A proporção do fármaco na forma neutra dependerá de seu pKa e do pH tecidual. Dentro da célula, em função do baixo pH, a forma ionizada é regenerada e o receptor dentro do canal é bloqueado. A porção intracelular do canal é, então, inativada pela forma protonada dos AL (Ritchie et al., 1965; Narahashi et al., 1969; Narahashi et al., 1970; Hille, 1977), enquanto que a forma neutra interage com a porção intra-membrana do canal, levando a sua inativação ou bloqueio de propagação do impulso nervoso (Courtney, 1980; Grupta, 1991; Rasgdale et al., 1994; 1996). Além disso, os AL solubilizados na membrana alteram sua organização lipídica e fluidez, o que pode afetar indiretamente o canal de sódio voltagem dependente (de Paula & Schreier, 1995). Se um número suficiente de canais é bloqueado, o limiar do potencial de ação não é atingido e, desta forma, há o impedimento da condução do impulso (Pardo et al., 2002).

A composição lipídica é importante para definir a ação do AL na permeabilidade da membrana (Pardo et al., 2002). A ação do AL levará a maiores alterações em membranas sem colesterol, como a membrana mitocondrial interna, e com pouco colesterol, como a membrana mitocondrial externa e do retículo endoplasmático (de Paula & Schreier, 1995, 1996; Pardo et al., 2002).

A afinidade intrínseca do AL pelo canal de sódio voltagem-dependente deve ser considerada na avaliação da qualidade do bloqueio, havendo diferenças entre a velocidade de ligação e de dissociação do canal entre os vários anestésicos locais (Pardo et al., 2002).

A intensidade do bloqueio neuronal também é afetada pelo diâmetro das fibras nervosas. Fibras de diâmetro largo (Fibras A $\beta$ -motoras) requerem maiores concentrações de AL para atingirem certo grau de bloqueio, comparadas com pequenas fibras mielinizadas (Fibras C-sensoriais), (McLure & Rubin, 2005).

### **1.1.2. TOXICIDADE DOS ANESTÉSICOS LOCAIS**

Os AL bloqueiam reversivelmente os potenciais de ação em todas as membranas excitáveis (Malamed, 1997; Groban, 2001). A literatura traz também relatos da interação não específica dos AL com outras proteínas de membranas (de Paula & Schreier, 1996) em particular com canais de cálcio e potássio, que evolutivamente, pertencem à mesma família dos canais de sódio voltagem-dependente (Groban, 2001). Por estes motivos, o sistema nervoso central (SNC) e o sistema cardiovascular (SCV) são especialmente susceptíveis à ação dos AL (Malamed, 2001). Em geral, o aparecimento dos sintomas de toxicidade sistêmica está relacionado à injeção intravascular inadvertida ou administração de dose excessiva do AL (Strichartz & Covino, 1993). O risco de injeção intravascular acidental e a conseqüente toxicidade aguda é inerente na maioria das técnicas de bloqueio nervoso. Por outro lado, a severidade da toxicidade nos sistemas cardiovascular e nervoso é diretamente proporcional à potência do AL, dose e via de administração (Mather et al., 2005).

#### ***1.1.2.1. Toxicidade ao Sistema Nervoso Central***

Os sintomas iniciais associados envolvem sensações de dor de cabeça leve e vertigens, seguidas freqüentemente de alterações visuais e auditivas como dificuldade de focalização e zumbidos. Outros sintomas incluem desorientação e

sonolência. Os sinais objetivos de toxicidade são normalmente de natureza excitatória e incluem calafrios, contrações musculares e tremores. Isto pode evoluir para convulsões generalizadas de natureza tônico-clônicas. Na administração de altas doses ou injeção venosa rápida, os sinais iniciais de excitação são rapidamente seguidos por estado de depressão generalizada (Strichartz & Covino, 1993). Os sinais mais graves incluem depressão respiratória, depressão cardiovascular e coma (Knudsen et al., 1997).

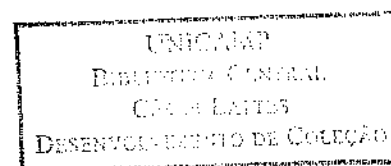
O SNC é mais susceptível às ações sistêmicas dos AL que o cardiovascular. A dose e o nível sanguíneo de AL necessários para produzir toxicidade ao SNC são normalmente mais baixos que para o sistema cardiovascular (Strichartz & Covino, 1993; Knudsen et al., 1997; Cox et al., 2003).

#### **1.1.2.2. Toxicidade ao Sistema Cardiovascular**

O efeito fisiológico cardíaco primário de altas doses de AL no coração é a diminuição da velocidade de despolarização máxima nas fibras de Purkinje e nos músculos ventriculares (Strichartz & Covino, 1993).

O potencial cardiotoxico dos AL está relacionado às características físico-químicas dos agentes, à via de administração e ao estado clínico do paciente (Groban & Dolinski, 2001). A diferença *in vitro* observada entre os AL está também relacionada à afinidade pelo canal e a duração da ligação (Reiz & Nath, 1986).

Todos os anestésicos locais deprimem a velocidade de despolarização máxima no potencial de ação cardíaco, ( $V_{max}$ ), (Cox et al., 2003; McLure & Rubin, 2005) inibindo a entrada de sódio pelos canais. Estudos eletrofisiológicos demonstram que esta diminuição no  $V_{max}$  ocorre de maneira dose dependente (Boyden & Wit, 1983). A condução mais lenta do impulso nervoso se manifesta por prolongamento do segmento PR e intervalo QRS e arritmias ventriculares verificados no eletrocardiograma (Reiz & Nath, 1986; Knudsen et al., 1997; Cox et al., 2003). Níveis variados de bloqueio átrio-ventricular, além de batimentos ectópicos, fenômenos de re-entrada e fibrilação ventricular também são relatados (McLure & Rubin, 2005). De fato, a fibrilação ventricular está entre as principais causas de morte causada pela bupivacaína (Scott et al., 1989), o anestésico de maior



toxicidade e também o mais usado em clínica para anestesia espinhal atualmente (Casati & Putzy, 2005). Concentrações extremamente altas de AL deprimem a atividade marcapasso no nó sinusal, resultando em bradicardia, bloqueio átrio-ventricular e parada sinusal (Strichartz & Covino, 1993).

As alterações nos canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), na produção do AMPc e síntese de ATP também contribuem para a cardiotoxicidade (Groban, 2001). O bloqueio do canal de  $\text{K}^+$  prolonga o potencial de ação, predispondo o coração para arritmias ventriculares. O efeito depressivo nos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , atenuando a entrada de cálcio, é importante no processo acoplado de excitação e contração cardíaca. A depressão da contração do miocárdio também pode estar relacionada à interferência da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático. A inibição da formação de AMPc pode prejudicar os esforços para ressuscitação, após a ocorrência de parada cardíaco-respiratória (Groban & Dolinski, 2001; Graf, 2001). A síntese de ATP prejudicada (através da depressão da fosforilação oxidativa pela interferência com os complexos I e II da cadeia respiratória) (Floridi et al., 1999; Graf, 2001) e conseqüente alteração do metabolismo energético mitocondrial contribui para a depressão elétrica e mecânica do miocárdio (Groban & Dolinski, 2001; Graf, 2001). Também pode ser considerado o fato de alguns anestésicos deslocarem ligantes dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Cox et al., 2003).

Além deste efeito direto dos AL no Sistema Cardiovascular, existe uma contribuição central para a cardiotoxicidade induzida por anestésicos (Groban, 2003), pois o estado de depressão do SNC pode levar à depressão cardiovascular. Isto se deve à depressão de neurônios corticais inibitórios e excitatórios localizados no lóbulo temporal e amígdala do sistema Límbico. Há também uma diminuição dos impulsos no núcleo do trato solitário, que é um importante centro de regulação cardiovascular (Graf, 2001). Também pelo efeito central, há uma diminuição da resistência vascular sistêmica, pelo relaxamento da musculatura lisa vascular, o que contribui para a hipotensão, além de uma redução da estimulação simpática (Cox et al., 2003).

Adicionalmente, a depressão respiratória, causada pela toxicidade no SNC, acompanhada de hipóxia, bradicardia e acidose pode contribuir para os sinais de

cardiotoxicidade, aumentando a frequência de arritmia cardíaca (Strichartz & Covino, 1993; Cox et al., 2003; Graf, 2001; Groban & Dolinski, 2001).

### **1.1.2.3. Toxicidade Local**

O músculo esquelético é o tecido mais sensível ao efeito local irritante dos AL (Malamed, 2001). A injeção direta do AL no músculo acarreta uma reação inflamatória intensa que pode levar a áreas de necrose muscular, o que pode ser acentuado com o uso de vasoconstritores (McLure & Rubin, 2005). A cicatrização pode ser acompanhada por fibrose e certo grau de contratura muscular, o que não é significativo, exceto nos casos de anestesia oftálmica (McLure & Rubin, 2005). Vários estudos relatam o aparecimento da toxicidade local, após a injeção dos AL, sobretudo da BVC (Kytta et al., 1986; Zink et al., 2003; Amaniti et al., 2006). As alterações locais são em geral reversíveis, havendo regeneração muscular completa cerca de duas semanas depois da administração do anestésico local (Malamed, 2001).

Os AL podem causar neurotoxicidade quando administrados nos espaços epidural ou subaracnóideo, com o aparecimento de neurite e degeneração, além de indução de apoptose neuronal. Apesar desta evidência, os AL empregados clinicamente raramente produzem lesões nervosas localizadas, nas concentrações usualmente empregadas (Strichartz & Covino, 1993; McLure & Rubin, 2005). A lesão neurológica permanente na anestesia regional é um evento muito raro (Cox et al., 2003).

Como exposto acima, a toxicidade é ainda um problema clínico presente na prática da anestesia local. Neste sentido, a busca por melhores AL têm sido o objetivo de muitas pesquisas, com duas abordagens principais: a) a síntese de novas moléculas ou a modificação química de moléculas já existentes (como por exemplo, a síntese de isômeros puros ao invés da mistura racêmica, como é o caso da Ropivacaína, produzida por síntese estereoseletiva e que apresenta pequenas alterações estruturais em relação à Bupivacaína e Mepivacaína) (Kuzma et al., 1997, Whiteside & Wildsmith, 2001) e b) a utilização de carreadores (ciclodextrinas,

lipossomas e polímeros), que podem alterar o perfil de liberação do fármaco no organismo (Kuzma et al., 1997; Grant & Bansinath, 2001; Grant, 2002). O uso de carreadores com anestésicos locais, sobretudo lipossomas e ciclodextrinas, tem sido objeto de estudo do nosso Laboratório (Laboratório de Biomembranas-IB-UNICAMP) nos últimos anos (Araújo et al., 2003; Araújo et al., 2004; Cereda et al., 2004, Pinto et al., 2004, Pinto et al., 2004a, Malheiros et al., 2004, Pinto et al., 2005, Pinto et al., 2005a, Araújo et al., 2005; Cereda et al., 2006).

### 1.1.3. ROPIVACAÍNA

A ropivacaína (RVC) (Figura 2), foi introduzida na clínica em 1996 como um anestésico local comercializado na forma de isômero levógiro puro, na tentativa de diminuir a toxicidade nos SNC e SCV, principalmente em relação à bupivacaína (BVC). Possui um pKa alto (8,1) (Whiteside & Wildsmith, 2001; McLure & Rubin, 2005) e solubilidade aquosa limitada (2 mM em pH 7,4). A RVC causa bloqueio preferencial das fibras que envolvem a transmissão da dor (A $\delta$  e fibras C), com relação às fibras de função motora (fibras A $\beta$ ). É menos cardiotóxica que a BVC em concentrações iguais e apresenta um limiar significativamente maior de toxicidade ao Sistema Nervoso Central (McClellan & Faulds, 2000). A meia-vida plasmática da RVC também é menor (Tabela 1), com um menor potencial de acúmulo com relação à BVC (Wang et al., 2001). Também com relação a esta, as principais diferenças farmacocinéticas, relacionadas à sua menor lipofilicidade são *clearance* plasmático um pouco mais alto e um padrão similar de ligação a proteínas plasmáticas (Tabela 1) (Thomas & Schug, 1999; Rosemberg, 2004).

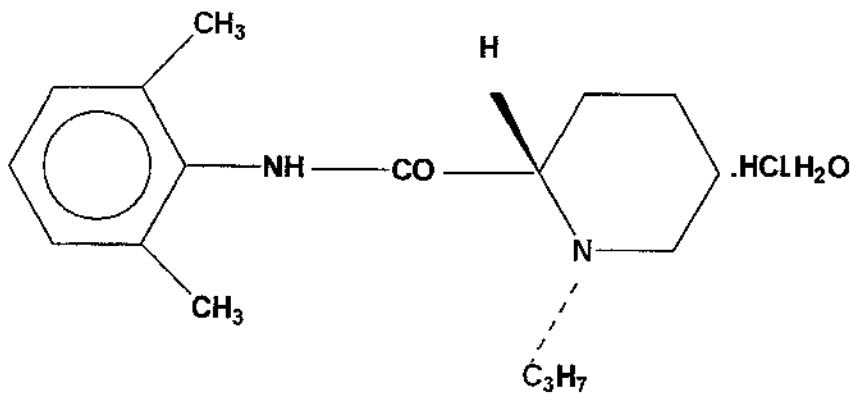


Figura 2- Fórmula estrutural do Cloridrato de Ropivacaína (S(-) RVC).

A concentração sistêmica da RVC depende da concentração utilizada, da via de administração, das condições hemodinâmicas e circulatórias do paciente e da vascularização no sítio de administração. Após a infusão intravenosa, o volume de distribuição no estado de equilíbrio é de  $41 \pm 7$  L. A ligação a proteínas plasmáticas é 94%, principalmente com a  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida. A RVC também atravessa a placenta, estabelecendo-se um equilíbrio com a fração livre. A metabolização é hepática através do citocromo P450 e a excreção é renal, sendo que apenas 1% é excretada de maneira inalterada na urina (Yutaka et al., 1995; McClure, 1996).

A RVC é comparável à BVC em vários estudos clínicos, em diferentes formas de anestesia regional. A maioria destes estudos mostra que o início de ação, potência e duração são bastante similares (Kohane et al., 1998; Whiteside & Wildsmith, 2001, Lew et al., 2001, Casaty & Putzu, 2005). Estudos em voluntários mostram que a RVC é similar à BVC no início de ação e na intensidade do bloqueio sensorial, enquanto que o bloqueio motor é menos intenso e de menor duração (Knudsen et al., 1997). O bloqueio motor, entretanto, não é desejável em muitos procedimentos médicos, como por exemplo, no uso da anestesia em trabalho de parto e em cirurgias ortopédicas (McLure & Rubin, 2005, Casaty & Putzu, 2005).

A característica mais importante atribuída à RVC, entretanto, é margem de segurança aumentada com relação à BVC (Wang et al., 2001; Groban & Dolinski, 2001). Em procedimentos de bloqueio nervoso periférico, que utilizam alta concentração de anestésico e grande volume de injeção, a RVC passa a ser o anestésico de escolha, devido ao seu menor potencial cardiotoxico (Groban &



Dolinski, 2001) uma vez que os estudos clínicos não mostram diferença na eficácia em concentrações clínicas relevantes entre RVC e BVC (Groban & Dolinski, 2001).

Recentes estudos de toxicidade em animais confirmam que a RVC é menos cardiotoxica com relação à BVC, com respeito à depressão miocárdica direta, sucesso de ressuscitação e potencial arritmogênico, quando administradas em doses iguais. Wang et al., (2001) em um trabalho de revisão da literatura sugerem que em doses clinicamente relevantes (utilizando concentrações de 0,5 a 0,75%), a RVC provê menor potencial de risco para injeção intravascular inadvertida que a BVC.

O reduzido potencial tóxico da RVC não resulta apenas em maiores concentrações plasmáticas e maiores doses requeridas para o aparecimento de sinais de toxicidade no sistema nervoso central, mas também na ausência de toxicidade cardíaca ou apenas de mínimos sinais de efeitos cardíacos após a toxicidade ao sistema nervoso central ter ocorrido. Além disso, a taxa de sucesso da ressuscitação cardiopulmonar observada após doses tóxicas de RVC terem sido administradas em animais é muito maior que a observada para a BVC (Whiteside & Wildsmith, 2001; Casaty & Putzu, 2005) e os efeitos tóxicos cardiovasculares resultantes de uma injeção intravascular inadvertida são facilmente revertidos (McLure & Rubin, 2005).

Considerando-se outros efeitos tóxicos, a RVC exerce pequeno efeito no metabolismo mitocondrial, já que comparado com a BVC possui menor acesso à membrana da mitocôndria (Floridi et al., 1999; Graf, 2001). Isto se deve à menor lipofiliabilidade da RVC, o que lhe confere menor coeficiente de partição em membranas, em comparação com a BVC. Este menor coeficiente de partição também leva a um menor potencial hemolítico da RVC, em relação à BVC (Araújo, 2005). Também deve ser considerado o fato de que a RVC inibe a agregação plaquetária humana induzida por epinefrina em menor intensidade que a BVC. Isto é um fator importante considerando-se uma possível perda de sangue em procedimentos cirúrgicos (Lullis et al., 2001).

Com relação à toxicidade local, apesar da RVC levar ao aparecimento de miotoxicidade, esta é dose-dependente e totalmente reversível (Amaniti et al., 2006) e também menos severa em comparação com a BVC (Zink et al., 2003). Ensaio de

viabilidade celular com fibroblastos também revelam esta menor toxicidade da RVC em relação à BVC (Araújo, 2005). Além disso, a utilização da RVC em modelo animal mostrou não apresentar efeito deletério na função motora do nervo ciático, após injeção intraneural nas concentrações clinicamente utilizadas (Iohom et al., 2005). Estudos histológicos em modelos animais também indicam que a RVC não leva à indução de irritação nos nervos periféricos, nem na medula espinhal (Lew et al., 2001). A RVC parece ser desprovida de toxicidade neural (Lew et al., 2001).

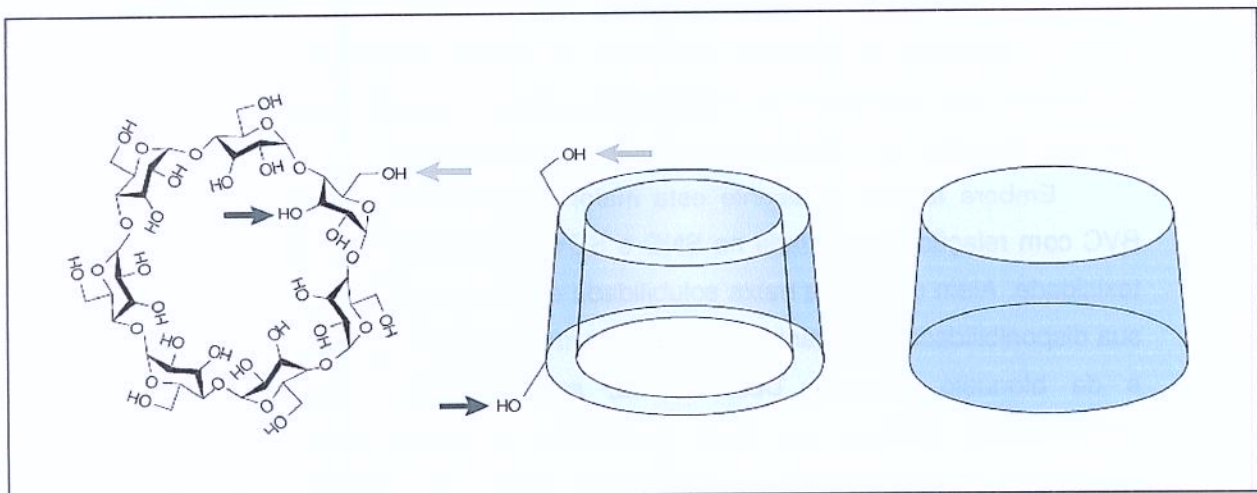
Outra vantagem da RVC consiste no fato de que as formulações dispensam vasoconstritores (McLure & Rubin, 2005), já que em concentrações baixas ela é capaz de levar a um leve efeito vasoconstritor. O efeito vasodilatador intrínseco presente em outros AL não ocorre para a RVC, nas concentrações clinicamente utilizadas. Em consequência disso, a epinefrina tem pouco efeito na ação local ou na concentração sistêmica da RVC em humanos (Whiteside & Wildsmith, 2001).

Desta forma, a RVC representa uma alternativa mais segura que a BVC, já que é capaz de levar a anestesia adequada, em concentrações apropriadas (Mulroy, 2002) e similares às daquele anestésico. A menor toxicidade é especialmente importante para pacientes que apresentem alterações sistêmicas (Pérusse et al., 1992a,b; Goulet et al., 1992), em particular os cardiopatas.

Embora a RVC apresente esta maior margem de segurança em relação à BVC com relação à toxicidade no SNC e SCV, ela não é totalmente desprovida de toxicidade. Além disto, sua baixa solubilidade em água em meio fisiológico prejudica sua disponibilidade no organismo, o que traz implicações relativas ao tempo de início e de bloqueio nervoso. Desta forma, sua inclusão em carreadores como ciclodextrinas, poderia ser uma alternativa vantajosa para melhorar suas características farmacocinéticas, permitindo, assim, um melhor desempenho da formulação de RVC, o que poderia resultar em doses menores necessárias para um mesmo efeito.

## 1.2. CICLODEXTRINAS

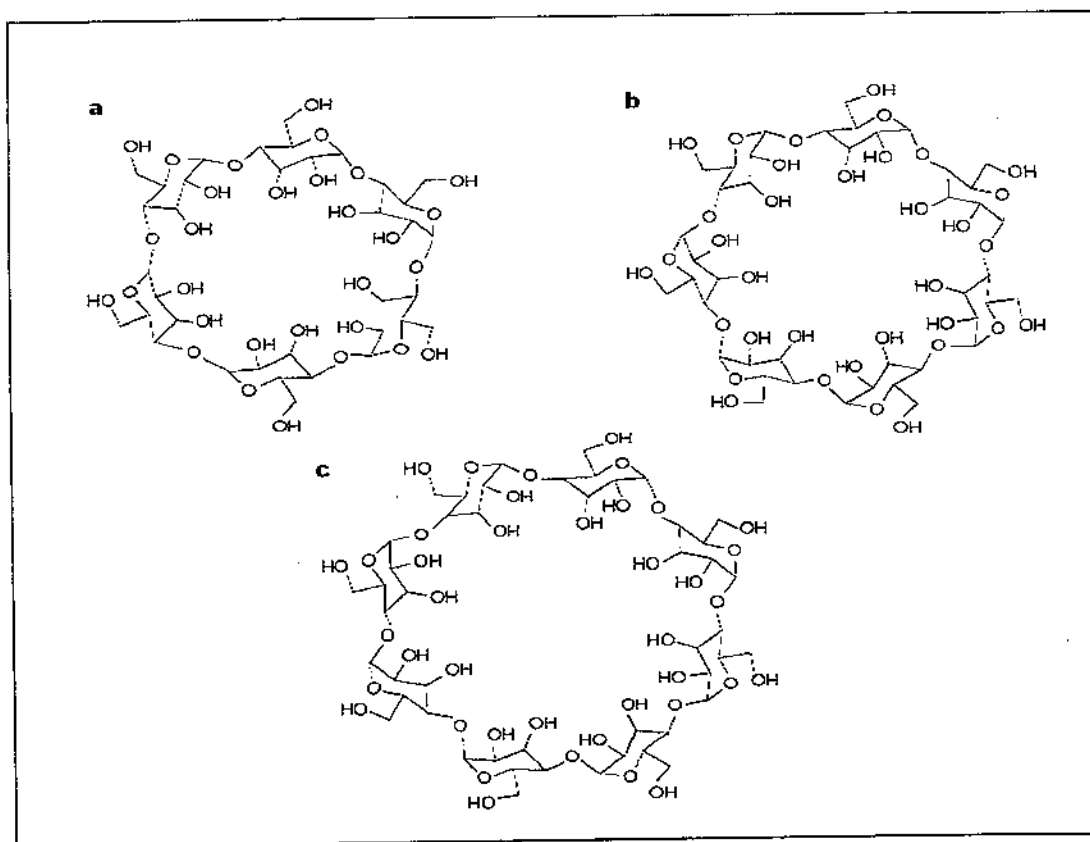
As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos que contêm de 6 a 8 unidades de D-(+)-glicose, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4. São produzidas pela ação da enzima ciclodextrina-glicosiltransferase presente em alguns microorganismos, a partir do amido (Matioli, 2000; Loftsson & Masson, 2001; Davis & Brewster, 2004). A estrutura das ciclodextrinas pode ser representada como a de um cone truncado (Figura 3), no qual o lado externo é hidrofílico devido às hidroxilas primárias e secundárias, das unidades de glicose, e a cavidade interna tem caráter hidrofóbico devido aos elétrons não compartilhados do oxigênio das ligações glicosídicas e aos hidrogênios dos monômeros de glicose (Matioli, 2000), podendo abrigar moléculas “hóspede” de dimensões compatíveis (Davis & Brewster, 2004).



**Figura 3.** Representação esquemática da  $\beta$ -CD, mostrando as hidroxilas primárias (seta cinza) e secundárias (seta preta) (Davis & Brewster, 2004).

As três ciclodextrinas naturais são a alfa ( $\alpha$ -CD), beta ( $\beta$ -CD) e gama ( $\gamma$ -CD) compostas de seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopiranoose, respectivamente, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 (Figura 4). O exterior hidrofílico e a cavidade interna hidrofóbica permitem às ciclodextrinas complexarem-se com moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas alterando as propriedades físico-químicas das mesmas como a

solubilidade em água, a estabilidade e a biodisponibilidade (McCormack & Gregoriadis, 1998; Matioli, 2000; Davis & Brewster, 2004). A inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e dos critérios de polaridade existentes com o fármaco (Davis & Brewster, 2004). Além disso, as forças que dirigem a complexação têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água na cavidade das ciclodextrinas, às interações de van der Waals, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Loftsson & Brewster, 1996; Bibby et al., 2000). A formação do complexo ocorre através de uma interação favorável entre uma molécula convidada não-polar com uma cavidade hidrofóbica solvatada (Bekers et al., 1991).

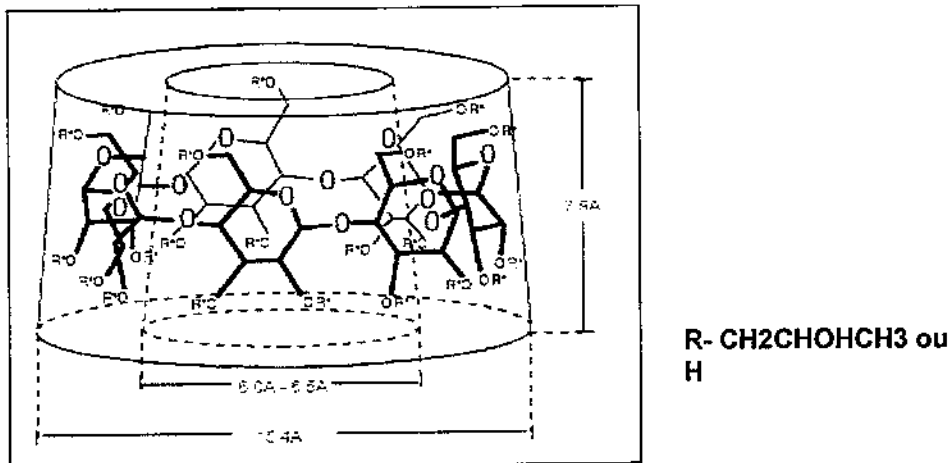


**Figura 4.** Estrutura geral das ciclodextrinas naturais:  $\alpha$ -ciclodextrina (a),  $\beta$ -ciclodextrina (b),  $\gamma$ -ciclodextrina (c).

As moléculas complexadas permanecem, normalmente, orientadas em uma posição onde há máximo contato entre sua porção hidrofóbica e a cavidade apolar da ciclodextrina, estando sua porção hidrofílica em contato com os grupos hidroxil da ciclodextrina (Frömming & Szejtli, 1994), ou expostas ao ambiente aquoso.

As ciclodextrinas podem ser usadas em produtos farmacêuticos, por serem biocompatíveis e não induzirem resposta imune, em humanos. Elas apresentam também resistência à degradação por enzimas, sendo eliminadas principalmente por via urinária (Davis & Brewster, 2004).

