



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

VIVIANE APARECIDA QUEIROZ

**“AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANESTÉSICA
E DA FARMACOCINÉTICA DA BUPIVACAÍNA COMPLEXADA
COM HIDROXIPROPIL-BETA-CICLODEXTRINA, EM
ASSOCIAÇÃO COM SUFENTANIL”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Viviane Aparecida Queiroz
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa Dra Eneida de Paula

Co-orientadora: Dra Cíntia Maria Saia Cereda

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Q32a

Queiroz, Viviane Aparecida, 1988-

Avaliação das atividades citotóxica e anestésica e da farmacocinética da bupivacaína complexada com hidroxipropil-beta-ciclodextrina, em associação com sufentanil / Viviane Aparecida Queiroz. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Eneida de Paula.

Coorientador: Cíntia Maria Saia Cereda.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Analgesia. 2. Bupivacaína. 3. Hidroxipropil-beta-ciclodextrina. 4. Sufentanil. I. Paula, Eneida de, 1963-. II. Cereda, Cíntia Maria Saia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of the analgesic and cytotoxic activities and pharmacokinetic of bupivacaine-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex associated with sufentanil

Palavras-chave em Inglês:

Analgesia

Bupivacaine

Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin

Sufentanil

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Eneida de Paula

Angélica de Fátima de Assunção Braga

Michelle Franz-Montan Braga Leite

Data da defesa: 07-03-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 07 de março de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eneida de Paula (Orientadora)



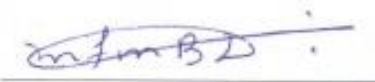
Assinatura

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga



Assinatura

Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite



Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Assinatura

Profa. Dra. Milene Heloisa Martins

Assinatura



Jardim em Giverny (Monet)

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

(Fernando Pessoa)

Dedicado aos meus pais, Antônio e Sirlei

...pelo amor incondicional e por todos os ensinamentos proporcionados, que sempre levarei comigo. Amo muito vocês!

“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **Deus**, por conceder-me conhecimento e capacidade para o desenvolvimento e concretização desta dissertação. Agradeço também, por ter colocado em meu caminho pessoas excepcionais, com as quais eu compartilho esta conquista, são elas:*

*Profa Dra **Eneida de Paula**, a qual sou imensamente grata, por ter me concedido a oportunidade de fazer parte da história do biomembranas. Agradeço pela orientação, pelos conhecimentos didáticos, adquiridos durante o PED e também pelos puxões de orelha, porque foram eles que me indicaram onde era preciso melhorar, e é esse o papel de um orientador comprometido. Assim, é por esse e outros motivos, que tenho muito orgulho de tê-la como **ORIENTADORA**. Muito Obrigada!!!*

*Profa Dra **Cíntia Maria Saia Cereda**, por ter se tornado ao longo dos anos uma pessoa muito especial para mim. Agradeço a você mãe Cíntia, não apenas pela brilhante coorientação, mas também por ter sido, acima de tudo, uma grande amiga, disposta a me auxiliar como seus conhecimentos e aconselhamentos, sempre muito sensatos. Tê-la como coorientadora foi uma constante aprendizagem, além de aprender a fazer os experimentos, tratar e discutir resultados, você me proporcionou conhecimentos que levarei para a vida. Muito Obrigada!!! ☺*

*Meus pais, **Antônio e Sirlei** e irmãos, **Ana Paula e Paulo César**, por sempre acreditarem e torcerem por mim!!! ♡*

*Profa Dra **Daniele Ribeiro de Araújo**, por ter acompanhado de perto minha jornada no Biomenbranas, sempre a disposição para esclarecer qualquer dúvida. Sua ajuda foi de fundamental importância para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!!!*

*Profa Dra **Giovana Tófoli**, pela importante colaboração nos ensaios farmacocinéticos, os quais, certamente, auxiliaram no enriquecimento do conjunto de resultados. Agradeço também, pelo incentivo, apoio e amizade!!!*

*Profa(s) Dra(s) **Patrícia Melo e Maristella Anazetti**, por terem me proporcionado a primeira oportunidade no meio científico. Sou muito grata!!*

*Prof Dr **Marcelo Lancellotti**, pelo fornecimento de células da linhagem NG97, bem como, pelo auxílio e explicações sobre o cultivo.*

*Prof Dr **Cleyton Crepaldi Domingues**, por todas as conversas e risadas ☺, sempre contagiando a todos com seu carisma!!*

Equipe Biomembranas, Eneida, Cíntia Cereda, Michelle, Cleyton, Maribel, Márcio, Camila, Bruna, Sheila, Allan, Renato Grillo, Nathalie, Diego, Anderson, Mário, Raquel, Vivi Guilherme, Vivi Vieira, Ana Laís, Jaqueline, Marina, Taciani, Cíntia Matsumoto, Livia e os que não fazem mais parte da equipe: Tati, Vivi Tseng, Clóvis e Thais. Agradeço a todos pela convivência ao longo desses anos.

As amigas **Sheila Stoco**, **Simone Lima (Billy)** e **Bruna Casadei**, pela amizade sincera, apoio, confiança, conselhos e risada, e olha que foram muitas. Obrigada por serem parte da minha história. Amo vocês!!! 

A amiga **Jucilene**, que desde sempre acreditou e torceu por mim!!

Os primos, **Amanda**, por ensaiar comigo a aula de qualificação incansavelmente e sem reclamar KKK, **Elaine**, pela confiança e aprendizagem, **Aléx** e **André**, pela torcida na conquista dos meus objetivos!!!

Os avôs **Sérgio** e **José** (in memoriam) por todos os momentos felizes e inesquecíveis!!!

As vovós **Ana** e **Elvira**, pelo amor e carinho!!!

Andréia Vigilato, por todos os esclarecimentos com a papelada.

Mãe Marina, pela amizade, confiança e torcida.

Daniel, **Fabiano** e **Juliana**, da universidade São Francisco, pela colaboração durante os ensaios farmacocinéticos.

À Universidade Estadual de Campinas.

Ao **CNPq**, pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

	Página
<u>ÍNDICE DE FIGURAS</u>	x
<u>ÍNDICE DE TABELAS</u>	xiii
<u>LISTA DE ABREVIACÕES</u>	xiv
<u>RESUMO</u>	xv
<u>ABSTRACT</u>	xvi
<u>I. INTRODUÇÃO</u>	1
1- Dor em Obstetrícia	1
2- Anestésicos Locais	2
2.1- Bupivacaína	9
3- Farmacologia dos Analgésicos Opióides	10
3. 1- Sufentanil	18
4- Associação entre Bupivacaína e Sufentanil para a Analgesia Obstétrica	18
5- Ciclodextrina	20
<u>II. OBJETIVOS</u>	26
<u>III. MATERIAL E MÉTODO</u>	27
1- Fármacos, Sais e Solventes	27
2- Equipamentos	27
3- Animais	27
4- Preparo do Complexo de Inclusão de Bupivacaína em Hidroxipropil-beta-ciclodextrina	28
5- Ensaio de Viabilidade Celular	29

6- Avaliação da Atividade Analgésica e Bloqueio Motor em Modelo Animal	31
6. 1- Grupos	31
6. 2- Injeção intratecal em <i>Ratus novergicus</i>	31
6. 3- Avaliação do Bloqueio Motor em <i>Ratus novergicus</i>	32
6. 4- Avaliação do Bloqueio Sensorial em <i>Ratus novergicus</i>	33
7- Avaliação da Farmacocinética em Coelhos Nova Zelândia	34
7. 1- Determinação da Concentração Plasmática da Bupivacaína nas Diferentes Formulações Estudadas	34
7. 2- Preparo e Análise das Amostras por Espectrometria de Massas	36
7. 3- Validação da Metodologia	37
8- Análise Estatística	39
<u>IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	40
1- Ensaios de Cultura de Células: Viabilidade Celular	40
2- Avaliação do Bloqueio Motor por Via Intratecal em Ratos	44
3- Avaliação do Bloqueio Sensorial em Ratos	45
4- Avaliação da Farmacocinética em Coelhos	53
4. 1- Validação da Metodologia	53
4. 2- Análise da Concentração Plasmática e do Perfil Farmacocinético da Bupivacaína e Sufentanil por Espectrometria de Massas	58
<u>V- CONCLUSÕES</u>	66
<u>VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	67
<u>VII- ATIVIDADES DESENVOLVIDAS</u>	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Condução do estímulo nervoso.	3
Figura 2	Interação dos AL com a fase lipídica membranar, exemplificando possíveis vias de acesso ao(s) sítio(s) de ação na proteína canal de sódio voltagem-dependente.	4
Figura 3	Anestésicos locais da família amida (A) e ésteres (B) – Estruturas químicas.	7
Figura 4	Estrutura química da BVC.	10
Figura 5	Analgesicos opióides naturais (A), semissintéticos (B) e sintéticos (C). (http://opioids.com/chemical/index.html). Acessado em 19 de setembro de 2011.	12
Figura 6	Representação esquemática da organização estrutural dos receptores para opióides apresentando domínios transmembranares e alças intra e extracelulares.	14
Figura 7	Representação esquemática da regulação da adenilato ciclase e de canais iônicos, induzida por opióides agonistas. A) Situação prévia à ligação do opióide ao receptor: proteína G com as três subunidades (α - β - γ) associadas e GDP ligado à subunidade α . B) A formação do complexo opióide-receptor, causando sua união à proteína G que, então, troca GDP por GTP. C) A ligação de GTP à subunidade α da proteína G promove dissociação das subunidades β - γ ; o complexo α -GTP liga-se à adenilato ciclase inibindo-a e o complexo β - γ determina a ativação da condutância ao potássio e inibição de canais de cálcio voltagem-dependente.	16
Figura 8	Estrutura química do SUF.	18
Figura 9	Representação estrutural do anel macrocíclico (A) e características estéricas (B) das CD naturais α , β e γ .	21
Figura 10	Disposição das hidroxilas de cada unidade glicopirranose (A) e representação das porções hidrofóbica (cavidade) e hidrofílica (superfície externa) da ciclodextrina (B).	22
Figura 11	Formação de complexos de inclusão entre fármaco e CD, nas proporções de 1:1 e 1:2.	23
Figura 12	Representação esquemática da formação de complexos de inclusão entre a BVC e a molécula de CD, em solução aquosa.	25
Figura 13	Representação esquemática do preparo do complexo de inclusão da BVC em HP- β -CD.	28
Figura 14	Fluxograma com os grupos e as respectivas concentrações para o ensaio de viabilidade celular.	30

Figura 15	Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular (teste do MTT).	30
Figura 16	Fluxograma com os grupos e as respectivas concentrações para os testes de bloqueio motor e sensorial.	31
Figura 17	Inserção da agulha no espaço intervertebral (L5-L6) para injeção intratecal em ratos.	32
Figura 18	Visualização do bloqueio motor induzido por AL em <i>Ratus norvegicus</i> .	32
Figura 19	Foto (A) e representação esquemática (B) do procedimento realizado durante o teste PWTP para avaliação do bloqueio sensorial em <i>Ratus norvegicus</i> .	33
Figura 20	Local da injeção intratecal em coelhos (A). Cateter intravascular como via de acesso venoso na orelha (B).	35
Figura 21	Representação esquemática do ensaio farmacocinético em coelhos. (A) injeção intramuscular de α -cloralose e uretano para indução de anestesia geral; (B) coleta de sangue antes da injeção intratecal (tempo zero); (C) injeção intratecal dos ativos; (D) coleta de sangue nos intervalos estabelecidos; (E) centrifugação das amostras e (F) análise das amostras por espectrometria de massas.	35
Figura 22	Microscopia óptica de culturas permanentes de neuroglioma (NG97) em teste de viabilidade celular após tratamento com: BVC:HP- β -CD+SUF 0,2 mM (A) e BVC:HP- β -CD+SUF 4 mM (B). Notar as células viáveis, coradas com MTT em A e células não coradas em B (ver texto).	41
Figura 23	Efeito citotóxico induzido pelas formulações BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF, contendo 0,2, 1, 2, 3 e 4 mM de BVC, em células 3T3 (A) e NG97 (B), incubadas por 24 h (a 37 °C, 5% de CO ₂ e pH 7,4) e avaliadas pela redução do corante MTT. Dados expressos em % de células viáveis em relação ao controle com MTT (Médias $\pm$ D.P. n=3). <i>Análise estatística: (ANOVA - Tukey-Kramer). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. (a) BVC vs BVC+SUF; (b) BVC vs BVC:HP-β-CD; (c) BVC vs BVC:HP-β-CD+SUF; (d) BVC+SUF vs BVC:HP-β-CD; (e) BVC+SUF vs BVC:HP-β-CD+SUF; (f) BVC:HP-β-CD vs BVC:HP-β-CD+SUF.</i>	43
Figura 24	Avaliação do bloqueio sensorial do nervo caudal em ratos: curvas de efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os fármacos BVC, BVC+SUF, BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF nas concentrações de 0,125% (A), 0,25% (B) e 0,5% de BVC (C). A concentração de SUF utilizada foi de 0,0015%. Valores expressos em média $\pm$ D.P. (n=7). <i>Análise estatística: (ANOVA - Tukey-Kramer). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. (a) BVC vs BVC+SUF; (b) BVC vs BVC:HP-β-CD; (c) BVC vs BVC:HP-β-CD+SUF; (d) BVC+SUF vs BVC:HP-β-CD; (e) BVC+SUF vs BVC:HP-β-CD+SUF; (f) BVC:HP-β-CD vs BVC:HP-β-CD+SUF.</i>	48

Figura 25	Avaliação do bloqueio sensorial em ratos: Curva de efeito x tempo no teste PWTP para o grupo tratado com o opióide SUF a 38,8 μ M. Valores expressos em média $\pm$ d.p. (n=7).	50
Figura 26	Avaliação do bloqueio sensorial do nervo caudal em ratos: curvas de efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os fármacos BVC (A); BVC+SUF (B); BVC:HP- β -CD (C) e BVC: HP- β -CD+SUF (D), nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5%. A concentração de SUF utilizada foi de 0,0015%. Valores expressos em média $\pm$ D.P. (n=7). <i>Análise estatística: (ANOVA - Tukey-Kramer). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$. A- (a) BVC-0,5% vs BVC-0,25%; (b) BVC-0,5% vs BVC-0,125% e (c) BVC-0,25% vs BVC-0,125%. B- (a) BVC+SUF-0,5% vs BVC+SUF-0,25%; (b) BVC+SUF-0,5% vs BVC+SUF-0,125% e (c) BVC+SUF-0,25% vs BVC+SUF-0,125%. C- (a) BVC:HP-β-CD-0,5% vs BVC:HP-β-CD-0,25%; (b) BVC:HP-β-CD-0,5% vs BVC:HP-β-CD-0,125% e (c) BVC:HP-β-CD-0,25% vs BVC:HP-β-CD-0,125%. D: (a) BVC:HP-β-CD+SUF-0,5% vs BVC:HP-β-CD+SUF-0,25%; (b) BVC:HP-β-CD+SUF-0,5% vs BVC:HP-β-CD+SUF-0,125% e (c) BVC:HP-β-CD+SUF-0,25% vs BVC:HP-β-CD+SUF-0,125%.</i>	51
Figura 27	Curvas do efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com BVC (0,5%) e BVC:HP- β -CD (0,25%) associadas ao SUF a 38,8 μ M.	52
Figura 28	(A) Espectro de massa sequencial da BVC, íon produto de m/z 140,16. Energia de colisão 20 eV. B) Espectro de massa sequencial do sufentanil, íon produto de m/z 238,1. Energia de colisão 20 eV.	53
Figura 29	Concentração plasmática média de BVC ($\pm$ erro padrão) x tempo após a injeção intratecal dos grupos: BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF a 0,5% (n = 5/grupo).	60
Figura 30	Concentração plasmática média de SUF ($\pm$ erro padrão) x tempo após a injeção intratecal dos grupos: SUF; BVC+SUF e BVC:HP- β -CD+SUF a 0,5% (n = 5/grupo).	62
Figura 31	Concentração plasmática média de bupivacaína medida em coelhos ($\pm$ erro padrão) x tempo, após a injeção intratecal das formulações: (A) BVC; (B) BVC+SUF; (C) BVC:HP- β -CD e (D) BVC:HP- β -CD+SUF em 0,5% e bloqueio sensorial do nervo caudal em ratos: curvas de efeito x tempo no teste PWTP para as mesmas formulações em igual concentração ($\pm$ erro padrão).	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das fibras nervosas.	4
Tabela 2	Características físico-químicas dos AL.	8
Tabela 3	Características físico-químicas dos opióides.	17
Tabela 4	Características das CD naturais e de alguns de seus derivados (adaptado de Brewster & Loftsson, 2007).	24
Tabela 5	Valores de IC ₅₀ para as linhagens 3T3 e NG97, após tratamento com as formulações: BVC livre; BVC+SUF; BVC:HP-β-CD; BVC:HP-β-CD+SUF e SUF (BVC e BVC:HP-β-CD – 0,2; 1; 2; 3 e 4 mM / SUF – 9,7 μM).	41
Tabela 6	Tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (ASC) induzido pelos fármacos BVC; BVC+SUF; BVC:HP-β-CD e BVC:HP β-CD +SUF a 0,125, 0,25 e 0,5%. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 7/grupo). <i>Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis</i> (ANOVA não paramétrico).	45
Tabela 7	Duração média de analgesia (min.) induzida pelos fármacos BVC; BVC+SUF; BVC:HP-β-CD e BVC:HP β-CD +SUF a 0,125, 0,25 e 0,5%.	49
Tabela 8	Curva de Calibração (Linearidade) do SUF.	54
Tabela 9	Curva de Calibração (Linearidade) da BVC.	55
Tabela 10	Resultados das análises intra-lote do controle de qualidade LQ do SUF.	56
Tabela 11	Resultados inter-lotes do controle de qualidade LQ do SUF.	56
Tabela 12	Resultados das análises intra-lote do controle de qualidade LQ da BVC.	57
Tabela 13	Resultados inter-lotes do controle de qualidade LQ da BVC.	57
Tabela 14	Concentração (média ± desvio padrão) de BVC (ng/mL) medida no plasma de coelhos, após a injeção intratecal dos grupos: BVC; BVC+SUF; BVC:HP-β-CD e BVC:HP-β-CD+SUF a 0,5% (n = 5/grupo).	59
Tabela 15	Concentração (média ± desvio padrão) de SUF (ng/mL) medida no plasma de coelhos após a injeção intratecal dos grupos: SUF; BVC+SUF e BVC:HP-β-CD+SUF (n = 5/grupo).	61
Tabela 16	Parâmetros farmacocinéticos (média ± D.P.) da BVC (ng/L) medida no plasma de coelhos, após a injeção intratecal de BVC; BVC+SUF; BVC:HP-β-CD e BVC:HP-β-CD+SUF	65
Tabela 17	Parâmetros farmacocinéticos (média ± D.P.) do SUF (ng/L) medida no plasma de coelhos, após a injeção intratecal de SUF; BVC+SUF; BVC:HP-β-CD+SUF.	65