As  $\beta$ -CD são as ciclodextrinas mais largamente utilizadas para a complexação de várias classes de fármacos (Irie & Uekama, 1997; Loftsson & Masson, 2001). As CDs naturais, em particular as  $\beta$ -CDs, têm solubilidade aquosa limitada e a formação de complexos com compostos lipofílicos geralmente resulta em precipitação dos complexos sólidos, caso o limite de solubilidade do complexo seja atingido. Com isto, a administração parenteral de  $\beta$ -CD não é possível, uma vez que sua baixa solubilidade pode levar à uma precipitação de microcristais nos rins. Outra causa de depósito de cristais nos túbulos renais, e o conseqüente comprometimento da função renal, é a complexação da  $\beta$ -CD com o colesterol (Frank et al., 1976; Frijilink et al., 1991, BeKers et al., 1991; Davis & Brewster, 2004). Para contornar tais problemas, várias modificações na estrutura química das  $\beta$ -CDs têm sido feitas originando derivados mais solúveis como a 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD, Figura 5) (Rajewski & Stella, 1996; Davis & Brewster, 2004). Sendo assim, a HP- $\beta$ -CD representa uma opção vantajosa para a farmacotécnica de uma nova formulação.



**Figura 5.** Representação esquemática da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

### 1.2.1. HP- $\beta$ -CD: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

A HP- $\beta$ -CD apresenta a vantagem de ter solubilidade aquosa aumentada e menor toxicidade em relação à  $\beta$ -CD. Sua toxicidade em animais foi extensivamente estudada e ela é bem tolerada pela maioria das espécies, com toxicidade mínima e apenas observada em algumas vias de administração (Gould & Scott, 2005). Ensaios toxicológicos indicam que a HP- $\beta$ -CD é segura, com efeitos bioquímicos e histopatológicos reversíveis. Os órgãos principais analisados foram os rins, pulmão e fígado (Gould & Scott, 2005). A administração de HP- $\beta$ -CD via infusão intravenosa em ratos, camundongos e em cachorros, induziu observações clínicas mínimas, assim como alterações bioquímicas (alterações hematológicas, aumento da concentração plasmática de enzimas hepáticas e diminuição do colesterol plasmático) e histopatológicas (nos rins e pulmão), todas elas reversíveis após o período de recuperação. Os estudos realizados foram: 225mg/kg/dia (11,25% m/v) via veia femoral, estudo de 7 dias em ratos; infusão contínua de 2400 mg/kg/dias (5% m/v) por 7 dias em ratos; estudo subagudo de 14 dias e 90 dias, subcrônico em dias alternados em ratos Sprague Dawley e macacos Cynomolgus, na dose 200

mg/kg (20% m/v); estudos de dois e três meses utilizando ratos Sprague Dawley e cachorros, com doses de até 400 mg/kg/dia (Gould & Scott, 2005).

Em um estudo para avaliação de possíveis alterações no desenvolvimento embrio-fetal em ratos e coelhos, não se observou efeitos adversos até a dose de 400 mg/kg/dia administrado por via intravenosa (Coussement et al., 1990).

Em humanos a HP- $\beta$ -CD é bem tolerada, sem efeitos documentados sobre a função renal (Seiller et al., 1991; Jassen Technical Bulletin, 1992 *apud* Gould & Scott, 2005; Gould & Scott, 2005) ou outra toxicidade local ou sistêmica. Vários estudos clínicos estão relatados na literatura e mostram que a HP- $\beta$ -CD é segura e bem tolerada pela maioria dos pacientes que a receberam por via oral, doses diárias totais contendo de 4 a 8g de HP- $\beta$ -CD, por, pelo menos, duas semanas (Irie & Uekama, 1997). Doses diárias mais altas, contendo de 16 a 24 g de HP- $\beta$ -CD, foram testadas em 14 voluntários, resultando em incidência aumentada de diarreia. Entretanto, com base em dados clínicos, a HP- $\beta$ -CD é considerada como não tóxica quando usada em doses diárias totais contendo menos que 16g de HP- $\beta$ -CD.(Gould & Scott, 2005).

Em estudos clínicos da administração intravenosa, usando doses únicas contendo até 3g de HP- $\beta$ -CD não foram encontrados efeitos tóxicos na função renal (Seiller et al., 1990). Em outro estudo, em que se analisou durante uma semana a administração intravenosa de uma única dose contendo 1g de HP- $\beta$ -CD, não foi constatado nenhum efeito adverso (Janssen Technical Bulletin, 1992 *apud* Gould & Scott, 2005). Finalmente, dados coletados pós-tratamento, de um paciente que recebeu HP- $\beta$ -CD na dose de 1,5g/kg de massa por via intravenosa (470 mg/kg/dia, num total de 30g em 4 dias, em solução a 5 % em água) para tratamento de hipervitaminose A, não foi observada qualquer complicação ou sintoma clínico em até 8 anos após a administração, inclusive na função renal (Carpenter et al., 1994). Neste estudo, os autores relatam não ter observado hemólise, mesmo após vários dias de infusão com HP- $\beta$ -CD (Carpenter et al., 1994), em contraste com o alto poder hemolítico da  $\beta$ -CD natural (Ohthani et al., 1989; Rajewski et al., 1995, Rajewski & Stella, 1996; Mireille et al., 1997; Davis & Brewster, 2004).

Experimentos realizados em ratos mostram que a administração intravenosa de HP- $\beta$ -CD não altera significativamente os níveis de biossíntese de colesterol. Isto indica que o "pool" de lipídios que podem estar na circulação, complexados com a HP- $\beta$ -CD, não é significativo (Carpenter et al., 1994), diferentemente da  $\beta$ -CD natural, cujo principal efeito tóxico após administração sistêmica está relacionado à retirada de colesterol de membranas plasmáticas, formando complexos insolúveis (cristais) que podem depositar-se nos túbulos proximais dos rins, reduzindo a filtração glomerular e causando nefrose (Frank et al., 1976). De fato, há indícios de que esses cristais sejam constituídos de complexos formados com colesterol e/ou ésteres de colesterol que atravessam facilmente a membrana basal glomerular (Frijlink et al., 1990; 1991; Bekers et al., 1991). Estudos indicam que derivados da  $\beta$ -CD, como HP- $\beta$ -CD, não induzem toxicidade renal, sendo excretados mais rapidamente e em maiores quantidades do que a  $\beta$ -CD.

### 1.2.2. HP- $\beta$ -CD: PERFIL FARMACOCINÉTICO

O perfil farmacocinético da HP- $\beta$ -CD tem sido estudado em voluntários sadios após a administração intravenosa e doses orais (Szathmary et al., 1990). Seguindo a administração intravenosa nas doses totais de 0,5 até 3,0 g, o nível plasmático da HP- $\beta$ -CD não modificada declina rapidamente, não havendo diferença entre homens e mulheres. Parâmetros farmacocinéticos como meia-vida, *clearance* e volume de distribuição mostraram ser dose independentes e o nível urinário sugere que a eliminação é praticamente toda feita através dos rins, sem sinais de reabsorção tubular (Gould & Scott, 2005).

Após a administração oral a HP- $\beta$ -CD não pôde ser detectada no plasma ou urina após 1 h, indicando que não há absorção pelo trato gastrointestinal e que a biodisponibilidade em humanos é baixa (Szathmary et al., 1990).



### 1.3. COMPLEXAÇÃO DE ANESTÉSICOS LOCAIS EM CICLODEXTRINAS

Vários fármacos, incluindo antineoplásicos, antibióticos, antifúngicos e anestésicos locais têm sido complexados em ciclodextrinas. A Tabela 3 fornece um perfil de produtos farmacêuticos preparados à base de ciclodextrinas naturais e modificadas (Davis & Brewster, 2004).

Com relação aos AL, estudos de caracterização em animais indicam que a utilização de  $\beta$ -ciclodextrina e derivados como a dimetil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina, aumentam a solubilidade de AL como a etidocaína, lidocaína, prilocaína, mepivacaína e, especialmente, bupivacaína (Dollo et al., 1996a,b; Araújo et al., 2005); bem como melhoram as propriedades farmacodinâmicas desses compostos (Dollo et al., 1998; 2000), levando a aumento da duração do efeito anestésico e diminuição da toxicidade dos fármacos (Dollo et al., 1998 e 2000; Estebe et al., 2002; Araújo et al., 2005).

A complexação com HP- $\beta$ -CD, pode levar a efeitos analgésicos mais pronunciados, com a vantagem de ser possível uma administração de menor concentração (Araújo et al., 2005). Desta forma, os anestésicos complexados em ciclodextrinas apontam uma nova direção no desenvolvimento de formulações mais eficazes e seguras para a anestesia (Araújo et al., 2003).

Não são ainda encontrados registros de anestésicos locais injetáveis na forma de preparações complexadas. No entanto, há várias patentes de produtos que contém ciclodextrina na formulação e produtos farmacêuticos já comercializados (Tabela 3). As primeiras utilizações da ciclodextrina em produtos registrados apareceram ainda na década de 70, com a complexação de prostaglandinas (Davis & Brewster, 2004). Um dos primeiros produtos, o Prostanorm E ( $PGE_2$ ), foi aprovado pelo mercado japonês em 1976 e representou um avanço médico na indução de trabalho de parto; neste, a prostaglandina  $PGE_2$  é complexada em  $\beta$ -ciclodextrina e administrada por via sublingual (Davis & Brewster, 2004). Outro exemplo foi a prostaglandina  $PGE_1$ , a segunda prostaglandina comercializada como o medicamento Prostavasin (Schwarz Pharma, Tabela 3), aprovado em 1979 para o

tratamento de complicações vasculares periféricas; neste caso o fármaco é complexado em  $\alpha$ -ciclodextrina e seu uso é intrarterial (Davis & Brewster, 2004).

A HP- $\beta$ -CD já está aprovada em mercados internacionais, principalmente nos EUA e Europa. O uso de HP- $\beta$ -CD, inclusive por via infiltrativa, é aprovado pelo FDA (Davis & Brewster, 2004). Há produtos registrados para administração oral, intravenosa, retal e oftálmica (Tabela 3). Com relação ao emprego intravenoso da HP- $\beta$ -CD especificamente, podem ser citados o antineoplásico Mitozitrex (Novartis, Suíça), que apresenta na sua composição a mitomicina complexada em HP- $\beta$ -CD para infusão e o Sporanox (Janssen), uma solução intravenosa do antifúngico itraconazol (Tabela 3). Neste último, a quantidade de HP- $\beta$ -CD administrada é de 8 a 16 g por dia (Davis & Brewster, 2004). A complexação do itraconazol com HP- $\beta$ -CD representou uma solução eficaz para permitir a administração oral e parenteral do itraconazol (pouco solúvel), necessário para o tratamento de infecções fúngicas, especialmente em pacientes em condições patológicas como AIDS e aqueles que se utilizam da quimioterapia para o tratamento do câncer. Para tais pacientes, uma formulação sólida não seria efetiva, uma vez que a função gastrointestinal apresentasse comprometida, o que traria problemas na biodisponibilidade do fármaco. A formulação se mostrou segura e efetiva em estudos clínicos, o que levou à introdução do produto nos EUA e Europa nos anos 90. A formulação oral foi aprovada em 1997 e a parenteral em 1999 (Davis & Brewster, 2004).

No Brasil, um produto farmacêutico já comercializado é o Flogene (Piroxicam/ $\beta$ CD), um antiinflamatório/analgésico produzido pela Aché, em solução, para uso oral (Tabela 3). A complexação do Piroxicam reduz as irritações gastrointestinais associadas ao fármaco livre e permite uma absorção mais veloz, com início de ação mais rápido (Davis & Brewster, 2004).

Inserido no trabalho do grupo do laboratório de Biomembranas com os anestésicos locais, a Ropivacaína, anestésico de estudo neste trabalho, já foi estudada e caracterizada em HP- $\beta$ -CD em escala laboratorial, sendo o complexo preparado com a utilização de um liofilizador para o processo de secagem (Araújo, 2002). Foram realizados testes de caracterização físico-química, toxicidade *in vitro* e testes *in vivo* (Araújo, 2002), (Anexo IX) e sendo obtidos resultados satisfatórios, nos

propusemos aqui a utilizar um processo escalonável, representando assim um passo seguinte para o cumprimento das etapas de desenvolvimento farmacêutico.

**Tabela 3.** Produtos comercializados em vários mercados mundiais, contendo ciclodextrinas naturais ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) e modificadas (metil- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD).

<b>Fármaco</b>	<b>Via de administração</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Empresa / País</b>
<b><math>\alpha</math>-ciclodextrina</b>			
Alprostadil (PGE <sub>1</sub> ) Cefotiam-hexetil	Intrarterial Oral	Prostavastim Pansporin T	Schwarz Pharma / EUA, Japão Ono/ Japão
<b><math>\beta</math>-ciclodextrina</b>			
Ácido gálico	Oral	Alidex	Biopharma / Alemanha
Ácido Tiaprofênico	Oral	Surgamyl	Roussel-Maestrelli / Itália
Benexato	Oral	Ulgut	Teikohu / Japão
Cefalosporina	Oral	Miact	Meiji Seika / Japão
Clordiazepóxido	Oral	Transilium	Gador / Argentina
Dexametasona	Dérmica	Glimesason	Funjinaga / Japão
Difenilhidramina	Oral	Stada-travel	Stada / Alemanha
Dinoprostona (PGE <sub>2</sub> )	Sublingual	Prostanorm E	Ono / Japão
Iodina	Tópica	Mena-gargle	Kiushin / Japão
Nicotina	Sublingual	Nicorette	Pharmacia / França
Nimesulida	Oral	Nimedex, Mesulid	Novartis / Itália
Nitroglicerina	Sublingual	Nitropen	Nippon / Japão
Omeprazol	Oral	Omebeta	Betapharma / Alemanha
Piroxicam	Oral	Cicladol, Brexin	Masterpharma / Itália
Piroxicam	Oral (em solução)	Flogene	Ache / Brasil
<b>Metil-<math>\beta</math>-ciclodextrina</b>			
Cloranfenicol 17- $\beta$ -Oestradiol	Oftálmica Nasal	Clorocil Aerodiol	Oftalder / Portugal Servier / França
<b>2-HP-<math>\beta</math>-Ciclodextrina</b>			
Cisaprida Indometacina Itraconazol Mitomicina	Retal Oftálmica Intravenosa Intravenosa	Prepulsid Indocid Sporamox Mitozitrex	Jassen / Bélgica Merck (MSD) / Europa Jassen, EUA / Europa Novartis / Suíça
<b>2-HP-<math>\gamma</math>-Ciclodextrina</b>			
Diclofenaco sódico	Oftálmica	Voltaren	Novartis / Suíça

Adaptado de Davis & Brewster, 2004; www.cyclolab.com

## II. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar uma pré-formulação anestésica de ropivacaína complexada em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), após processo de escalonamento.

Para tanto, as seguintes etapas se fizeram necessárias:

- Agitação mecânica e secagem em spray-dryer;
- Avaliação da eficácia da complexação, por diferentes técnicas;
- Avaliação *in vivo* das vantagens da complexação da pré-formulação em ratos, em relação ao bloqueio sensorial e a cardiotoxicidade, comparando-a com a ropivacaína comercial.

### III-MATERIAIS & MÉTODOS

#### 3.1. REAGENTES

- **Anestésico local:** Cloridrato de Ropivacaína (Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda, Lote n° 10.0317, Val. 03/09/07);
- **Ciclodextrina:** Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina (Kleptose-HPB®.-Roquette Serv. Tech. Lab., Lote: 420-920-1, Val. dez/08);
- **Outros:** HEPES, grau analítico (Q-Biogene Inc., EUA, Lote n° 0304066, Val. Jan/08), NaCl, grau analítico (Alkimia Ltda), Tiopental sódico (Thiopentax®-Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda, Lote 06053650, Val. maio/08).

#### 3.2. EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro (Beckman DU-70);
- Spray-dryer (Buchi B290-Suíça, Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda);
- Calorímetro Universal (Mettler Toledo Star SW 7.01, Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda);
- Difratorômetro de Raios X (Philips Analytical X-Ray, IQ-UNICAMP);
- Espectrômetro Varian Mercury-300 (Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa).

#### 3.3. ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos, machos e com peso entre 250 a 350g, submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada a  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , alojados coletivamente (5 animais por gaiola). A procedência destes foi o CEMIB (Centro de Bioterismo da Unicamp) para

os experimentos de avaliação sensorial e o Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ouro Preto/ UFOP para os estudos de cardiotoxicidade.

Todos os experimentos encontravam-se 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 do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEA ) /IB/ Unicamp (protocolo nº 994-1, Anexo X).

### **3.4. DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA DO COMPLEXO POR ABSORBÂNCIA**

Para avaliar a estequiometria da complexação, foi utilizado o tratamento de *Job Plot* ou Método de Variação Contínua (Connors, 1987; Loukas, 1997). Neste método, um parâmetro físico-químico diretamente relacionado com a concentração do complexo é medido em função de  $r$ , onde  $r = [AL]_{total} / ([AL]_{total} + [HP-\beta-CD]_{total})$ . Para este teste os complexos foram preparados misturando-se soluções de ropivacaína e HP- $\beta$ -CD para um volume final padrão, variando-se as proporções de maneira que a concentração total fosse constante. O parâmetro avaliado neste experimento foi a absorbância da RVC, realizando-se a leitura em 260 nm. O experimento foi realizado à 25° C e a concentração total utilizada foi de 1mM. O preparo dos complexos foi realizado de acordo com item 3.5. Embora a absorbância seja um parâmetro relacionado à concentração de RVC, este método é possível porque as variações na absorbância estarão relacionadas às diferentes concentrações do complexo, uma vez que a complexação leva a mudanças no espectro de absorção UV/VIS (Bekers et al., 1991). O valor máximo de variação da absorbância ocorre em  $r = m/(m+n)$ , onde  $m$  e  $n$  são as concentrações molares de ropivacaína e HP- $\beta$ -CD, respectivamente.

### **3.5. PREPARO DO COMPLEXO**

Os complexos foram preparados por co-solubilização, pela adição de quantidades apropriadas do anestésico local e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, na razão molar 1:1, em água Milli Q. A concentração utilizada foi de 30mM.

A suspensão ficou sob agitação à 25°C por, no mínimo, 5 h para equilíbrio da complexação (Araújo, 2005). Após este tempo, a solução foi seca em Spray Dryer (Bekers et al., 1991; Dollo et al., 1998, Loftsson & Masson, 2001).

A secagem foi realizada utilizando-se parâmetros estabelecidos para o escalonamento (pressão de nitrogênio 40 mbar, aspiração 100%, temperatura de entrada do ar 130 ° C, e vazão da solução de alimentação de 10 mL/min). O estudo para determinação dos parâmetros foi realizado pela Dra. Giuliana Piovesan Alves, sob supervisão da Dra Maria Helena Andrade Santana (Lab. de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Fac. Engenharia Química/UNICAMP) como parte de um convênio estabelecido entre aquele laboratório, nosso laboratório e a empresa CRISTÁLIA Prod. Quím. Farm. Ltda. (Proc. 07-P 2756/2004).

Para os testes posteriores de caracterização dos complexos e testes *in vivo*, os complexos foram ressuspendidos em tampão HEPES 20 mM + NaCl 150mM pH 7,4.

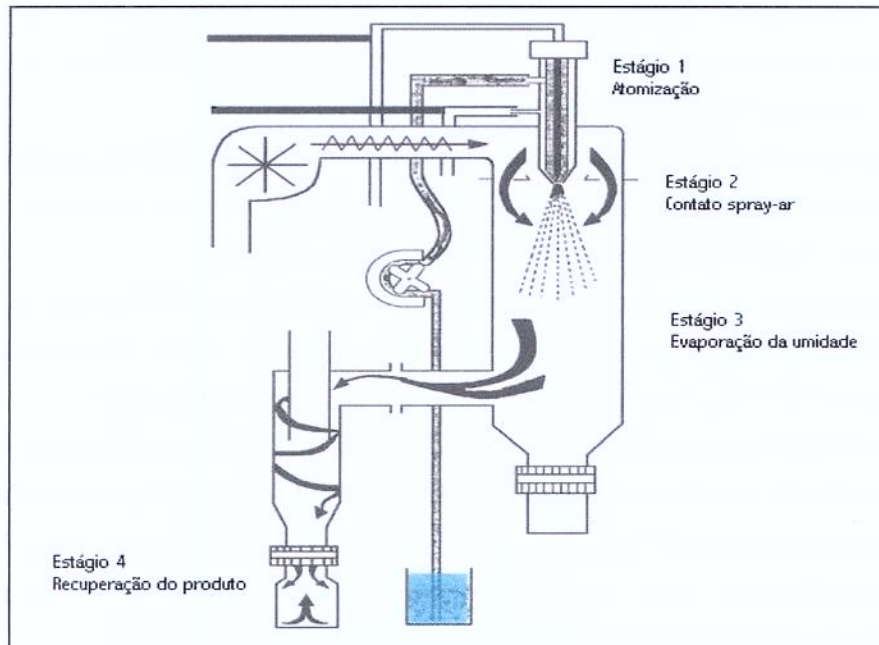
#### **3.5.1. SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO**

O processo de secagem por atomização (utilizando-se o spray-dryer) envolve quatro etapas, ilustradas na Figura 6: atomização da solução de alimentação, contato entre as gotículas produzidas com o fluido de secagem (ar ou algum gás inerte), evaporação do solvente e recuperação do produto.

O equipamento promove a remoção da água através da aplicação de calor ao produto alimentado, além do seu controle no meio de secagem. O calor é aplicado através do ar quente. Quando a solução de alimentação é atomizada ocorre a evaporação dos solventes. O controle da umidade do produto seco é feito através da



regulagem do fluxo de ar e da temperatura. A temperatura de secagem e o conteúdo de sólidos, revelam a eficiência térmica do processo (Masters, 1972).



**Figura 6.** Etapas do processo de secagem por atomização ([irtec1.irtec.bo.cnr.it/proc-spray-drying.htm](http://irtec1.irtec.bo.cnr.it/proc-spray-drying.htm)).

### 3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

#### 3.6.1. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A DSC é aplicável ao estudo de sistemas de liberação sustentada e de complexos de fármacos com ciclodextrinas (Dollo et al., 1996 a, b; Loftsson & Masson, 2001), possibilitando uma análise qualitativa da complexação (Frömming & Szejtli, 1994).

As mudanças na entalpia e entropia são associadas com mudanças no comportamento da água durante a formação do complexo e incluem a quebra da estrutura da água dentro da cavidade da CD, a remoção da água da cavidade e a reestruturação da água ao redor da molécula convidada. Outra contribuição

energética é a restrição na rotação das cadeias glicosídicas, quando a molécula convidada entra na cavidade (Bekers, 1991).

Os resultados são apresentados como termogramas que indicam a diferença de calor absorvido por um material de referência em comparação com as amostras: RVC pura, complexo RVC:HP- $\beta$ -CD e mistura física do anestésico com a ciclodextrina (RVC/HP- $\beta$ -CD), numa ampla faixa de aquecimento. A velocidade de aquecimento das amostras foi de 10°C / min. em uma faixa de 0 a 350°C e foram utilizadas 10 mg de cada amostra. O preparo da mistura-física consistiu na simples mistura da RVC com a HP- $\beta$ -CD, nas mesmas proporções molares utilizadas no preparo do complexo.

### 3.6.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A difração de Raios X pode ser usada para evidenciar um complexo de inclusão em estado sólido. A complexação é indicada pela alteração do padrão do difratograma da ciclodextrina e da molécula convidada (Bekers, 1991).

O difratograma do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD (preparado de acordo com item 3.5) foi realizado com as seguintes condições: voltagem de 30kV, corrente de 35 mA, ângulo de difração de  $2\theta$  na faixa de 5 a 35°. A HP- $\beta$ -CD e a RVC puras foram submetidas às mesmas condições que o complexo, com o mesmo processamento em *Spray*. A mistura física HP- $\beta$ -CD / RVC foi preparada com a mistura destas amostras de RVC e HP- $\beta$ -CD que passaram por este processamento. Estes controles são necessários para evidenciar o difratograma diferencial do complexo e, no caso da mistura física, para que se possa afirmar que a diferença observada não é proveniente de alterações provocadas pelo processo, o que poderia levar a alterações na cristalinidade das substâncias (Bekers et al., 1991).

### 3.6.3. ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

#### 3.6.3.1. Titulação por RMN

A Titulação por RMN é realizada através da medida de variação dos deslocamentos químicos induzidos pela complexação e é freqüentemente utilizada para a determinação de constantes de associação ( $K_c$ ) e da estequiometria de complexos (Fielding, 2000). Este experimento consiste em medir as mudanças de deslocamentos químicos em função da concentração das espécies (hóspede e hospedeiro) em solução e tem a vantagem, se comparado com a maioria dos métodos de determinação de constantes de equilíbrio, de fornecer vários sinais independentes para a avaliação de  $K_c$ . Esta metodologia apresenta resultados confiáveis quando o grau de complexação situa-se entre 20 e 80% (Schneider, 1998).

Os métodos mais comuns empregados para a determinação da estequiometria de complexação são: a) variação contínua de um dos componentes (Botsi et al., 1995; Botsi et al., 1997) e b) variação contínua de ambos os componentes (Djedaini et al., 1990) (Método de Job, já descrito no item 3.4). O primeiro método consiste em observar a variação de deslocamentos químicos ( $\Delta\delta_{obs}$ ) dos hidrogênios do hospedeiro em soluções distintas perante a variação da razão molar do hóspede em relação ao hospedeiro, cuja concentração se mantém constante. Pela observação de  $\Delta\delta_{obs}$  é possível avaliar a estequiometria através de um gráfico ( $\Delta\delta_{obs}$  versus razão molar). O ponto estequiométrico é atingido quando  $\Delta\delta_{obs}$  permanece constante, de forma análoga à titulação de pH (Figura 7a).

No método de Job, as concentrações de ambos os componentes (hóspede e hospedeiro) variam continuamente enquanto a soma total das concentrações permanece constante e, da mesma forma que no método anterior, a partir de dados racionalizados em gráfico ( $r \cdot obs$  versus  $r$ ; onde  $r = \frac{[hospede]}{([hospede] + [hospedeiro])}$ ) observa-se o ponto estequiométrico, o qual é atingido quando a variante Y ( $r \cdot obs$ ) do mesmo atinge o valor máximo. A seguir, são apresentados gráficos representativos onde é possível visualizar as principais razões

estequiométricas ( $[\text{hóspede}]/[\text{hospedeiro}] = 1:2; 1:1; 2:1$ ), empregando ambos os métodos RMN mencionados (Figura 7b). Neste trabalho, a titulação foi feita através do Método da Variação Contínua, em pH 7,4, utilizando-se a concentração final de 2mM. O solvente utilizado foi D2O.

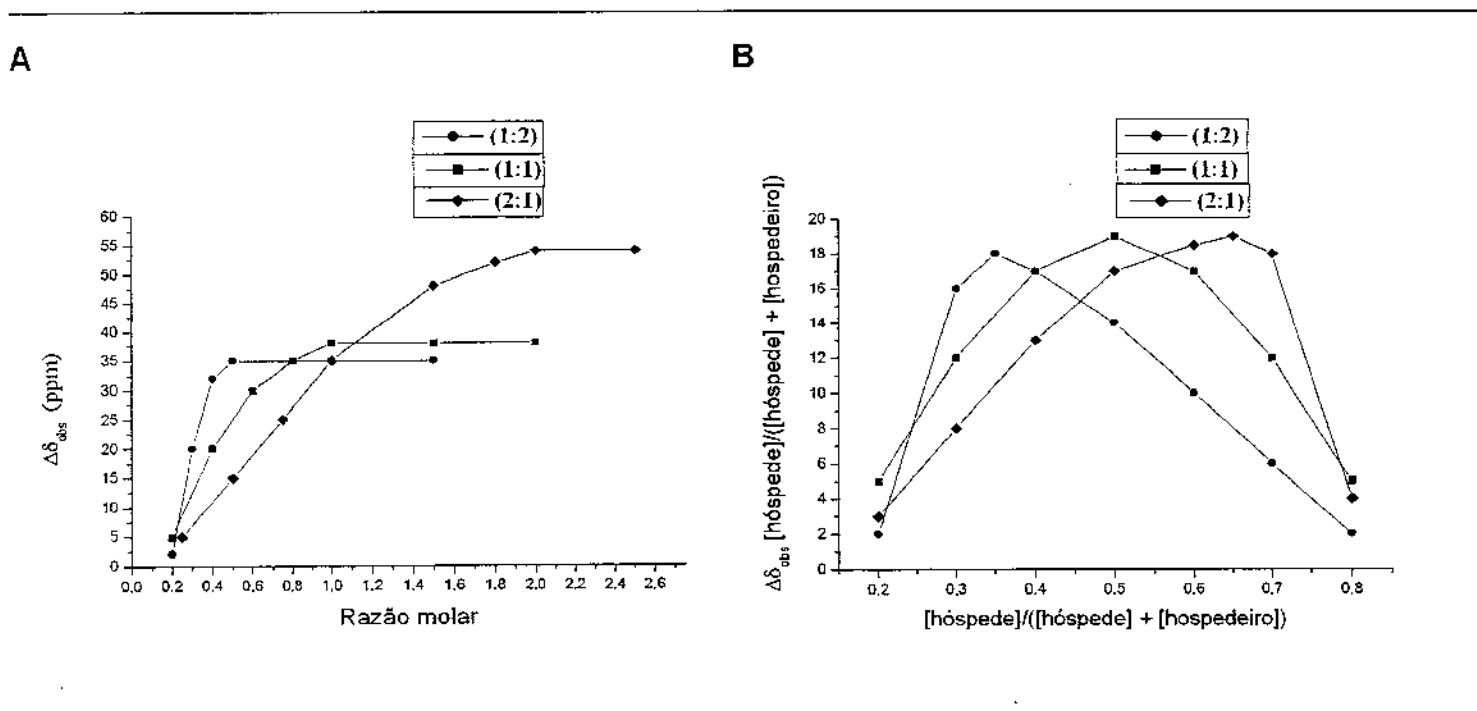


Figura 7 - Titulação por RMN de  $^1\text{H}$ : a) método com variação contínua de um dos componentes e b) método de Job (Adaptado de Laverd, 2001).