LISTA DE ABREVIACÕES

AL	Anestésico(s) Local(is)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área Sob a Curva
BVC	Bupivacaína
CD	Ciclodextrina(s)
C_{max}	Concentração Plasmática Máxima
CM	Concentração Média
CSVD	Canais de Sódio Voltagem-Dependente
DP	Desvio Padrão
HP-β-CD	2-hidroxipropil-β-ciclodextrina
LC-MS-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry</i>
LQ	Limite de Quantificação
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio
PI	Padrão Interno
PWTP	<i>Pain Withdrawal Threshold to Pressure</i>
Q1	Primeiro Analisador
Q2	Segundo Analisador
Q3	Terceiro Analisador
SUF	Sufentanil
T_{max}	Tempo para Obtenção da Concentração Máxima
t ¹/₂ beta	Tempo de Meia Vida de Eliminação

RESUMO

Dentre os fármacos usados para prevenir e aliviar a dor encontram-se os anestésicos locais (AL). A bupivacaína (BVC) é um dos AL do tipo amino-amida mais utilizado na terapia da dor aguda e crônica. Sua combinação com opióides lipofílicos tornou-se uma prática comum para analgesia em procedimentos cirúrgicos, com o objetivo de reduzir a dose necessária de AL sem comprometer a qualidade de analgesia. Contudo, a BVC é conhecida por apresentar uma acentuada toxicidade para o sistema nervoso central e sistema cardiovascular. Uma alternativa para diminuir os efeitos tóxicos, bem como aumentar o efeito terapêutico é a utilização de sistemas de liberação modificada de fármacos, que empregam carreadores como as ciclodextrinas. Neste trabalho avaliamos a eficácia anestésica e o perfil farmacocinético da BVC (na forma do complexo BVC hidroxipropil-beta-ciclodextrina - BVC:HP- β -CD, na razão molar de 1:1) em associação com o opióide sufentanil (SUF), em modelos animais. Foram realizados também ensaios de citotoxicidade *in vitro*, em cultura de células de fibroblastos 3T3 e de neurogliomas NG97, sendo a viabilidade celular determinada através do teste de redução do MTT. Para avaliação da atividade analgésica, realizou-se o teste pressão na pata em ratos da linhagem Unib: Wistar; os animais foram tratados com injeção intratecal de: BVC e BVC:HP- β -CD nas concentrações de 4, 8 e 16 mM (0,125; 0,25 e 0,5%, respectivamente), associadas ou não com 38,8 μ M de SUF; o bloqueio motor induzido por essas formulações foi também avaliado. Para determinação da concentração plasmática e do perfil farmacocinético das formulações descritas, foram utilizados coelhos albinos da raça Nova Zelândia, que receberam tratamento por via intratecal, com BVC livre ou complexada (16 mM), associada ou não com SUF (38,8 μ M); as amostras foram analisadas por espectrometria de massas. Nos testes de avaliação de toxicidade *in vitro*, células 3T3 e NG97 foram tratadas com as formulações acima, mas em concentrações que variaram de 0,2 a 4 mM, para a BVC livre ou complexada, em associação ou não com SUF em concentração proporcionalmente correspondentes à dos testes *in vivo* (9,5 μ M). Nos resultados de atividade analgésica, o tratamento com BVC:HP- β -CD+SUF prolongou o efeito analgésico, em comparação com BVC+SUF, em 1,9 e 1,8 vezes nas concentrações de BVC de 4 e 8 mM, respectivamente. Além disso, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto à função motora dos animais. Em relação ao perfil farmacocinético da BVC, o grupo BVC:HP- β -CD apresentou características de lenta liberação, com baixos níveis plasmáticos, que não foram alteradas após a associação ao coadjuvante SUF. Esses resultados evidenciam uma potencial aplicação clínica da associação medicamentosa BVC:HP- β -CD e SUF, para reduzir a frequência de administração e também a concentração necessária de BVC para promover analgesia em procedimentos cirúrgicos.

ABSTRACT

Local anesthetics (LA) are among the most important medicines used to prevent and alleviate pain. Bupivacaine (BVC) is the drug of choice in the treatment of acute and chronic pain, worldwide. It has been used in association with lipophilic opioids in surgical procedures, reducing the required amount of anesthetic without loss of the analgesic level achieved. Bupivacaine is also known to be toxic for the Central Nervous and Cardiovascular systems. The development of drug delivery systems, with carriers such as cyclodextrins, is an interesting approach to reduce toxic side effects and to enhance the therapeutic index of biological active compounds. Here we evaluated the anesthetic activity as well as the pharmacokinetic profile of BVC (free and complexed with hydroxypropyl-beta-cyclodextrins - BVC:HP- β -CD in a 1:1 molar ratio) in association with the opioid sufentanil (SUF) in animal models. The cytotoxicity of such formulations against 3T3 fibroblasts and NG97 neuroglioma cells in culture were also investigated by the use of MTT reduction tests. Sensorial (paw pressure test) and motor blockage was evaluated after intrathecal administration of BVC and BVC:HP- β -CD at concentrations = 4, 8 and 16mM (0.125; 0.25 and 0.5%, respectively), associated or not with 38.8 μ M SUF, to Wistar rats. BVC plasma levels and pharmacokinetic profile were evaluated through mass spectroscopy in New Zealand rabbits, intrathecally administered with 16 mM BVC (free or complexed with HP- β -CD), associated or not with 38.8 μ M SUF. For the in vitro tests 3T3 and NG97 cells were treated with the formulations at concentrations that ranged from 0.2 to 4 mM BVC (free or complexed) plus 9.5 μ M SUF, i.e. proportionally equivalent to the concentration used at the in vivo tests. Treatment with BVC:HP- β -CD+SUF was able to improve the antinociceptive effect of bupivacaine 1.8-1.9 times (4 and 8 mM, respectively), in comparison to BVC+SUF. No statistical differences were observed for the motor blockade among the groups. Regarding the pharmacokinetic profile of BVC, the BVC:HP- β -CD group showed slow release characteristics with low plasma levels, with no changes after the association to the SUF supporting. Altogether these results point toward a potential application for the pharmaceutical association of BVC:HP- β -CD with SUF, reducing the concentrations and the administration frequency required for analgesia effect in surgical procedure

I. INTRODUÇÃO

1. Dor em Obstetrícia

Nos últimos anos, avanços significativos foram observados na compreensão dos mecanismos que são subjacentes à dor e seu tratamento. Segundo Ossipov e col., (2010) a experiência da dor é altamente variável entre os indivíduos, por estar associada ao estado emocional, grau de ansiedade, atenção e distração, experiências passadas, entre outros fatores. De fato, o comitê de taxionomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como uma experiência emocional e sensorial desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial (Cavalcanti et al., 2004).

Na classificação da dor por uma perspectiva neurobiológica (Woolf, 2010), a mesma pode ser dividida em três classes: i) dor nociceptiva, resultante da ativação mecânica, térmica ou química de receptores aferentes nociceptivos, que atuam como um sistema de alerta para detectar e minimizar o contato com estímulos nocivos, ii) dor inflamatória, causada pela ativação do sistema imunológico por lesão tecidual ou infecção e iii) dor patológica, caracterizada por um estado doente, decorrente de danos ao sistema nervoso (dor neuropática) ou pela sua função anormal (dor disfuncional). Quanto à característica de resolução, a dor pode ser classificada em aguda - a qual apresenta fisiopatologia bem compreendida e desaparece com o processo de cura - ou dor crônica, caracterizada por maior tempo de duração e cujo diagnóstico e tratamento são mais difíceis (Menezes, 2005; Ferreira & Perla, 2007).

A experiência da dor no trabalho de parto, embora subjetiva, é considerada a mais severa sentida pelas mulheres em função de possuir uma pelve adaptada gradativamente ao andar bípede, inadequada para o parto vaginal. A introdução da analgesia no parto começou em 1847 quando o obstetra escocês James Y. Simpson usou éter e, posteriormente clorofórmio, para alívio da dor (Vale, 1998; Wong, 2009).

Posteriormente, com a descoberta dos anestésicos locais e da anestesia espinal, foi desenvolvida a analgesia de parto por meio de bloqueios regionais. Em 1943 Hingson e Edwards publicaram o primeiro relatório de analgesia caudal contínua, método mais utilizado para o parto na década de quarenta, devido a possibilidade em administrar doses adicionais de anestésicos locais (Hingson & Edwards 1943; Wong, 2009).

Atualmente, o grande desafio dos estudos que buscam o controle da dor ou sua eliminação, caracteriza-se pelo desenvolvimento de novos ativos, ou de formulações anestésicas capazes de aliar o aumento do efeito analgésico, melhora na qualidade do bloqueio sensorial e redução dos efeitos tóxicos dos compostos utilizados.

2. Anestésicos Locais

Anestésicos locais (AL) são substâncias capazes de bloquear de modo reversível a geração e condução do impulso nervoso ligando-se a receptores específicos nos canais de sódio voltagem-dependente (CSVD) (Yagiela et al., 2000; Lagan & McLure, 2004; Becker & Reed, 2006; Golembiewski, 2007).

O primeiro AL descrito foi a cocaína, extraído das folhas de *Erythroxylon coca* pelo químico alemão Albert Nieman, em 1860. Posteriormente, em 1884 o neurologista austríaco Sigmund Freud publicou o livro intitulado “Uber coca” (sobre a cocaína), no qual descreveu as diversas aplicações deste alcalóide, incluindo o uso como AL, afrodisíaco, estimulante e no tratamento de enfermidades como exaustão nervosa, desordens digestivas, histeria, asma, entre outras (Moriarty et al., 1984; Haas, 1995). Naquele mesmo ano, Carl Koller, na Áustria, introduziu a cocaína como AL para anestesia oftálmica (Carvalho, 1994; Ferreira & Martini, 2001). O uso da cocaína espalhou-se rapidamente pela Europa e América para uso em anestesia local e regional (Ruetsch et al., 2001).

Experiências posteriores, realizadas por Freud e outros, demonstraram o grande potencial da cocaína no desenvolvimento de dependência química, o que resultou na proibição de seu uso em 1914 (Araujo et al., 2008a). Neste contexto, houve a necessidade de realizar novas pesquisas à procura de AL mais seguros, o que levou à descoberta de vários outros compostos sintéticos com atividade antinociceptiva como: benzocaína, procaína, prilocaína, lidocaína, mepivacaína, bupivacaína, ropivacaína, levobupivacaína entre outros (Strichartz, 1987; de Paula & Schreier, 1995; 1996; Malamed, 2001).

Para a compreensão do mecanismo pelo qual os AL exercem seus efeitos farmacológicos, faz-se necessário o entendimento da condução nervosa, iniciada em função de um estímulo, que pode ser químico, físico ou elétrico (Carvalho, 1994). Esse estímulo resulta no aumento gradativo da permeabilidade da membrana aos íons de sódio, de modo a tornar o

potencial de membrana positivo e desencadear o potencial de ação ao longo das fibras nervosas (Figura 1) (McLure & Rubin, 2005). Essas fibras são classificadas de acordo com o tamanho, velocidade de condução e função (Barash & Stok, 2009).

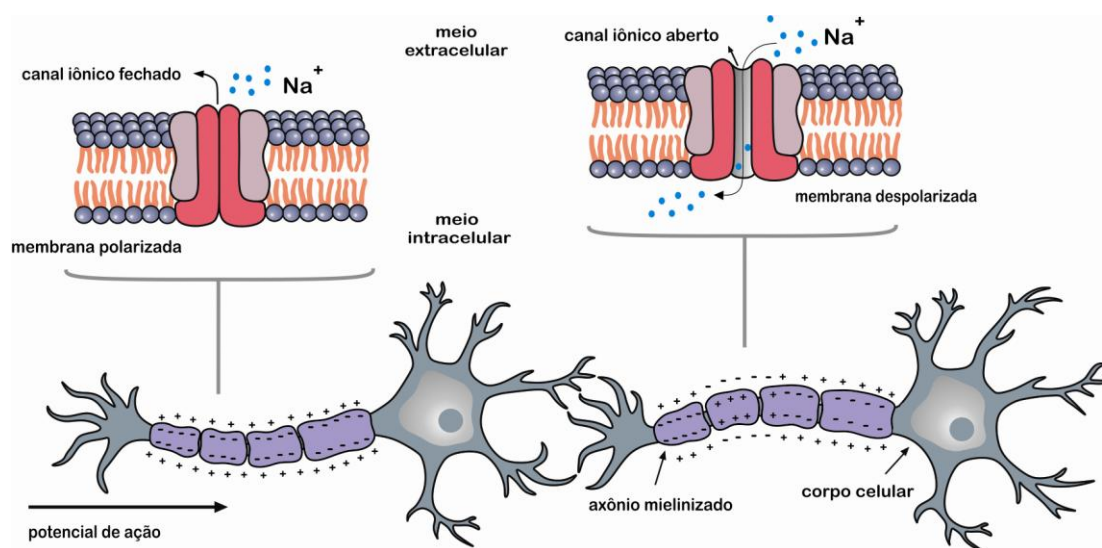


Figura 1. Condução do estímulo nervoso.

Fibras mielinizadas e de maiores diâmetros (A: α - β - γ - δ) estão tipicamente envolvidas em funções sensoriais e motoras em que a velocidade de transmissão nervosa é crítica. Em contraste, fibras não mielinizadas e de menores diâmetros (fibras C), apresentam menores velocidades de conduções e transmitem informações sensoriais como dor, temperatura e funções autonômicas (Tabela 1) (Barash & Stok, 2009).

Os mecanismos de ação dos AL descritos na literatura envolvem tanto a interação com regiões específicas no CSVD, localizados ao longo das membranas excitáveis das fibras nervosas, quanto com a fase lipídica membranar (Figura 2).

A ação dos AL nas fibras nervosas resulta na interrupção do estímulo nervoso por bloquear reversivelmente uma ou mais regiões diferentes do CSVD, impedindo a condutância do íon sódio e consequentemente, a deflagração do potencial de ação (Ragsdale et al., 1994, 1996; Ragsdale & Avoli, 1998; Li et al., 1999; Fraceto et al., 2006). A afinidade do AL varia de acordo com o estado do canal, em geral, a afinidade é maior quando o CSVD está aberto, e menor quando está fechado (McLure & Rubin, 2005).

Quanto à interação com a fase lipídica membranar, os AL quando em grandes quantidades, interrompem a condutância iônica por inserir-se nesta região, de modo a desorganizá-la e modificar o estado dos CSVD. Essa teoria indica a relação existente entre a hidrofobicidade do AL e sua potência anestésica (Butterworth e Strichartz, 1990; de Paula & Schreier, 1996). Ainda, a inserção dos AL no interior da bicamada lipídica levaria à formação de um sítio transiente, facilitando o acesso da molécula ao(s) sítio(s) de ligação nos CSVD (Fraceto et al., 2006; de Paula et al., 2008).

Tabela 1. Classificação das fibras nervosas (adaptado de Barash et al., 2009).

Fibra	Diâmetro (μ)	Presença de mielina	Velocidade de condução (m/sec)	Função
A α - A β	6-22	+	30-120	motor e propriocepção
A γ	3-6	+	15-35	tônus muscular
A δ	1-4	+	5-25	dor, toque e temperatura
B	< 3	+	3-15	função autonômica
C	0,3-1,3	-	0,7-1,3	dor e temperatura

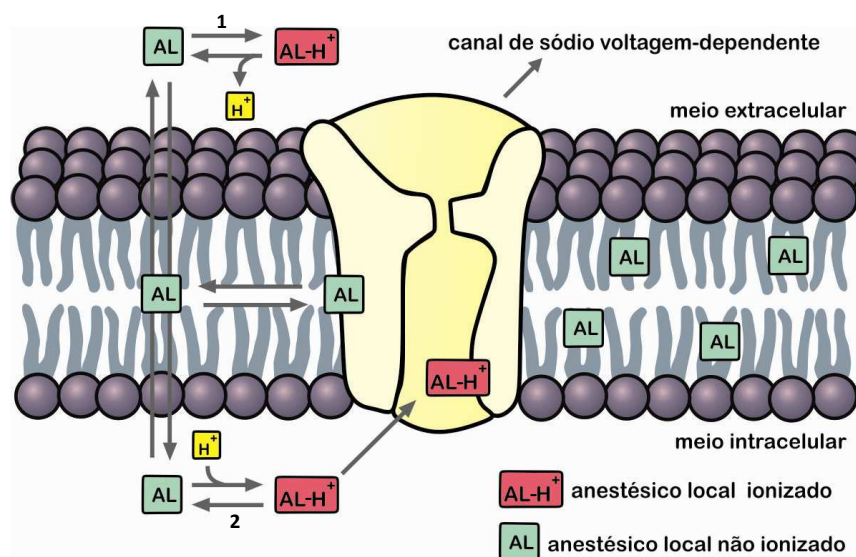


Figura 2. Interação dos AL com a fase lipídica membranar, exemplificando possíveis vias de acesso ao(s) sítio(s) de ação na proteína canal de sódio voltagem-dependente.

O desempenho clínico dos AL depende, sobretudo, de suas propriedades físico-químicas, que são decorrentes de sua estrutura química (Carvalho, 1994; McLure & Rubin, 2005). Uma molécula típica de AL é composta por um anel benzênico, responsável pela penetração do fármaco no nervo em função da lipossolubilidade e também por um grupo amina, ionizável sob influência do pH do meio. Estas duas regiões ligam-se por meio de uma cadeia intermediária, em geral formada por um éster (-COO-) ou uma amida (-CONH-).

Desse modo, de acordo com a natureza química da ligação entre o anel benzênico e o grupamento amina, os AL de uso comercial classificam-se em dois grandes grupos, denominados amino-amidas e amino-ésteres (Figura 3) (Carvalho, 1994; Friedman et al., 1999; Golembieswski, 2007). O grupo amino-amida é o mais utilizado na clínica e tem como representantes a lidocaína, prilocaína, levobupivacaína, bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína (Koehler et al., 2005; Weiniger, et al., 2010). Os AL do grupo amino-amida são biotransformados pelos microsossomos hepáticos, enquanto que os do grupo amino-ésteres sofrem biotransformação no plasma, pelas colinesterases plasmáticas (Malamed, 2001; Becker et al., 2006).

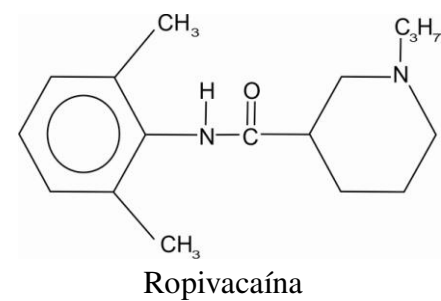
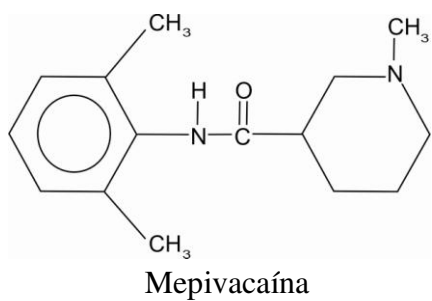
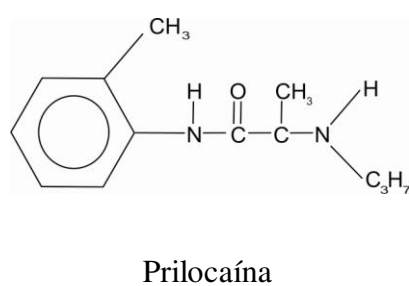
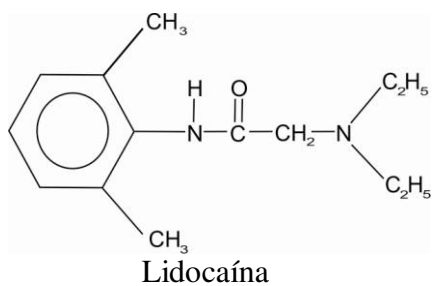
A maioria dos AL de uso clínico apresentam um pKa maior que o do pH fisiológico (entre 7 e 8), o que determina uma maior porção do anestésico injetado na forma iônica (protonada, -NH^+), no pH fisiológico. Por serem bases fracas e pouco solúveis em meio aquoso, os AL são usados sob a forma de cloridrato ($\text{pH} = 5\text{-}5,5$), onde 100% das moléculas está ionizada. No entanto, é a porção não ionizada (-N:) que apresenta maior partição nas membranas, onde encontram-se os CSVD (Lagan & McLure, 2004). Sendo assim, para que ocorra o bloqueio do impulso nervoso, esses compostos, ao serem administrados, sofrem tamponamento pelos sistemas tampões teciduais, tal que em pH 7,4 o equilíbrio desloca-se no sentido de formação de uma fração não ionizada, que ultrapassa as barreiras biológicas com facilidade e se redistribui no lado citoplasmático dos axônios, reequilibrando-se, em parte, na forma ionizada (Carvalho, 1994). Segundo Frazier et al., (1970), existem evidências de que a forma ionizada, pelo lado interno da membrana axonal, interage com o portão de inativação do CSVD, inativando-o (Frazier et al., 1970).