### 3.6.3.2. Efeito Overhauser Nuclear (NOE)

Outra metodologia muito empregada no estudo de complexos hóspede-hospedeiro é a análise das interações dipolares através do efeito Overhauser nuclear (NOE). Os experimentos de diferença de NOE, NOESY ou ROESY, aplicados ao estudo de complexos podem revelar uma associação supramolecular. O primeiro requerimento para a observação de um NOE intermolecular entre duas espécies de um complexo é que a concentração da espécie complexada seja suficiente para possibilitar a observação da relaxação cruzada entre os núcleos de interesse durante

o tempo de vida do complexo, uma vez que o NOE é um efeito relativamente pequeno (Mo & Pochapsky, 1997).

Todos os experimentos unidimensionais de RMN foram realizados em espectrômetros Varian Mercury-300 ( $B_0 = 7$  T), operando a 300,069 MHz para  $^1\text{H}$  e pertencente à Universidade de Federal de Viscosa (MG), em colaboração com o Dr. Sérgio Antônio Fernandes.

Amostras do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD, foram analisadas em tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro. O sinal de deutério do solvente ( $\text{D}_2\text{O}$ ) foi utilizado como trava. O pH utilizado para a análise foi 7,4 e a concentração da amostra 15mM. Os espectros foram obtidos a 25° C.

Os experimentos unidimensionais foram adquiridos utilizando “softwares” padrões Varian sob condições típicas, descritas abaixo. Os espectros foram processados nas estações de dados utilizando o programa VNMR do equipamento (Varian, Inc.).

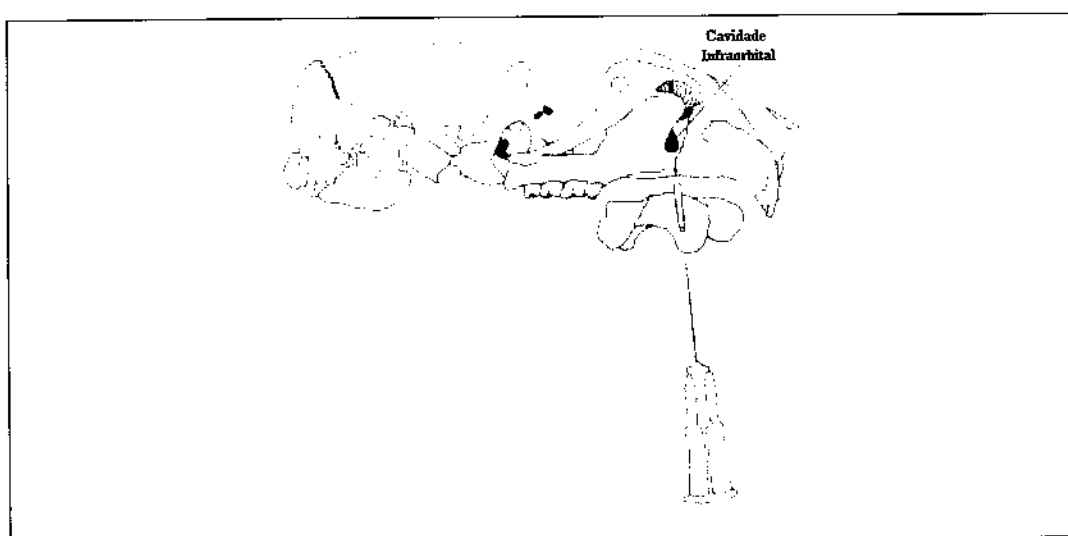
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos com pulsos de 30° (duração do pulso: 2,5–4,0  $\mu\text{s}$ ), janela espectral de 8 kHz (número de pontos 32 K), tempos de aquisição (at) e espera de reciclagem (d1) de 3,0 s e 1,0 s, respectivamente. Foram acumulados cerca de 64–128 transientes e a resolução digital do espectro de 0,5 Hz/ponto. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm, tomando-se como padrão de referência interna a HOD (4,67 ppm).

Os experimentos de 1-D ROESY foram obtidos, com tempo de mistura de 500 ms. Os parâmetros e condições utilizados foram: tempo de aquisição (at) = 3,0 s; largura de varredura (sw) = 4 kHz; número de transientes (nt) = 1024; alargamento de linha (lb) = 3,0 Hz. Os valores do tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) foram calculados e o valor do tempo de espera para reciclagem (d1) empregado foi de 3 x  $T_1$ .

### 3.7. TESTES *IN VIVO*

#### 3.7.1. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL EM RATOS

O efeito anestésico do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD em relação à RVC livre foi avaliado pelo bloqueio do nervo infraorbital em ratos. As preparações anestésicas foram injetadas no forame infraorbital (situado no espaço entre o molar posterior e o incisivo anterior) de um dos lados da face do animal (Figura 8) sendo o outro lado utilizado como controle.



**Figura 8.** Representação esquemática da região do nervo infraorbital e local de injeção das formulações anestésicas em ratos (adaptado de Fink et al., 1975).

O efeito anestésico foi avaliado pela observação da resposta aversiva do animal ao pinçamento do lábio superior, de acordo com os escores: 0 (reação aversiva) ou 1 (ausência de resposta aversiva). Esses valores foram expressos em porcentagem de animais com anestesia (Grant et al., 2004).

As preparações anestésicas foram injetadas após os animais terem sido previamente anestesiados com tiopental intraperitoneal (25 mg/kg). Este nível de sedação não interfere com a resposta aversiva do animal (Cereda et al, 2004).

Cada animal (grupos de n=7 ratos) recebeu 0,1 mL das seguintes preparações:

Grupo 1- RVC livre

Grupo 2 - HP- $\beta$ -CD

Grupo 3 - Complexo RVC: HP- $\beta$ -CD

Grupo 4 – Tampão HEPES 20mM com NaCl 0,9% (pH 7,4).

As concentrações de RVC, utilizadas tanto na forma livre quanto complexada, foram: 0,125, 0,25 e 0,5% (m/v) (4, 8 e 16mM respectivamente).

O lado esquerdo intacto do animal serviu como controle para comparação das respostas entre os dois lados. Os animais foram testados a cada 5 minutos, até que o primeiro sinal de resposta aversiva fosse detectado. A eficácia do bloqueio foi analisada pelo tempo de recuperação e pelo efeito total (estimado pela área sob a curva do efeito x tempo, através do método trapezoidal, utilizando o programa Origin 6.0-Microcal TM Software, Inc. (Cereda et al., 2004)). O experimento foi realizado pelo mesmo observador em todos os tempos e em todos os grupos testados evitando assim, possíveis divergências na determinação da primeira resposta aversiva do animal.

### **3.7.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CARDÍACA**

#### ***3.7.2.1. Avaliação do eletrocardiograma***

O eletrocardiograma é uma das formas de registro da atividade elétrica do coração. Este registro reflete os eventos elétricos do conjunto das células cardíacas, embora para sua compreensão possa ser relacionado à atividade elétrica de uma única célula miocárdica.

A Figura 9 representa o perfil de um eletrocardiograma (ECG) normal humano, mas que também é ilustrativo para o ECG de ratos. Ele consta de um ciclo elétrico

formado pelas ondas: P, segmento PR, complexo QRS, segmento ST e T (Carneiro, 1989). Cada uma destas ondas e segmentos associa-se a um evento cardíaco:

- **Onda P** - Representa a despolarização atrial;
- **Intervalo PR** - Representa o tempo entre o início da despolarização atrial e o início da despolarização ventricular. Inclui a excitação do nódulo átrio-ventricular (AV) antes do fim da onda P, a despolarização do feixe de His, ramos e rede Purkinje; é medido do início da onda P até o início da primeira onda do complexo QRS.
- **Complexo QRS** - Representa a despolarização ventricular;
- **Segmento ST** - Representa o fim da despolarização ventricular;
- **Onda T** - Representa a repolarização ventricular.
- **Intervalo RR** - Intervalo entre duas ondas R consecutivas; determina o ritmo cardíaco;
- **Intervalo QT** - Representa o processo de despolarização e repolarização dos ventrículos.

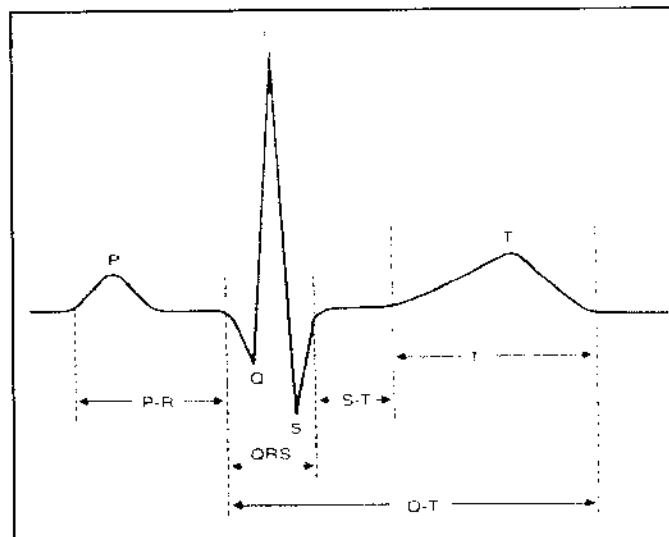


Figura 9. Registro eletrocardiográfico normal (Adaptado de Carneiro, 1989).



O eletrocardiógrafo mede pequenas intensidades de corrente, a partir da diferença de potencial entre dois eletrodos dispostos em determinados pontos do corpo. Esta diferença de potencial gerado é decorrente da atividade cardíaca. Chama-se de derivação, a linha que une esses dois eletrodos (Carneiro, 1989). A derivação não é um fio único conectado ao corpo, mas um circuito completo (Guyton & Hall, 1997).

A disposição dos eletrodos nas três derivações bipolares clássicas obedece a uma convenção estabelecida por Einthoven (Carneiro, 1989; Guyton & Hall, 1997), formando o "triângulo de Einthoven" (Figura 10). Assim, a derivação DI é obtida colocando-se o eletrodo positivo no braço esquerdo e o negativo no braço direito. Para a obtenção da derivação DII, o eletrodo positivo é colocado na perna esquerda e o negativo no braço direito. No registro de DIII, o eletrodo positivo é conectado à perna esquerda e o negativo no braço esquerdo. Estes três pontos formam um circuito. Cada derivação é dividida por uma perpendicular entre uma metade positiva e uma negativa. Assim, quando um vetor, com a origem no centro do triângulo se projetar na metade positiva de uma derivação, ocorrerá uma deflexão positiva e se o vetor se projetar na metade negativa, ocorrerá uma deflexão negativa (Carneiro, 1989).

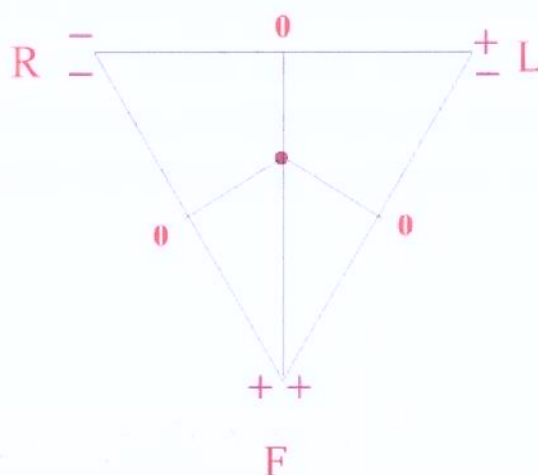


Figura 10. Esquema representativo do triângulo de Einthoven ([www.lrz-muenchen.de/~jmd/entstehung.htm](http://www.lrz-muenchen.de/~jmd/entstehung.htm)).

Este teste foi realizado na Faculdade de Farmácia de Ouro Preto-MG, utilizando a metodologia desenvolvida pela Dra. Andréa Grabe Guimarães. Os animais foram divididos em 4 grupos, que receberam as seguintes preparações:

Grupo 1- RVC livre;

Grupo 2- HP- $\beta$ -CD;

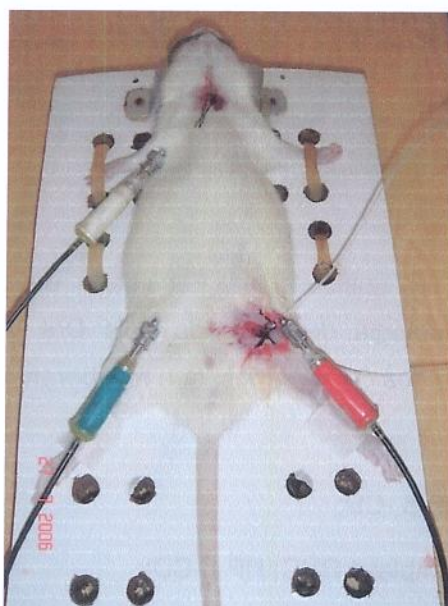
Grupo 3- Complexo RVC: HP- $\beta$ -CD;

Grupo 4- Tampão HEPES 20mM com NaCl 0,9 % (pH 7,4).

Para o procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com pentobarbital (70 mg/kg), por via intraperitoneal. Após a anestesia, os animais foram submetidos ao procedimento de implantação de catéteres intravenoso e intra-arterial (artéria e veia femoral), após tricotomia e traqueostomia. A dose utilizada em cada grupo foi 6mg/Kg.

O sinal de eletrocardiograma (ECG) foi obtido utilizando agulhas hipodérmicas de aço inoxidável como sensores. As agulhas foram inseridas no tecido subcutâneo do membro superior direito e inferior esquerdo (Figura 11). O registro da pressão

arterial foi realizado utilizando-se um transdutor de pressão. Este transdutor foi conectado ao catéter introduzido na artéria femoral do animal. Os sensores de ECG e o transdutor de pressão arterial foram, então, conectados a um sistema condicionador de sinais. Os registros foram realizados antes e depois da injeção da amostra, via catéter intravenoso, em tempos pré-determinados, até 55 min após injeção.



**Figura 11.** Foto do animal, após implantação dos eletrodos.

Dos registros eletrocardiográficos, os seguintes parâmetros foram mensurados: intervalo PR, complexo QRS, intervalo RR e intervalo QT (Figura 9). O intervalo QT foi corrigido (QTc) em função da frequência cardíaca (determinada pelo intervalo RR), através da fórmula Fridericia (Equação 1), adequada para intervalos de RR menores que 0,5s (Abernethy et al., 2001; Shah, 2002):

$$QTc = \frac{QT}{RR^{0,33}} \quad \text{que (1) o valor de QT}$$

pela raiz cúbica do intervalo RR correspondente. Esta correção se faz necessária para que a análise da alteração causada pelos grupos comparados seja feita sem a

influência da alteração provocada pela frequência cardíaca, que pode ocorrer mesmo na ausência de qualquer intervenção (Abernethy, 2001; Shah, 2002,). A frequência cardíaca foi calculada em função de RR.

Foram registrados 544 seguimentos de traçado eletrocardiográfico para os 04 grupos de animais analisados (8 ratos/grupo). Estes seguimentos se assemelham a um ECG clássico, mas apresentam algumas alterações no formato das ondas em virtude dos sinais da diferença de potencial terem sido obtidos em um circuito aberto e não fechado. Feita esta observação é preciso esclarecer ainda que as medidas dos intervalos são válidas e permitem a comparação dos efeitos cardiotoxicos das amostras, uma vez que os registros dos tempos controle (antes da injeção) e após a injeção, para as diferentes amostras, foram feitos com o mesmo sistema de aquisição. Para cada um destes seguimentos, foram medidos os intervalos em 10 ciclos cardíacos. Os valores apresentados representam a média do grupo (n=8) da média dos 10 ciclos cardíacos medidos para cada animal. A análise dos registros foi feita com o auxílio do *software* Win/DATAQ.

### **3.7.2.2. Noções de Eletrofisiologia cardíaca**

Em resposta ao impulso elétrico, canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) voltagem - dependente se abrem, levando a uma entrada de  $\text{Na}^+$  que resulta em despolarização da membrana. Subseqüentemente, há abertura de canais de cálcio voltagem-dependente, nas células do nóculo sinuatrial e atrioventricular, responsável pela fase de platô do potencial de ação. A entrada de cálcio promove a liberação de cálcio intracelular, dos canais do retículo sarcoplasmático que, por sua vez, será responsável pela contração da fibra muscular cardíaca. O potencial de ação termina com a inativação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e entrada de potássio ( $\text{K}^+$ ). Para que o relaxamento possa ocorrer, o  $\text{Ca}^{2+}$  deve ser removido dos sítios de ligação da troponina, permitindo a dissociação da actina e miosina. O  $\text{Ca}^{2+}$  é, então, bombeado para o retículo sarcoplasmático, com gasto de ATP (Groban & Dolinski, 2001).

O potencial de ação cardíaco pode ser dividido em fases, conforme Figura 12 (Carneiro, 1989):

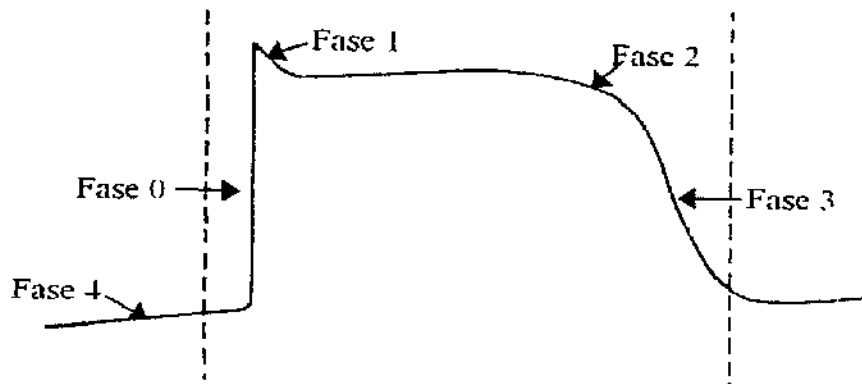
Fase 0 - Gerada pelo influxo rápido de íons  $\text{Na}^+$ . Representa a fase de despolarização, levando à diminuição do potencial (negativo) de repouso da membrana celular.

Fase 1 - Deslocamento da curva em direção à linha de potencial zero; representa a repolarização rápida e precoce, através da diminuição da permeabilidade ao sódio.

Fase 2 - Representa o platô do potencial de ação, através da entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais voltagem-dependente.

Fase 3 - Fase de repolarização, através da abertura dos canais de  $\text{K}^+$ .

Fase 4- Fase de repouso elétrico.



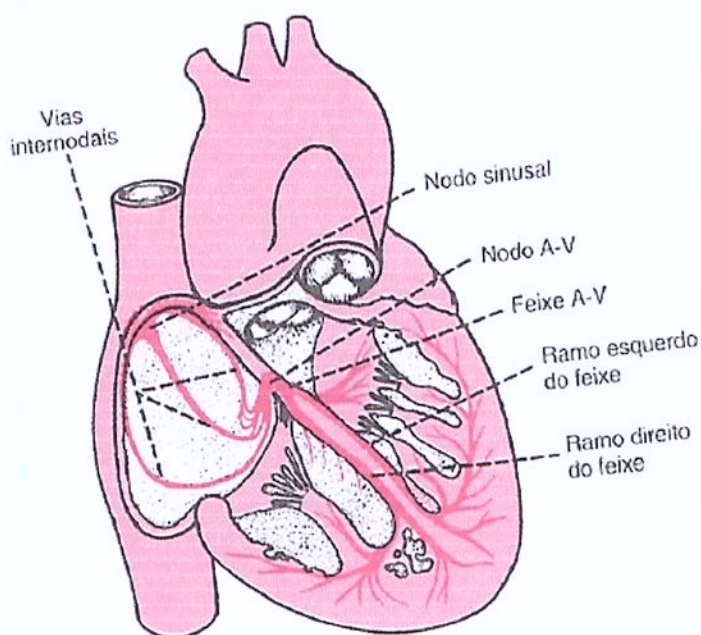
**Figura 12.** Potencial de ação de uma célula miocárdica.

A frequência cardíaca é determinada pelo tempo que as células marcapasso (do nódulo sinusal) ativas requerem desde a despolarização (saída do estado de repouso) até o limiar de descarga de potencial de ação. Este intervalo depende da

despolarização necessária para trazer a membrana ao limiar e a velocidade com que essa despolarização se desenvolve (Guyton & Hall, 1997).

Quando o impulso atinge as fibras musculares juncionais, ligando os átrios aos ventrículos, ocorre uma pausa na condução da excitação. Em grande parte, é no nódulo átrio-ventricular e nas fibras condutoras adjacentes que ocorre este retardo na transmissão (Guyton & Hall, 1997). Este retardo nodal possibilita que a sístole atrial se complete antes que os ventrículos sejam excitados.

A contração do ventrículo é sincronizada através da ativação de todos os elementos contráteis. Devido às extensas ramificações do tecido condutor especializado dentro dos ventrículos, a onda de excitação atinge todas as porções do músculo cardíaco rapidamente. A propagação do estímulo, que tem início no nódulo sinusal localizado no átrio direito, alcança o átrio esquerdo e em seguida o nódulo átrio-ventricular, o feixe de His e seus ramos, a rede de Purkinje e os ventrículos (Figura 13).



**Figura 13.** Nódulo sinusal e o sistema Purkinje do coração, mostrando também o nódulo A-V, as vias internodais atriais e os ramos ventriculares do eixo A-V (Guyton & Hall, 1997).

O registro da atividade elétrica cardíaca (ECG) permite avaliar a fisiologia da contração cardíaca, possibilitando identificar compartimentos ou áreas mais afetadas pela ação de agentes tóxicos, como os anestésicos locais.

### **3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os grupos experimentais da análise do ECG foram comparados por análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) com teste posterior de Tukey-Kramer. A variação do intervalo RR para os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD nos intervalos após a injeção foram comparados pelo Teste t não pareado. Os dados foram apresentados como médias e desvios padrão (SD) dos experimentos realizados. Para a avaliação do bloqueio do nervo infraorbital (ASC, tempo de recuperação) os valores foram expressos em mediana (limites mínimo e máximo) e comparados utilizando-se o teste de Mann – Whitney.

O software utilizado foi o Graph Pad Instat (Graph Pad Software Inc., versão 3.0, 1997 – 1998).

## IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

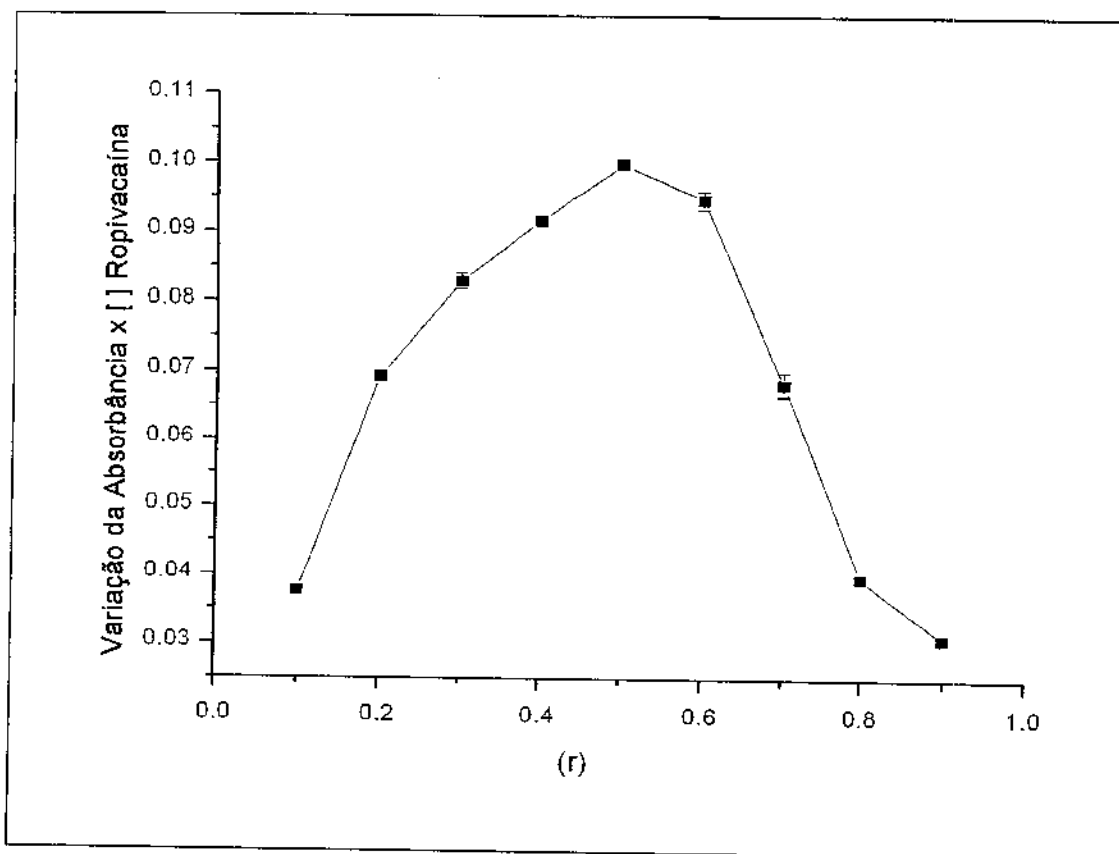
### 4.1. DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA DO COMPLEXO

A análise de mudanças no espectro de absorção UV/VIS é útil para evidenciar a complexação, embora as alterações observadas sejam pequenas. Estas mudanças se devem à perturbação do nível de energia eletrônica da molécula convidada tanto por interações diretas com a cavidade da ciclodextrina, como pela exclusão de moléculas de água de solvatação (Bekers et al., 1991).

A utilização desta técnica, pelo tratamento de *Job*, permitiu a determinação da estequiometria de complexação entre RVC e HP- $\beta$ -CD.

A variação da absorção no UV da RVC foi o parâmetro físico proporcional à concentração do complexo graficado em função de  $r$ , a razão molar de RVC e HP- $\beta$ -CD. A Figura 14 traz os resultados obtidos para a complexação da RVC em HP- $\beta$ -CD. A máxima variação da absorbância foi observada em  $r = 0,5$ , o que evidencia uma estequiometria 1:1 (Connors, 1987).





**Figura 14.** Gráfico de variação contínua (Job plot) do complexo RVC : HP- $\beta$ -CD, por absorção no UV, à 25°C, em água.

## 4.2. CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO

### 4.2.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Os termogramas de DSC da RVC, HP- $\beta$ -CD, mistura física RVC/HP- $\beta$ -CD e do complexo RVC: HP- $\beta$ -CD estão mostrados na Figura 15 .

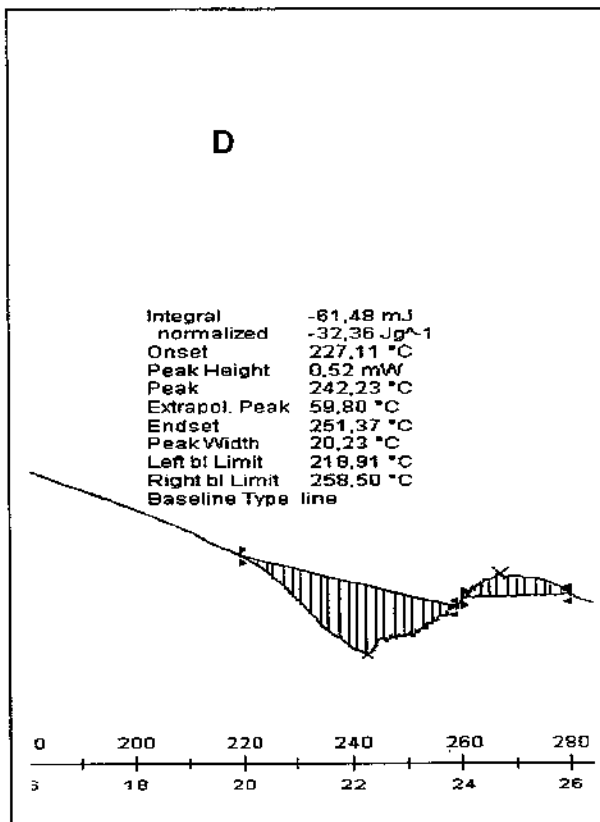
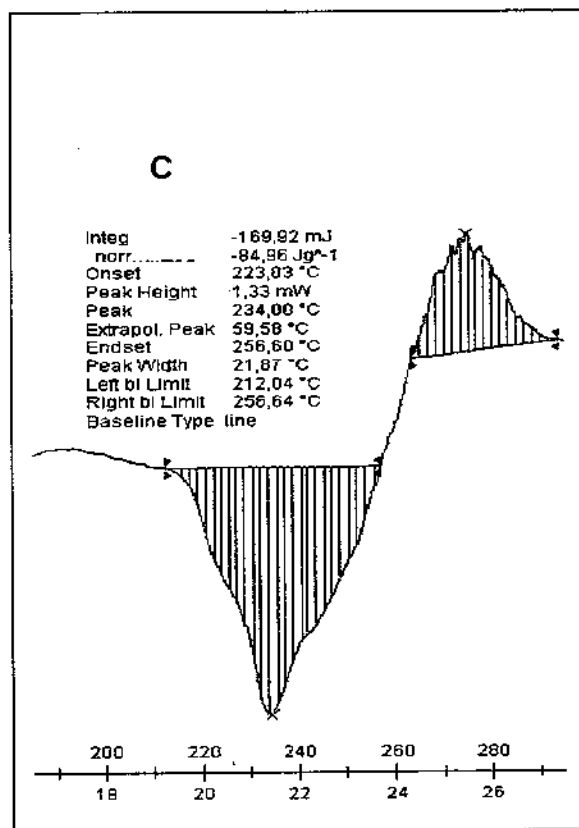
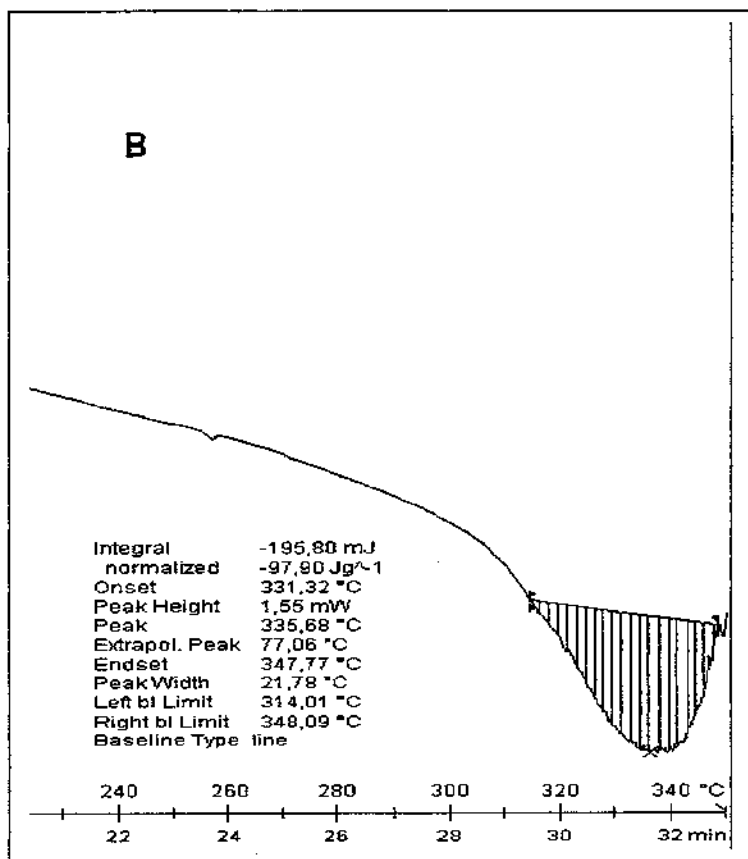
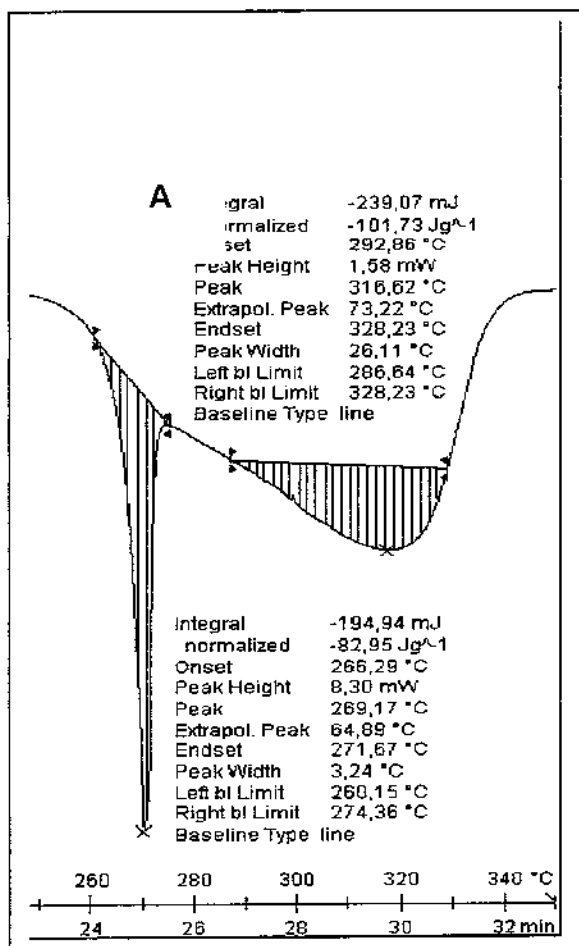


Figura 15. Termogramas de DSC de RVC(A), HP- $\beta$ -CD (B), Mistura-Física RVC/HP- $\beta$ -CD (C) e Complexo RVC:HP- $\beta$ -CD (D).

A **Tabela 4** apresenta os valores de temperatura e variação da entalpia ( $\Delta H$ , J/g) dos picos endotérmicos observados na Figura 15, relativos à fusão da RVC pura (Merck Index) e à fusão e perda de moléculas de água da cavidade da ciclodextrina (Spamer et al., 2002).

**Tabela 4.** Valores de temperatura e variação de Entalpia ( $\Delta H$ ) dos picos observados nos termogramas de DSC para: RVC, HP $\beta$ -CD, mistura física RVC/HP- $\beta$ -CD e complexo sólido RVC:HP- $\beta$ -CD, na razão molar 1:1.

<b>AMOSTRA</b>	<b>TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO</b>	<b><math>\Delta H</math></b>
	<b>DE FASES (°C)</b>	<b>(J/g)</b>
<b>RVC</b>	269,17	82,95
<b>HP<math>\beta</math>-CD</b>	335,68	97,90
<b>Mistura física</b>	234,00	84,86
<b>Complexo RVC<sub>HP<math>\beta</math>-CD</sub></b>	242,23	32,36

A análise dos termogramas revela um pico endotérmico estreito e bem definido da RVC em 269,17°C. A entalpia envolvida ( $\Delta H$ ) foi 82,95 J/g. Já a HP- $\beta$ -CD apresentou um pico de transição alargado em 335,68°C, de acordo com dados da literatura (Spamer et al., 2002; Araújo, 2005). Tanto as amostras de RVC como as de HP- $\beta$ -CD foram submetidas às mesmas condições de processamento, em Spray-dryer e também foram utilizadas no preparo da mistura física.

A mistura física apresentou um pico endotérmico deslocado, em 234°C, com um  $\Delta H$  igual a 84,96 J/g. Este pico é alargado e se estende de 223 a 256,6°C. De acordo com dados já obtidos para esta mistura física (Araújo, 2005), este pico se refere à dessolvatação da cavidade da ciclodextrina e à fusão, mas se encontra deslocado (em relação ao da ciclodextrina pura). A  $\Delta H$  envolvida foi 84,96 J/g, próxima aos valores de  $\Delta H$  da RVC e HP - $\beta$ -CD puras.

O termograma do complexo apresentou um pico em 242,23°C, que se refere à dessolvatação da cavidade da ciclodextrina e à fusão. A variação da entalpia foi 32,36 J/g, i.e., bem menor a que a entalpia envolvida nas transições das demais substâncias estudadas. Embora o termograma da mistura física não tenha revelado o pico de transição da RVC, a entalpia envolvida ainda se mantém alta em relação a RVC pura, diferentemente do complexo, que tem sua entalpia bem menor, mostrando que a complexação favorece a dessolvatação da cavidade da CD.

Estes resultados fornecem evidências da formação do complexo de inclusão entre RVC e HP-β-CD.

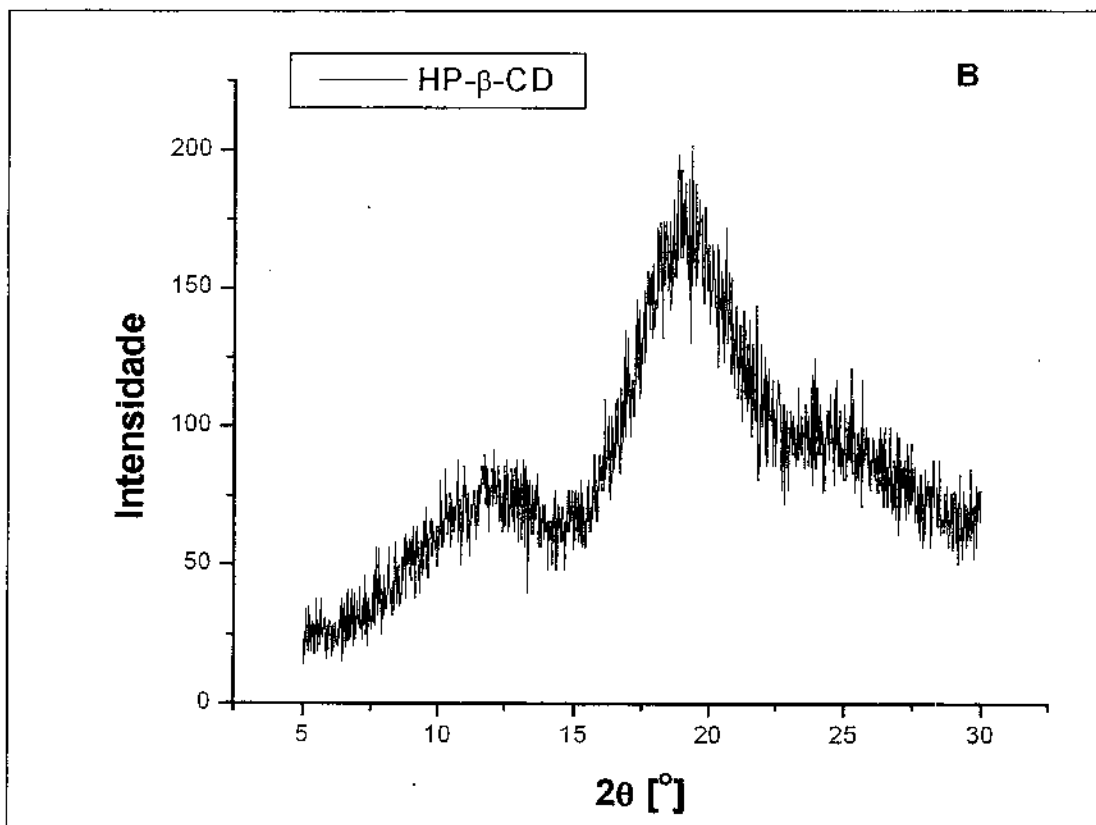
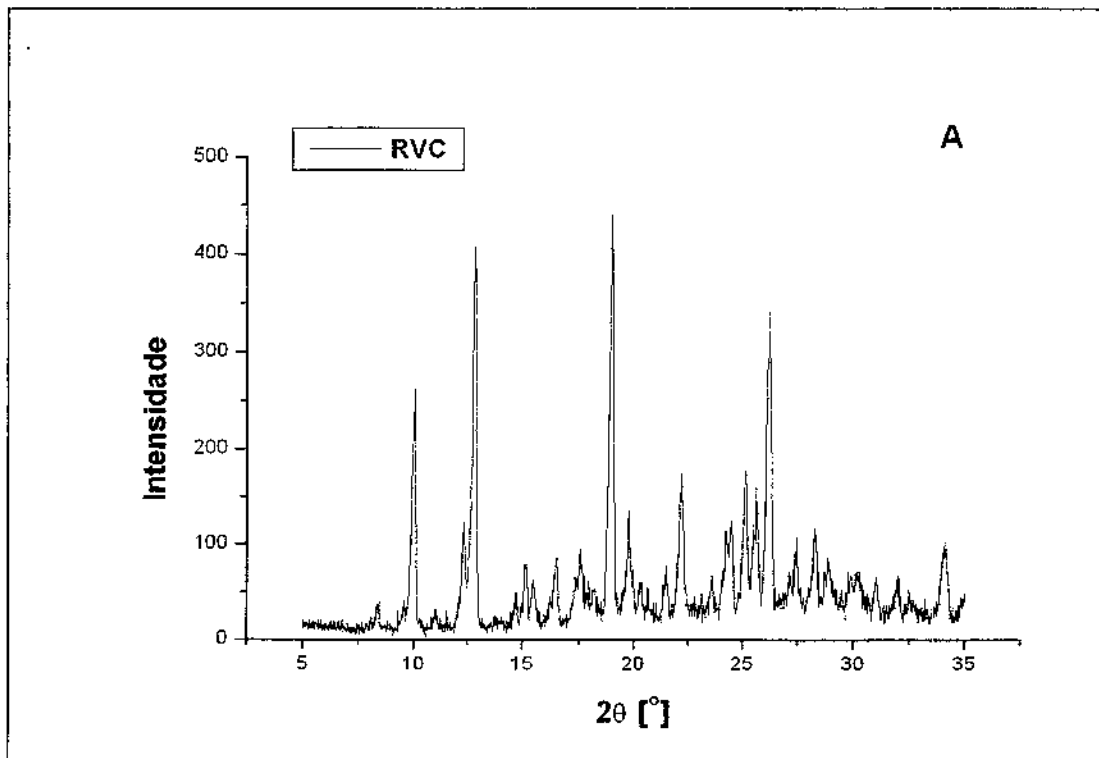
#### 4.2.2. Difração de Raios X

Os difratogramas obtidos para a RVC, HP-β-CD, mistura física RVC/HP-β-CD e complexo RVC:HP-β-CD são mostrados na Figura 16. A mudança no padrão de difração do complexo de inclusão em relação às moléculas puras permite evidenciar a formação do complexo (Bekers et al., 1991).

A Figura 16 A mostra o difratograma da RVC pura. O padrão de difração observado revelou a estrutura cristalina do sal anestésico, com picos estreitos e bem definidos. Já a Figura 16 B, que traz o difratograma da HP-β-CD, revelou o um padrão típico de substância amorfa, e está de acordo com os resultados descritos na literatura para a hidroxipropil-β-CD (Spamer et al., 2002).

A Figura 16 C, que representa o difratograma da mistura física RVC/HP-β-CD, mostrou que a mistura guarda características das substâncias isoladas, isto é o caráter amorfo da ciclodextrina mas também a cristalinidade da RVC (os quatro principais picos da RVC ainda podem ser observados).

Já a Figura 16 D traz o difratograma do complexo RVC/HP-β-CD. O que se observou são as características amorfas da ciclodextrina, sem a característica cristalinidade da RVC. Este perfil difere bastante do perfil da mistura física, que mantém as características dos dois componentes ali presentes. A perda do padrão de cristalinidade evidencia a complexação (William et al., 1998), confirmando os resultados encontrados por calorimetria diferencial de varredura.



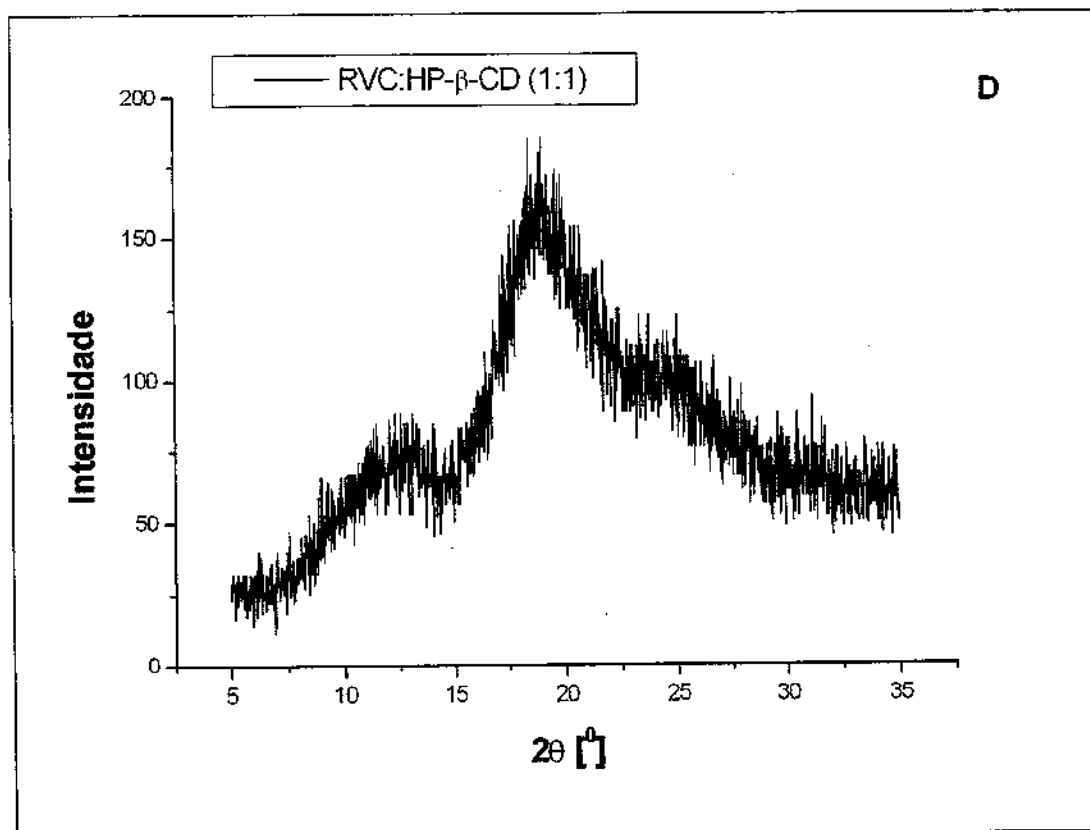
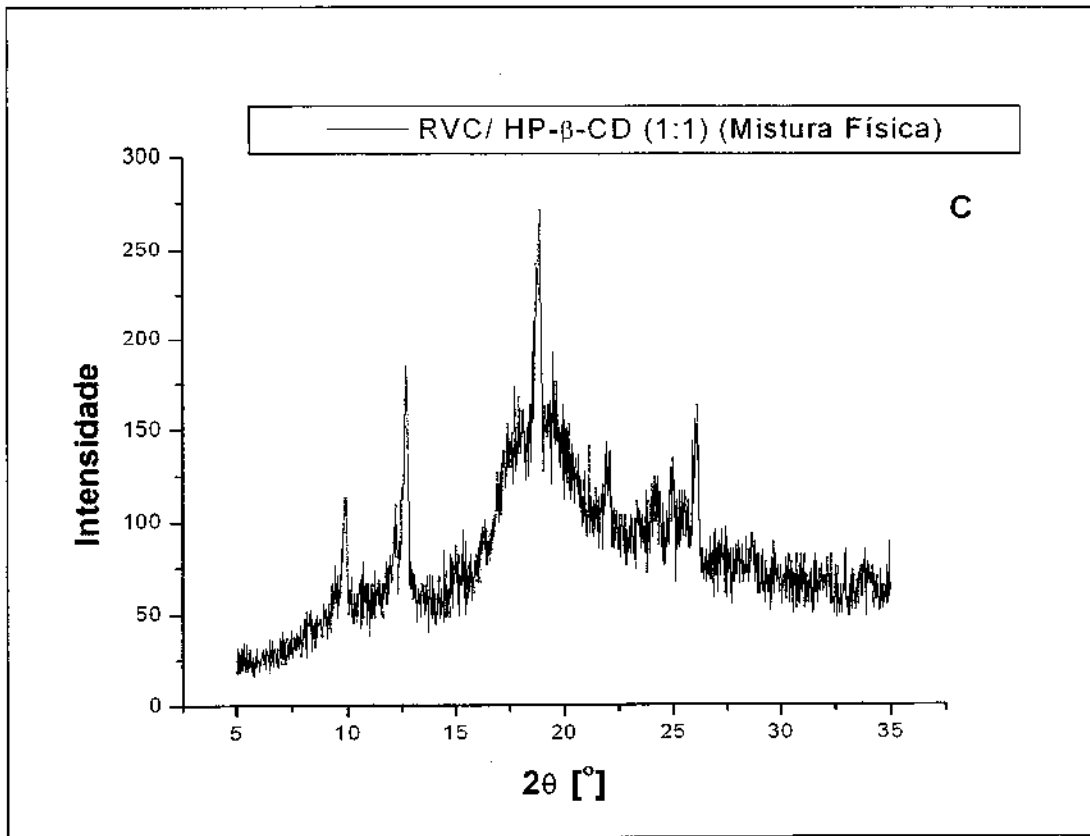


Figura 16. Difratoigramas de Raios X de RVC (A), HP- $\beta$ -CD (B), Mistura física RVC/HP- $\beta$ -CD (C) e Complexo RVC:HP- $\beta$ -CD.

### 4.2.3. ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

#### 4.2.3.1. Titulação por RMN

Os resultados obtidos com a titulação por RMN, confirmam a estequiometria 1:1 na formação do complexo entre RVC e HP- $\beta$ -CD, determinada também através da espectrofotometria por absorvância apresentada no item 4.1. O gráfico obtido está representado na Figura 17. Nele pode-se observar que o valor máximo obtido na variação do deslocamento químico ( $\Delta\delta_{obs}$ ) foi obtido com  $r=0,5$ , evidenciando a complexação na razão molar 1:1, o que seria esperado, considerando-se as estruturas da RVC e da HP- $\beta$ -CD. A literatura mostra, inclusive, a utilização desta mesma proporção molar 1:1 para a bupivacaína (anestésico com estrutura semelhante a RVC-Tabela 2) em ensaios de caracterização físico-química do complexo de bupivacaína em HP- $\beta$ -CD (Dollo et al., 1996a).

O valor da constante de associação ( $K_c$ ), calculado a partir deste experimento, através da regressão não-linear dos valores de deslocamento químico, foi  $80 \text{ M}^{-1}$ . Este valor indica uma associação estável (Tommasini et al., 2004) e está de acordo com dados de literatura (Dollo et al., 1996a, b). Em nosso laboratório determinamos por HPLC um valor de  $K_c = 36 \text{ M}^{-1}$  para a associação da Lidocaína – um anestésico menos hidrofóbico que a RVC - com HP- $\beta$ -CD em pH 10,5 (Moraes et al, 2007). Dollo e col. (1996b) determinou valores da constante de associação de alguns anestésicos em HP- $\beta$ -CD (lidocaína, mepivacaína e bupivacaína), em água, a  $25^\circ\text{C}$ , sendo o valor de  $K_c$  encontrado para a bupivacaína em HP- $\beta$ -CD igual a  $95 \text{ M}^{-1}$ . A bupivacaína possui estrutura semelhante à da RVC (Tabela 2) mas é também mais hidrofóbica que esta (como demonstrado pelos valores de coeficiente de partição membrana/água-Tabela 1), justificando, assim, um valor mais baixo da constante de associação da RVC com HP- $\beta$ -CD, em relação à Bupivacaína. A lidocaína e mepivacaína, anestésicos menos hidrofóbicos que a RVC, apresentaram valores

mais baixos de  $K_c$ , sendo estes iguais a 19,9 e 38  $M^{-1}$  respectivamente (Dollo et al., 1996b).

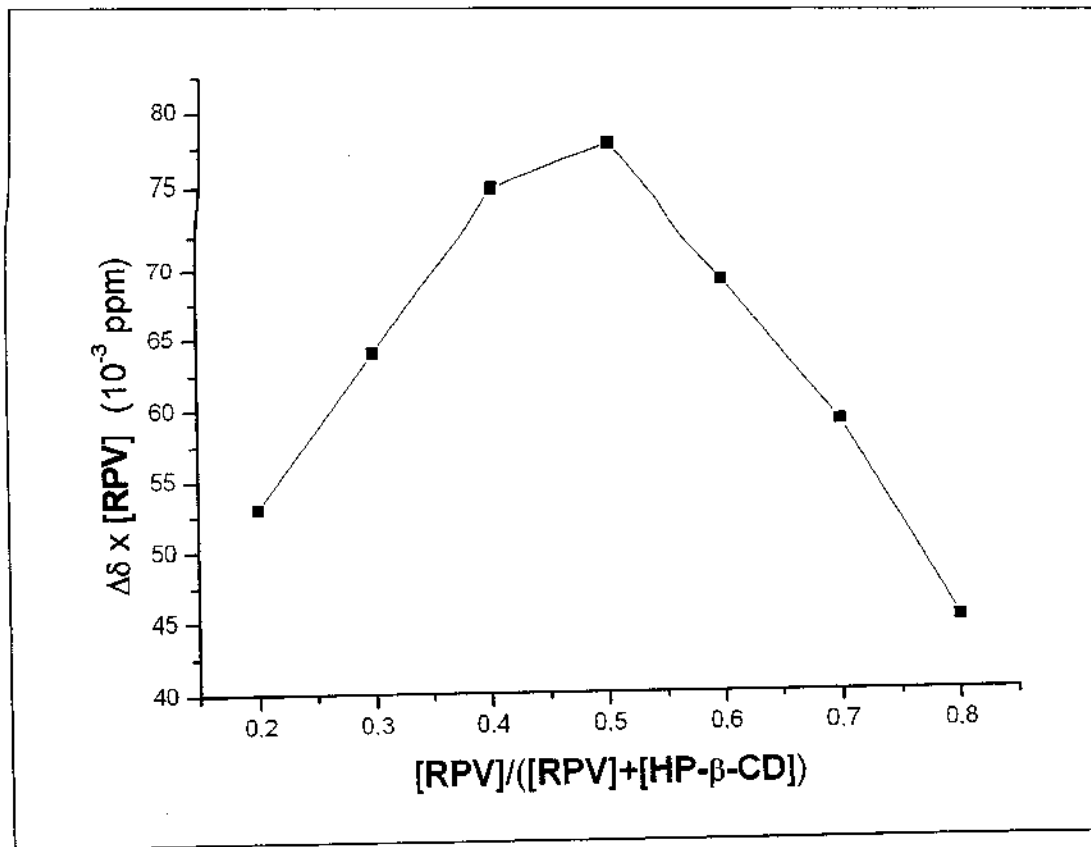


Figura 17. Gráfico de variação contínua (Job plot) do complexo RVC : HP- $\beta$ -CD, por RMN, à 25°C, pH 7,4.