AL com menor pKa têm maior proporção de base neutra (não ionizada) que pode penetrar na célula e acelerar o início da ação (Lagan & McLure, 2004).

A lipossolubilidade é também um importante fator na determinação do início de ação dos AL. Esses compostos são capazes de se difundir pelas membranas neuronais com diferentes velocidades, e acessar seus sítios de ação no CSVD. O coeficiente de partição é um parâmetro hidrofóbico bastante usado e sua determinação consiste na quantificação da distribuição do AL entre as fases orgânica e aquosa de modo, que quanto maior seu valor, maior será a lipossolubilidade e potência do anestésico (McLure & Rubin, 2005).

A ligação dos AL com as proteínas plasmáticas (albumina e α 1-glicoproteína ácida) e teciduais também se correlaciona com a duração de ação da atividade anestésica, potência, dose administrada, vascularização do tecido e taxa de metabolismo (McLure & Rubin, 2005). A afinidade dos AL por proteínas plasmáticas é proporcional à hidrofobicidade dos mesmos e, segundo Becker e col. (2006), corresponde à afinidade de ligação desses compostos a pontos específicos nos CSVD, de modo a prolongar a presença do AL no local de ação e consequentemente, a duração do efeito anestésico. Na Tabela 2, são apresentadas características físico-químicas e farmacológicas de alguns AL das famílias amino-éster e amino-amida.

(A)AMIDAS



(B)ÉSTERES

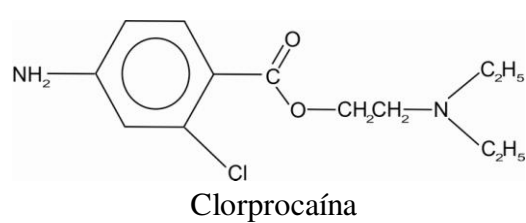
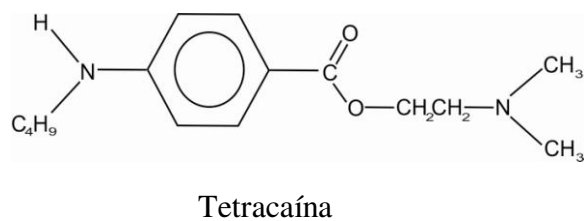
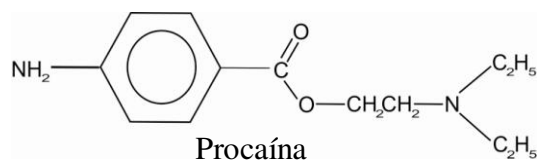
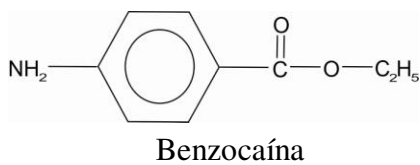


Figura 3. Anestésicos locais da família amino-amida (A) e amino-éster (B) – Estruturas químicas.

Tabela 2. Características físico-químicas dos AL.

Agentes	Massa molecular	pKa (25°C)	Velocidade de início de ação	Coefficiente de partição*	% de ligação a proteínas	Potência
Amino-ésteres						
Cocaína	303	8,7	lento	-	98	alta
Procaína	236	9	lento	1,7	6	baixa
Tetracaína	264	8,2	lento	221	76	intermediária
Amino-amidas						
Lidocaína	234	7,7	rápido	43	64	intermediária
Bupivacaína	288	8,1	lento	346	95	alta
Levobupivacaína	288	8,1	lento	346	96	alta
Ropivacaína	274	8,1	lento	115	94	intermediária
Prilocaina	220	7,9	rápido	25	55	intermediária
Articaína	321	7,8	rápido	-	95	intermediária

* Coeficiente de Partição octanol/água (McLure e Rubin, 2005).

No entanto, o uso desses fármacos não exclui a possibilidade da manifestação de efeitos como cardiotoxicidade e/ou neurotoxicidade, decorrentes de sua absorção sistêmica, após administração regional (Rang et al., 2004).

Na cardiotoxicidade evidencia-se, a princípio, hipertensão e taquicardia, resultantes da ativação central do sistema nervoso simpático, de modo a mascarar os efeitos cardiodepressores dos AL. Porém, a contratilidade deprimida das fibras miocárdicas em um segundo momento, induz a hipotensão progressiva (Mercado & Weinberg, 2011).

No que diz respeito à neurotoxicidade, as vias inibitórias são as primeiras a serem suprimidas. Essas vias são, em grande parte, dependentes de receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de vertebrados (Sugimoto et al., 2000). Desse modo, manifesta-se inicialmente uma fase excitatória, caracterizada pela ocorrência de tremores, aparecimento de agitação e convulsões. À medida que a dose é aumentada, as vias excitatórias são suprimidas, instalando-

se uma fase inibitória, descrita pela manifestação de um estado generalizado de depressão do SNC (Groban, 2003; Rang et al., 2004).

Uma variedade de fatores influenciam a possibilidade de ocorrência ou severidade da toxicidade sistêmica dos AL, incluindo a localização e técnica de bloqueio, fatores de riscos individuais do paciente, dose administrada, adequação do tratamento e AL específico (Neal et al., 2010). Uma técnica frequentemente utilizada para limitar as concentrações sistêmicas do fármaco é a coadministração de um agente vasoconstritor, que tem como exemplo mais comumente utilizado, a epinefrina. Em uma concentração de 5 µg/mL (1:200.000), a epinefrina reduz acentuadamente as concentrações máximas sistêmicas dos AL medidas após a infiltração subcutânea ou injeção do plexo cervical superficial (Rosenberg et al., 2004).

A bupivacaína e etidocaina são os AL mais propensos a provocarem arritmias letais, por apresentarem uma elevada potência anestésica (Mercado & Weinberg, 2011), relacionada diretamente a toxicidade (Knudsen et al., 1997). Esses efeitos são proporcionais à lipossolubilidade dos AL, uma vez que a associação desses compostos com a região hidrofóbica das bicamadas lipídicas resulta em sua maior distribuição para os locais de ação (Li et al., 2002).

2.1 Bupivacaína

A bupivacaína (BVC) (Figura 4) é o AL da classe amino-amida mais utilizado na terapia da dor aguda e crônica (Araújo et al., 2005). Este sucesso é atribuído a sua elevada potência e capacidade de produzir anestesia prolongada. No entanto, a maior incidência de alterações e paradas cardíacas, além do número elevado de mortes após a injeção intravascular acidental de BVC, torna este AL diferente dos demais (Cuvillon et al., 2009). De acordo com Clarkson & Hondegheem (1985), a cardiotoxicidade deste AL está associada a sua lenta dissociação dos CSVD, durante a diástole ventricular.

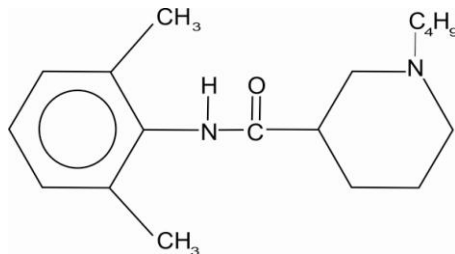


Figura 4. Estrutura química da BVC.

A presença de um carbono assimétrico em sua molécula permite a existência de dois estereoisômeros: a dextrobupivacaína e a levobupivacaína (Moraes et al., 2007b). Esta última juntamente com a ropivacaína, são os AL amino-amidas mais recentemente introduzidos na clínica médica por possuírem um menor risco de cardiotoxicidade em relação à mistura racêmica da BVC (Van de Velde et al., 2007; Mercado & Weinberg, 2011), sendo utilizados inclusive em combinações com opióides por via intratecal para analgesia de parto (Vercauteren et al., 2001).

Contudo, apesar da vantagem no que diz respeito à cardiotoxicidade, a levobupivacaína e a ropivacaína, quando administrados via intratecal, apresentam potência inferior à verificada para a BVC racêmica (Van de Velde et al., 2007).

3. Farmacologia dos Analgésicos Opióides

O ópio, produto natural extraído da planta *Papaver somniferum* (papoula), tem sido empregado desde a antiguidade para obtenção de analgesia e sedação. No entanto, apenas em 1806, foi relatado o isolamento de uma substância pura de seu extrato, pelo químico alemão Friedrich Setürner, a qual recebeu a denominação de morfina em alusão a Morfeu, o deus do sono (Pugsley, 2002; Duarte, 2005). Rapidamente após a morfina, outros alcalóides foram purificados da papoula (tebaína, codeína, papaverina, noscapina,...) e estes, juntamente com a morfina constituem a classe dos alcalóides naturais (Pugsley, 2002).

Contudo, a partir da síntese de novos fármacos com estrutura similar à da morfina, houve a necessidade em adequar a nomenclatura dos componentes deste grupo farmacológico. Assim, o termo opiáceo, utilizado inicialmente para designar compostos derivados naturais do ópio e vários congêneres semissintéticos, foi substituído pelo termo opióide, que representa todos os fármacos naturais, semissintéticos ou sintéticos (Figura 5) que atuam por meio da

interação com receptores e desempenham ação farmacológica semelhante à morfina (Gutstein & Akil, 2003).

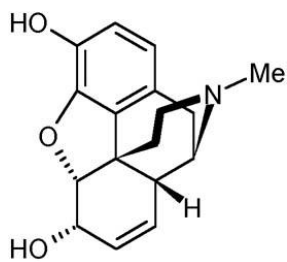
A classe dos opióides semissintéticos é representada pelos derivados da hidromorfona, diacetilmorfina (heroína), tebaína-buprenorfina e oxicodona (Sakata & Issy, 2008), sendo que a obtenção de muitos desses compostos, ocorre a partir de modificações relativamente simples na estrutura química da morfina ou da tebaína (Gutstein & Akil, 2003; Duarte, 2005). Em relação aos opióides sintéticos, incluem-se como representantes a meperidina, naloxona, naltrexona, propoxifeno, fentanil, sufentanil entre outros (Sakata & Issy, 2008). Os efeitos farmacológicos dos integrantes desse grupo mimetizam a ação dos peptídeos opióides endógenos (encefalinas, dinorfinas e endorfinas) (Eguchi, 2004; Vallejo et al., 2011).

A meta-encefalina e a leu-encefalina foram os primeiros opióides endógenos a serem isolados a partir do cérebro de suínos, por Hughes e Kosterlitz (1975). Esses autores verificaram a competição desses opióides endógenos com opióides semelhantes à morfina, pela interação com receptores do SNC, fornecendo novas dimensões ao estudo das relações estrutura-atividade dos mesmos (McDonald & Lambert, 2011).

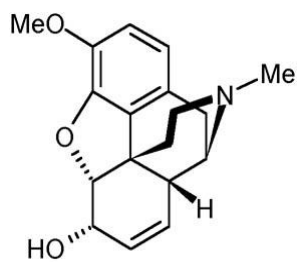
Desse modo, estudos foram realizados a fim de definir os tipos de receptores nervosos através da caracterização do mecanismo de ação e de perfis farmacológicos dos opióides. Atualmente, esses receptores são classificados em μ (mi, subtipos 1, 2 e 3), δ (delta, subtipos 1 e 2), κ (kappa, subtipos 1, 2 e 3) e ORL-1 (*Opioid Receptor Like*), este último sendo considerado historicamente relacionado à família dos receptores opióides por apresentar distribuição semelhante, além do grau de homologia (Dietis et al., 2011; McDonald & Lambert, 2011).

Estruturalmente, os receptores opióides apresentam-se dispostos em sete domínios transmembranares conectados por três alças ou *loops* intracelulares e três extracelulares, com um domínio C-terminal intracelular e um domínio N-terminal extracelular (Figura 6) (Pugsley, 2002; Medzihradszky, 2003). Na comparação dos mesmos, evidencia-se similaridade entre os domínios transmembranares e alças intracelulares, sendo que essas estruturas se apresentam até mesmo idênticas em algumas regiões. No entanto, existem divergências significativas na estrutura dos segmentos C e N-terminal, bem como na estrutura dos domínios 4 e 5 (Medzihradszky, 2003).

(A) OPIÓIDES NATURAIS

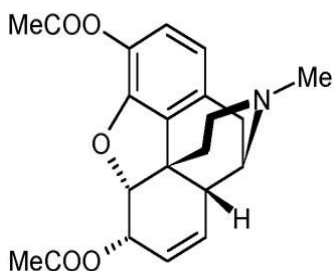


Morfina

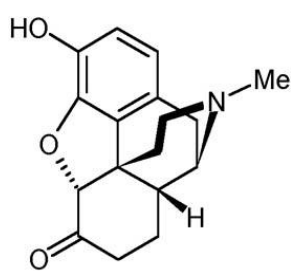


Codeína

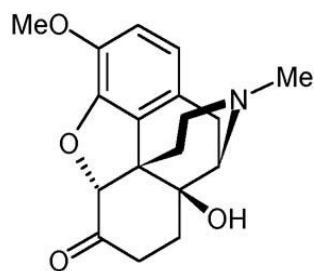
(B) OPIÓIDES SEMISSINTÉTICOS



Diacetilmorfina (heroína)

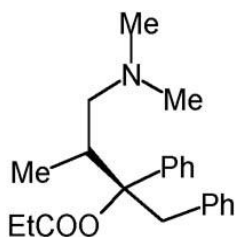


Hidromorfona

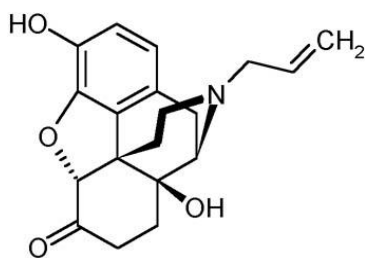


Oxycodona

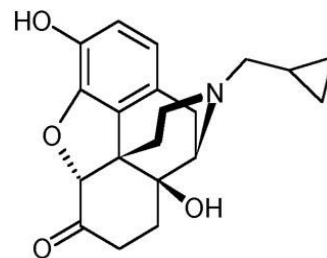
(C) OPIÓIDES SINTÉTICOS



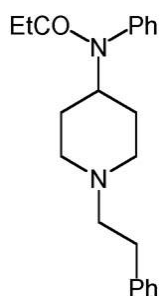
Propoxifeno



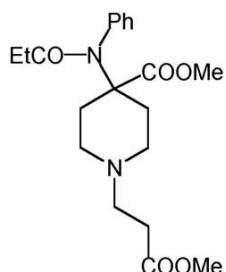
Naloxona



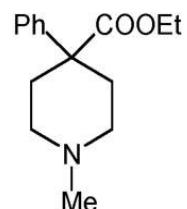
Naltrexona



Fentanil



Remifentanil



Meperidina

Figura 5. Analgésicos opióides naturais (A), semi-sintéticos (B) e sintéticos (C). (<http://opioids.com/chemical/index.html>). Acessado em 19 de setembro de 2011

Quanto à localização, os receptores difundem-se em todo SNC e SNP, bem como, em todos os tecidos periféricos. Entretanto, pode-se verificar que a maior concentração desses receptores está em áreas como tálamo medial, núcleo magno da rafe e substância cinzenta periaquedutal, por estarem associados com a transmissão da dor (Sakata & Issy, 2008; Trescot et al., 2008). Segundo Satoh & Minami, (1995) a presença de receptores em diversas áreas do SNC (medula espinhal, núcleo caudado e amígdala) resulta na modulação das atividades sensitivas, motoras e psíquicas. Além disso, os opióides modulam a liberação de dopamina nos núcleos da base e tronco encefálico; ativam o sistema inibitório rostrocaudal (que modula a aferência nociceptiva na medula espinhal); exercem analgesia no corno posterior da medula espinhal; e modificam as reações emocionais e os processos cognitivos relacionados à dor no sistema límbico e no córtex cerebral (Eguchi, 2004).

A interação de analgésicos opióides com receptores μ pode desencadear uma série de efeitos como analgesia, euforia, tolerância, dependência, imunossupressão, doenças respiratórias, náuseas, vômitos e depressão (Vallejo et al., 2011). A ocorrência de depressão respiratória é mediada por receptores μ localizados nos centros respiratórios da medula, com a diminuição da sensibilidade dos quimiorreceptores ao dióxido de carbono. Efeitos como náuseas e vômitos são prevalentes em pacientes que receberam morfina, sendo causados pela estimulação na zona de gatilho quimiorreceptora da medula (McDonald & Lambert, 2011).

Em relação à ativação de receptores δ , evidenciam-se efeitos como analgesia, imunoestimulação e depressão respiratória. A ativação de receptores κ promove a indução de analgesia, sedação, diurese, disforia e miose, sendo esta última resultante da interação opióide-receptor κ no núcleo de Edinger-Westphal e em segmentos autonômicos do nervo oculomotor (Sakata & Issy, 2008; Vallejo et al., 2011).

Desse modo, a ocorrência e potencialidade dos efeitos farmacológicos dependem, entre outros fatores, das características dos receptores com os quais os opióides interagem. Considerando esta interação, os opióides podem ser classificados em: i) agonistas, quando a atividade farmacológica é aparente, ii) antagonistas, que ao interagirem não desencadeiam resposta farmacológica, iii) agonista-antagonista, quando apresentam efeito agonista em alguns receptores e antagonista em outros e ii) agonistas parciais, quando se produz menos do que a resposta máxima. Opióides antagonistas como a naloxona são capazes de interferir

na atividade de um opióide agonista se ambos interagirem com o mesmo receptor sendo, portanto, capazes de reduzir ou reverter efeitos proporcionados por intoxicações opiáceas. Estes compostos podem ser competitivos, se ligarem no mesmo receptor do agonista, ou não competitivos, se bloquearem os efeitos de maneira diferente (Vallejo et al., 2011).