#### 4.2.3.2. Efeito Overhauser Nuclear (NOE)

Os espectros obtidos nos experimentos de NOE revelaram detalhes moleculares da complexação, já evidenciada pelas técnicas descritas, pois permitiram obter informações sobre a proximidade espacial entre a molécula da RVC e a da HP- $\beta$ -CD. O efeito NOE é observado quando um determinado sinal de energia é saturado e os núcleos que interagem espacialmente com o spin nuclear saturado sofrem alterações de intensidade em seus picos, de acordo com a proximidade espacial com o núcleo saturado (Gil & Gerald, 1987). Em relação à



interação intermolecular (ciclodextrina-anestésico), a modificação de sinal(is) de RMN de hidrogênios pertencente(s) à HP- $\beta$ -CD e causada pela saturação específica de hidrogênios pertencentes à Ropivacaína, ou vice-versa, comprova a proximidade destes hidrogênios no complexo, permitindo avaliar a porção da molécula do fármaco envolvida na complexação. Pelos espectros obtidos (Figuras 18 e 19, A e B), pôde-se verificar que a porção aromática da RVC é a porção inserida na cavidade da HP- $\beta$ -CD, na complexação. A Figura 20 faz a representação esquemática da provável posição da RVC em relação à HP- $\beta$ -CD no complexo, revelada pela interpretação dos espectros (Figuras 18 e 19). A Figura 18 A mostra o espectro do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD, com a atribuição dos hidrogênios da HP- $\beta$ -CD, e dos sinais relativos aos hidrogênios do anel aromático e da metila orto-aromática da molécula de RVC. A atribuição do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da HP- $\beta$ -CD em meio aquoso é encontrada na literatura (Nalluri et al., 2005; NaKim et al., 2004). A Figura 18 B mostra o espectro com o sinal dos prótons do anel aromático da RVC irradiado, detectando-se as interações encontradas com esta irradiação seletiva dos hidrogênios aromáticos. Com esta irradiação, verifica-se uma correlação com os hidrogênios H5 da cavidade da HP- $\beta$ -CD. Também são observadas interações com os hidrogênios H2 e H4, mas provavelmente, esta é uma "falsa correlação" com estes hidrogênios da HP- $\beta$ -CD, uma vez que sinais da RVC podem estar sobrepostos ao da HP- $\beta$ -CD.

A Figura 19 A, mostra o espectro do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD, idêntico ao da Figura 18 A. A Figura 19 B apresenta o espectro com a irradiação seletiva dos hidrogênios da metila orto-aromática da RVC. Esta irradiação seletiva mostra a interação com os hidrogênios H3 e H5 da ciclodextrina, mostrando que a metila orto-aromática está inserida na cavidade da HP- $\beta$ -CD.

A representação esquemática da geometria proposta está na Figura 20.

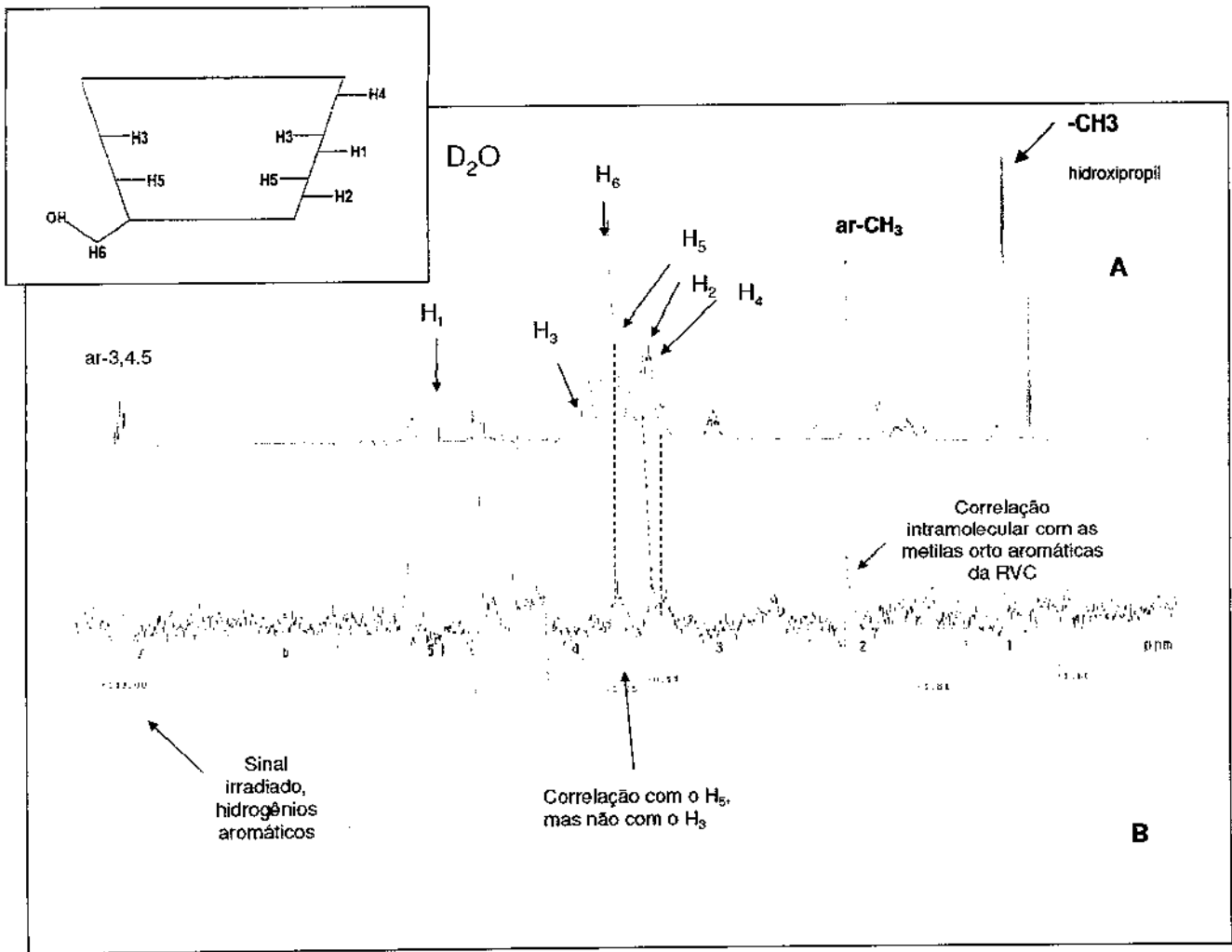


Figura 18. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do complexo RVC:HP-β-CD (A). Efeito NOE após irradiação seletiva do anel aromático da RVC (B). No detalhe: representação esquemática dos hidrogênios da ciclodextrina.

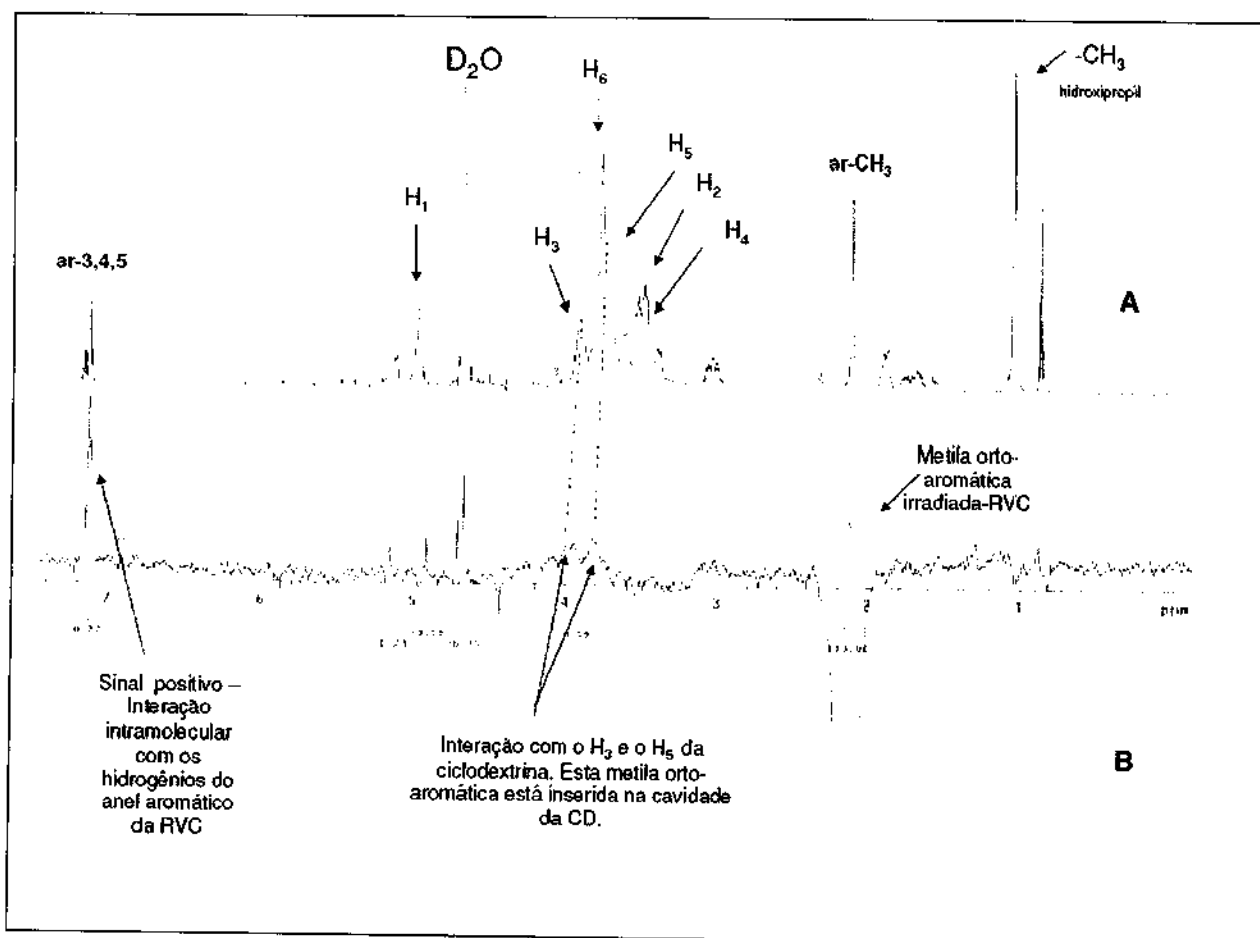
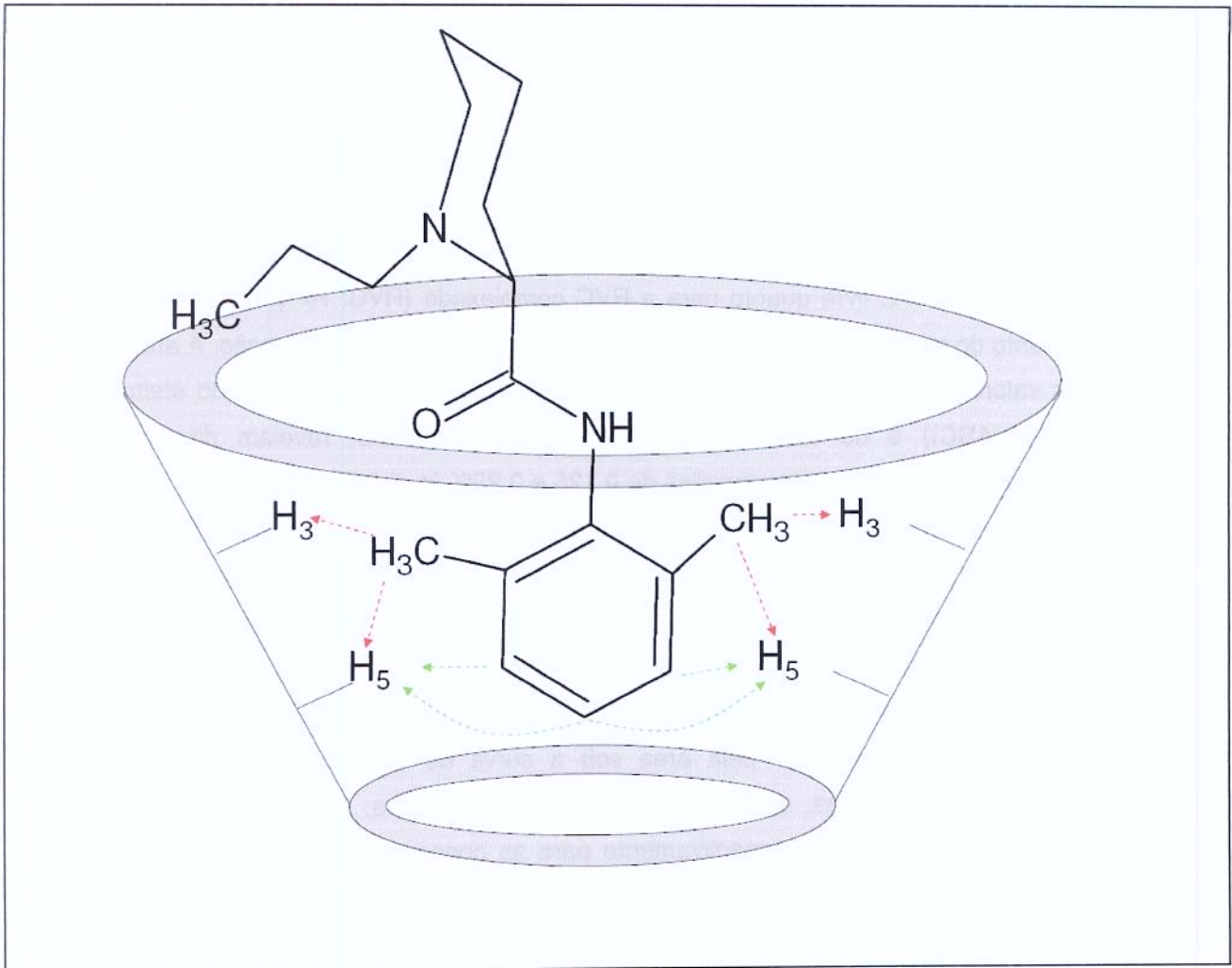


Figura 19. Espectro de  $^1H$ -RMN do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD (A). Efeito NOE após irradiação seletiva dos hidrogênios da metila orto-aromática da RVC (B).



**Figura 20.** Representação esquemática da inserção proposta para a RVC na cavidade da HP- $\beta$ -CD, no complexo 1:1 formado.

### 4.3. TESTES *IN VIVO*

#### 4.3.1. AVALIAÇÃO BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL EM RATOS

O efeito anestésico de soluções de RVC e do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD foi avaliado pelo bloqueio do nervo infraorbital. Foram administradas doses iguais à concentração clínica (0,5% (m/v)-16mM), bem como doses sub-clínicas de 0,125%, 0,25% (m/v)(4 e 8 mM respectivamente) tanto da RVC livre quanto do complexo. Esses resultados estão ilustrados na Figura 21 e Tabela 5. A HP- $\beta$ -CD e o tampão

HEPES também foram administrados, não sendo observado nenhum efeito anestésico (dados não mostrados).

Os dados mostram que o bloqueio do nervo infraorbital foi dose-dependente, tanto para a RVC livre quanto para a RVC complexada (RVC: HP- $\beta$ -CD), havendo aumento do bloqueio do nervo infraorbital com o aumento da concentração. A análise dos valores de efeito anestésico total (estimado pela área sob a curva do efeito x tempo (ASC)) e do tempo de recuperação para a RVC, revelam diferenças significativas entre as concentrações de 0,125 e 0,25% ( $p < 0,01$ ), e entre 0,25 e 0,5% , bem como entre 0,125 e 0,5% ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma, para a RVC:HP- $\beta$ -CD, foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações 0,125 e 0,25%; 0,25 e 0,5% e 0,125 e 0,5% ( $p < 0,001$ ), tanto para o efeito total quanto para o tempo de recuperação.

Os dados revelam que a utilização do complexo levou a um aumento de efeito anestésico total (estimado pela área sob a curva do efeito x tempo) nas três concentrações testadas, em comparação com a RVC pura. Este aumento foi de 54,5%, 53,3% e 20,0%, respectivamente para as concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5% ( $p < 0,001$ ).

Analisando-se o tempo de recuperação dos animais, a complexação mostra um aumento de 42,9%, 44,4% e 18,8%, respectivamente, às concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5%, quando comparado com a RVC pura ( $p < 0,001$ ).

É interessante notar que para a pré-formulação complexada de 0,125%, o complexo mostrou um efeito anestésico maior que a solução de RVC 0,25% ( $p < 0,01$ ), isto é, um efeito anestésico maior foi obtido com o complexo contendo metade da concentração da RVC pura. Este fato é de extrema importância clínica, uma vez que a possibilidade de se obter o mesmo efeito com uma menor dose, traz maior segurança ao procedimento anestésico.

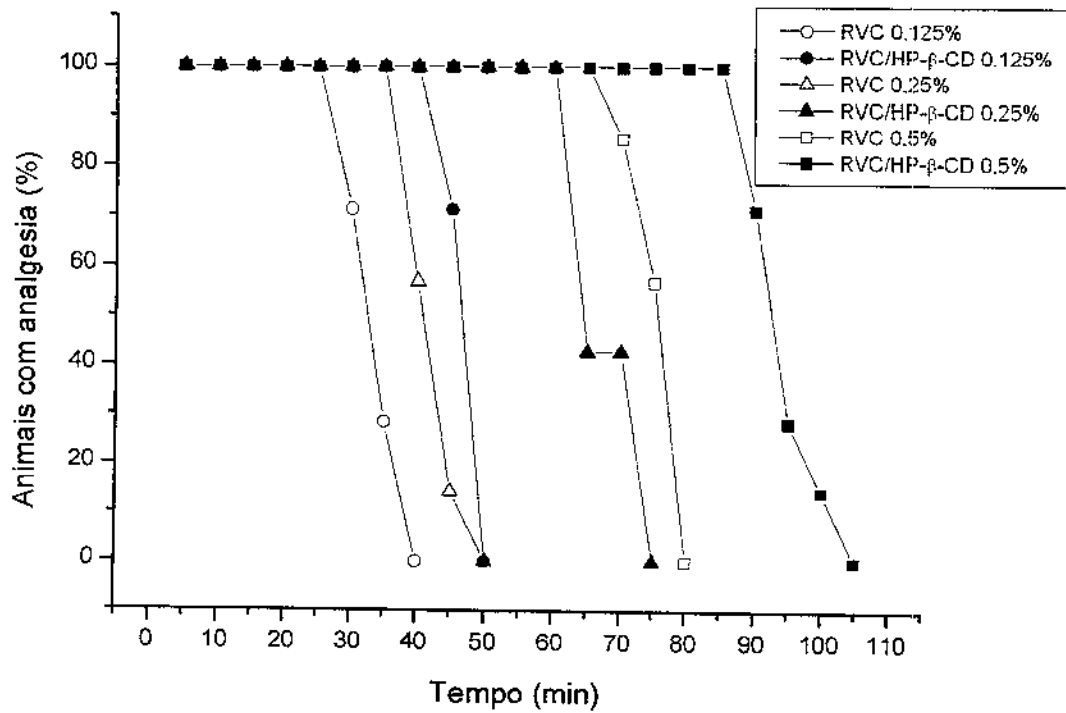
Finalmente, o efeito observado com o complexo RVC:HP- $\beta$ -CD a 0,5% ultrapassou 100 min de anestesia, o que se verifica no gráfico da porcentagem de animais anestesiados (Figura 21). Isto representa um aumento de 31% em relação a RVC 0,5% livre, e aproxima o efeito do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD ao da bupivacaína, um AL mais potente que a RVC, mas também mais tóxico. Vários trabalhos na

literatura comprovam o efeito anestésico de maior duração da BVC, quando comparada à RVC, nas mesmas concentrações (McClure, 1996; McNamee et al., 2002; Casaty & Putzu, 2005). Em nosso grupo de pesquisa (Araújo, 2005) mostramos que, no bloqueio sensorial do nervo ciático de ratos - analisado através do teste de Pressão na Pata, o tempo de duração da anestesia foi cerca de 20% maior quando foi administrada BVC a 0,5% que com RVC 0,5%.

O maior efeito anestésico observado para o complexo, em relação ao efeito total e tempo de recuperação, pode ser atribuído à maior disponibilidade do fármaco no local de ação, principalmente evidenciado nas doses sub-clínicas (0,125 e 0,25%). Esta maior disponibilidade se relaciona com uma maior solubilidade aquosa conferida à RVC pela complexação com a HP- $\beta$ -CD, pois o complexo formado é mais hidrofílico que a RVC pura. De fato, resultados anteriores de nosso laboratório demonstraram aumento linear da solubilidade da RVC em função das concentrações crescentes de HP $\beta$ -CD (Araújo, 2005).

Desta forma, a RVC se torna mais disponível ao local de ação justificando, assim, seu maior efeito. Na concentração clínica, o aumento do efeito pela complexação é menor, talvez porque a concentração aplicada já esteja próxima ao efeito máximo (para a RVC livre) e esta maior disponibilização do fármaco já não cause resposta tão evidente neste tipo de aplicação anestésica, em que o local de injeção é bem próximo do nervo.

O teste de bloqueio do nervo infraorbital já foi bastante empregado para avaliar soluções anestésicas puras (Fink et al., 1975; Ready & Fink, 1980) e também complexadas (Hassan et al., 1985 a,b, Cereda et al., 2004, 2006) e se mostrou adequado para a avaliação desta pré-formulação. Através deste teste, pode-se perceber que a complexação com a HP- $\beta$ -CD é uma alternativa para o desenvolvimento de formulações anestésicas de RVC: 1) empregando doses sub-clínicas (0,25%) mas equipotentes à RVC comercial e diminuindo, assim, o efeito cardiotoxíco associado ao anestésico; 2) empregando doses clínicas (0,5%) mas atingindo efeito comparável ao da BVC livre a 0,5%, podendo substituir este anestésico em anestésias de longa duração, com menor toxicidade ao SCV e SNC.



**Figura 21.** Teste de bloqueio do nervo infraorbital. Porcentagem de animais com analgesia x tempo no bloqueio do nervo infraorbital induzido pelas formulações de RVC livre e complexadas nas concentrações de 0,125 %, 0,25 % e 0,5 % (n=7).

**Tabela 5.** Tempo de recuperação e efeito total do bloqueio sensorial (ASC) induzido pelas formulações de RVC livre e complexada em HP- $\beta$ -CD durante o bloqueio do nervo infraorbital em ratos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 7/grupo). a. Comparação em relação a concentração de 0,125%; b. Comparação em relação a concentração de 0,25% c. Comparação entre RVC e RVC-HP- $\beta$ -CD. \*\*p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. Testes de Mann – Whitney.

Grupos	Concentração (%)	Tempo de recuperação (min)	ASC (escore/min)
RVC	0,125	35,0 (30,0-40,0)	27,5 (22,5-32,5)
	0,25	45,0 (40,0-50,0) <sup>a**</sup>	37,5 (32,5-42,5) <sup>a**</sup>
	0,5	80,0 (70,0-80,0) <sup>a,b***</sup>	72,5 (62,5-72,5) <sup>a,b***</sup>
RVC:HP- $\beta$ -CD	0,125	50,0 (45,0-50,0) <sup>c***</sup>	42,5 (37,5-42,5) <sup>c***</sup>
	0,25	65,0 (65,0-75,0) <sup>a,c***</sup>	57,5 (57,5-67,5) <sup>a,c***</sup>
	0,5	95,0 (90,0-105,0) <sup>a,b,c***</sup>	87,5 (82,5-97,5) <sup>a,b,c***</sup>

#### 4.3.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CARDÍACA

##### 4.3.2.1. Traçados Eletrocardiográficos

Os valores absolutos obtidos dos intervalos PR, complexo QRS, intervalos RR, da frequência cardíaca, dos intervalos QT e QTc, além das pressões PAS e PAD, em diferentes tempos, antes (tempo zero) e após a injeção das amostras estão mostrados nos Anexos de 1 a 8, respectivamente. O tempo anotado como de "injeção" corresponde aos segundos decorridos imediatamente após a injeção de



cada amostra (Tampão HEPES 20mM, pH 7,4 ou HP- $\beta$ -CD ou RVC ou complexo RVC:HP- $\beta$ -CD). Para este tempo de “injeção” as medidas de PR, complexo QRS, intervalos QT e QTc foram feitas apenas para os animais dos grupos controle (tampão e HP- $\beta$ -CD), uma vez que nos grupos da RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD a alteração das ondas, decorrente dos bloqueios cardíacos induzidos impossibilitou as medidas dos parâmetros elétricos. Note-se que a primeira medida obtida após o tempo de injeção ocorre em 7,5 minutos, incluindo neste tempo 5 minutos registrados após a injeção mais o intervalo de 2,5 minutos para o próximo registro.

A **Tabela 6** reúne os dados de variação percentual daqueles valores absolutos, nos tempos principais: 7,5, 10, 20, 30, 40 e 55 min após injeção, em relação ao tempo zero (antes da injeção), para os intervalos: PR, complexo QRS, RR e para a frequência cardíaca (FC). Da mesma forma, a variação percentual dos intervalos QT e QTc estão na **Tabela 7** enquanto a variação percentual dos valores de pressão (PAS e PAD) causada pela injeção das soluções é apresentada na **Tabela 8**.

Para o **intervalo PR**, que se relaciona à despolarização atrial (Figura 9) a análise dos dados do Anexo I e da Tabela 6 revela que houve um aumento gradativo de PR em função do tempo (7,5 a 55 min), em todos os grupos de animais estudados, mas que não ultrapassou 25% em nenhum dos grupos, em qualquer tempo avaliado (Tabela 6). Estas diferenças, detectadas dentro de cada grupo entre os tempos antes e após a injeção foram significativas em todos os tempos após a injeção, em relação ao tempo zero ( $p < 0,001$ ) para os grupos HP- $\beta$ -CD, RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD e somente após 30 min em relação ao tempo zero ( $p < 0,01$  para 30 min e  $p < 0,001$  de 35 a 55 min), para o grupo Tampão (Anexo I).

Não houve diferença significativa na variação percentual dos intervalos PR entre os grupos tratados: RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD, em nenhum dos tempos analisados. Diferenças significativas da variação percentual (Tabela 6) foram encontradas somente entre os grupos RVC e Tampão ( $p < 0,001$  nos tempos iniciais - 7,5 e 10 min - após a injeção) e RVC e HP- $\beta$ -CD ( $p < 0,01$  para o tempo 7,5 e  $p < 0,001$  para o tempo 10 min). Para o grupo de animais que recebeu o complexo RVC:HP- $\beta$ -CD

foram encontradas diferenças significativas na variação percentual de PR em relação ao Tampão - com exceção do tempo de 55 min - e em relação ao grupo HP-β-CD, em todos os tempos registrados ( $p < 0,001$  nos tempos 7,5, 10 e 20 min;  $p < 0,01$  para os tempos de 30 e 40 min e  $p < 0,05$  para 55 min).

Os **dados de QRS** (Anexo II) também revelam um aumento neste intervalo relacionado à despolarização ventricular, em função do tempo decorrido após a injeção. A variação, porém, é pequena e não ultrapassa 9% em nenhum dos grupos (Tabela 6). Diferenças significativas entre os valores absolutos (Anexo II) foram obtidas antes e após a injeção para o grupo RVC, apenas nos tempos 7,5 e 10 min ( $p < 0,001$  para 7,5 e 0,05 para 10 min) e também para o controle HP-β-CD, a partir de 25 min após a injeção ( $p < 0,05$ ). A alteração observada no grupo RVC:HP-β-CD nos diferentes tempos não revela diferenças significativas em relação ao tempo zero (antes da injeção), da mesma forma que o grupo controle (Tampão).

Em relação à variação percentual dos valores do complexo QRS (Tabela 6), não foram registradas diferenças significativas entre os grupos RVC e RVC:HP-β-CD. Diferenças na variação de QRS para os grupos RVC e RVC:HP-β-CD em relação aos grupos controle foram obtidas em tempos isolados, sendo encontradas diferenças significativas entre a RVC e Tampão e entre RVC e HP-β-CD no tempo inicial (7,5 min após a injeção,  $p < 0,001$ ). Para o complexo RVC: HP-β-CD, a diferença significativa observada foi em relação ao Tampão apenas no tempo 40 min ( $p < 0,05$ ).

A análise dos dados referentes ao **intervalo RR** revela um aumento, em relação ao tempo inicial, com o passar dos minutos após a injeção (Anexo III e Tabela 6). Como o RR mede o intervalo entre duas ondas R consecutivas, estes dados permitem determinar a **frequência cardíaca (FC)**, expressa em batimentos por minuto (bpm) (Anexo IV e Tabela 6). Com o aumento do RR em função do tempo, a frequência cardíaca conseqüentemente encontra-se diminuída com o passar dos minutos após a injeção. Aumentos significativos nos valores absolutos de RR (Anexo III) nos tempos antes e após a injeção foram obtidos à partir de 7,5 min após a injeção para os grupos RVC ( $p < 0,001$ ) e HP-β-CD ( $p < 0,05$  para 7,5 min,

$p < 0,01$  de 10 a 15 min e  $p < 0,001$  após de 15 min) e para o grupo Tampão a partir de 20 min ( $p < 0,05$  em 20 min,  $p < 0,01$  em 25 min e  $p < 0,001$  após 30 min). Diferenças significativas nos valores absolutos da frequência cardíaca (Anexo IV) nos tempos antes e após a injeção foram obtidas à partir de 7,5 min após a injeção para os grupos RVC ( $p < 0,01$  para 20min e  $p < 0,001$  para os demais tempos) e RVC:HP- $\beta$ -CD ( $p < 0,001$ ) e também para os grupos Tampão à partir de 12,5 min ( $p < 0,05$  em 12,5 min,  $p < 0,01$  em 15 min e  $p < 0,001$  após 20 min), e HP- $\beta$ -CD a partir de 10 minutos ( $p < 0,01$  em 10 min e  $p < 0,001$  para os demais tempos).