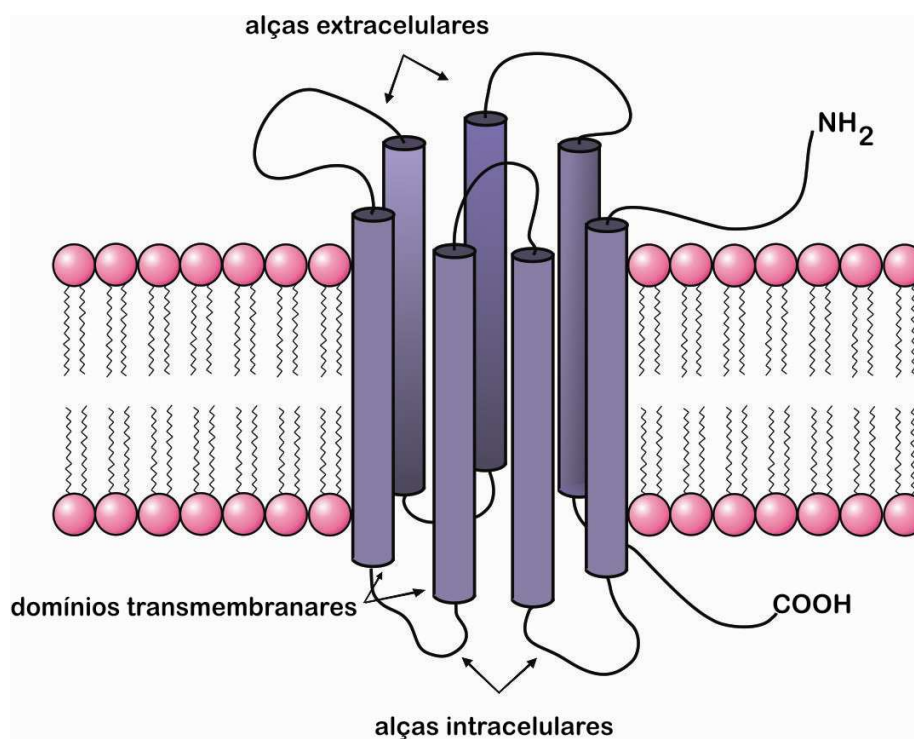


Figura 6. Representação esquemática da organização estrutural dos receptores para opióides, apresentando domínios transmembranares e alças intra e extracelulares.

Por serem aniônicos, os receptores opióides localizados na membrana celular, acoplam-se à proteína G em sua forma ionizada, para que ocorra uma ligação eficiente. Após a interação com um agonista, o receptor sofre mudança conformacional que resulta na substituição de uma guanosina difosfato (GDP) por uma guanosina trifosfato (GTP) na subunidade α da proteína G inibitória, estimulando-a. Esse evento resulta na dissociação da subunidade α das demais subunidades da proteína G (β - γ), que podem se associar com outros compostos intracelulares, a fim de modular as funções biológicas.

A inibição da adenilato ciclase mediada pela interação com o complexo α -GTP promove a redução na produção de AMP cíclico (AMPC) de modo a influir negativamente na atividade da proteína quinase A (PKA). A diminuição na atividade da PKA resulta na diminuição da liberação de neurotransmissores, entre eles o neurotransmissor excitatório substância P, que facilita a transmissão do estímulo doloroso. Outros mecanismos para a redução da excitabilidade celular por opióides ocorrem por meio da hiperpolarização da membrana causada pela ativação da condutância ao potássio e inibição de canais de cálcio voltagem-dependente, ambos mediados pelo complexo β - γ da proteína G inibitória (Figura 7) (Pugsley, 2002; Eguchi, 2004; McDonald & Lambert, 2011).

A escolha do opióide pelos anestesiológicos baseia-se geralmente em princípios farmacocinéticos. Opióides que apresentam rápida meia-vida de eliminação são utilizados em procedimentos curtos ao passo que opióides com longa meia-vida de eliminação são selecionados para procedimentos mais prolongados. O que os torna então, compostos amplamente utilizados no controle da dor, com acentuada importância na dor intensa (Adam et al., 2001; Lang & Stein, 2009).

A habilidade dos opióides em atravessar a barreira hematoencefálica depende do tamanho molecular, lipossolubilidade, grau de ligação proteica e grau de ionização (Tabela 3). Um fator determinante na velocidade e extensão de acesso dos opióides aos receptores é a lipossolubilidade. Opióides lipossolúveis difundem-se rapidamente através das membranas e medula espinhal, o que leva a um rápido início de analgesia. No entanto, quanto maior a lipossolubilidade maior será a probabilidade de estes opióides serem absorvidos pelos vasos, gorduras ou sítios de receptores inespecíficos. Por outro lado, opióides hidrossolúveis como a morfina atravessam as membranas mais lentamente, o que determina um lento início de ação (Rocha et al., 2002; Sakata & Issy, 2008).

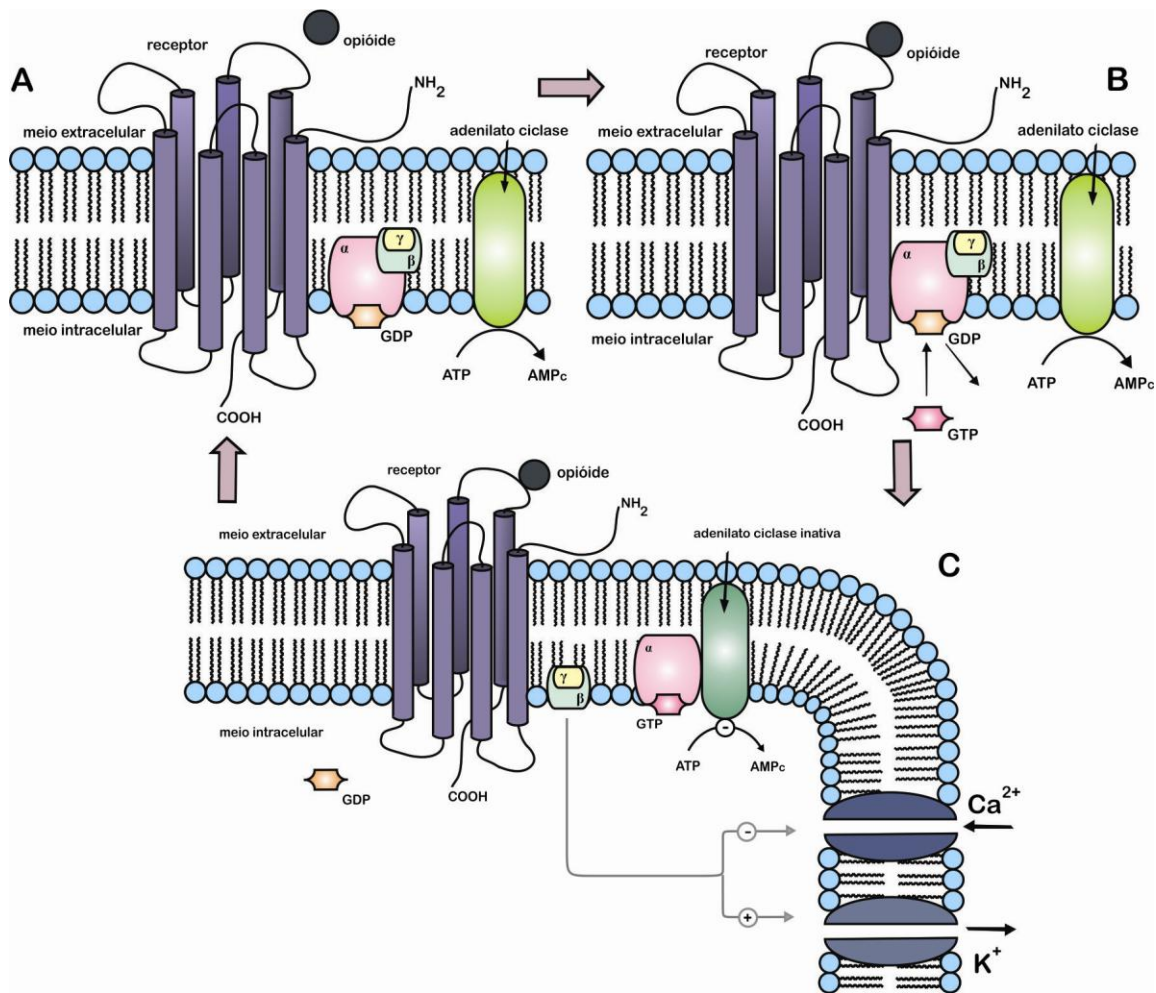


Figura 7. Representação esquemática da regulação da adenilato ciclase e de canais iônicos, induzida por opióides agonistas. A) Situação prévia à ligação do opióide ao receptor: proteína G com as três subunidades (α - β - γ) associadas e GDP ligado à subunidade α . B) A formação do complexo opióide-receptor, causando sua união à proteína G que, então, troca GDP por GTP. C) A ligação de GTP à subunidade α da proteína G promove dissociação das subunidades β - γ ; o complexo α -GTP liga-se à adenilato ciclase inibindo-a e o complexo β - γ determina a ativação da condutância ao potássio e inibição de canais de cálcio voltagem-dependente.

De modo geral, os opióides podem ser totalmente absorvidos após a injeção subcutânea ou intramuscular e também no trato gastrointestinal. Quanto à absorção espinal, podem penetrar adequadamente na medula, após a administração epidural ou intratecal (Gutstein & Akil, 2003).

A administração espinhal de opióides tem sido empregada principalmente para o alívio da dor aguda de diversas causas: traumatismo (fratura de membro inferior ou de costelas), queimaduras, analgesia intraoperatória (em associação com AL ou complementar à anestesia geral) e analgesia pós-operatória. Ela também é indicada para dor crônica quando o efeito analgésico não for suficiente com opióide oral ou quando houver contraindicação de uso oral (Sakata & Issy, 2008).

A infusão intratecal de analgésicos surgiu como uma opção terapêutica para o alívio da dor em pacientes que não obtiveram sucesso com outras vias de tratamento, e também para pacientes com analgesia adequada em alta dose enteral ou terapia parenteral, mas com efeitos colaterais inaceitáveis (Smith et al., 2008). Além do fácil manejo, esta técnica reduz a permanência hospitalar ao garantir recuperação rápida, apresenta excelente analgesia pós-operatória, atenuação do estresse cirúrgico e diminuição de fenômenos trombóticos, entre outras vantagens (Vale, 1998).

A administração de opióides por via intratecal ocorre rotineiramente e, quando comparada ao uso sistêmico, está associada a menor incidência de efeitos colaterais, maior duração de ação e necessidade de menores doses, uma vez que a administração intratecal permite o acesso maior e direto ao receptor. A maioria dos opióides pode ser administrada por via intratecal, mas características como peso molecular, lipossolubilidade, farmacocinética, afinidade intrínseca pelos receptores e propriedades físico-químicas, determinarão a eficácia analgésica, a incidência e a intensidade dos efeitos indesejáveis (Rocha et al., 2002).

Tabela 3. Características físico-químicas dos opióides (adaptado de Gozzani, 1994).

	Morfina	Fentanil	Sufentanil
Tamanho da molécula	285u	336u	386u
Solubilidade lipídica	1,4	813	1778
% ligada a proteínas	30	84	93
% não ionizada	23	10	20

3.1 Sufentanil

O sufentanil (SUF) (Figura 8), opióide sintético derivado do grupo das fenilpiperidinas, é considerado um dos principais adjuvantes (associados ao uso de AL) por via intratecal. Sua interação com receptores μ (Cavalcanti & Gozzani et al.; 2004), resulta em rápido início de ação - em função da sua alta lipossolubilidade, prolonga a analgesia pós-operatória e reduz a incidência de efeitos colaterais (Motiani et al., 2011).

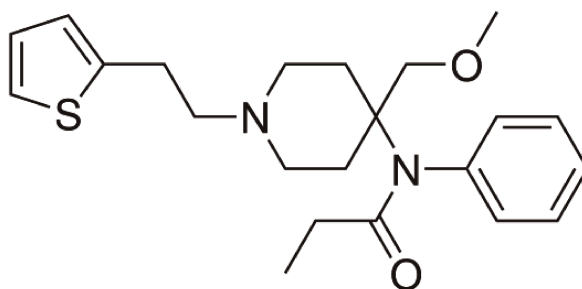


Figura 8. Estrutura química do SUF.

Este opióide apresenta uma acentuada importância no que diz respeito à potência, sendo aproximadamente 1000 vezes mais potente que a morfina e 10 vezes mais potente que o fentanil. Entretanto, em relação aos parâmetros farmacocinéticos, apresenta um volume de distribuição e meia-vida de eliminação (164 min.) menor que a do fentanil (219 min.) (Cavalcanti et al.; 2004). Sua metabolização ocorre no fígado, por atividade enzimática microsomal e os metabólitos são eliminados por via renal (Gozzani, 1994).

4. Associação entre Bupivacaína e Sufentanil para a Analgesia Obstétrica

Nos últimos anos, estudos na literatura têm buscado verificar o efeito de associações entre diferentes fármacos e AL a fim de melhorar a qualidade do bloqueio sensorial, prolongar a duração da analgesia em procedimentos pré e pós-operatórios e diminuir os efeitos indesejáveis ocasionados após administração dos AL (Wong et al., 2000; Yamaguchi et al., 2004).

Em analgesia obstétrica, é frequente o uso de AL, principalmente a BVC, associados à opióides lipossolúveis. O efeito aditivo e sinérgico desses compostos permite que se obtenha melhora na qualidade da analgesia e prolongamento do efeito analgésico (Lilker et al., 2009).

Segundo Lee et al., (2011), a infusão intratecal de 20 µg de fentanil ou 2,5 µg de SUF associados a BVC hiperbárica a 0,5%, promove analgesia intraoperatória adequada, sem efeitos adversos significativos para a mãe e neonato. Esses resultados corroboram com os apresentados por Yamaguchi et al. (2004), em que a adição de SUF intratecal nas doses de 2,5 µg e 5 µg associados a 2,5 mg de BVC hiperbárica, melhorou a qualidade e prolongou a duração da analgesia de parto. Outro estudo, comparando a BVC (0,125%) coadministrada com SUF (7,5 µg) por via epidural durante o trabalho de parto, indicou ocorrência de analgesia rápida e completa (Gautier, et al., 1999).

Contudo, apesar do sucesso da associação entre a BVC e o SUF, quanto à qualidade e prolongamento do efeito analgésico, deve ser considerada a acentuada toxicidade intrínseca deste AL, como descrito anteriormente. Sendo assim, uma alternativa para reduzir os efeitos indesejáveis dos AL, mantendo, sobretudo, uma acentuada potência anestésica, pode ser alcançada através da complexação do AL com carreadores para liberação sustentada, e posterior associação ao coadjuvante de interesse.

A utilização de sistemas de liberação modificada de fármacos, deve-se a facilidade de sua passagem através de barreiras biológicas; a modulação da velocidade com que esses fármacos atravessam as barreiras e penetram na circulação em direção ao tecido alvo; ao direcionamento do fármaco no organismo, de modo a evitar seu acúmulo em tecidos não específicos e ao aumento da estabilidade do fármaco (Alonso, 2004; Durán et al., 2006). Em relação aos AL, os sistemas de liberação modificada têm como objetivo promover uma liberação lenta e continuada, reduzindo a toxicidade sistêmica destes fármacos de ação regional (Simonetti & Andrade, 1996; Kuzma et al., 1997; Araújo et al., 2003; de Paula et al., 2010). Neste contexto, existem na literatura relatos de diferentes sistemas de liberação modificada para AL, dentre os quais se destacam os lipossomais, sistemas nanoestruturados poliméricos e complexos com ciclodextrinas (Gorner et al., 1999; Govender et al., 1999; Polakovic et al., 1999; Blanco et al. 2003).

O preparo e caracterização de sistemas de liberação sustentada de AL tem sido objeto de intensa pesquisa no Laboratório de Biomembranas (Departamento de Bioquímica - UNICAMP). Diante dos resultados favoráveis obtidos em testes *in vivo* de avaliação da atividade farmacológica com formulações anestésicas de liberação modificada (Araújo et al., 2004, 2005, 2006; Cereda et al., 2004, 2006; Franz-Montan, 2007; Tófoli et al., 2010), impõe-se o desafio de estudar novas associações medicamentosas com essas formulações anestésicas de ação prolongada, com vistas na diminuição dos efeitos indesejáveis, além do prolongamento do efeito anestésico, e futuros ensaios em clínica.

5. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD) são conhecidas desde o final do século XIX, tendo sido primeiramente identificadas por Villiers em 1891 e caracterizadas no século XX como uma mistura de oligossacarídeos cíclicos por Frank Schardinger, que também descreveu processos para a sua obtenção e purificação (Duchêne, et al., 1999).

As ciclodextrinas naturais são formadas a partir da degradação enzimática do amido pelas enzimas glicosiltransferases, sintetizadas por alguns microrganismos. As três CD mais comuns são a alfa (α -CD), beta (β -CD) e gama (γ -CD), compostas respectivamente por seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopirranose unidas através de ligações glicosídicas α -1,4 (Figura 9-A) (Welliver & McDnough, 2007; Loftsson & Brewster, 2011). Estas macromoléculas cíclicas possuem forma assemelhada a de um cone, com uma cavidade de 7,9 Å de profundidade e diâmetro superior e inferior da cavidade de 4,7 e 5,3 Å para a α -CD, 6,0 e 6,5 Å para a β -CD e 7,5 e 8,3 Å para a γ -CD (Figura 9-B) (Rekharsk & Inoue, 1998).

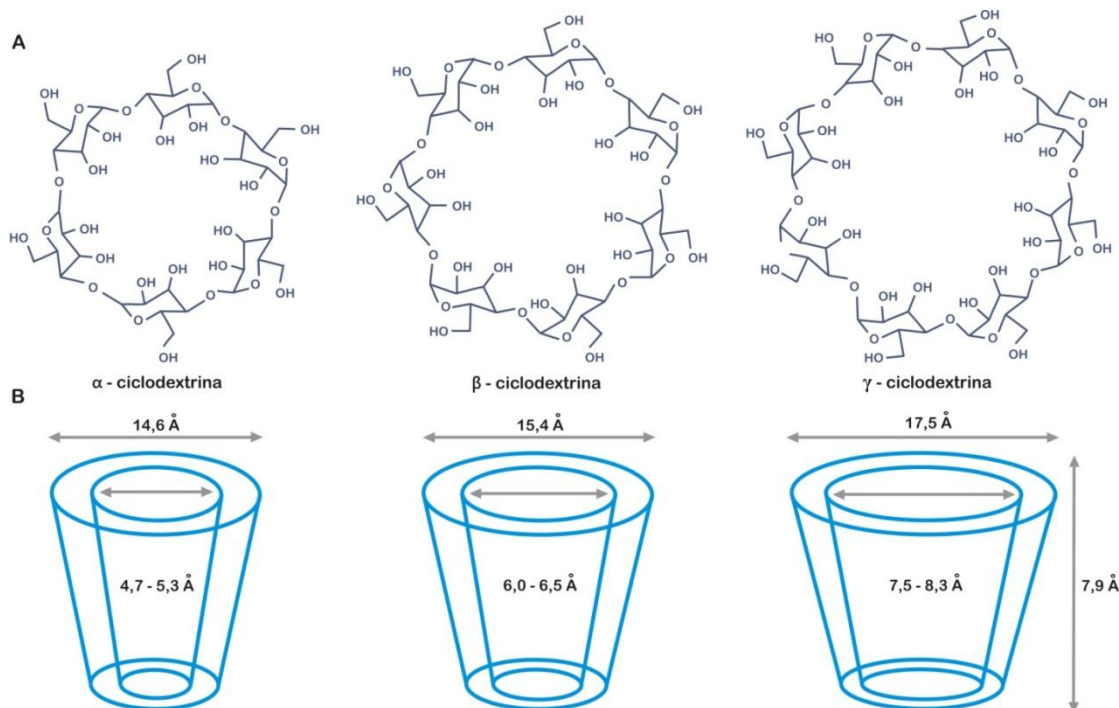


Figura 9. Representação estrutural do anel macrocíclico (A) e características estéricas (B) das CD naturais α , β e γ .

Quanto à organização estrutural, seus grupos hidroxílicos secundários orientam-se para a borda mais larga, estando ligados aos átomos de carbono C2 e C3, enquanto que os primários orientam-se para a borda mais estreita, ligados ao carbono C6 (Figura 10-A) (Ribeiro, 2004). A existência de bordas com diferentes diâmetros deve-se, sobretudo, à movimentação dos grupos hidroxílicos. A redução efetiva do diâmetro na borda mais estreita ocorre em função da livre rotação dos grupos hidroxila primários, característica que os diferem dos grupos hidroxila secundários, relativamente mais rígidos, resultando em bordas de maior diâmetro (Bekers et al., 1991).

Esta organização resulta em uma molécula com superfície externa hidrofílica e uma cavidade central com caráter relativamente hidrofóbico (Figura 10-B), capaz de formar complexos de inclusão com fármacos “convidados” de dimensões compatíveis com a cavidade (Loftsson & Brewster, 2011).

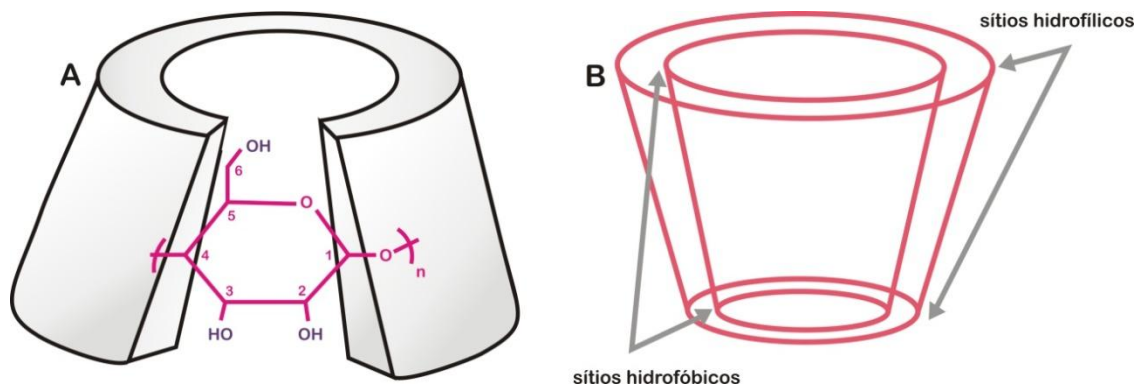


Figura 10. Disposição das hidroxilas de cada unidade glicopiranosose (A) e representação das porções hidrofóbica (cavidade) e hidrofílica (superfície externa) da ciclodextrina (B).

A inclusão de um fármaco no interior hidrofóbico da CD resulta em um equilíbrio dinâmico, quando o fármaco apresenta propriedades adequadas para a formação de complexos de inclusão, como a polaridade, tamanho e geometria (Oliveira et al., 2009) além da estrutura e propriedades físico-químicas da CD. A Figura 11 ilustra o equilíbrio dinâmico de complexos fármaco:CD nas estequiometrias 1:1 e 1:2.

As forças que contribuem para a formação e estabilização dos complexos têm sido atribuídas a interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e também à alta energia de repulsão das moléculas de água da cavidade das CD (Bibby et al., 2000).

A α -CD é a mais utilizada para complexação de moléculas menores ou cadeias laterais alifáticas por apresentar uma cavidade reduzida, insuficiente para acomodar fármacos de maiores medidas. Em contraste, a γ -CD é capaz de alojar moléculas maiores, uma vez que apresenta a maior cavidade em relação as CD naturais (Loftsson & Brewster, 1997), entretanto o custo elevado conferido a esta CD torna seu uso desfavorável (Rajewsky & Stella, 1996; Davis & Brewster, 2004). Já a β -CD apresenta grande utilidade para a complexação de moléculas que contêm anéis aromáticos em sua estrutura (Loftsson & Brewster, 1997; Loftsson & Brewster, 2011).

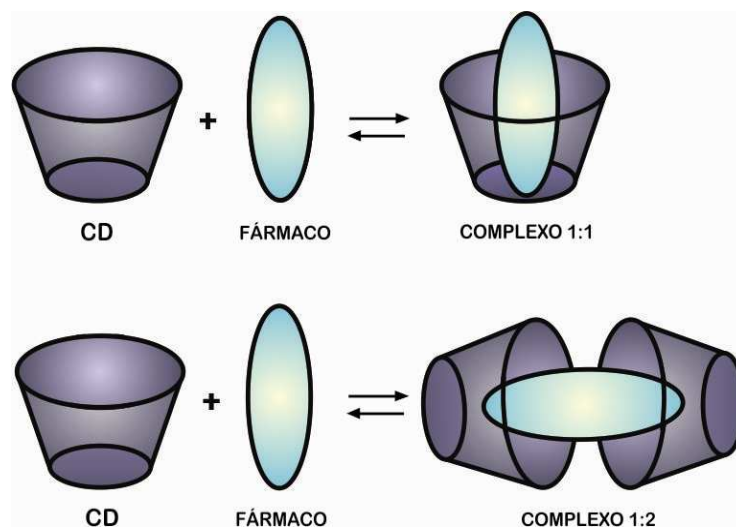


Figura 11. Formação de complexos de inclusão entre fármaco e CD, nas proporções de 1:1 e 1:2.

Atualmente as CD são utilizadas em inúmeras áreas como a indústria agroquímica, farmacêutica, cosmética, alimentícia, entre outras (Davis & Brewster, 2004). A utilização das CD na indústria farmacêutica deve-se, sobretudo às suas propriedades de complexação, permitindo aumentar a solubilidade e estabilidade de fármacos “convidados”, melhorar a biodisponibilidade, mascarar odores e sabores, reduzir a evaporação de substâncias muito voláteis, entre outras aplicações (Davis & Brewster, 2004).

Contudo, apesar das vantagens mencionadas a utilização destas moléculas em complexos de inclusão restringe-se à limitação da solubilidade, principalmente da β -CD (16,6 mM (18,8 g/L), resultando na precipitação dos complexos sólidos em água ou outros sistemas aquosos quando o limite de solubilidade é atingido (Brewster & Loftsson, 2007). A limitada solubilidade aquosa da β -CD se deve, em grande parte, às ligações intramoleculares de hidrogênio entre os grupos hidroxil secundários, o que desfavorece a interação desta ciclodextrina com as moléculas de água (Irie & Uekama, 1997; Matioli, 2000).

Neste contexto, vários derivados de ciclodextrinas têm sido desenvolvidos com o objetivo de melhorar essa propriedade (Tabela 4). As modificações introduzidas incluem substituição dos grupos hidroxílicos primários e/ou secundários por diversos grupos funcionais, classificados como hidrofílicos (grupos metil e hidroxipropil), hidrofóbicos (grupos acetil e etil), anfifílicos (estruturas de micelas) e derivados iônicos (sulfobutil-éter) (Veiga et al., 2006). Um dos derivados que tem sido bastante estudado é a 2-hidroxipropil- β -

ciclodextrina (HP- β -CD), por apresentar maior solubilidade e menor toxicidade (Moraes et al., 2007a,b).

De maneira geral, a formação de complexos de inclusão entre CD e fármacos, resulta no aumento da solubilidade e biodisponibilidade dos mesmos, o que modula a eficácia e a potência da atividade terapêutica, possibilitando a redução da dose administrada e consequentemente a redução de efeitos adversos locais e sistêmicos (Rajewski & Stella, 1996).

Tabela 4. Características das CD naturais e de alguns de seus derivados (adaptado de Brewster & Loftsson, 2007).

Ciclodextrina (CD)	grupo R	Peso	solubilidade
		Molecular (Da)	em água (mg/mL)
α -ciclodextrina (α -CD)	H	972	145
β -ciclodextrina (β -CD)	H	1135	18,5
2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD)	$\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	1400	>600
sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD)	$(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3^-$ Na^+	2163	>500
metil- β -ciclodextrina (RM- β -CD)	CH_3	1312	>500
γ -ciclodextrina (γ -CD)	H	1297	232
2-hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HP- γ -CD)	$\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	1576	>500

A complexação de AL com ciclodextrinas tem sido objeto de intensa pesquisa em nosso laboratório, tanto na caracterização físico-química, como também na avaliação nociceptiva dos complexos formados, em experimentos com animais (Pinto et al., 2004, 2005; Araújo et al., 2005, 2006, 2008b; Carvalho, 2007). A complexação da levobupivacaína (Moraes et al, 2007a,b), da BVC racêmica (levobupivacaína- 50:dextrobupivacaína-50) e da mistura com excesso enantiomérica de bupivacaína (levobupivacaína 75:dextrobupivacaína 25) com HP- β -CD (de Araújo et al, 2005, 2006) foi descrita e, em todos os casos, a estequiometria da complexação foi determinada em 1:1 (Figura 12) e houve aumento da

solubilidade aquosa do anestésico complexado. No caso das misturas racêmicas de BVC, a complexação promoveu aumento significativo do bloqueio sensorial em camundongos e ratos (Araújo et al, 2005, 2006), sem alterar o bloqueio motor após aplicação intratecal, em ratos (Araújo et al, 2006).

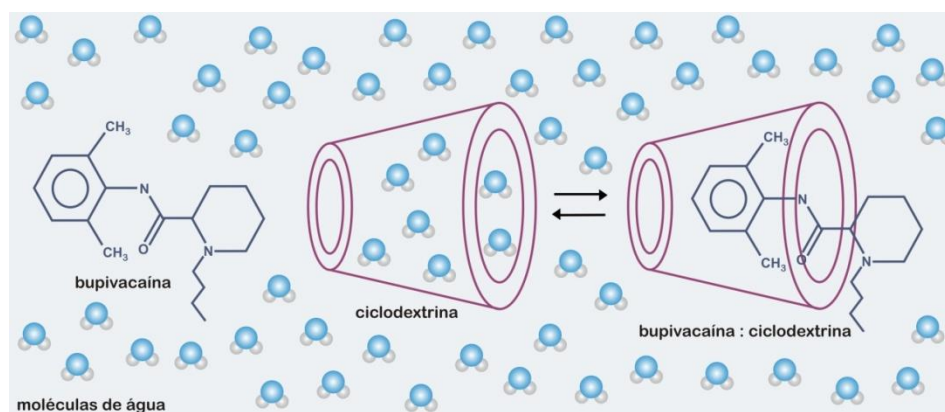


Figura 12. Representação esquemática da formação de complexos de inclusão entre a BVC e a molécula de CD, em solução aquosa.

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo avaliar as atividades citotóxica e anestésica e a farmacocinética da BVC racêmica complexada com HP- β -CD, em associação com SUF. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

- Realização de ensaios de citotoxicidade *in vitro* em culturas permanentes de neuroglioma (NG97) e fibroblastos de camundongos Balb/c (3T3) nas concentrações de 0,2; 1; 2; 3 e 4 mM (0,006; 0,031; 0,062; 0,093 e 0,125%) para a BVC livre e complexada com HP- β -CD e 9,5 μ M para o SUF, utilizado em associação.
- Avaliação da atividade anestésica *in vivo* dos grupos contendo BVC a 4, 8 e 16 mM (0,125; 0,25 e 0,5%) na forma livre (pH 5,5) e complexada com HP- β -CD (pH 6,5) (razão molar 1:1) em associação com SUF 38,8 μ M (15 μ g/mL – pH 4,2) pelo teste de bloqueio motor por via intratecal em ratos, comparando os bloqueios sensorial e motor induzidos pela BVC.
- Realização de ensaios *in vivo* em coelhos, após amnistração intratecal, para determinar as concentrações plasmáticas e o perfil farmacocinético da BVC, livre (pH 5,5) e complexada com HP- β -CD (pH 6,5) 16 mM (0,5%) associadas ou não a 38,8 μ M (15 μ g/mL – pH 4,2) de SUF através de espectrometria de massas.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Fármacos, Sais e Solventes

- Cloridrato de bupivacaína (racêmica)- Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda.
- Hidroxipropil- β -CD - Roquette Serv. Tech. Lab.
- (Sufenta[®]) - Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.
- Meio RPMI 1640- Nutricel Nutrientes Celulares.
- Meio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Nutricell).
- Outros: etanol, xilol, acetato de etila, acetonitrila; ácido fórmico, soro fetal bovino, penicilina, MTT (Sigma-Aldrich, USA), solução de tripsina (Cultilab), heparina (Liquemine[®] Roche), halotano - Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda, tetraborato de sódio - (Sigma-Aldrich, USA), α -cloralose - (Sigma-Aldrich, USA), uterano - (Sigma-Aldrich, USA), solução fisiológica, nitrogênio líquido.

2. Equipamentos

- Analgesímetro (Ugo Basile-Itália).
- Espectrômetro de massas triplo-quadrupolar (Micromass Quattro LC[®]) com fonte de irradiação por eletrospray – pertencente à Unidade de Gastroenterologia e Farmacologia clínica da Universidade São Francisco.
- Espectrofotômetro Bio-Tek[®] ELx800 – Laboratório de Bioensaios e Transdução de Sinal, IB – Unicamp.
- Liofilizador (Labconco-freeze dry system/Freezone[®]).
- Agitador magnético Tecnal[®] TE 0851.
- Agitador de tubos Phoenix[®] AP56.
- Centrífuga Quimis[®].

3. Animais

Para avaliação do bloqueio motor e sensorial, foram utilizados *Ratus norvegicus* da linhagem Unib: WH (peso 250-300g), machos, adultos, submetidos a ciclo claro/escuro de 12

h com água e alimentação *ad libitum*, temperatura controlada ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$), alojados coletivamente (5 por gaiola) e aclimatados ao local da experimentação por no mínimo 7 dias. Os animais foram adquiridos do CEMIB/UNICAMP e o protocolo dos experimentos foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) (Protocolo 1957-1 – anexo I), do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Em relação aos ensaios farmacocinéticos, foram utilizados coelhos albinos da raça Nova Zelândia, machos, com peso entre 2 e 3 kg, submetidos às mesmas condições descritas para os *Ratus norvegicus*. A utilização de coelhos se deve ao fato da maior facilidade na obtenção das amostras, além do maior volume das mesmas, de modo a facilitar a validação da metodologia e consequentemente a dosagem adequada dos ativos. Os animais foram adquiridos do criadouro S. B. Cunha e o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (Protocolo 001.11.11 – Anexo II)

4. Preparo do Complexo de Inclusão de Bupivacaína em Hidroxipropil-beta-ciclodextrina

Em solução, os complexos foram preparados pela adição de quantidades apropriadas de BVC e de HP- β -CD (razão molar 1:1), em meio aquoso. A suspensão formada foi equilibrada por agitação em temperatura ambiente, por 24 h, resultando, assim, em uma solução límpida do complexo BVC:HP- β -CD (Araújo et al., 2006). Para a preparação de complexos sólidos, a solução foi liofilizada (Figura 13) e guardada a -20°C para uso posterior (Dollo et al., 1998; Loftsson & Masson, 2001).

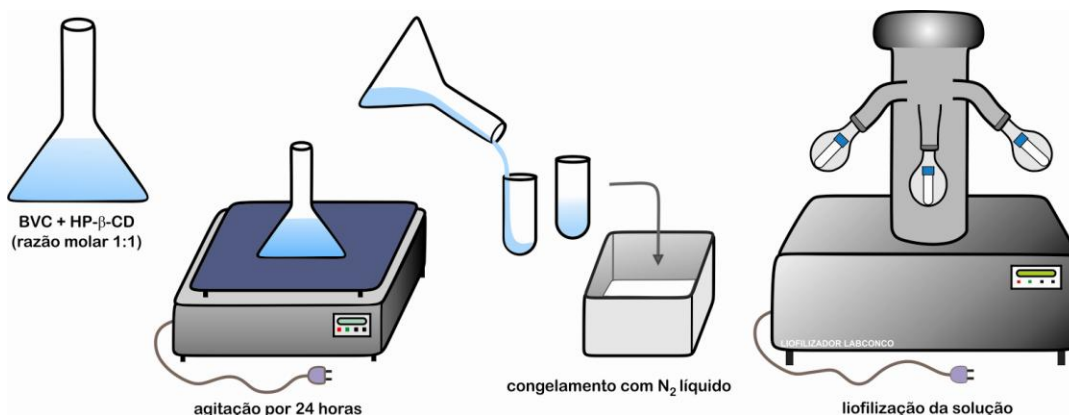


Figura 13. Representação esquemática do preparo do complexo de inclusão da BVC em HP- β -CD.

5. Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada através do teste de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio). O princípio do teste consiste na captação do MTT pelas células e redução a formazan (composto púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais, resultando em acúmulo desse composto em células viáveis. A solubilização das células possibilita a liberação do formazan, que pode ser facilmente detectado por fotometria, em 570 nm (Denizot & Lang, 1986; Welder, 1992).

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados com células provenientes de culturas permanentes de fibroblastos de camundongos Balb/c do tipo 3T3 e de neuroglioma humano, tipo NG97. As células da linhagem 3T3 foram mantidas em cultura contínua (meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, pH 7,2-7,4, 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂ através de repiques periódicos.

As culturas permanentes de neuroglioma da linhagem NG97 obedeceram ao mesmo protocolo descrito anteriormente, excetuando-se apenas o meio de cultivo. Para estas culturas, o meio de cultivo utilizado foi o RPMI 1640, também suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina.

Para ambas as linhagens o plaqueamento foi realizado com a inoculação de 2×10^4 células viáveis em placas de 96 cavidades, com semi-confluência atingida após uma incubação por 48h. As células foram incubadas por 24h com o veículo (HP-β-CD), com a BVC livre ou complexada (BVC:H-β-CD), associada ou não com o SUF, nas concentrações apresentadas na Figura 14.

Em seguida, fez-se a substituição do meio de cultura e incubação com MTT (1mg/mL) por 3h. Ao final desse período, o meio contendo MTT não reduzido foi removido cuidadosamente e a cada placa foi adicionado 0,1mL de HCl isopropanol, a fim de dissolver os cristais de formazan produzidos pela redução do corante. As placas foram agitadas por cerca de 20 min. para garantir a solubilização do formazan e transferidas para um leitor de microplacas. A absorbância da solução em cada cavidade foi medida em 570nm e os resultados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (células

tratadas apenas com meio de cultura DMEM ou RPMI 1640) (Babich et al., 1991; Lee et al., 2000). A representação esquemática do procedimento experimental pode ser visualizada na Figura 15.