Esta diminuição na frequência cardíaca chega ao valor máximo de 23,28% (correspondente a um aumento de RR de 31,40%) (Tabela 6) com o grupo que recebeu RVC:HP- $\beta$ -CD, após 55 min. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD. Diferenças estatísticas significativas em relação a frequência cardíaca foram obtidas entre os grupos RVC e Tampão (7,5 min,  $p < 0,01$ ) e entre RVC e HP- $\beta$ -CD (nos tempos iniciais de 7,5 min,  $p < 0,01$ , e 10min,  $p < 0,05$ ). Também foram observadas diferenças entre os grupos RVC:HP- $\beta$ -CD e Tampão (nos tempos 7,5min,  $p < 0,01$ , 10 e 30 min,  $p < 0,05$ ) e entre RVC:HP- $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD (nos tempos 7,5min,  $p < 0,001$ ; 10min,  $p < 0,001$  e à partir de 30 min,  $p < 0,05$  após a injeção. Com relação ao intervalo RR, diferenças estatísticas relativas à variação porcentual do intervalo foram obtidas entre os grupos RVC e Tampão (7,5 min,  $p < 0,01$ ) e entre RVC e HP- $\beta$ -CD (nos tempos iniciais de 7,5 min,  $p < 0,01$ , e 10min,  $p < 0,05$ ). Também foram observadas diferenças entre os grupos RVC:HP- $\beta$ -CD e Tampão (nos tempos 7,5 e 10 min,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) e entre RVC:HP- $\beta$ -CD e HP- $\beta$ -CD (nos tempos 7,5; 10 e 20 min após a injeção ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente).

Medidas do intervalo QT também mostraram valores crescentes no decorrer do tempo, tanto nos grupos controle (Tampão e HP- $\beta$ -CD), quanto nos grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD (Anexo V e Tabela 7). Diferenças significativas nos valores absolutos deste parâmetro, que representa o processo de despolarização e repolarização dos ventrículos (Anexo V) antes e após a injeção apenas foram obtidas para o grupo RVC:HP- $\beta$ -CD ( $p < 0,01$  em 7,5 min e  $p < 0,001$  nos demais tempos).

A alteração de QT foi pequena e não ultrapassou 10% em nenhum grupo (Tabela 7). Diferenças significativas na variação percentual observada (Tabela 7) foram registradas entre os grupos RVC e Tampão em um único tempo (30 min após a injeção,  $p < 0,05$ ). Já com relação ao grupo RVC:HP- $\beta$ -CD, diferenças significativas foram obtidas em relação ao Tampão nos tempos 7,5; 30; 40 e 55 min ( $p < 0,05$ ) e em relação à HP- $\beta$ -CD no tempo inicial de 7,5 min ( $P < 0,05$ ). Diferenças significativas entre os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD não foram encontradas, para este parâmetro, em nenhum tempo.

A análise dos valores absolutos do **intervalo QT corrigido pela frequência**, QTc, (Anexo VI) mostrou diferenças significativas antes e após a injeção, apenas para o grupo Tampão, a partir de 30 min após a injeção ( $p < 0,05$  em 35 min e  $p < 0,001$  de 35 a 55 min). A variação percentual de QTc (Tabela 7) não revelou diferença significativa entre os grupos, com exceção da RVC:HP- $\beta$ -CD em que se verificou uma diferença significativa em relação ao Tampão em um único tempo (7,5 min após a injeção,  $p < 0,05$ ) e a RVC, que apresentou diferença significativa em relação a HP- $\beta$ -CD no tempo de 55 min ( $p < 0,01$ ).

Tabela 6. Variação dos Intervalos PR, QRS RR, e da frequência cardíaca(FC) nos grupos Tampão, HP-β-CD, RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). a. Comparação em relação ao grupo Tampão; b-Comparação em relação ao grupo HP-β-CD. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001 (ANOVA).

Parâmetro	Tempo (min)	Variação do Intervalo (%)			
		Tampão	HP-β-CD	RVC	RVC:HP-β-CD
PR	7,5	2,63 ± 1,51	3,81 ± 1,98	15,57 ± 9,55 <sup>a***,b**</sup>	18,42 ± 5,38 <sup>a,b***</sup>
	10	2,60 ± 2,51	4,04 ± 2,71	14,33 ± 4,81 <sup>a,b***</sup>	17,02 ± 5,20 <sup>a,b***</sup>
	20	4,56 ± 3,41	6,02 ± 3,60	10,69 ± 6,07	17,10 ± 5,81 <sup>a,b***</sup>
	30	6,69 ± 5,23	8,74 ± 4,23	13,30 ± 6,01	19,17 ± 6,98 <sup>a,b**</sup>
	40	10,61 ± 17,50	10,40 ± 3,90	15,18 ± 6,05	21,8 ± 6,63 <sup>a,b**</sup>
	55	15,32 ± 7,79	12,82 ± 5,60	18,13 ± 7,23	24,30 ± 7,18 <sup>b*</sup>
QRS	7,5	1,59 ± 1,19	1,53 ± 1,21	8,88 ± 4,71 <sup>a,b***</sup>	5,38 ± 2,74
	10	1,48 ± 1,51	2,19 ± 1,15	5,54 ± 4,53	3,32 ± 6,12
	20	2,18 ± 1,57	2,81 ± 1,17	5,28 ± 4,92	6,3 ± 3,60
	30	2,85 ± 1,67	3,37 ± 1,52	6,34 ± 6,22	6,15 ± 3,90
	40	2,00 ± 1,03	3,68 ± 1,81	5,75 ± 4,33	7,37 ± 4,55 <sup>a*</sup>
	55	3,09 ± 1,85	2,31 ± 2,89	5,49 ± 4,69	5,22 ± 5,30
RR	7,5	4,93 ± 4,71	3,60 ± 2,95	15,36 ± 6,72 <sup>a,b**</sup>	16,53 ± 6,57 <sup>a**,b***</sup>
	10	5,82 ± 5,44	4,35 ± 3,33	13,12 ± 6,05 <sup>b*</sup>	15,88 ± 7,38 <sup>a*,b**</sup>
	20	9,09 ± 6,92	7,25 ± 4,20	11,40 ± 8,44	17,48 ± 8,51 <sup>b*</sup>
	30	12,20 ± 8,69	11,58 ± 5,16	13,69 ± 8,54	23,38 ± 10,58
	40	17,45 ± 10,70	12,29 ± 6,48	18,18 ± 12,29	25,05 ± 11,11
	55	24,93 ± 9,70	15,61 ± 6,15	18,02 ± 13,63	31,40 ± 12,97
FC	7,5	-4,55 ± 3,95	-3,4 ± 2,72	-13,06 ± 5,04 <sup>a**,b***</sup>	-13,94 ± 5,04 <sup>a**,b***</sup>
	10	-5,31 ± 4,45	-4,09 ± 3,02	-11,37 ± 4,80 <sup>b*</sup>	-13,36 ± 5,60 <sup>a*,b**</sup>
	20	-8,05 ± 5,24	-6,64 ± 3,62	-9,80 ± 6,77	-14,48 ± 6,29
	30	-10,47 ± 6,14	-10,21 ± 4,18	-11,62 ± 6,54	-19,50 ± 6,84 <sup>a*,b*</sup>
	40	-14,32 ± 6,84	-10,69 ± 5,07	-14,59 ± 8,74	-22,19 ± 7,53 <sup>b*</sup>
	55	-19,56 ± 6,02	-13,29 ± 4,48	-14,36 ± 9,07	-23,28 ± 7,16 <sup>b*</sup>

O valor negativo refere-se à variação negativa dos valores da FC.

**Tabela 7.** Variação dos Intervalos QT e QTc nos grupos Tampão, HP-β-CD, RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). a. Comparação em relação ao grupo Tampão; b- Comparação em relação ao grupo HP-β-CD. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001 (ANOVA).

Parâmetro	Tempo (min)	Variação do Intervalo (%)			
		Tampão	HP-β-CD	RVC	RVC:HP-β-CD
QT	7,5	0,96 ± 1,35	1,54 ± 2,31	5,32 ± 3,77	6,97 ± 5,10 <sup>a,b*</sup>
	10	1,99 ± 1,50	2,61 ± 2,51	5,80 ± 6,39	7,05 ± 5,43
	20	2,16 ± 1,17	3,80 ± 0,73	5,87 ± 4,18	7,26 ± 4,34
	30	1,87 ± 1,15	4,53 ± 2,25	6,39 ± 3,28 <sup>a*</sup>	8,23 ± 4,12 <sup>a*</sup>
	40	1,87 ± 1,51	6,20 ± 5,22	4,10 ± 3,83	8,87 ± 4,90 <sup>a*</sup>
	55	2,60 ± 1,58	4,41 ± 2,65	6,57 ± 5,86	9,59 ± 5,34 <sup>a*</sup>
QTc	7,5	-1,45 ± 1,37	1,79 ± 1,74	3,64 ± 2,00	4,15 ± 2,32 <sup>a*</sup>
	10	1,07 ± 0,85	2,63 ± 1,99	-4,70 ± 4,25	4,01 ± 2,70
	20	-1,71 ± 1,25	-2,13 ± 1,67	4,49 ± 1,82	2,98 ± 1,94
	30	-1,97 ± 2,04	1,76 ± 1,52	-4,55 ± 2,96	3,87 ± 1,81
	40	-3,33 ± 1,99	-3,96 ± 6,40	-5,01 ± 2,78	3,59 ± 1,95
	55	-5,29 ± 1,61	-3,00 ± 1,76	-6,72 ± 2,92 <sup>b*</sup>	-4,48 ± 3,13

O valor negativo refere-se à variação negativa dos valores de QTc.

Os dados de **pressão arterial sistólica**, PAS (Anexo VII) não revelaram diferenças significativas nos valores absolutos antes e após a injeção, em nenhum dos grupos analisados (Anexo VII). Já a análise da variação percentual (Tabela 8) mostra que com o decorrer do tempo houve, em geral, uma pequena queda na pressão sistólica nos grupos Tampão e RVC:HP-β-CD, diferentemente do grupo da RVC, em que em geral se verificou um aumento nos valores de PAS. O grupo HP-β-CD apresentou uma oscilação na alteração, com aumento seguido de queda da pressão sistólica com o decorrer do tempo. O valor máximo de queda de pressão sistólica ocorreu segundos após a injeção (tempo de injeção), sendo de 17% para a RVC e 21% para a RVC: HP-β-CD. Esta diferença entre os dois grupos, entretanto, não foi significativa. No grupo da RVC houve um aumento de pressão, cujo valor máximo (10% de variação) aconteceu 30 min após a injeção (Tabela 8). O grupo da RVC:HP-β-CD mostrou perfil comparável ao grupo da RVC, mas a variação não ultrapassou 9,72% (Tabela 8).

A análise dos dados de **pressão arterial diastólica**, PAD (Tabela 8), mostrou no decorrer do tempo, valores mais baixos com relação ao tempo zero (antes da injeção), para os grupos testados, com exceção do grupo RVC. O padrão observado na queda dos valores de PAD, entretanto, foi irregular. Não foram encontradas diferenças significativas com relação aos valores absolutos antes e após a injeção, para nenhum dos grupos, à exceção do tempo de “injeção”, para os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD ( $p < 0,001$ ) (Anexo VIII). Esta medida corresponde a maior alteração observada nestes grupos (RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD), com diminuição de 35 e 23%, respectivamente, na PAD.

Observando-se a variação provocada nos valores de pressão (Tabela 8), tanto em PAS quanto em PAD, verifica-se que não houve diferença significativa entre os grupos.

De maneira geral, pela análise dos parâmetros eletrocardiográficos de intervalos (Tabelas 6 e 7) e nos valores de pressão (Tabela 8), tanto PAS quanto PAD, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com RVC livre ou complexada, nos tempos avaliados (0 – 55 min).

Este intervalo de tempo (0-55min) foi escolhido de acordo com experimentos semelhantes da avaliação da cardiotoxicidade de anestésicos já realizados (Lefrant et al, 2001; Mather *et al.*, 2005; Borgeat, 2005). As alterações no tempo de “injeção” (Tabelas 9, 10, 11 e 12) provocadas pela RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD (e que serão discutidas), mostraram ser importante observar o efeito cardiotóxico deste anestésico nos tempos iniciais de medida.

**Tabela 8.** *Varição da Pressão Sistólica (PAS) e Diastólica (PAD) nos grupos Tampão, HP-β-CD, RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo).*

Parâmetro	tempo (min)	Variação da pressão (%)			
		Tampão	HP-β-CD	RVC	RVC:HP-β-CD
PAS	7,5	-3,79 ± 3,79	4,79 ± 5,32	-6,44 ± 2,71	-9,18 ± 5,25
	10	-4,08 ± 4,05	4,24 ± 3,74	6,96 ± 5,03	-8,59 ± 6,35
	20	-6,30 ± 5,07	4,73 ± 5,49	10,04 ± 7,99	-8,66 ± 5,02
	30	-6,78 ± 4,53	-7,53 ± 4,01	10,16 ± 5,66	-9,00 ± 3,98
	40	-10,52 ± 8,70	-10,06 ± 6,28	7,62 ± 6,93	-9,04 ± 8,23
	55	-8,04 ± 5,87	9,57 ± 8,75	9,42 ± 7,06	-9,72 ± 6,07
PAD	7,5	-7,24 ± 4,70	-3,52 ± 2,07	5,16 ± 6,35	-5,48 ± 4,44
	10	-6,93 ± 5,07	-5,46 ± 2,50	7,64 ± 7,06	7,45 ± 4,73
	20	-6,59 ± 7,29	5,53 ± 5,09	14,62 ± 11,79	-8,20 ± 4,38
	30	-8,50 ± 7,30	-9,42 ± 4,36	13,28 ± 6,76	-10,98 ± 3,20
	40	-7,07 ± 5,91	-11,86 ± 5,32	11,58 ± 6,52	-10,06 ± 10,04
	55	nd	-7,63 ± 6,85	9,05 ± 11,34	-11,80 ± 6,31

O valor negativo refere-se à variação negativa dos valores de PAS e PAD/ nd. Não determinado.

#### 4.3.2.2. Avaliação do Tempo de Injeção

Pela discussão do item 4.2.1, pôde-se perceber que as alterações provocadas nos diferentes tempos após a injeção foram pequenas e não trouxeram diferenças significativas para os parâmetros analisados, entre os grupos RVC e RVC:HP-β-CD, dentro de 55 minutos de observação pós injeção.

Por outro lado, o tempo que corresponde àquele de injeção das soluções, mostrou grandes alterações cardíacas para os grupos tratados com RVC e RVC:HP-β-CD, em todos os intervalos eletrocardiográficos medidos (Tabelas 9 a 12) e que não foram observadas para os grupos controle (Tampão e HP-β-CD). Estas

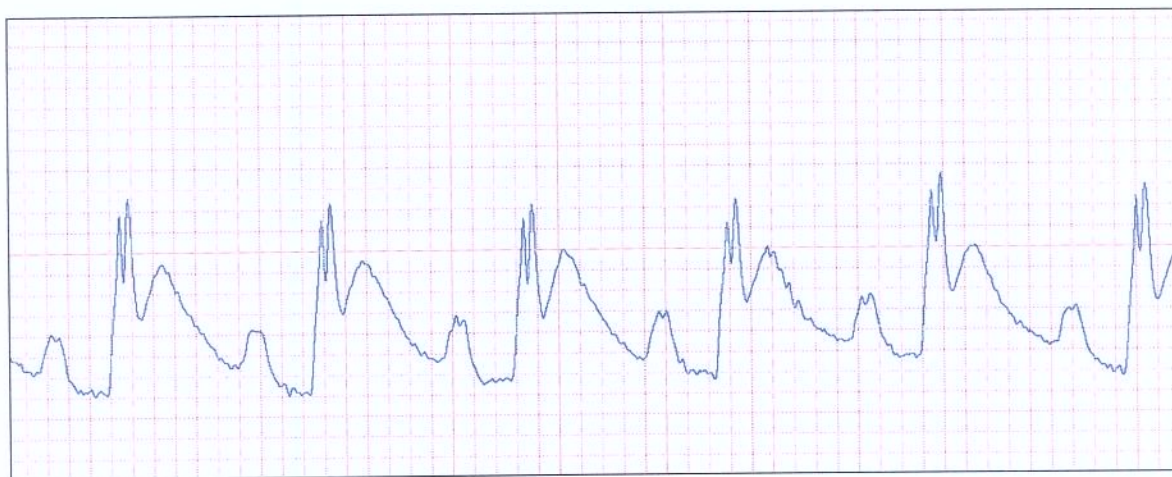


alterações (PR, QSR, RR) revelam tipos de bloqueio da condução elétrica normal do coração, sobretudo da condução ventricular.

Para interpretar melhor as alterações observadas imediatamente após injeção, os registros obtidos foram subdivididos entre 1 a 2,5 min em 4 intervalos de tempo, sendo eles de 3 a 20s, 20 a 40; 40 a 90 e de 90 a 140 s após a injeção e os classificamos quanto ao tipo de bloqueio átrio ventricular caracterizado pelas alterações do registro eletrocardiográfico (Zipes, 1987; Carneiro, 1989, Guyton & Hall, 1997).

As **Tabelas 9 e 10** mostram um resumo das alterações encontradas para os animais dos grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD, respectivamente, nestes curtos intervalos de tempo. Os sinais positivos indicam o registro de bloqueio átrio-ventricular (de 1° e 2° grau ou total), bloqueio de ramo e presença de inversão da polaridade do complexo QRS.

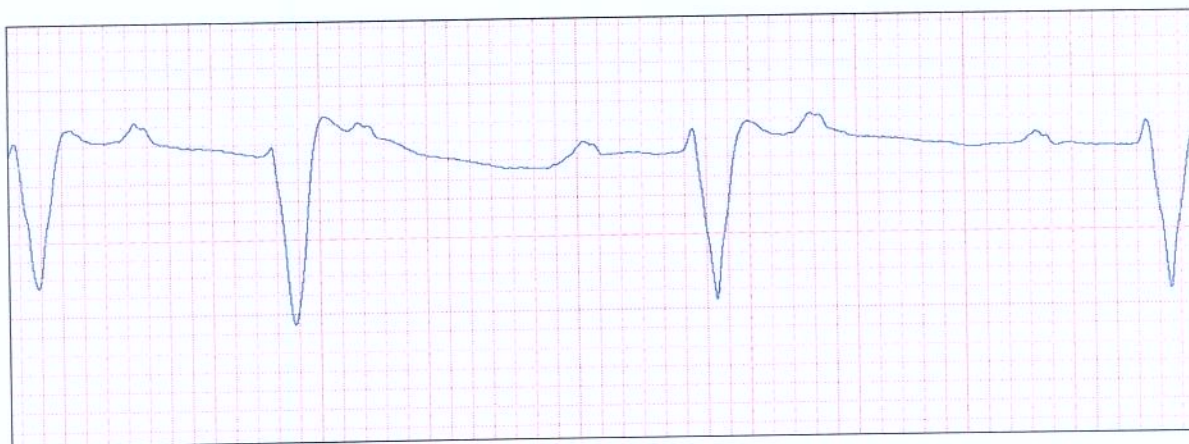
O perfil normal de ECG para os ratos neste experimento está representado na Figura 22:



**Figura 22.** Perfil normal de ECG para ratos nesta metodologia empregada (0,167s/divisão).

Verificou-se, então, que nos primeiros 20 s após a injeção, os registros revelaram de forma predominante, um padrão de bloqueio átrio-ventricular de 2° grau (BAV de 2° grau) (Tabelas 9 e 10), associado a um Bloqueio de Ramo, tanto para a RVC como para a RVC:HP- $\beta$ -CD. O BAV de 2° grau caracteriza-se pela lentificação

*anormal da condução átrio-ventricular, de tal ordem que para uma série qualquer de impulsos, pelo menos um estímulo é bloqueado (Carneiro, 1989), verificando-se a ocorrência de 2 ondas P para um complexo QRS, tal que a relação estímulo atrial e resposta ventricular não é mais de 1:1. O bloqueio de ramo é assim chamado porque resulta do bloqueio do impulso através dos ramos de um dos lados do feixe de His e sistema Purkinje, o que impede a condução normal no ventrículo. Neste caso a condução fica prejudicada e passa a ser mais lenta, podendo surgir pontos ectópicos de estímulo dentro do ventrículo; isto faz com que a condução ocorra através das células musculares cardíacas na região bloqueada e não mais através das fibras nervosas, o que deixa a condução lenta e alarga o complexo QRS (Figuras 23, 24).*



**Figura 23.** Alterações cardíacas observadas segundos após a injeção para os grupos RVC e RVC: HP- $\beta$ -CD: Perfil de BAV de 2° grau evidenciando duas ondas P consecutivas, além do bloqueio de ramo (complexo QRS mais largo) e inversão do complexo QRS. (0,167s/divisão).

No tempo de 20 a 40s, houve um aumento na ocorrência de um padrão de Bloqueio Átrio-ventricular de 1° grau (BAV de 1° grau) (Tabelas 9 e 10), em que há uma lentificação anormal da condução átrio-ventricular, porém com a manutenção da relação entre estímulo atrial e resposta ventricular, de 1:1 (Figura 24). O Bloqueio de ramo também esteve presente nos registros deste intervalo de tempo para todos os animais, tanto para a RVC quanto para a RVC:HP- $\beta$ -CD.



**Figura 24.** Alterações cardíacas observadas segundos após a injeção para os grupos RVC e RVC: HP- $\beta$ -CD: Perfil de BAV de 1º grau, evidenciando alargamento do intervalo PR, alargamento do complexo QRS e inversão da polaridade. (0,167s/divisão)

Em alguns animais, o bloqueio de ramo foi tão intenso que a deformação das ondas impediu a identificação dos tipos de bloqueio átrio ventricular (Figura 25).



**Figura 25.** Alterações cardíacas observadas segundos após a injeção para os grupos RVC e RVC: HP- $\beta$ -CD: Perfil de Bloqueio de ramo intenso, com grande alargamento do Complexo QRS. (0,167s/divisão).

No intervalo de 40 a 90, em geral o BAV de 2º grau já não esteve mais presente (Tabelas 9 e 10), sendo predominante o BAV de 1º grau e o Bloqueio de ramo. No intervalo de 90 a 140s, o bloqueio de ramo desapareceu para os grupos de

RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD, mas o BAV de 1° grau ainda continuou presente para alguns animais, principalmente para a RVC.

O Bloqueio átrio-ventricular total (BAVT), que se refere ao bloqueio total dos estímulos atriais caracterizado pela presença de onda P dissociadas do complexo QRS (Carneiro, 1989; Guyton & Hall, 1997) foi observado em apenas um animal de cada grupo, tanto para a RVC, quanto para a RVC:HP- $\beta$ -CD (Tabelas 9 e 10; Figura 26).



**Figura 26.** Alterações cardíacas observadas segundos após a injeção para o grupo RVC: Perfil de Bloqueio Total, evidenciando seqüência de ondas P, sem o desenvolvimento completo de um complexo QRS. (0,167s/divisão).

Associado a estes tipos de bloqueio A-V e de ramo, que levam a uma alteração nos intervalos PR e QRS, pôde-se detectar uma alteração da polaridade do complexo QRS, presente em todos os animais dos dois grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD, no intervalo de tempo inicial de 3 a 20s, e para na maioria dos animais, nos tempo de 20 a 40s (Tabelas 9 e 10; Figuras 23 e 24). A frequência desta alteração diminui no tempo seguinte, de 40 a 90s, e desaparece para todos os animais no tempo de 90 a 140s (Tabelas 9 e 10). Esta inversão de polaridade do complexo QRS refere-se a uma alteração na condução ventricular. O sinal do eletrocardiograma é dado por um vetor resultante da condução elétrica, que é medida em função da diferença de potencial entre dois pontos. Como em associação ao Bloqueio de Ramo há uma alteração da condução ventricular com a geração de estímulos elétricos em

pontos ectópicos dentro do ventrículo, o vetor resultante pode se tornar diferente, o que altera a polaridade do sinal. A inversão da polaridade indica, portanto, uma alteração na condução elétrica ventricular (Zipes, 1987; Carneiro, 1989). Com relação à alteração da polaridade do complexo QRS, as Tabelas 9 e 10 mostram que não houve diferenças entre os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD.

**Tabela 9.** Perfil de alterações cardíacas observadas em cada animal segundos após a injeção de ropivacaína livre (RVC).

Alteração Cardíaca	Intervalo de tempo após a Injeção- RVC (s)	Animal							
		n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8
BAV de 1° grau	3-20	+	-	-	-	-	-	-	+
	20-40	-	+	-	+	-	+	+	-
	40-90	*	+	*	+	*	+	+	+
	90-140	-	-	+	+	+	+	-	-
BAV de 2° grau	3-20	-	+	+	+	+	+	+	-
	20-40	+	-	+	-	+	-	-	+
	40-90	*	-	*	-	*	-	-	-
	90-140	-	-	-	-	-	-	-	-
BAVT	3-20	-	-	-	-	+	-	-	-
	20-40	-	-	-	-	-	-	-	-
	40-90	-	-	-	-	-	-	-	-
	90-140	-	-	-	-	-	-	-	-
Bloqueio de Ramo	3-20	+	+	+	+	+	+	+	+
	20-40	+	+	+	+	+	+	+	+
	40-90	+	-	+	+	+	+	-	-
	90-140	-	-	-	-	-	-	-	-
Inversão da Polaridade do QRS	3-20	+	+	+	+	+	+	+	+
	20-40	+	+	+	+	+	+	-	+
	40-90	-	+	-	+	-	-	-	+
	90-140	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) presença/ (-) ausência/ \* não pode ser identificado

**Tabela 10.** Perfil de alterações cardíacas observadas em cada animal segundos após a injeção de ropivacaína complexada (RVC:HP- $\beta$ -CD).

Alteração Cardíaca	Intervalo de tempo após a Injeção-RVC:HP- $\beta$ -CD (s)	Animal							
		n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8
BAV de 1° grau	3-20	-	+	-	+	-	+	-	-
	20-40	+	-	+	*	-	+	+	+
	40-90	+	+	+	+	*	+	+	+
	90-140	+	-	-	-	-	-	+	-
BAV de 2° grau	3-20	+	-	+	+	+	-	+	+
	20-40	-	+	-	*	+	-	-	-
	40-90	-	-	-	-	*	-	-	-
	90-140	-	-	-	-	-	-	-	-
BAVT	3-20	-	-	-	-	-	-	-	-
	20-40	-	-	-	-	-	-	+	-
	40-90	-	-	-	-	-	-	-	-
	90-140	-	-	-	-	-	-	-	-
Bloqueio de Ramo	3-20	+	+	+	+	+	+	+	+
	20-40	+	+	+	+	+	+	+	+
	40-90	+	+	+	+	-	+	-	-
	90-140	-	-	-	-	-	-	-	-
Inversão da Polaridade do QRS	3-20	+	+	+	+	+	+	+	+
	20-40	-	+	+	+	+	+	+	+
	40-90	-	+	-	+	-	-	-	+
	90-140	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) presença/ (-) ausência/ \* não pode ser identificado

A alteração da largura do complexo QRS também foi avaliada, uma vez que ela está diretamente relacionada aos bloqueios causados na condução ventricular. Como as alterações provocadas pela injeção de RVC e de RVC:HP- $\beta$ -CD foram muito intensas e impossibilitaram a medida do complexo QRS nos primeiros minutos após a injeção, se procedeu a medida da largura do pico da onda Q do complexo QRS (Figura 9). Os resultados estão mostrados na Tabela 11. Pode-se observar um aumento da largura da onda Q do complexo QRS para os dois grupos tratados, nos três primeiros intervalos de tempo (0-20, 20-40 e 40-90s) após a injeção. Justamente nestes intervalos houve a ocorrência do bloqueio de ramo para a maioria dos animais (Tabelas 9 e 10) o que justifica este alargamento. Para os grupos controle Tampão e HP- $\beta$ -CD, a largura da onda Q não sofreu modificações em relação ao tempo antes da injeção, apresentando os valores de  $0,55 \pm 0,02$ cm e  $0,53 \pm 0,03$  respectivamente. Para a RVC, foram encontradas diferenças significativas em relação ao tampão ( $p < 0,01$ ) no intervalo de 40 a 90s e à HP- $\beta$ -CD, nos intervalos de 20 a 40s ( $p < 0,01$ ) e de 40 a 90s ( $p < 0,01$ ). Para o grupo RVC: HP- $\beta$ -CD foram encontradas diferenças significativas em relação ao grupo HP- $\beta$ -CD ( $p < 0,05$ ), com relação ao intervalo de 20 a 40s. Não houve diferença significativa entre os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD para nenhum intervalo de tempo considerado. Diferença significativa antes e após a injeção foi encontrada para o grupo RVC, apenas no intervalo de tempo de 40 a 90s ( $p < 0,01$ ).



**Tabela 11.** Valores absolutos de largura do Pico da Onda Q (cm) do Complexo QRS segundos após a injeção de RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). Análise estatística entre os valores medidos nos diferentes tempos após a injeção e o tempo zero (ANOVA): \*\* p < 0,01.

Intervalo de Tempo após injeção (s)	Grupo RVC	Grupo RVC :HP-β-CD
0	0,55 ± 0,03	0,51 ± 0,03
3-20	0,69 ± 0,09	0,73 ± 0,025
20-40	0,87 ± 0,15	0,92 ± 0,27
40-90	0,99 ± 0,50**	0,85 ± 0,45
90-140	0,57 ± 0,07	0,58 ± 0,11

As Tabelas 12 e 13 mostram, respectivamente, as alterações provocadas no intervalo RR e frequência cardíaca (FC), para intervalos de tempo após a injeção: 3 a 20; 20 a 40; 40 a 90 e 90 a 140s. A variação percentual de RR mostra que há uma diminuição da frequência (aumento de RR) principalmente nos primeiros segundos - 3 a 20 e 20 a 40s - sendo a variação de RR máxima para a RVC (107,59%) entre 20 a 40s e para a RVC:HP-β-CD (61,39%) no intervalo de 3 a 20s. A variação no RR é refletida nos valores de frequência cardíaca, que apresenta a variação máxima de 46,84% para a RVC entre 20 e 40s e de 35,67% para a RVC:HP-β-CD, no intervalo de 3 a 20s após a injeção. Para o intervalo RR, nos grupos controle tampão e HP-β-CD, esta variação foi de 3,71± 4,01% (intervalo RR de 0,1575 ± 0,0174s - Anexo III) e 1,79±1,41% (intervalo RR de 0,1710 ± 0,0126s - Anexo III) respectivamente. Para a RVC, foram encontradas diferenças significativas nos intervalos de 3 a 20s e 20 a

40s em relação ao tampão ( $p < 0,05$  de 3 a 20s e  $p < 0,001$  de 20 a 40s) e à HP- $\beta$ -CD ( $p < 0,05$  de 3 a 20s e  $p < 0,01$  de 20 a 40s). Para o grupo RVC:HP- $\beta$ -CD foram encontradas diferenças significativas nos mesmos intervalos, de 3 a 20s e de 20 a 40s, tanto em relação ao tampão quanto à HP- $\beta$ -CD ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD, com exceção do último intervalo (de 40 a 90s), em que a RVC levou a uma maior alteração no intervalo RR que a RVC:HP- $\beta$ -CD, com variações de 35,94 e 26,12% respectivamente ( $p < 0,01$ ). Já para os valores de frequência cardíaca, nos grupos controle tampão e HP- $\beta$ -CD, a variação encontrada em relação ao tempo zero para o período de injeção foi de  $3,95\% \pm 5,14\%$  (FC de  $0,1575 \pm 0,0174s$  - Anexo IV) e  $1,79 \pm 1,41\%$  (FC de  $0,1710 \pm 0,0126s$  - Anexo IV) respectivamente. Tanto para a RVC, quanto para a HP- $\beta$ -CD, foram encontradas diferenças significativas em todos os intervalos do *Tempo de injeção* em relação ao tampão e à HP- $\beta$ -CD ( $p < 0,001$ ). Diferenças significativas entre os grupos RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD, foram encontradas nos intervalos de 40 a 90s e de 90 a 140s ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  respectivamente), com maiores alterações observadas para a RVC em relação a RVC:HP- $\beta$ -CD, como pode ser observado na **Tabela 13**.

**Tabela 12.** Valores absolutos (s) e de variação(%) do intervalo RR, segundos após a injeção de RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). Análise estatística entre os valores da porcentagem de variação do grupo RVC em relação ao grupo RVC:HP-β-CD (Teste t não pareado): \*\* p < 0,01

Intervalo de Tempo após injeção (s)	RVC		RVC:HP-β-CD	
	Intervalo RR (s)	Variação do intervalo RR(%)	Intervalo RR(s)	Variação do intervalo RR (%)
0	0,1593 ± 0,0197	---	0,1599 ± 0,0270	---
3-20	0,2673 ± 0,063	69,12 ± 14,65	0,2615 ± 0,0847	61,39 ± 12,40
20-40	0,3362 ± 0,1593	107,59 ± 38,94	0,2690 ± 0,1030	60,14 ± 36,72
40-90	0,2291 ± 0,039	43,32 ± 3,14	0,21560 ± 0,4679	34,22 ± 3,36
90-140	0,2172 ± 0,035	35,94 ± 2,98	0,2023 ± 0,0414	26,12 ± 3,24**

**abela 13.** Valores absolutos (bpm) e de variação(%) da frequência cardíaca, segundos após a injeção de RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). Análise estatística entre os valores de porcentagem de variação do grupo RVC em relação ao grupo RVC:HP-β-CD (Teste t não pareado): \*p< 0,05

Intervalo de Tempo após injeção (s)	RVC		RVC:HP-β-CD	
	FC (bpm)	Variação da FC (%)	FC(bpm)	Variação da FC (%)
0	381 ± 45	---	384 ± 57	---
3-20	238 ± 62	-37,09 ± 17,69	250 ± 74	-35,67 ± 12,53
20-40	205 ± 66	-46,84 ± 15,47	249 ± 84	-34,99 ± 13,57
40-90	268 ± 37	-30,07 ± 4,03	288 ± 52	-21,42 ± 9,42*
90-140	282 ± 40	-26,20 ± 4,38	306 ± 56	-20,36 ± 5,45*

O tempo de recuperação médio das alterações cardíacas, representadas pelos diversos graus de bloqueio A-V e bloqueio de ramo dos dois grupos analisados foi de 133,6 ± 44,8 s para a RVC e 119,4 ± 33,9 s para a RVC: HP-β-CD, não sendo esta diferença significativa.

Os dados apresentados mostram que na dose testada de RVC, 6 mg/kg (de acordo com experimentos similares (Groban & Dolinski, 2001; Lefrant et al., 2001) e que representa 2 vezes a dose máxima recomendada para este anestésico (Cox et al., 2003), todos os animais apresentaram sintomas de cardiotoxicidade tanto para a RVC livre quanto para o complexo RVC:HP-β-CD. Estas alterações, de maneira geral, são decorrentes de alterações da condução elétrica ventricular. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas entre os dois grupos tratados (RVC e RVC complexada) nos parâmetros avaliados, observou-se que entre 1-3 minutos após a injeção o grupo complexado trouxe menores alterações na

freqüência cardíaca (Tabela 13) que a RVC em solução aquosa, o que é um fator importante, uma vez que uma lentificação extrema na freqüência pode levar a outras arritmias ventriculares, em função de uma taquicardia compensatória que poderia ser originada.

Também deve-se ressaltar que, embora a RVC esteja mais disponível na pré-formulação complexada em virtude da sua maior solubilidade aquosa - o que ficou demonstrado pelo teste do bloqueio do nervo infraorbital - este aumento na disponibilidade não levou a maior efeito tóxico, em relação à RVC pura, como mostraram os testes de toxicidade cardíaca.

## V. CONCLUSÕES

O complexo de RVC em hidroxipropil- $\beta$ -CD mostrou-se possível de ser escalonado. A preparação em escala prévia à escala piloto foi satisfatória e a secagem em spray-dryer tornou o processo rápido e com bom rendimento.

A estequiometria do complexo foi confirmada em 1:1, sendo isto evidenciado pela técnica de variação contínua (*Jop Plot*).

A complexação foi evidenciada pelos dados de DSC e confirmada pelos dados de Raios X e RMN. Os ensaios de caracterização mostraram boa correlação com outros, previamente determinados em nosso laboratório (Araújo et al., 2005), em escala laboratorial - sem escalonamento.

As medidas de  $^1\text{H}$ -RMN forneceram detalhes da interação molecular entre a RVC e a HP- $\beta$ -CD e permitiram o cálculo da Constante de associação do complexo ( $K_c$ ), que revelou uma associação estável.

A complexação da ropivacaína em HP- $\beta$ -CD mostrou-se vantajosa em relação à RVC livre, uma vez que proporcionou uma maior disponibilidade do fármaco no local de ação. Esta maior disponibilidade resultou em um maior efeito anestésico, observado através do bloqueio do nervo infraorbital. Este aumento na atividade antinociceptiva foi evidenciado, sobretudo, em concentrações sub-clínicas, que embora não sejam concentrações usuais, são também usadas em procedimentos em que não se pretende um bloqueio tão intenso, como por exemplo, para o alívio da dor no trabalho de parto (Casati & Putzu, 2005). O efeito obtido com o complexo RVC:HP- $\beta$ -CD na concentração clínica usual (0,5%) foi muito satisfatório, e poderia-se sugerir que este se aproxima do bloqueio proporcionado pela BVC, um anestésico local conhecido pela maior potência e toxicidade

Desta forma, a complexação da RVC em HP- $\beta$ -CD permite a utilização de menores doses do anestésico para um mesmo efeito desejado. Na dose clínica (0,5%) podemos afirmar que a RVC complexada torna-se uma opção adequada para substituir a BVC em bloqueios sensoriais. Em ambos os casos o uso da RVC complexada em HP- $\beta$ -CD proporciona maior segurança ao procedimento anestésico.

Finalmente os resultados de medidas eletrocardiográficas mostraram que, o efeito anestésico prolongado pelo aumento da disponibilidade da RVC complexada, não trouxe como consequência uma maior toxicidade cardíaca. A RVC:HP- $\beta$ -CD não se mostrou mais cardiotóxica que a RVC, o que avaliza sua utilização em procedimentos cirúrgicos. Esta evidência, associada ao fato da possível utilização de uma menor dose para um mesmo efeito, faz do complexo RVC:HP- $\beta$ -CD uma pré-formulação promissora, na busca de anestésicos seguros e potentes.

## VI. REFERÊNCIAS

- Abernethy, D.; Barbey, J.; Franc, J.; Brown, K.S.; Ferreira, I.; Ford, N.; Salazar, D.E. (2001). Loratadine and terfenadine interaction with nefazodone: Both antihistamines are associated with QTc prolongation. **Clin. Pharmacol. Ther.** 69, 96-103.
- Amaniti, E.; Drampa, F.; Kouzi-Loliakos, K.; Kapoukranidou, D.; Pouzitaki, C.; Vasilakos, D. (2006). Ropivacaine myotoxicity after single intramuscular injection in rats. **Eur. J. Anaesthesiol.** 23, 130-135.
- Araujo, D.R.; Cereda, C. M. S.; Brunetto, G. B.; Pinto, L.M.A.; Santana, M.H.A.; de Paula, E. (2004). Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. **Can. J. Anaesth.** 51, 566-572.
- Araujo, D.R.; Pinto, L.M.A.; Braga, A.F.A.; de Paula, E. (2003). Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 53, 663-671.
- Araújo, D.R.; Braga, A.F.A.; Moraes, C.M.; Fraceto, L.F.; de Paula, E. (2005). Avaliação farmacológica do complexo de inclusão da mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25) com hidroxipropil-betaciclodextrina (HP $\beta$ -CD) - caracterização físico-química e efeitos da administração intratecal em ratos. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 55, 316-327.
- Araújo, D.R. (2005). Formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-amidas cíclicas: preparação, caracterização e ensaios farmacológicos. **Tese de doutorado / Instituto de Biologia / UNICAMP/ Campinas.**
- Araujo, D.R.; Braga, A.F.A.; Moraes, C. M.; Fraceto, L. F.; de Paula, E. (2006). Complexation of 50% enantiomeric excess (S75-R25) bupivacaine with cyclodextrins and spinal block anesthesia in rats. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 56, 495-506.



- Bekers, O.; Uijtendaal, E.V.; Beijnen, J.H.; Bult, A.; Underberg, W.J.M. (1991). Cyclodextrins in the pharmaceutical field. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 17, 1503-1549.
- Bibby, D.; Davies, N.M.; Tucker, I.G. (2000). Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **Int. J. Pharm.** 197, 1-11.
- Borgeat, A.; Ekatodramis, G; Blumenthal, S. (2004). Interscalene brachial plexus anesthesia with Ropivacaine 5 mg/mL and Bupivacaine 5 mg/mL: Effects on Electrocardiogram. **Reg. Anesth. Pain Med.** 29, 557-563.
- Botsi, A.; Yannakopoulou, K.; Perly, B.; Hadjoudis, E. (1995). Positive or adverse effects os methylation on the inclusion behavior of cyclodextrins. A comparative NMR study using pheromone constituents of the olive fruit fly. **J. Org. Chem.** 60, 4017-4023.
- Botsi, A.; Perly, B.; Hadjoudis, E. (1997). (+)- and (-)-alpha-pirene as chiral recognition probes with natural cyclodextrins and their permethylated derivatives: an aqueous NMR study. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2**, 89-94.
- Boyden, P.A.; Wit, A.L. (1983). Pharmacology of the antiarrhythmic drugs. In: Rosen, M.R.; Hoffman, B.F. **Cardiac Therapy** Amsterdam: Nijhoff.
- Butterworth, J.F.; Strichartz G.R. (1990). Molecular mechanisms of local-anesthesia- a review. **Anesthesiology** 72, 711-734.
- Carneiro, E. (1989). O Eletrocardiograma-10 anos depois. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Enéas Ferreira Carneiro.
- Carpenter, T.O.; Gerloczy, A.; Pitha, J. (1994). Safety of parenteral Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **J. Phar. Sci.** 84, 222-225.
- Casaty, A.; Putzu, M. (2005). Bupicavaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different? **Best Pract. Res.** 19, 247-268.
- Catteral, W.; Mackie, K. (1996). Anestésicos locais. In: Goodman, L. S., Gilman, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 9<sup>a</sup> ed. Chile: McGraw-Hill Interamericana.

- Cereda, C.M.S.; Araujo, D.R.; Bruneto, G.B.; de Paula, E. (2004). Liposomal prilocaine: preparation, characterization and *in vivo* evaluation. **J. Pharm. Sci.** 7, 235-240.
- Cereda, C.M.S.; Burschini, G.; Araújo, D.R.; de Paula, E. (2006). Liposomal formulations of prilocaine, lidovaine and mepivacaine prolong analgesic duration. **Can. J. Anesth.** 53, 1092-1097.
- Connors, K.A. (1987). **Binding constants, the measurement of molecular complex stability.** New York: Wiley.
- Courtney, K. R. (1975). Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivate GEA 968. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 195: 225-236.
- Courtney, K.R. (1980). Structure-activity for frequency-dependent sodium-channel block nerve by local anesthetics. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 213, 114-119.
- Coussement, W.; Van Cauteren, H.; Vandenberghe, J.; Vanparys, P.; Teuns, G.; Lampo, A.; Marsboom, R. (1990). Toxicological profile of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in laboratory animals. In: Duchêne, D. **Minutes of the 5 th International Symposium on Cyclodextrins.** Paris: Editions de Santé.
- Covino, B.G.; Vassalo, H.G.(1985). **Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico.** Rio de Janeiro: Colina.
- Covino, B. G. (1986). Pharmacology of local anaesthetic agents. **Br. J. Anaesth.** 58, 701-716.
- Cox, B.; Duriex, M.E.; Marcus, M.A.E. (2003). Toxicity of local anaesthetics. **Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.** 17, 111-136.
- Davis, M.E.; Brewster, M.E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nat. Rev. Drug Discov.** 3, 1023-1035.
- de Paula, E.; Schreier, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. **Biochem. Biophys. Acta** 1240, 25-33.

- de Paula, E.; Schreier, S. (1996). Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29, 877-894.
- Djedaini, F.; Lin, S. Z.; Perly, B.; Wouessidjewe, D. (1990). High field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a  $\beta$ -cyclodextrin:indometacin inclusion complex. **J. Pharm. Sci.** 79, 643-646.
- Dollo, G.; Le Corre, P.; Chevanne, F.; Le Verge, R. (1996a). Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with  $\beta$ -cyclodextrin and derivatives. I. Physicochemical characterization. **Int. J. Pharm.** 131, 219-228.
- Dollo, G.; Le Corre, P.; Chevanne, F.; Le Verge, R. (1996b). Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with  $\beta$ -cyclodextrin and derivatives. II. Evaluation of affinity constants and in vitro transfer rate constants. **Int. J. Pharm.** 136, 165-174.
- Dollo, G.; Thompson, D. O.; Le Corre, P.; Chevanne, F.; Le Verge, R. (1998). Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with  $\beta$ -cyclodextrin and derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- $\beta$ -CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. **Int. J. Pharm.** 164, 11-19.
- Dollo, G.; Le Corre, P.; Freville, J.C.; Chevanne, F.; Le Verge, R. (2000). Biopharmaceutics of local anesthetic cyclodextrin complexes following loco-regional administration. **Ann. Pharm. Fr.** 58, 425-432.
- Estebe, J.P.; Ecoffey, C.; Dollo, G.; Le Corre, P.; Chevanne, F.; Le Verge, R. (2002). Bupivacaine pharmacokinetics and motor blockade following epidural administration of the bupivacaine-sulfobutylether-7- $\beta$ -cyclodextrin complex in sheep. **Eur. J. Anaesthesiol.** 19, 308-310.
- Fielding, L. (2000). Determination of association constants ( $K_a$ ) from Solution NMR data. **Tetrahedron** 56, 6151-6170.
- Fink, B. R.; Aasheim, G.; Kish, S. J.; Croley, T.S. (1975). Neurokinetics of lidocaine in the infraorbital nerve of the rat *in vivo*: relation to sensory block. **Anesthesiology** 42, 731-736.

- Floridi, A.; di Padova, M.; Barbieri, R.; Arcuri, E. (1999). Effect of local anesthetic Ropivacaine on isolate rat liver mitochondria. **Biochem. Pharmacol.** 58, 1009-1016.
- Fraceto, L.F.; Oyama, S.; Nakaie, C.R.; Spini, A.; de Paula, E.; Pertinhez, T.A. (2006). Interaction of local anesthetics with a peptide encompassing the IV/S4-S5 linker of the Na<sup>+</sup> channel. **Biophys. Chem.** 123, 29-39.
- Frank, D.W.; Gray, J.E.; Weaver, R.N. (1976). Cyclodextrin nephrosis in the rat. **Am. J. Pathol.** 83, 367-382.
- Frijlink, H.W.; Eissens, A.C.; Heffing, N.R.; Poelstra, K.; Lerk, C.F.; Meijer, D.K.F. (1991). The effect of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat. **Pharm. Res.** 8, 1248-1252.
- Frömming, K.H.; Szejtli, J. (1994). **Topics in Inclusion Science - Cyclodextrins in Pharmacy**, Hungria: Kluwer Academic Publishers.
- Gould, S.; Scott, R.C. (2005). 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD): a toxicology review. **Food Chem. Toxicol.** 43, 1451-1459.
- Goulet, J.P.; Pérusse, R.; Turcotte, J.Y. (1992). Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: part III. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 74, 692-697.
- Graf, B. (2001). The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of Ropivacaine. **Curr. Top. Med. Chem.** 1, 207-214.
- Grant, G.J.; Barenholz, Y.; Bolotin, E.M.; Bansinath, M.; Turndorf, H.; Piskoun, B.; Davidson, E.M. (2004). A Novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. **Anesthesiology** 101, 133-137.
- Gil, V.M.S.; Geraldés, C.F.G.C. (1987). **Ressonância Magnética Nuclear**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Grant, S. A. (2002). The holy grail: long-acting local anaesthetics and liposomes. **Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.** 16, 345-352.

- Grant, G.J.; Bansinath, M. (2001). Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Reg. Anesth. Pain. Med.** 26, 61-63.
- Groban, L.; Dolinski, S.Y. (2001). Differences in cardiac toxicity among ropivacaine, levobupivacaine, bupivacaine, and lidocaine. **Tech. Reg. Anesth. Pain Manag.** 5(2), 48-55.
- Gupta, S.P. (1991). Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. **Chem. Rev.** 91, 1109-1119.
- Guyton, A.; Hall, J. (1997). **Tratado de Fisiologia Médica.** 9<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Hassan, H.G.; Renck, H.; Lindberg, B.; Åkerman, B.; Hellquiste, R. (1985a). Effects of adjuvants to local anesthetics on the duration. I. Studies of dextrans of widely varying molecular weight and adrenaline in rat infraorbital nerve block. **Acta Anaesth. Scand.** 29, 375-379.
- Hassan, H.G.; Renck, H.; Lindberg, B.; Lindquist, B.; Åkerman, B. (1985b). Effects of adjuvants to local anesthetics on the duration. II. Studies of some substituted dextrans and other macromolecules in rat infraorbital nerve block. **Acta Anaesth. Scand.** 29, 380-383.
- Hille, B. (1977). pH-dependent rate of action of local-anesthetics on node of ranvier. **J. Gen. Physiol.** 69, 497-515.
- Iohom, G.; Lan, G.B.; Diarra, D.P.; Grignon, Y.; Kinirons, B.P.; Girard, F.; Merle, M.; Granier, G.; Cahn, V.; Bouaziz, H. (2005). Long-term evaluation of motor function following intraneural injection of ropivacaine using track analysis in rats. **Br. J. Anaesth.** 94, 524-529.
- Irie, T.; Uekama, K. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm. Sci.** 86, 147-162.
- Iullis, A.; Zanatta, L.; Vicenti, E.; Galzigna, L. (2001). Differences ropivacaine and bupivacaine relevant to antiinflammatory activity, platelet aggregation and antioxidant activity in vitro. **II Farmaco** 56, 153-157.

- Jassen Technical Bulletin (1992). Encapsin HPB Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. A real solution for real drug delivery problems. **Jassen Biotech N.V.**: 1-7.
- Kim, J-H; lee, S-K.; Ki, M-H; Choi, W-K.; Ahn, S-K; Shin, H-J.; Hong, C.I. (2004). Development of parenteral formulation for a novel angiogenesis inhibitor, CKD-732 through complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Int. J. Pharm.** 272, 79-89.
- Knudsen, J.; Suurküla, M. B.; Bolmberg, S.; Sjövall, J.; Edvardsson, N. (1997). Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. **Br. J. Anaesth.** 78, 507-514.
- Kohane, D.S.; Sankar, W.N.; Shubinam M. (1998). Sciatic nerve blockade in infant, adolescent and adult rats. **Anesthesiology** 89, 1199:1208.
- Kuzma, P.J.; Kline, M.D.; Calkins, M.D.; Staats, P.S. (1997). Progress in the development of ultra-long-acting local anesthetics. **Reg. Anesth.** 22, 543-551.
- Kyttä, J.; Heinonen, E.; Rosenberg, P.H.; Wahlström, T.; Gripenberg, J.; Huopaniemi, T. (1986). Effects of repeated bupivacaine administration on sciatic nerve and surrounding muscle tissues. **Acta Anaesth. Scand.** 30, 625-629.
- Laverd, A. (2001). Estudos de RMN aplicados à química supramolecular e discriminação enantiomérica. **Tese de doutorado / Instituto de Química / UNICAMP/ Campinas.**
- Lefrant, J.; Coussaye, J.; Ripart, J.; Muller, L.; Laloucey, L.; Peray, P.A.; Mazoit, X.; Sassine, A.; Eledjam, J.J. (2001). The comparative eletrophysiologic and hemodynamic effects of a large dose of Ropivacaine and Bupivacaine in anesthetized and ventilated piglets. **Anesth. Analg.** 93, 1598-1605.
- Lew, E.; Vloka, J.D.; Hadzie, A. (2001). Ropivacaine for peripheral nerve blocks: Are there advantages? **Tech. Reg. Anesth. Pain Manag.** 5, 56-59.
- Loftsson, T.; Masson, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int. J. Pharm.** 225, 15-30.
- Loftsson, T.; Brewster, M.E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins, I. Drug solubilizations and stabilizations. **J. Pharm. Sci.** 85, 1017-1025.

- Loukas, Y.L.; Vraka, V.; Gregoriadis, G. (1998) . Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. **Int. J. Pharm.** 162, 137-142.
- Malamed, S. F. (2001). **Manual de anestesia local**. 4<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Malheiros, S.V.P.; Pinto, L.M.A.; Gottardo, L.; Yockaichiya, D.K.; Fraceto, L.F.; Meirelles, N.; de Paula, E. (2004). A new look at the hemolytic effect of local anesthetics considering their real membrane/partitioning at pH 7.4. **Biophys. Chem.** 110, 213-221.
- Masters, K. (1972). **Spray drying-an introduction to principles, operational practice and applications**. London: Leonard Hill Books.
- Mather, L.; Copeland, S.; Iadd, L. (2005). Acute toxicity of local anesthetics: underlying pharmacokinetic and pharmacodynamic concepts. **Reg. Anesth. Pain Med.** 30, 553-566.
- Matioli, G. (2000). **Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**. Maringá: EdUEM.
- McClellan, K.J; Faulds, D. (2000). Ropivacaine: an update of its use in regional anaesthesia. **Drugs** 60, 1065-1093.
- McClure, J.H. (1996). Ropivacaine. **Br. J. Anaesth.** 76, 300-307.
- McCormack, B.; Gregoriadis, G. (1998). Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the rate of water insoluble drugs *in vivo*. **Int. J. Pharm.** 162, 59-69.
- McLure, H.A.; Rubin, A.P. (2005). Review of local anaesthetic agents. **Minerva Anesthesiol.** 71, 59-74.
- McNamee, D.A; McClelland, A.M.; Scott,S.; Milligan,K.R.; Westman, L.; Gustafsson, U. (2002). Spinal anaesthesia: comparison of plain ropivacaine 5 mg mL<sup>-1</sup> with bupivacaine 5 mg mL<sup>-1</sup> for major orthopaedic surgery. **Br. J. Anaesth** 89, 702-706.

- Meirelle, B.; Iaine, V.; Pilard, F.; Gardelle, A.; Defaye, J.; Perly, B. (1997). The hemolytic properties of chemically modified cyclodextrins. **J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.** 29, 57-63.
- Mo, H.; Pochapsky, T. C. (1997). Intermolecular interactions characterized by nuclear Overhauser effects. **Prog. NMR Spectrosc.** 30, 1-38.
- Moraes, C.M.; Abrami, P.; Araujo, D.R.; Braga, A.F.A.; Issa, M.G. Ferraz, H.G.; de Paula, E.; Fraceto, L.F. (2007). Characterization of Lidocaine:Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex. *In press.* **J. Inclusion Phenom.**
- Mulroy, M.F. (2002). Systemic toxicity and cardiotoxicity from local anesthetics: incidence and preventive measures. **Reg. Anesth. Pain Med.** 27(6), 556-561.
- Nalluri, B.N.; Chowdary, K.P.R.; Murthy, K.V.R.; Satyanarayana, V.; Hayman, A.R.; Becket, G. (2005). Inclusion complexation and dissolution properties of nimesulide and meloxicam-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin binary systems. **J. Inclusion Phenom.** 53, 103-110.
- Narahashi, T.; Frazier, D.T.; Yamada, M. (1970). The site of action and active form of local anesthetics: I: Theory and pH experiments with tertiary compounds. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 171, 32-44.
- Narahashi, T.; Yamada, M.; Frazier, D.T. (1969). Cationic forms of local anaesthetics block action potentials from inside nerve membrane. **Nature** 223, 748-749.
- Nau, C; Wang, G.K. (2001). Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. **J. Membr. Biol.** 201, 1-8
- Oda, Y.; Furuichi, K.; Tanaka, K.; Hiroi, T.; Imaoka, S.; Asada, A.; Fujimori, M.; Funae, Y. (1995). Metabolism of a new local anesthetic, Ropivacaine by human hepatic cytochrome P450. **Anesthesiology** 82, 214-220
- Othani, Y.; Uekama, K.; Fukunaga, K.; Pitha, J. (1989) Differential effects of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrins on human erythrocytes. **Eur. J. Biochem.** 186, 17-22.
- Pardo, L.; Blanck, T.J.J.; Recio-Pinto, E. (2002). The neuronal membrane permeability was markedly increased by bupivacaine and mildly affected by lidocaine and ropivacaine. **Eur. J. Pharmacol.** 455, 81-90.