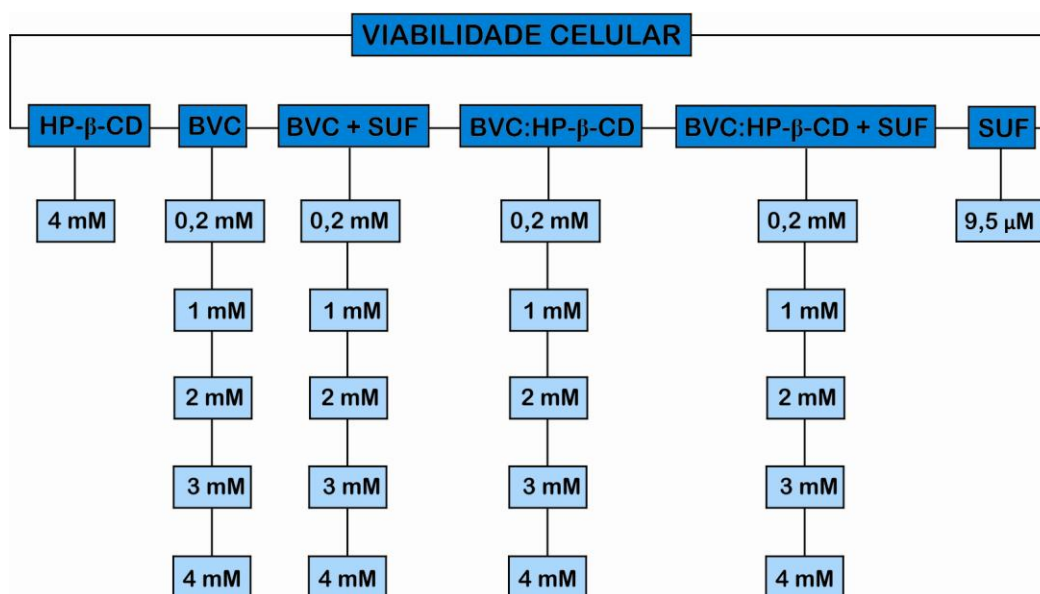


Figura 14. Fluxograma com os grupos e as respectivas concentrações de BVC para o ensaio de viabilidade celular.

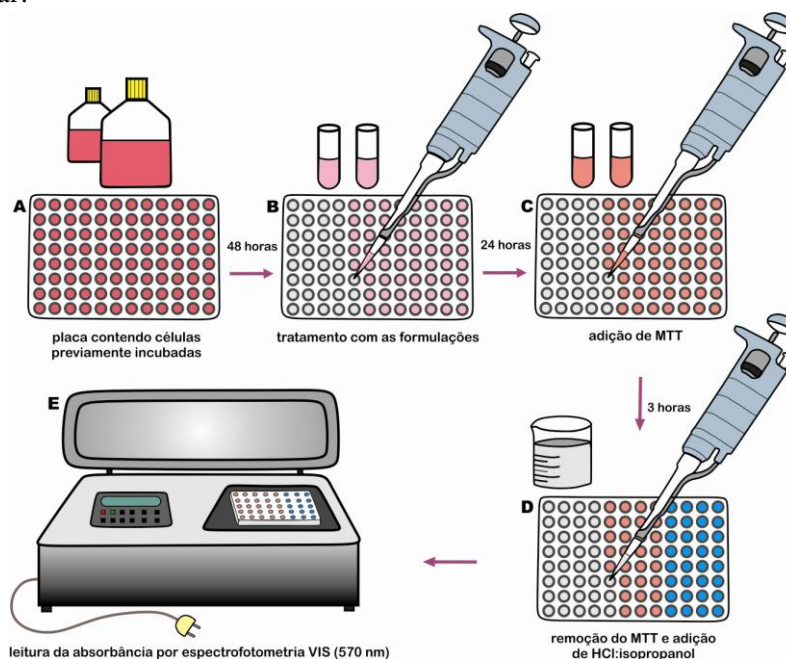


Figura 15. Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular (teste do MTT).

6. Avaliação de Atividade Analgésica e Bloqueio Motor em Modelo Animal

6.1 Grupos

Os grupos experimentais (n=7 *Ratus norvegicus* por grupo) estabelecidos para a realização da atividade analgésica são apresentados na Figura 16. A concentração de SUF foi de 38,8 μ M ou 15 μ g.mL⁻¹ (Vercauteren et al., 1992) administrado nas formas livre, associado à BVC e ao complexo BVC:HP- β -CD.

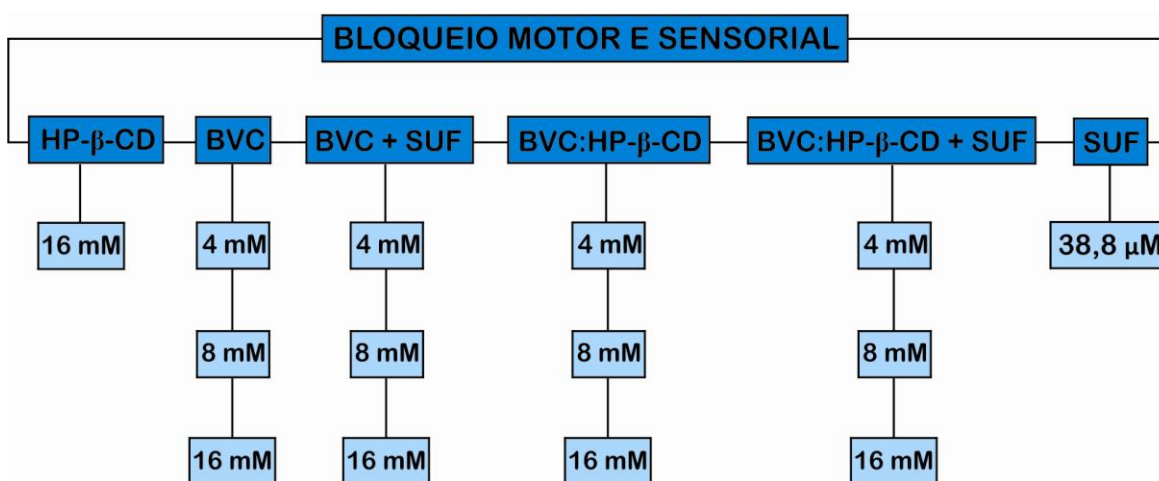


Figura 16. Fluxograma com os grupos e as respectivas concentrações para os testes de bloqueio motor e sensorial.

6.2 Injeção intratecal em *Ratus norvegicus*

Para injeção intratecal, os animais foram contidos firmemente enquanto uma agulha conectada a uma seringa de Hamilton foi inserida perpendicularmente no espaço entre as vértebras L5 e L6. O sítio de injeção selecionado estava restrito à região onde a medula espinhal termina e a cauda equina começa, de forma a reduzir a possibilidade de dano espinhal e facilitar a acessibilidade intervertebral (Figura 17).

No momento em que a agulha foi inserida no espaço subaracnóideo, observou-se um súbito movimento da cauda, reflexo este que foi utilizado como indicativo de punção correta. As formulações foram injetadas em um volume máximo de 20 μ L (Mestre et. al., 1994).

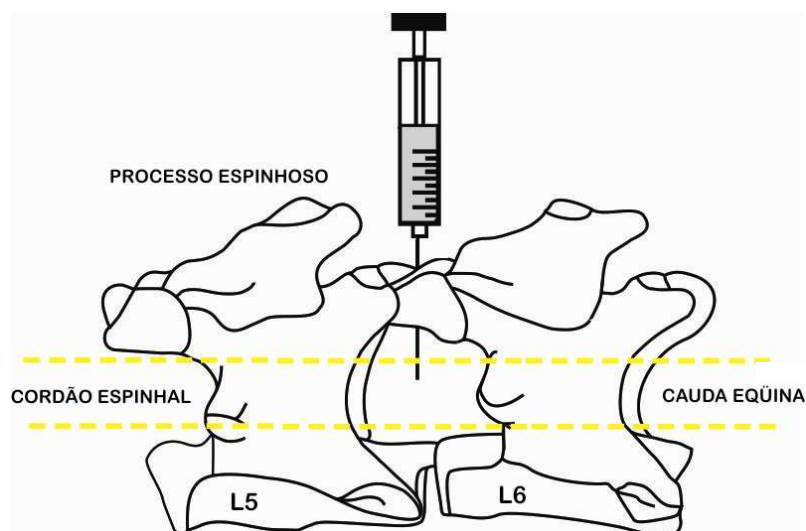


Figura 17. Inserção da agulha no espaço intervertebral (L5-L6) para injeção intratecal em ratos.

6.3 Avaliação do Bloqueio motor em *Ratus norvegicus*

A presença da anestesia após a administração intratecal foi definida como a perda do controle motor de ambos os membros posteriores, após injeção intratecal, sendo evidenciada pelo “arrastamento” do membro posterior e/ou fechamento dos dedos (Feldman & Covino, 1988) (Figura 18).

A intensidade do bloqueio motor foi avaliada de acordo com valores de escore: 0 (uso normal dos membros posteriores), 1 (incapacidade de flexionar completamente os membros posteriores) e 2 (impossibilidade do uso dos membros posteriores) (Gantenbein et al., 1996, 1997). A avaliação foi feita a cada minuto durante os 5 primeiros min. após a administração e, posteriormente, em intervalos de 5 a 10 min. até que fosse verificada a total recuperação dos movimentos do animal (pelo menos 1 hora de observação). O efeito total foi estimado, para cada animal, utilizando-se a área sob a curva efeito (ASC).



Figura 18. Visualização do bloqueio motor induzido por AL em *Ratus norvegicus*.

6.4 Avaliação do Bloqueio Sensorial em *Ratus norvegicus*

O bloqueio sensorial foi determinado pelo limiar de remoção da pata dos animais frente a um estímulo mecânico. Para a execução dos testes utilizou-se um equipamento apropriado, chamado analgesímetro (Ugo Basile-Itália), que gera um aumento gradual da força (em gramas) exercida por uma extremidade plástica sobre a superfície dorsal da pata do animal (Fletcher et al., 1997) (Figura 19).

Trinta min. após a injeção das formulações, a pata do animal foi colocada sobre a extremidade plástica do aparelho analgesímetro, onde a pressão foi aplicada e aumentada em ritmo constante até que o animal retirasse a pata como sinal indicativo da nocicepção (*Pain Withdrawal Theshold to Pressure* - PWTP). A analgesia foi definida como um aumento no limiar de pressão suportado pelos animais, pelo menos 50 % maior que aquele observado nos grupos controle. O ponto final da analgesia foi estabelecido quando não houvesse diferença estatística entre os grupos testes e controle.

Foi estabelecido um valor máximo (*cut off*) de 350 gramas, para evitar lesões nas patas e estimulação excessiva dos nociceptores (Araújo et al, 2006). As medidas foram realizadas a cada h até o limite de 12 h, com uma medida complementar em 24 h.

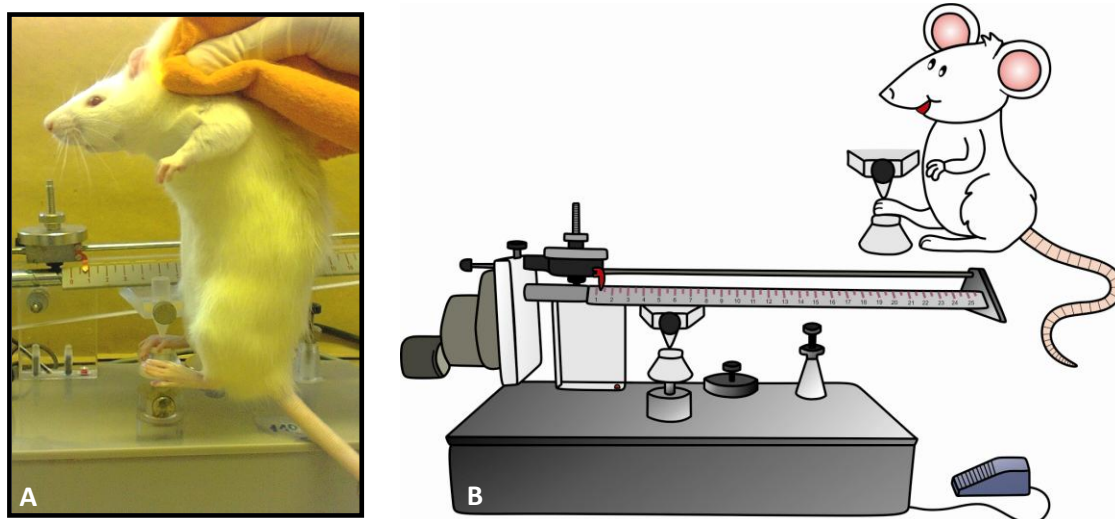


Figura 19. Foto (A) e representação esquemática (B) do procedimento realizado durante o teste PWTP para avaliação do bloqueio sensorial em ratos.

7. Avaliação da Farmacocinética em Coelhos Nova Zelândia

7.1 Determinação da Concentração Plasmática da Bupivacaína nas Diferentes Formulações Estudadas

Para determinar a concentração plasmática dos ativos, coelhos da raça Nova Zelândia foram inicialmente divididos nos mesmos grupos descritos na avaliação de atividade analgésica e bloqueio motor em modelos animais (seção 6.1), com 5 animais por grupo. A concentração da BVC livre e complexada em HP- β -CD utilizada foi de 16mM e a de SUF = 38,8 μ M.

Previamente à administração intratecal das soluções (Figura 20-A), foi realizada indução da anestesia geral com α -cloralose (50mg.kg⁻¹) e uretano (1g.kg⁻¹) por via intramuscular. Em seguida, os animais foram colocados em um contensor para coelhos e um cateter intravascular foi instalado na orelha, como via de acesso venoso (Figura 20-B). Foram coletadas amostras de 5 mL de sangue nos seguintes tempos: 0 - antes da injeção (“baseline”), 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 e 540min. após a administração dos tratamentos. O volume da injeção intratecal para cada fármaco utilizado em associação (BVC e SUF) foi de 75 μ L, de modo a obter um volume final de 150 μ L. O tempo de coleta de cada amostra foi definido e ajustado de modo que fossem obtidas doze amostras entre o tempo Zero (antes da administração) e 4 vezes o tempo de meia-vida da BVC ($t_{1/2}$ = 136 min.) (Ratajczak-Enselme et al., 2008) e do SUF (a $t_{1/2}$ = 120min.). Este esquema de progressão geométrica é comumente utilizado e fornece informações sobre a disposição do fármaco (Bourne, 1995). Logo após a colheita, a cânula foi lavada com uma mistura de anticoagulante (heparina sódica) e soro fisiológico, para evitar coagulação do sangue e obstrução da via de acesso. As amostras foram centrifugadas e o plasma separado foi armazenado a -70°C até a análise. Ao fim do experimento, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia com SUF (50 μ g/mL). Na Figura 21 pode ser visualizada a representação esquemática do procedimento experimental.

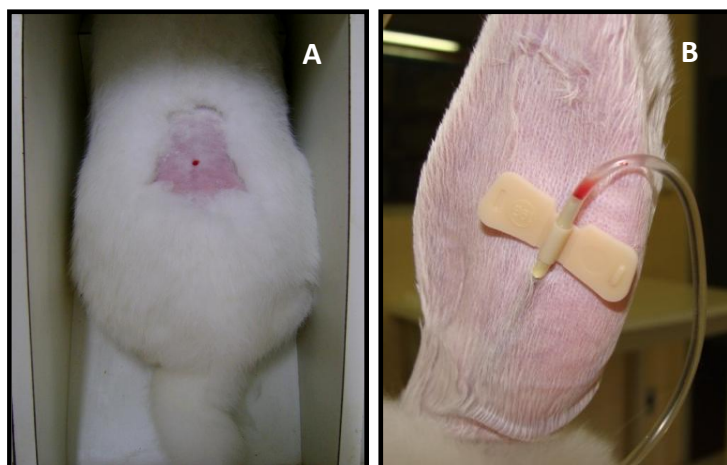


Figura 20. Local da injeção intratecal em coelhos (A). Cateter intravascular como via de acesso venoso na orelha (B).

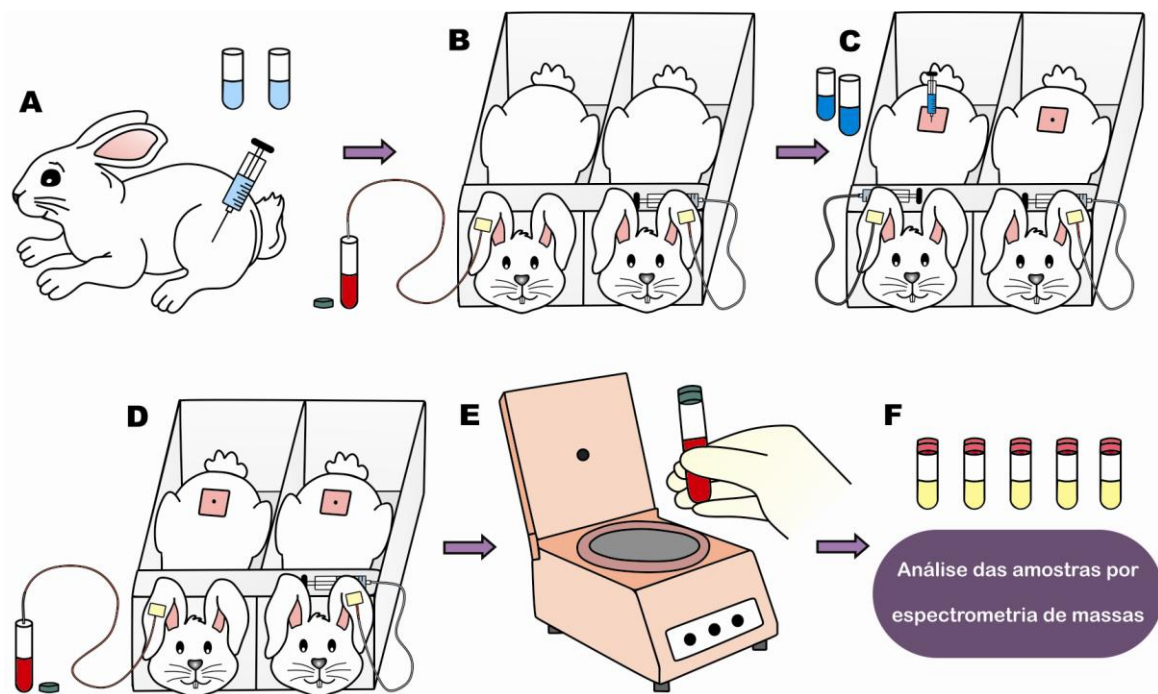


Figura 21. Representação esquemática do ensaio farmacocinético em coelhos. (A) injeção intramuscular de α -cloralose e uretano para indução de anestesia geral; (B) coleta de sangue antes da injeção intratecal (tempo zero); (C) injeção intratecal dos ativos; (D) coleta de sangue nos intervalos estabelecidos; (E) centrifugação das amostras e (F) análise das amostras por espectrometria de massas.

7.2 Preparo e Análise das Amostras por Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica que envolve a fragmentação de moléculas alvo, seguida da separação e da medida de massa dos fragmentos individuais (Ullman et al., 1998). O resultado final de todas as análises feitas por espectrômetro de massa, independentemente do tipo de ionização ou de características de desempenho dos sistemas, é o fornecimento de um espectro que fornece a relação massa-carga no eixo x versus o fluxo de íons detectados no eixo y (Gillette et al., 2005).

O equipamento utilizado para a obtenção das concentrações plasmáticas de SUF e BVC foi um espectrômetro de massas triplo-quadrupolar em sequência com fonte de ionização por eletrospray, acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC 20 AD.

Para detecção do SUF as amostras de plasma (200µL) foram descongeladas em temperatura ambiente e misturadas com o padrão interno (PI) de lamivudina (3000 ng/mL), previamente a extração. As amostras misturadas com o PI foram agitadas por 2 min. para garantir solubilização do PI no plasma. Em seguida foram adicionados 1mL de hexano e acetato de etila (1:1 v:v) e a mistura foi agitada por 5 min. e centrifugada a 14000 rpm por 5 min. a - 4°C. Foram transferidos 800 µL da fase orgânica para um microtubo de 2 mL e em seguida a amostra foi seca em fluxo de nitrogênio. Cada amostra foi ressuspensa em 200 µL da fase móvel, agitada por 1 min. e esta solução foi transferida para o *insert* (150 µL), para posterior injeção no sistema *liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry* (LC-MS-MS).

Foram injetados 5 µL desta mistura no LC- MS- MS. Foi utilizada uma coluna Phenomenex C18 de 5µm (100 x 4,6 mm) e a fase móvel utilizada era composta de acetonitrila e água (80:20 v:v) com adição de 0,2% de ácido fórmico. O tempo de corrida foi de 2,5 min., sendo o tempo de retenção do SUF 0,67 min.

A detecção foi feita pelo modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), que consiste na separação no primeiro analisador (Q1) da molécula-alvo ionizada e fragmentação no segundo analisador (Q2), seguida da análise do fragmento específico no terceiro analisador (Q3). A amostra de SUF foi monitorada em MRM 387,1>238,1, e o PI em MRM 229,9>111,9.

Para detecção da BVC as amostras de plasma (50µL) foram descongeladas em temperatura ambiente e misturadas com o PI de ropivacaína (50ng/mL), previamente a extração. As amostras misturadas com o PI foram agitadas por 2 min. para garantir solubilização do PI no plasma. Em seguida foram adicionados 50µL de NaOH (1M) e 1000µL de hexano e acetato de etila (1:1 v:v), a mistura foi agitada por 5min., centrifugada a 14000 por 5 min. a - 4°C. Foram transferidos 800µL da fase orgânica para um microtubo de 2mL e em seguida a amostra foi seca em fluxo de nitrogênio. Cada amostra foi ressuspensa em 50µL da fase móvel, agitada por 1min. e esta solução foi transferida para o *insert* (150µL) para posterior injeção no sistema LC-MS-MS.

Foram injetados 5µL desta mistura no LC- MS- MS. Foi utilizada uma coluna Polaris C18 de 5µm (50 x 2mm) e a fase móvel utilizada era composta de acetonitrila e água (80:20 v:v) com adição de 0,1% de ácido fórmico. O tempo de corrida foi de 2,5 min., sendo o tempo de retenção da BVC = 0,72min.

A detecção foi feita pelo modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), a amostra de BVC foi monitorada em MRM 289,3>140,1, e o PI-ropivacaína em MRM 275,00>125,96.

O software P.K. Solutions 2.0 (Summit Research Services) foi utilizado para calcular os parâmetros farmacocinéticos: concentração plasmática máxima (Cmax), tempo para obtenção da concentração máxima (Tmax), área sob a curva (ASC) do tempo 0 até 540min. e de 0 a infinito e tempo de meia vida de eliminação ($t_{1/2}$ beta).

7.3 Validação da Metodologia

Foi utilizado um “*pool*” de plasma de coelhos, coletado com um cateter intravascular instalado na orelha de 3 animais. O plasma foi congelado a -70°C até a utilização na validação da metodologia. Durante a validação da metodologia analítica foram avaliados os parâmetros descritos a seguir:

Especificidade: capacidade do método de medir um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para confirmar a especificidade do método, foram analisadas amostras (n=5) de um *pool* de plasma

dos animais, sendo que quatro amostras não apresentavam hemólise. Foi observada a presença de interferentes e de supressão de íons no tempo de retenção do fármaco e do PI.

Linearidade: É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A análise da linearidade foi feita com, no mínimo, 6 concentrações diferentes. Foram construídas 3 curvas de calibração, para cada fármaco, que incluíram a análise da amostra branco, amostra branco +PI e mais seis amostras com valores na faixa de 0,02 a 10ng/mL, para o SUF e 0,3 a 120ng/mL para a BVC, em plasma de coelhos. O desvio deve ser menor ou igual a 20%, em relação à concentração nominal para o limite de quantificação (LQ) e deve ser menor ou igual a 15% da concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. O coeficiente de correlação linear deve ser de, no mínimo, $r=0,98$.

Precisão: É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada como repetibilidade ou precisão intracorrída e precisão intermediária ou intercorrídas. A precisão intra-corrída é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo instrumentador e a mesma instrumentação. Esta análise foi feita com três concentrações: alta (CA 8ng/mL-SUF e 90ng/mL-BVC), média (CM 4 ng/mL-SUF e 45 ng/mL-BVC) e baixa (CB 0,06ng/mL-SUF e 0,9ng/mL-BVC), em três replicatas, perfazendo 9 determinações para cada fármaco. A precisão intermediária (ou inter-corrídas) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com instrumentador e/ou equipamentos diferentes. Esta análise também foi feita com três concentrações e três replicatas, em dois dias diferentes, num total de 18 determinações. A precisão não deve apresentar valores de desvio superiores a 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%.

Exatidão: É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. A exatidão do método foi determinada com o uso de 3 concentrações (CA, CB e CM) com cinco determinações por concentração. A exatidão foi determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrída) e em corridas diferentes (exatidão inter-corrídas), como a precisão. O desvio não deve

exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

Limite de quantificação (LQ): É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. A resposta de pico para o LQ deve ser, no mínimo, 5 vezes maior que qualquer interferência na amostra branco, no tempo de retenção do fármaco. O pico de resposta do fármaco no LQ foi identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão, através da análise de cinco amostras de padrões.

Estes parâmetros foram determinados e avaliados de acordo com os preceitos da resolução 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para a condução e validação dos ensaios analíticos, foi utilizado o padrão analítico de citrato de SUF (Cerilliant-Certified Reference Materials/Analytical Reference Standards, Texas, EUA).

8. Análise estatística

Os grupos experimentais para os ensaios de viabilidade celular; teste PWTP e ensaios farmacocinético (concentrações plasmáticas e parâmetros farmacocinéticos), foram comparados por análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) com teste posterior de *Tukey-Kramer*. Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle e desvio padrão (DP); médias do bloqueio sensorial e DP e médias das concentrações plasmáticas e dos parâmetros farmacocinéticos e DP, respectivamente.

No bloqueio motor (tempo de recuperação e ASC), os dados foram expressos em mediana (limites mínimo e máximo) e comparados pelo teste de *Kruskall-Wallis*.

As análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa Graph Pad - versão 3.0 (*Graph Pad Software Inc.*).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Ensaios em Culturas de Células: Viabilidade Celular

A avaliação do efeito citotóxico das formulações estudadas (BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD; BVC:HP- β -CD+SUF; SUF e HP- β -CD) foi realizada através da medida de viabilidade celular, pelo teste de redução do corante MTT em culturas de fibroblastos de camundongo (3T3) e de neuroglioma (NG97). A adição de MTT permitiu visualizar as células viáveis, nos pocinhos que exibissem coloração púrpura, em função da redução deste corante a formazan, pelas desidrogenases mitocondriais ativas.

De uma forma geral, o tratamento das células com as formulações farmacêuticas testadas alterou a porcentagem de células viáveis em relação ao controle, de maneira concentração-dependente para a BVC. A título de ilustração, a Figura 22 mostra resultados da microscopia óptica da cultura da linhagem NG97, tratada com o grupo BVC:HP- β -CD+SUF a 0,2 mM (100% de células viáveis) e 4,0 mM (células mortas).

A concentração máxima de BVC utilizada foi correspondente ao seu limite de solubilidade aquosa (4 mM), que equivale a um quarto da concentração clínica (16 mM). As demais concentrações foram obtidas a partir das seguintes diluições: 0,2, 1, 2 e 3 mM. A fim de manter a proporção entre as concentrações dos ativos testados, utilizou-se um quarto (9,5 μ M) da concentração do SUF estabelecida para os testes de bloqueio motor e sensorial (38,8 μ M).

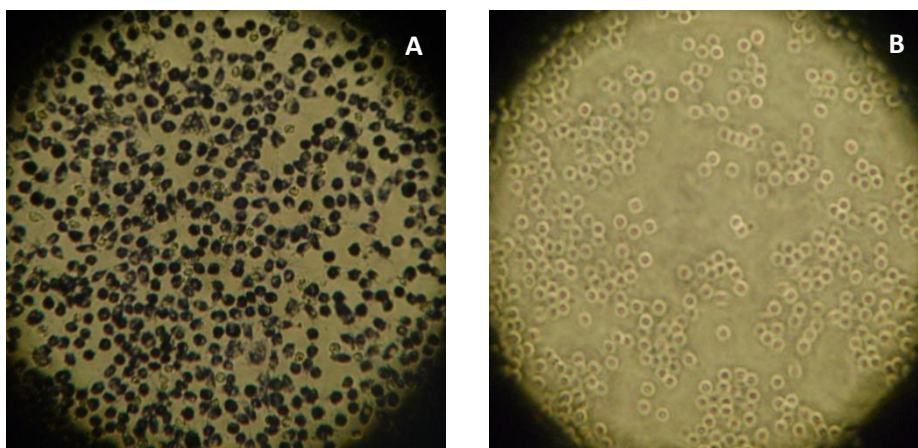


Figura 22. Microscopia óptica de culturas permanentes de neuroglioma (NG97) em teste de viabilidade celular após tratamento com: BVC:HP- β -CD+SUF 0,2 mM (A) e BVC:HP- β -CD+SUF 4 mM (B). Notar as células viáveis, coradas com MTT em A e células não coradas em B (ver texto).

A Figura 23 mostra as curvas de viabilidade celular registradas para as células 3T3 e NG97, após tratamentos com as diferentes formulações anestésicas. A partir delas determinamos os valores de IC_{50} , apresentados na Tabela 5. Estes valores indicam a concentração em que 50% das células não se apresentam mais viáveis. Nas concentrações de 0,2 e 1 mM, ambas as linhagens apresentaram viabilidade acima do IC_{50} (Tabela 5), e não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 5. Valores de IC_{50} para as linhagens 3T3 e NG97, após tratamento com as formulações: BVC livre; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF (BVC e BVC:HP- β -CD).

Grupos	IC_{50} - 3T3 (mM)	IC_{50} - NG97 (mM)
BVC	1,67	1,67
BVC+SUF	1,58	1,57
BVC:HP- β -CD	1,75	1,73
BVC:HP- β -CD+SUF	1,64	1,67

Nas demais concentrações, tais diferenças foram verificadas entre o veículo HP- β -CD e as demais formulações estudadas ($p < 0,001$), que apresentaram viabilidade abaixo do IC₅₀. O perfil citotóxico dos tratamentos realizados nas linhagens avaliadas mostrou-se bastante semelhante, como descrito a seguir.

Na Figura 23-A (linhagem 3T3) foi possível verificar que, na concentração de 3 mM, o tratamento com BVC diferiu estatisticamente ($p < 0,01$) daquele com BVC+SUF, que induziu maior efeito tóxico ($<$ viabilidade celular). O grupo BVC+SUF, também diferiu estatisticamente dos grupos BVC:HP- β -CD ($p < 0,01$ em 3 mM e $p < 0,05$ em 4 mM) e BVC:HP- β -CD+SUF ($p < 0,01$, em 3 mM). Desse modo, apesar da melhora na qualidade da analgesia e prolongamento do efeito analgésico (Lilker et al., 2009), o efeito aditivo e sinérgico, resultante desta associação induz também, um aumento na intensidade de efeitos citotóxicos.

Na Figura 23-B (linhagem NG97), o tratamento com BVC:HP- β -CD+SUF induziu maior porcentagem de viabilidade celular em relação à formulação BVC+SUF ($p < 0,01$ - 2 mM; $p < 0,05$ - 3 e 4 mM) e menor viabilidade que o tratamento com BVC:HP- β -CD ($p < 0,05$ - 2 mM; $p < 0,01$ - 3 e 4 mM). Assim como verificado no tratamento das células da linhagem 3T3, o tratamento com BVC:HP- β -CD foi o menos citotóxico para as células.

De maneira geral, nota-se menor viabilidade celular após tratamento com BVC livre, efeito tóxico esse que é potencializado com a associação ao sufentanil (BVC+SUF). Contudo, após a complexação da BVC com HP- β -CD há redução da citotoxicidade do anestésico, indicando a vantagem da utilização do AL neste sistema de liberação modificada.

O tratamento com SUF a 9,5 μ M não interferiu significativamente na viabilidade celular (dados não mostrados).

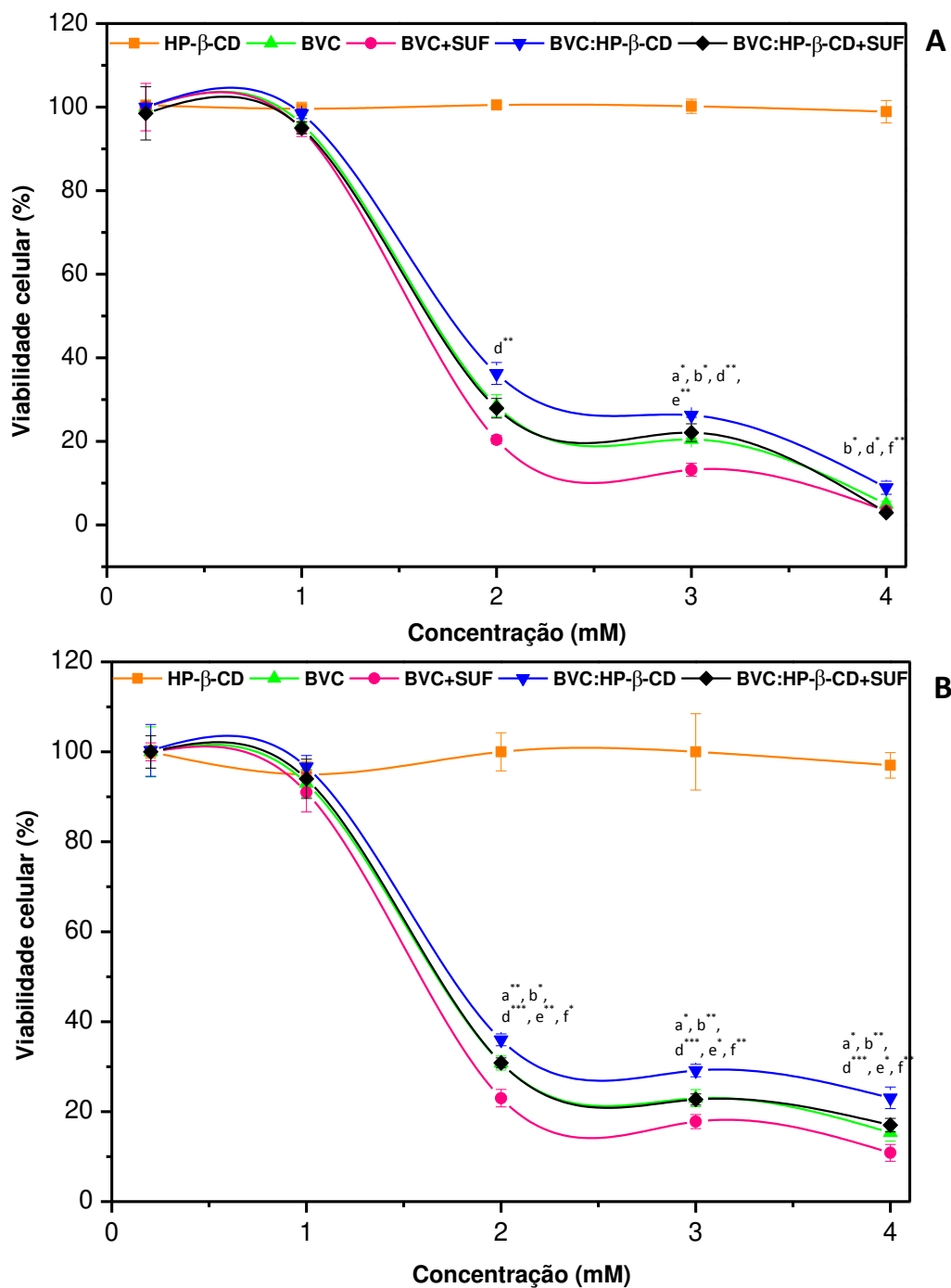


Figura 23. Efeito citotóxico induzido pelas formulações BVC; BVC+SUF; BVC:HP-β-CD e BVC:HP-β-CD+SUF, contendo 0,2, 1, 2, 3 e 4 mM de BVC, em células 3T3 (A) e NG97 (B), incubadas por 24 h (a 37 °C, 5% de CO₂ e pH 7,4) e avaliadas pela redução do corante MTT. Dados expressos em % de células viáveis em relação ao controle com MTT (Médias ± D.P. n=3). *Análise estatística: (ANOVA - Tukey-Kramer). *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05. (a) BVC vs BVC+SUF; (b) BVC vs BVC:HP-β-CD; (c) BVC vs BVC:HP-β-CD+SUF; (d) BVC+SUF vs BVC:HP-β-CD; (e) BVC+SUF vs BVC:HP-β-CD+SUF; (f) BVC:HP-β-CD vs BVC:HP-β-CD+SUF.*

Segundo Tsuchiya e col. (2010), o efeito tóxico dos AL deve-se a alterações das propriedades físico-químicas da membrana, levando a um menor ordenamento lipídico ou aumento da fluidez da membrana. Segundo esses autores, a fluidização da membrana influenciaria a atividade de receptores e canais e, conseqüentemente a função da membrana. De fato, em trabalhos anteriores de nosso grupo, foi demonstrado que a interação de diferentes AL com membranas modelo (de Paula & Schreier, 1995) e biológica (Araújo, et al., 2008a) diminui a organização lipídica da fase membranar, podendo levar à hemólise, no caso de membranas biológicas (Malheiros et al, 2004). A fluidização de sistemas membranares contendo fosfolípidos aniônicos, após a interação de AL como a BVC, poderia estar relacionada à cardiotoxicidade sistêmica dos AL, segundo Tsuchiya et al. (2010).

2. Avaliação do Bloqueio Motor por Via Intratecal em Ratos

Na avaliação do bloqueio motor, a administração das formulações BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD; BVC:HP- β -CD+SUF alterou, de maneira concentração-dependente em relação à BVC, a função motora dos animais após o bloqueio caudal (injeção intratecal), havendo a perda reversível dos reflexos motores em todos os animais tratados. Para comparação entre os grupos experimentais, avaliou-se o tempo de recuperação e efeito anestésico total - ASC (Tabela 6).

Os resultados apresentados indicaram que a complexação da BVC com HP- β -CD, bem como a associação ao SUF, não modificaram de maneira significativa os parâmetros de bloqueio motor avaliados, o que é bastante desejável na prática clínica. De fato, Araújo e col. (2006), encontraram resultados semelhantes ao avaliar esses mesmos parâmetros, após injeção subaracnóidea em ratos de mistura enantiomérica de BVC (S75-R25) e BVC racêmica (S50-R50), a 0,5%, livres ou complexadas (com HP- β -CD).

Embora não significativo, foi possível observar a ocorrência de um efeito sinérgico do SUF associado à BVC, levando a um maior tempo de recuperação e bloqueio motor total em todas as concentrações estudadas (BVC+SUF vs. BVC).

Tabela 6. Tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (ASC) induzido pelos fármacos BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD +SUF a 0,125, 0,25 e 0,5%. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 7/grupo). *Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis* (não paramétrico).