- Pérusse, R.; Goulet, J.P.; Turcotte, J-Y. (1992a). Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: part I. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 74, 679-686.
- Pérusse, R.; Goulet, J.P.; Turcotte, J-Y. (1992b). Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: part II. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 74, 687-691.
- Pinto, L.M.A. (2002). **Desenvolvimento de formulações anestésicas locais de longa duração.** Tese de Doutorado/Instituto de Biologia/ UNICAMP.
- Pinto, L.M.A.; de Jesus, M.B.; de Paula, E.; Lino, A.C.S.; Duarte, H.A.; Takahata, Y. (2004a). Inclusion compounds between  $\beta$ -cyclodextrin: local anesthetics: a theoretical and experimental study using differential scanning calorimetry and molecular mechanics. **J. Mol. Struct. (TEOCHEM)** 678, 63-66.
- Pinto, L.M.A.; Pereira, R.; de Paula, E.; de Nucci, G.; Santana, M.H.A; Donato, J.L. (2004). Influence of liposomal-local anesthetics on platelet aggregation *in vitro*. **J. Liposome Res.** 14, 51-59.
- Pinto, L.M.A.; Fraceto, L.F.; Santana, M.H.A.; Pertinhez, T.A.; Júnior S.O.; de Paula, E. (2005). Physico-chemical characterization of benzocaine-beta-cyclodextrin inclusion complexes. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 39, 956-963.
- Ragsdale, D.S.; Avoli, M. (1998). Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. **Brain Res. Rev.** 26, 16-28.
- Ragsdale, D.S.; McPhee, J.C.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of sodium channels by local anesthetics. **Science** 265, 1724-1728.
- Ragsdale, D.S.; McPhee, J.C.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic and anticonvulsant block of voltage-gates  $\text{Na}^+$  channels. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93, 9270-9275.
- Rajewski, R.A.; Traiger, G.; Bresnahan, J.; Jaberaboansari, P.; Stella, V. J. (1995). Preliminary safety evaluation of parenterally administered sulfoalkylether  $\beta$ -cyclodextrin derivatives. **J. Pharm. Sci.** 84, 927-932.

- Rajewski, R.A.; Stella, V. J. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. II. *In vivo* drug delivery **J. Pharm. Sci.** 85: 1142-1169.
- Ready, L.B.; Fink, B.R. (1980). Experimental evaluation of local anesthetic solutions using rat infraorbital nerve block. **Can. J. Anaesth.** 27, 58-61.
- Reiz, S.; Nath, S. (1986). Cardiotoxicity of local anaesthetic agents. **Br. J. Anaesth.** 58, 736-746.
- Ritchie, J.M.; Ritchie, B.R.; Greengard, P. (1965). Active structure of local anesthetics. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 150, 152-159.
- Rosemberg, P.; Veering, B.; Urmev, W. (2004). Maximum recommended doses of local anesthetics: A multifuncional concept. **Reg. Anesth. Pain Med.** 29, 564-575.
- Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Rudiger, V.; Ikeda, H. (1998). NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Chem. Rev.** 98, 1755-1785.
- Scott, D.B.; Lee, A.; Fragan, D.; Browler, G.M.; Bloomfield, P.; Lundh, R. (1989). Acute toxicity of ropivacaine compared with that of bupivacaine. **Anesth. Analg.** 69, 563-569.
- Seiller, K.U.; Szathamary, S.; Huss, H.J.; de Coster, R.; Junge, W.(1990). Safety profile and intravenous tolerance of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin after increasing single dose. In: Duchêne, D. **Minutes of the 5 th International Symposium on Cyclodextrins**, 1990. Paris: Éditions de Santé.
- Shah, R. (2002). The significance of QT interval in drug development. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 54, 188-202.
- Spamer, E.; Müller, D.; Wessels, P.; Venter, J. (2002). Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- $\beta$ -cyclodextrin. **Eur. J. Pharm. Sci.** 16, 247-253.
- Strichartz, G; Covino, B. (1993). Anestésicos Locais. In: Miller, R. **Anestesia** 3<sup>a</sup>ed. Brasil: Artes Médicas.

- Szathamary, S.; Seiller, K.U.; Luchmann, I., Huss, H.J.(1990). Pharmacokinetic behaviour and absolute bioavailability of Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin after increasing doses in volunteers. In: Duchêne, D. **Minutes of the 5 th International Symposium on Cyclodextrins**. Paris: Éditions de Santé.
- The Merck Index**. (1996). 12<sup>a</sup>ed. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station.
- Thakkar, A.L.; Demarco, P.V. (1971). Cycloheptaamylose inclusion complexes of barbiturates: correlation between proton magnetic resonance and solubility studies. **J. Pharm. Sci.** 60, 652-653.
- Thomas, J.M.; Schug, S.A. (1999). Recent advances in the pharmacokinetics of local anaesthetics. Long-acting amide enantiomers and continuous infusions. **Clin Pharmacokinet.** 36, 67-83.
- Tommasini, S; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calabro, M.L; Stancanelli, R.; Ficarra, P. (2004) Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 35, 379-387.
- Wang, R. D.; Dangler, L. A.; Greengrass, R. A. (2001). Update on ropivacaine. **Expert Opin. Pharmacother.** 2, 2051-2063.
- Whiteside, J. B.; Wildsmith, J. A. (2001). Developments in local anesthesia drugs. **Br. J. Anaesth.** 87, 27-35.
- Wildsmith, J. A. W.; Gissen, A. J.; Takman, B.; Covino, B. G. (1987). Differential nerve-blockade: esters vs amides and the influence of pKa. **Br. J. Anaesth.** 59, 379-384.
- William, R.O.; Mahaguma, V.; Sriwongjanya, M. (1998). Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Eur. Pharm. Biopharm.** 46, 335-360.
- Zink, W.; Seife, C.; Bohl, J. R. E.; Hacke, N.; Braun, P. M.; Sinner, B.; Martin, E.; Fink, R. H. A.; Graf, B. M. (2003). The acute myotoxic effect of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockade. **Anesth. Analg.** 97, 1173-1179.

Zipes, D. (1987). Arritmias cardíacas -Diagnóstico e tratamento. In: Braunwald, E. **Tratado de Medicina Cardiovascular**. 1ªed. Brasil: Rocca.

**ANEXO I.** Valores absolutos do Intervalo PR(s), nos grupos: Tampão, HP-β-CD, RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). Análise estatística entre os valores medidos nos diferentes tempos após a injeção e o tempo zero (ANOVA): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001.

INTERVALO PR (s)				
Tempo (min)	Tampão	HP-β-CD	RVC	RVC:HP-β-CD
0	0,0466 ± 0,0025	0,0549 ± 0,0029	0,0474 ± 0,0053	0,0490 ± 0,0054
injeção	0,0485 ± 0,0032	0,0559 ± 0,0028	nd	nd
7,5	0,0474 ± 0,0034	0,0569 ± 0,0023 *	0,0546 ± 0,0064 ***	0,0582 ± 0,0084 ***
10	0,0478 ± 0,0032	0,0570 ± 0,0020 **	0,0541 ± 0,0062 ***	0,0574 ± 0,0078 ***
12,5	0,0481 ± 0,0038	0,0576 ± 0,0019 ***	0,0541 ± 0,0059 ***	0,0580 ± 0,0089 ***
15	0,0483 ± 0,0037	0,0582 ± 0,0024 ***	0,0536 ± 0,0068 ***	0,0570 ± 0,0081 ***
20	0,0488 ± 0,0036	0,0581 ± 0,0016 ***	0,0529 ± 0,0078 ***	0,0575 ± 0,0070 ***
25	0,0492 ± 0,0045	0,0587 ± 0,0016 ***	0,0533 ± 0,0732 ***	0,0576 ± 0,0072 ***
30	0,0497 ± 0,0045 **	0,0596 ± 0,0014 ***	0,0537 ± 0,0071 ***	0,0584 ± 0,007 ***
35	0,0503 ± 0,0047 ***	0,0603 ± 0,0017 ***	0,0547 ± 0,0074 ***	0,0589 ± 0,0072 ***
40	0,0517 ± 0,0054 ***	0,0605 ± 0,0015 ***	0,0546 ± 0,0074 ***	0,0597 ± 0,0081 ***
45	0,0516 ± 0,0057 ***	0,0609 ± 0,0019 ***	0,0553 ± 0,0070 ***	0,0595 ± 0,0083 ***
50	0,0529 ± 0,0056 ***	0,0617 ± 0,0016 ***	0,0568 ± 0,0085 ***	0,0606 ± 0,0815 ***
55	0,0538 ± 0,0055 ***	0,0618 ± 0,0016 ***	0,0561 ± 0,0079 ***	0,0610 ± 0,0084 ***

nd-Não determinado

**ANEXO II.** Valores absolutos do Intervalo QRS(s), nos grupos Tampão, HP-β-CD, RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). Análise estatística entre os valores medidos nos diferentes tempos após a injeção e o tempo zero (ANOVA): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

INTERVALO QRS (s)				
Tempo (min)	Tampão	HP-β-CD	RVC	RVC:HP-β-CD
0	0,0294 ± 0,0009	0,03197 ± 0,0019	0,0312 ± 0,0018	0,0318 ± 0,0037
Injeção	0,0299 ± 0,0009	0,0322 ± 0,0017	nd	nd
7,5	0,0296 ± 0,0005	0,0322 ± 0,0018	0,0339 ± 0,0024 <sup>***</sup>	0,0330 ± 0,0034
10	0,0295 ± 0,001	0,0324 ± 0,0019	0,0329 ± 0,0024 <sup>*</sup>	0,0328 ± 0,0036
12,5	0,0298 ± 0,0007	0,0323 ± 0,0020	0,0328 ± 0,0024	0,0365 ± 0,0082
15	0,0302 ± 0,0010	0,0324 ± 0,0019	0,0325 ± 0,0022	0,0328 ± 0,0034
20	0,0298 ± 0,0007	0,0325 ± 0,0017	0,0327 ± 0,0017	0,0329 ± 0,0034
25	0,0303 ± 0,0011	0,0327 ± 0,0015 <sup>*</sup>	0,0327 ± 0,0016	0,0363 ± 0,0094
30	0,0300 ± 0,0006	0,0327 ± 0,0015 <sup>*</sup>	0,0328 ± 0,0021	0,0397 ± 0,0218
35	0,0302 ± 0,0009	0,0327 ± 0,0016 <sup>*</sup>	0,0326 ± 0,0017	0,0330 ± 0,0033
40	0,0296 ± 0,0009	0,0328 ± 0,0015 <sup>**</sup>	0,033 ± 0,00214	0,0335 ± 0,0032
45	0,0305 ± 0,001	0,0327 ± 0,0016 <sup>*</sup>	0,0329 ± 0,0023	0,0333 ± 0,0027
50	0,0303 ± 0,0007	0,0327 ± 0,0015 <sup>*</sup>	0,0330 ± 0,0029	0,0332 ± 0,0030
55	0,0303 ± 0,0007	0,0327 ± 0,0017 <sup>*</sup>	0,0329 ± 0,002	0,0331 ± 0,0025

nd-Não determinado

**ANEXO III.** Valores absolutos do Intervalo RR(s), nos grupos Tampão, HP-β-CD, RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). Análise estatística entre os valores medidos nos diferentes tempos após a injeção e o tempo zero (ANOVA): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001.

INTERVALO RR(s)				
Tempo (min)	Tampão	HP-β-CD	RVC	RVC:HP-β-CD
0	0,1581 ± 0,0169	0,1673 ± 0,0136	0,1593 ± 0,0197	0,1600 ± 0,0270
Injeção	0,1575 ± 0,0174	0,1710 ± 0,0126	a	a
7,5	0,1659 ± 0,0183	0,1731 ± 0,0121 *	0,1842 ± 0,0286***	0,1867 ± 0,0351
10	0,1673 ± 0,0190	0,1744 ± 0,0120 **	0,1809 ± 0,0297***	0,1858 ± 0,0364
12,5	0,1690 ± 0,0187	0,1758 ± 0,0118 **	0,1804 ± 0,0307***	0,1871 ± 0,0368
15	0,1696 ± 0,0191	0,1763 ± 0,0118 ***	0,1803 ± 0,0316***	0,1870 ± 0,0377
20	0,1725 ± 0,0217*	0,1792 ± 0,0131 ***	0,1774 ± 0,0343 **	0,1885 ± 0,0384
25	0,1742 ± 0,0225**	0,1839 ± 0,01307 ***	0,1808 ± 0,0332***	0,1907 ± 0,0375
30	0,1776 ± 0,0242***	0,1864 ± 0,0127 ***	0,1815 ± 0,0340***	0,1944 ± 0,0383
35	0,1825 ± 0,0256***	0,1891 ± 0,01237 ***	0,1827 ± 0,0336***	0,1939 ± 0,0392
40	0,1860 ± 0,0275***	0,1874 ± 0,0120 ***	0,1881 ± 0,0282***	0,2000 ± 0,0384
45	0,1879 ± 0,0263***	0,1910 ± 0,0111 ***	0,1853 ± 0,0278***	0,2024 ± 0,0384
50	0,1905 ± 0,0269***	0,1929 ± 0,0115 ***	0,1897 ± 0,0347***	0,2074 ± 0,0402
55	0,1973 ± 0,0232***	0,1929 ± 0,0107 a***	0,1886 ± 0,0351***	0,2101 ± 0,040

a- Não determinado como único valor; ver Tabela 12.

**ANEXO IV.** Valores absolutos da frequência cardíaca FC(bpm), nos grupos Tampão, HP-β-CD, RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). Análise estatística entre os valores medidos nos diferentes tempos após a injeção e o tempo zero (ANOVA): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001.

INTERVALO RR(s)				
Tempo (min)	Tampão	HP-β-CD	RVC	RVC:HP-β-CD
0	383 ± 39	361 ± 30	381 ± 43	384 ± 57
Injeção	384 ± 34	353 ± 27	a	a
7,5	365 ± 40	348 ± 24	332 ± 49***	331 ± 60***
10	363 ± 41	345 ± 23**	339 ± 51***	333 ± 62***
12,5	359 ± 39 <sup>†</sup>	343 ± 22***	340 ± 53***	331 ± 62***
15	357 ± 40**	342 ± 22***	341 ± 55***	331 ± 63***
20	352 ± 43***	336 ± 23***	349 ± 63**	329 ± 63***
25	349 ± 45***	328 ± 23***	341 ± 59***	325 ± 60***
30	343 ± 46***	324 ± 22***	340 ± 60***	319 ± 60***
35	334 ± 46***	318 ± 21***	338 ± 60***	320 ± 63***
40	329 ± 48***	321 ± 20***	325 ± 49***	309 ± 56***
45	325 ± 45***	315 ± 18***	330 ± 48***	306 ± 57***
50	320 ± 45***	312 ± 19***	325 ± 57***	299 ± 57***
55	308 ± 36***	312 ± 17 <sup>a***</sup>	328 ± 59***	295 ± 55***

a- Não determinado como único valor, ver Tabela 13.



**ANEXO V.** Valores absolutos do Intervalo QT(s), nos grupos Tampão, HP-β-CD, RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). Análise estatística entre os valores medidos nos diferentes tempos após a injeção e o tempo zero (ANOVA): \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001.

INTERVALO QT(s)				
Tempo (min)	Tampão	HP-β-CD	RVC	RVC:HP-β-CD
0	0,0723 ± 0,0023	0,0750 ± 0,0061	0,0731 ± 0,0058	0,0700 ± 0,032
injeção	0,0715 ± 0,0038	0,0758 ± 0,0068	nd	nd
7,5	0,0730 ± 0,0027	0,0762 ± 0,0068	0,0768 ± 0,0059	0,0743 ± 0,0056**
10	0,0737 ± 0,0024	0,0769 ± 0,0071	0,0760 ± 0,0060	0,0743 ± 0,0058**
12,5	0,0735 ± 0,0029	0,0762 ± 0,0064	0,0751 ± 0,0056	0,0751 ± 0,0051**
15	0,0734 ± 0,0025	0,0766 ± 0,0053	0,0716 ± 0,0052	0,0759 ± 0,0057**
20	0,0735 ± 0,0035	0,0753 ± 0,0035	0,0759 ± 0,0052	0,0750 ± 0,0047**
25	0,0739 ± 0,0024	0,0779 ± 0,0068	0,0075 ± 0,0054	0,0758 ± 0,0051**
30	0,0736 ± 0,0027	0,0785 ± 0,0070	0,0759 ± 0,0063	0,0755 ± 0,0049**
35	0,0738 ± 0,0027	0,0780 ± 0,0062	0,0740 ± 0,0048	0,0751 ± 0,0044**
40	0,0737 ± 0,0031	0,0760 ± 0,0069	0,0738 ± 0,0035	0,0762 ± 0,0055**
45	0,0736 ± 0,0030	0,0878 ± 0,0308	0,0736 ± 0,0036	0,0756 ± 0,0053**
50	0,0732 ± 0,0037	0,0778 ± 0,0065	0,0744 ± 0,0044	0,0765 ± 0,0061**
55	0,0737 ± 0,0037	0,0784 ± 0,0069	0,0750 ± 0,0049	0,0760 ± 0,0055**

nd-Não determinado

**ANEXO VI.** Valores absolutos do Intervalo QTc(s), nos grupos Tampão, HP-β-CD, RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). Análise estatística entre os valores medidos nos diferentes tempos após a injeção e o tempo zero (ANOVA): \* p < 0,05 e \*\*\* p < 0,001.

INTERVALO QTc (s)				
Tempo (min)	Tampão	HP-β-CD	RVC	RVC:HP-β-CD
0	0,1339 ± 0,0049	0,1361 ± 0,0084	0,1349 ± 0,0081	0,1296 ± 0,0068
injeção	0,1326 ± 0,0065	0,1364 ± 0,0096	nd	nd
7,5	0,1331 ± 0,0062	0,1367 ± 0,0102	0,1352 ± 0,0063	0,1304 ± 0,0073
10	0,1341 ± 0,0055	0,1376 ± 0,0109	0,1346 ± 0,0066	0,1308 ± 0,00653
12,5	0,1332 ± 0,0052	0,1359 ± 0,0092	0,1332 ± 0,0046	0,1319 ± 0,0049
15	0,1328 ± 0,0053	0,1367 ± 0,0072	0,1334 ± 0,0043	0,1333 ± 0,00415
20	0,1324 ± 0,0065	0,1324 ± 0,0065	0,1357 ± 0,0058	0,1314 ± 0,0047
25	0,1327 ± 0,0061	0,1369 ± 0,0096	0,1334 ± 0,0051	0,1323 ± 0,0054
30	0,1314 ± 0,0055	0,1373 ± 0,0098	0,1340 ± 0,006	0,1310 ± 0,0047
35	0,1305 ± 0,006*	0,1359 ± 0,0088	0,1309 ± 0,0441	0,1319 ± 0,0078
40	0,1295 ± 0,005***	0,1327 ± 0,0100	0,1291 ± 0,0047	0,1308 ± 0,0050
45	0,1289 ± 0,005***	0,1321 ± 0,0510	0,1295 ± 0,0048	0,1290 ± 0,0064
50	0,1275 ± 0,006***	0,1346 ± 0,0096	0,1301 ± 0,0061	0,1298 ± 0,007
55	0,1269 ± 0,005***	0,1356 ± 0,0105	0,1312 ± 0,0048	0,1285 ± 0,0080

nd-Não determinado

**ANEXO VII.** Valores absolutos de PAS (mmHg), nos grupos Tampão, HP-β-CD, RVC e RVC:HP-β-CD. Dados expressos em média ± SD (n = 8/grupo). Análise estatística entre os valores medidos nos diferentes tempos após a injeção e o tempo zero (ANOVA): \*\*\* p < 0,001.

PAS (mmHG)				
Tempo (min)	Tampão	HP-β-CD	RVC	RVC:HP-β-CD
0	142,00 ± 14,31	123,00 ± 15,93	128,30 ± 8,35	141,02 ± 6,137
injeção	141,28 ± 16,64	122,95 ± 14,34	105,90 ± 11,04***	110,61 ± 10,80***
7,5	133,65 ± 17,37	124,34 ± 10,44	125,84 ± 2,88	128,03 ± 8,56
10	132,81 ± 18,62	125,18 ± 13,04	128,94 ± 15,77	129,50 ± 9,22
12,5	131,29 ± 17,27	125,70 ± 14,06	127,64 ± 13,47	133,02 ± 8,05
15	131,89 ± 17,57	127,10 ± 10,97	128,54 ± 14,010	134,56 ± 11,13
20	130,31 ± 19,10	127,62 ± 12,05	133,24 ± 17,28	134,23 ± 10,85
25	131,40 ± 16,38	119,34 ± 10,70	135,19 ± 17,31	133,66 ± 8,97
30	135,56 ± 16,82	120,38 ± 9,52	136,4 ± 15,52	133,28 ± 12,05
35	139,99 ± 16,88	120,15 ± 10,71	135,59 ± 13,68	134,53 ± 8,08
40	128,19 ± 21,86	118,00 ± 11,81	133,30 ± 12,75	130,75 ± 14,06
45	129,35 ± 18,60	120,66 ± 12,15	133,38 ± 12,90	134,16 ± 11,00
50	127,88 ± 18,83	123,00 ± 14,22	133,14 ± 12,95	131,63 ± 8,38
55	130,04 ± 18,03	123,69 ± 13,44	134,75 ± 11,87	128,26 ± 9,01

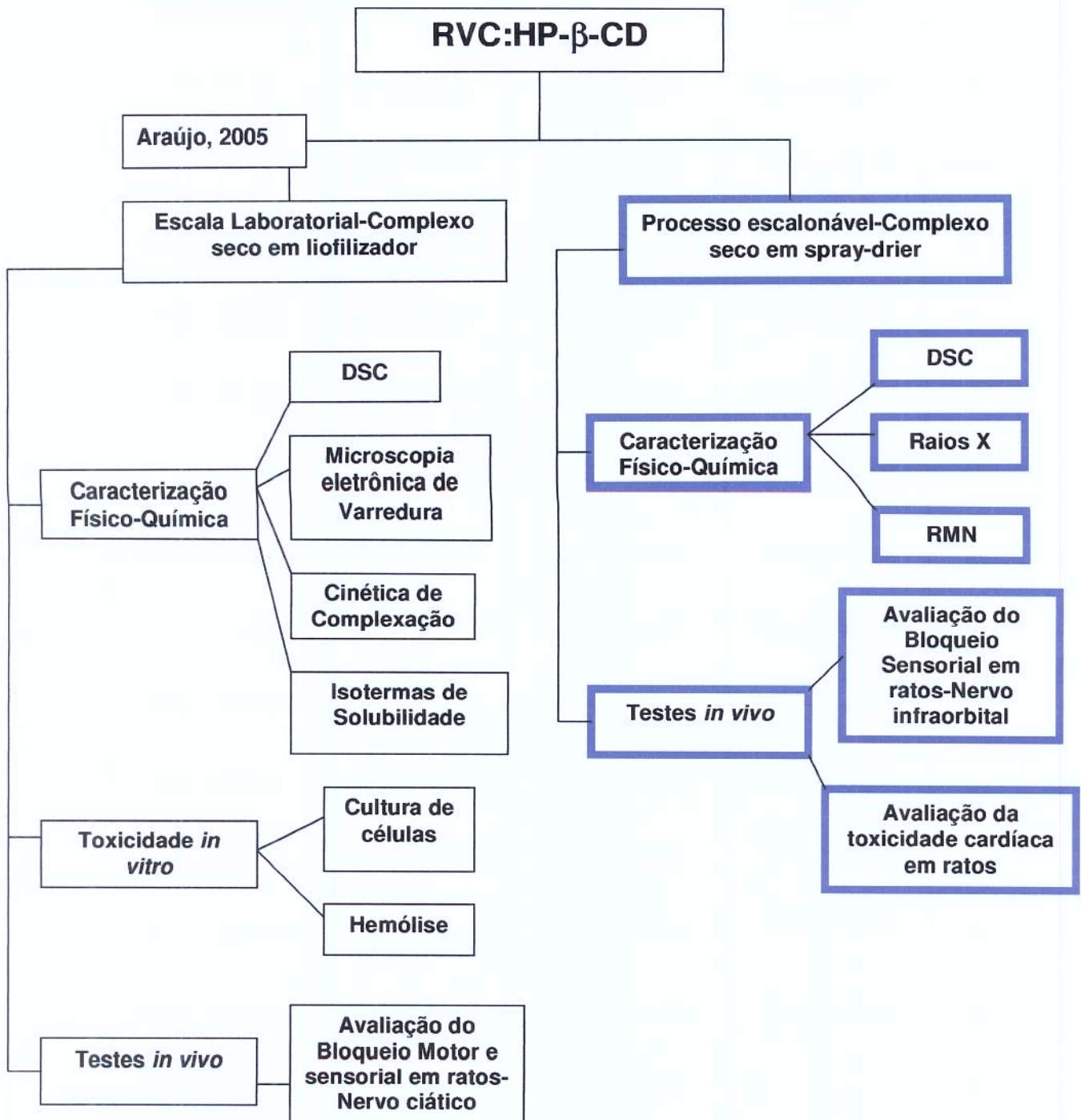
**ANEXO VIII.** Valores absolutos de PAD (mmHg), nos grupos Tampão, HP- $\beta$ -CD, RVC e RVC:HP- $\beta$ -CD. Dados expressos em média  $\pm$  SD ( $n = 8$ /grupo). Análise estatística entre os valores medidos nos diferentes tempos após a injeção e o tempo zero (ANOVA): \*\*\*  $p < 0,001$ .

PAD (s)				
Tempo (min)	Tampão	HP- $\beta$ -CD	RVC	RVC:HP- $\beta$ -CD
0	95,02 $\pm$ 13,72	84,93 $\pm$ 12,36	86,38 $\pm$ 17,4	91,61 $\pm$ 7,09
injeção	97,33 $\pm$ 13,87	85,29 $\pm$ 14,08	56,28 $\pm$ 15,23***	69,32 $\pm$ 13,37***
7,5	90,46 $\pm$ 16,30	83,93 $\pm$ 11,26	86,96 $\pm$ 10,22	84,65 $\pm$ 6,25
10	89,05 $\pm$ 14,94	84,09 $\pm$ 10,73	86,67 $\pm$ 9,99	92,03 $\pm$ 10,56
12,5	90,74 $\pm$ 17,86	84,41 $\pm$ 10,88	85,65 $\pm$ 8,99	91,72 $\pm$ 10,99
15	90,68 $\pm$ 18,16	84,01 $\pm$ 12,05	85,79 $\pm$ 9,19	91,36 $\pm$ 12,86
20	86,72 $\pm$ 16,96	86,75 $\pm$ 9,45	91,04 $\pm$ 11,05	91,12 $\pm$ 11,53
25	90,04 $\pm$ 18,23	78,63 $\pm$ 8,68	90,77 $\pm$ 10,91	90,57 $\pm$ 11,77
30	94,94 $\pm$ 14,10	80,80 $\pm$ 9,20	91,22 $\pm$ 11,03	89,44 $\pm$ 14,55
35	86,65 $\pm$ 17,59	77,45 $\pm$ 10,04	90,02 $\pm$ 11,44	90,73 $\pm$ 13,22
40	84,21 $\pm$ 21,65	80,51 $\pm$ 6,35	87,35 $\pm$ 11,98	87,43 $\pm$ 15,91
45	84,40 $\pm$ 21,25	81,58 $\pm$ 10,89	89,41 $\pm$ 12,14	89,32 $\pm$ 4,19
50	84,32 $\pm$ 21,45	80,34 $\pm$ 11,28	76,48 $\pm$ 30,57	86,19 $\pm$ 12,07
55	nd	81,21 $\pm$ 2,11	88,24 $\pm$ 12,16	83,96 $\pm$ 11,88

nd-Não determinado

Anexo IX

Caracterização e ensaios realizados para o Complexo RVC:HP- $\beta$ -CD. Em azul, estão os testes realizados nesta dissertação.





Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

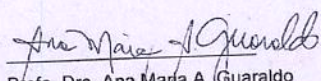
CERTIFICADO

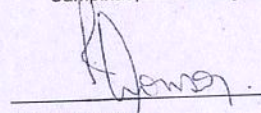
Certificamos que o Protocolo nº 994-1, sobre "TESTES DE ANALGESIA IN VIVO COM FORMULAÇÕES DO COMPLEXO DE ROPIVACAÍNA: HIDROXIPROPIL-BETA-CICLODEXTRINA" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula / Fernanda Del Grossi Ferraz Carvalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação 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 22 de março de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 994-1, entitled "ANALGESIC TESTES WITH RIPOVACAINE: HIDROXYPROPYL-BETA-CYCLODEXTRIN COMPLEX", 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 March 22, 2006.

Campinas, 22 de março de 2006.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA/IB - Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13063-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3788-6359  
Telefax: (19) 3788-6356  
E-mail: [ceea@cemib.unicamp.br](mailto:ceea@cemib.unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>