Concentração (%)	Grupos	Tempo de recuperação (min.)	ASC (escore/h)
0,125	BVC	15,0 (10,0-15,0)	8,5 (6,0-9,5)
	BVC+SUF	20,0 (15,0-20,0)	18,0 (13,0-18,0)
	BVC:HP- β -CD	15,0 (10,0-15,0)	9,5 (7,0-13,0)
	BVC:HP- β -CD+SUF	15 (10,0-15,0)	13,0 (8,0-13,0)
0,25	BVC	20,0 (20,0-25,0)	18,0 (16-22)
	BVC+SUF	25,0 (20,0-25,0)	23,0 (21-26)
	BVC:HP- β -CD	20,0 (20,0-25,0)	21 (18-23)
	BVC:HP- β -CD+SUF	20,0 (20,0-25,0)	18 (17-23)
0,5	BVC	30,0 (29,0-30,0)	28,0 (28,0-31,0)
	BVC+SUF	35,0 (35,0-40,0)	36,0 (33,0-46,0)
	BVC:HP- β -CD	29,5 (29,0-30,0)	29,5 (28,0-31,0)
	BVC:HP- β -CD+SUF	34,0 (30,0-35,0)	33,0 (31,0-36,0)

3. Avaliação do Bloqueio Sensorial em Ratos

A avaliação do efeito antinociceptivo, através do teste PWTP, mostrou as relações dose - efeito para os grupos: BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD; BVC:HP- β -CD+SUF; SUF e HP- β -CD (controle). Os efeitos da injeção intratecal das formulações foram avaliados ao longo do tempo, para três diferentes concentrações de BVC (0,125, 0,25 e 0,5%).

A infiltração do veículo HP- β -CD no espaço intratecal, não modificou os valores de linha basal (180 – 280 g) para o limiar da dor em ratos. Porém, todas as outras formulações elevaram significativamente o limiar de dor dos animais tratados em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). A administração do complexo BVC:HP- β -CD e da associação BVC+SUF levou a

um aumento na duração e na intensidade do bloqueio sensorial, quando comparados ao anestésico livre (Figura 24).

A injeção de BVC+SUF na concentração de 0,125% (Figura 24-A, Tabela 7) levou a um aumento da duração (147 min. em média) e da intensidade do efeito analgésico, quando comparada com a BVC livre (3,1 vezes, $p < 0,001$ a 60 e 120 min.). Maior duração e intensidade da atividade analgésica foram também alcançadas para a BVC complexada com HP- β -CD, aumentando para 137 min. a duração do efeito analgésico (2,9 vezes $p < 0,001$ em relação à BVC livre). Além disso, o grupo tratado com BVC complexada e associada ao SUF (BVC:HP- β -CD+SUF), mostrou-se ainda mais potente, com um acentuado aumento na duração (197 min.) em média e na intensidade do efeito analgésico (4,2 vezes, $p < 0,001$) em relação à BVC livre.

Na concentração de 0,25% (Figura 24-B, Tabela 7), a comparação com a BVC livre também revelou maior intensidade e duração do efeito analgésico (206, 249 e 386 min., respectivamente) para os grupos: BVC+SUF (2,0 vezes, $p < 0,001$ em 120 e 180 min. e $p < 0,05$ a 240 min.); BVC:HP- β -CD (2,4 vezes, $p < 0,001$ a 120, 180 e 240 minutos) e BVC:HP- β -CD+SUF (3,7 vezes, $p < 0,001$ a 120, 180 e 240 min.).

Observou-se também que o grupo tratado com BVC+SUF desenvolveu bloqueio sensorial de menor duração e intensidade analgésica que os grupos tratados com BVC complexada, não associada (BVC:HP- β -CD - 1,2 vezes, $p < 0,05$ a 240 min.) e associada (BVC:HP- β -CD+SUF - 1,9 vezes, $p < 0,01$ a 240 min. e $p < 0,001$ a 300 e 360 min.). Finalmente, os grupos tratados com BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,001$), nos tempos de 300 e 360 min., com maior bloqueio sensorial induzido pelo último.

Após a infiltração de BVC a 0,5%, (Figura 24-C, Tabela 7) observou-se um perfil semelhante ao encontrado com tratamento nas concentrações de 0,125% e 0,25%, verificando-se aumento da intensidade e duração do efeito analgésico (para 385, 454 e 694 min.) em relação ao grupo da BVC livre, comparando-se o tratamento com: BVC+SUF (1,8 vezes, $p < 0,001$ a 240, 300 e 360 min.); BVC:HP- β -CD (2,1 vezes, $p < 0,001$ a 240, 300 e 360 min.) e BVC:HP- β -CD+SUF (3,2 vezes, $p < 0,001$ a 240, 300 e 360 min.), respectivamente.

Novamente, o grupo BVC+SUF apresentou menor duração e intensidade do efeito analgésico, em relação aos grupos BVC:HP- β -CD (1,2 vezes, $p < 0,01$ a 420 e 540 min.) e BVC:HP- β -CD+SUF (1,8 vezes, $p < 0,01$ a 420 min. e $p < 0,001$ a 480, 540 e 600 min.), enquanto o grupo do complexado associado ao SUF (BVC:HP- β -CD+SUF) aumentou a duração do efeito analgésico em 1,5 vezes ($p < 0,001$ a 480 e 600 min. e $p < 0,01$ a 540 min.), quando comparado com a BVC complexada com HP- β -CD.

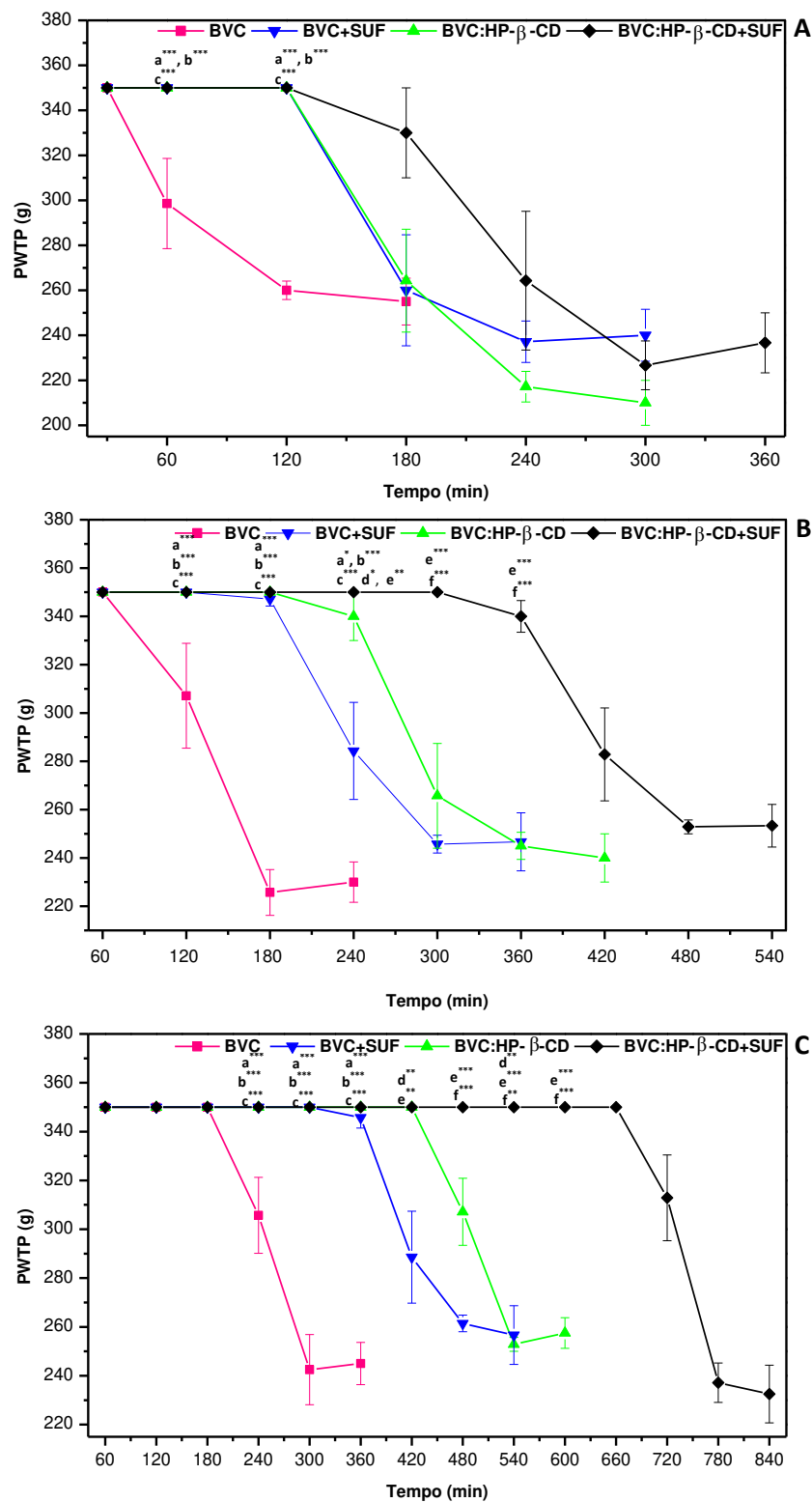


Figura 24. Avaliação do bloqueio sensorial do nervo caudal em ratos: curvas de efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os fármacos BVC, BVC+SUF, BVC:HP-β-CD e BVC:HP-β-

CD+SUF nas concentrações de 0,125% (A) , 0,25% (B) e 0,5% de BVC (C). A concentração de SUF utilizada foi de 0,0015%. Valores expressos em média $\pm$ D.P. (n=7). *Análise estatística: (ANOVA - Tukey-Kramer). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. (a) BVC vs BVC+SUF; (b) BVC vs BVC:HP- β -CD; (c) BVC vs BVC:HP- β -CD+SUF; (d) BVC+SUF vs BVC:HP- β -CD; (e) BVC+SUF vs BVC:HP- β -CD+SUF; (f) BVC:HP- β -CD vs BVC:HP- β -CD+SUF.*

Tabela 7. Duração média de analgesia (min.) induzida pelos fármacos BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD e BVC:HP β -CD +SUF a 0,125, 0,25 e 0,5%.

Concentração (%)	Grupos	Duração média de analgesia (min.)
0,125	BVC	47
	BVC+SUF	147
	BVC:HP-B-CD	137
	BVC:HP-B-CD+SUF	197
0,25	BVC	103
	BVC+SUF	206
	BVC:HP-B-CD	249
	BVC:HP-B-CD+SUF	386
0,5	BVC	214
	BVC+SUF	385
	BVC:HP-B-CD	454
	BVC:HP-B-CD+SUF	694

De maneira geral, os resultados mostraram um aumento na potência e na duração da analgesia para todas as formulações estudadas, em relação à BVC livre. A potencialização do efeito analgésico promovido pela associação do SUF a BVC em todas as concentrações testadas, explica-se pela ocorrência de um efeito aditivo do potencial analgésico dos fármacos (AL e opióide). Neste sentido, e para efeito de controle, a Figura 25 mostra a duração do bloqueio sensorial para o grupo tratado somente com SUF, onde pode-se verificar uma duração média de 2:25 h do bloqueio induzido por 38,8 μ M de SUF. De acordo com Boersma e col. (1992), fármacos lipofílicos, quando injetados intratecalmente apresentam uma rápida

distribuição e alto clearance no fluido cerebrospinal. Sendo assim, o SUF caracteriza-se por um início de ação mais rápido, mas com reduzida duração de ação, em relação a opióides hidrofílicos, o que justifica a importância de sua associação com AL.

Para fins de melhor visualização a Figura 26 apresenta a comparação entre as mesmas formulações, porém, nas diferentes concentrações estudadas.

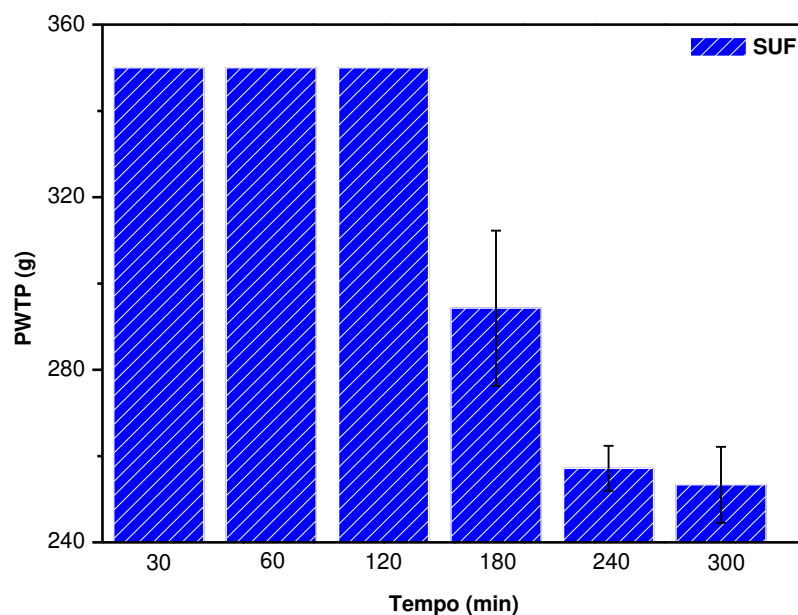


Figura 25. Avaliação do bloqueio sensorial em ratos: Curva de efeito x tempo no teste PWTP para o grupo tratado com o opióide SUF a 38,8μM. Valores expressos em média ± d.p. (n=7).

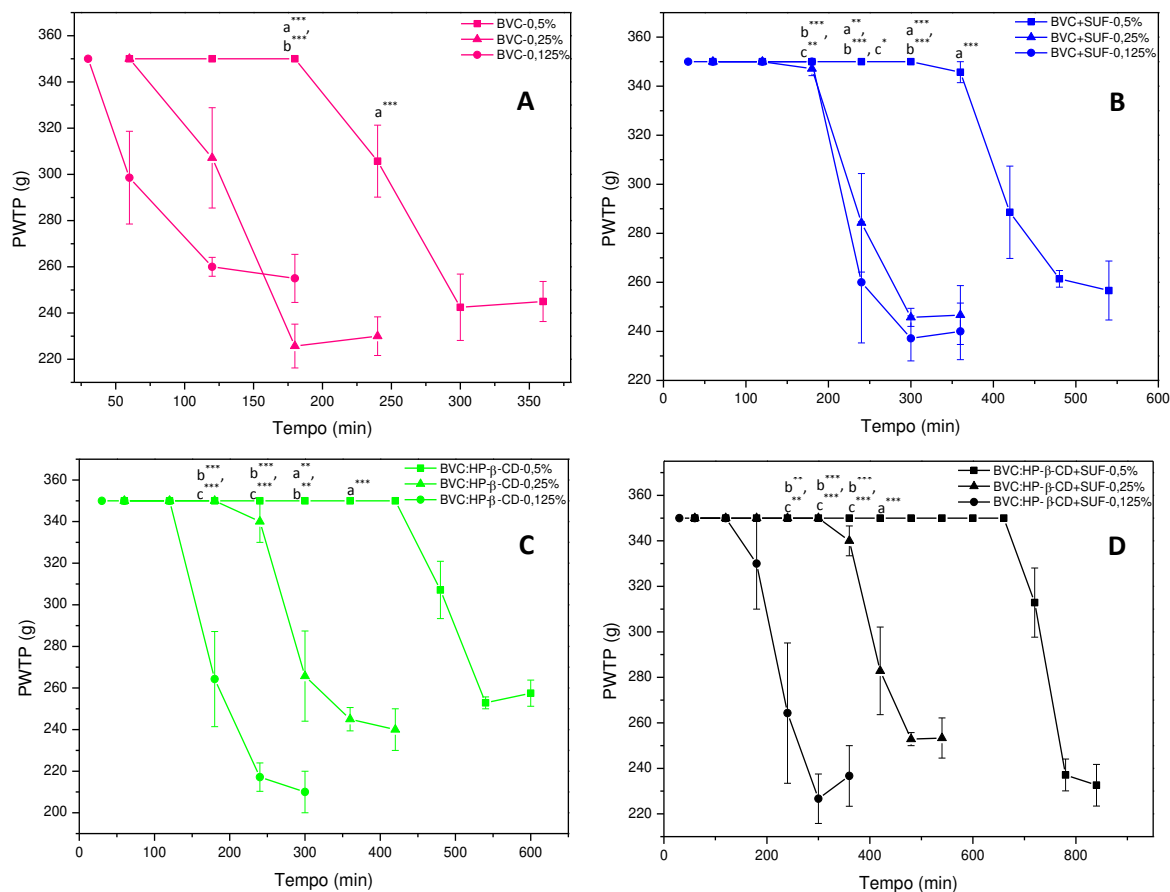


Figura 26. Avaliação do bloqueio sensorial do nervo caudal em ratos: curvas de efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os fármacos BVC (A); BVC+SUF (B); BVC:HP-β-CD (C) e BVC: HP-β-CD+SUF (D), nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5%. A concentração de SUF utilizada foi de 0,0015%. Valores expressos em média ± D.P. (n=7). *Análise estatística: (ANOVA - Tukey-Kramer). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$. A-* (a) BVC-0,5% vs BVC-0,25%; (b) BVC-0,5% vs BVC-0,125% e (c) BVC-0,25% vs BVC-0,125%. **B-** (a) BVC+SUF-0,5% vs BVC+SUF-0,25%; (b) BVC+SUF-0,5% vs BVC+SUF-0,125% e (c) BVC+SUF-0,25% vs BVC+SUF-0,125%. **C-** (a) BVC:HP-β-CD-0,5% vs BVC:HP-β-CD-0,25%; (b) BVC:HP-β-CD-0,5% vs BVC:HP-β-CD-0,125% e (c) BVC:HP-β-CD-0,25% vs BVC:HP-β-CD-0,125%. **D:** (a) BVC:HP-β-CD+SUF-0,5% vs BVC:HP-β-CD+SUF-0,25%; (b) BVC:HP-β-CD+SUF-0,5% vs BVC:HP-β-CD+SUF-0,125% e (c) BVC:HP-β-CD+SUF-0,25% vs BVC:HP-β-CD+SUF-0,125%.

A complexação de BVC com HP-β-CD levou a uma potencialização do efeito analgésico para todos os grupos estudados. Este resultado está de acordo com observações anteriores, de aumento do bloqueio sensorial após administração por vias intramuscular

(Araújo et. al., 2005) e intratecal (Araújo et al., 2006) de BVC racêmica, nas mesmas concentrações. Este efeito pode ser explicado pela proteção oferecida pela complexação na cavidade hidrofóbica da CD, o que impediria/diminuiria a ligação do AL com as proteínas do líquido e sua captação pela circulação, já que a BVC livre apresenta grande capacidade de ligação às proteínas do líquido (Araújo et al., 2006).

Como esperado, o maior efeito analgésico foi conseguido após associação da BVC complexada associada ao SUF (BVC:HP- β -CD+SUF), o que resultou em maior eficácia analgésica em todas as concentrações estudadas. Esta associação apresenta uma potencial aplicação clínica, uma vez que, com ela, é possível reduzir a frequência de administração e também a dose necessária de BVC para promover analgesia em procedimentos cirúrgicos, como evidenciado pela comparação do efeito analgésico entre os grupos BVC (0,5%) e BVC:HP- β -CD (0,25%) em associação com 38,8 μ M de SUF (Figura 27).

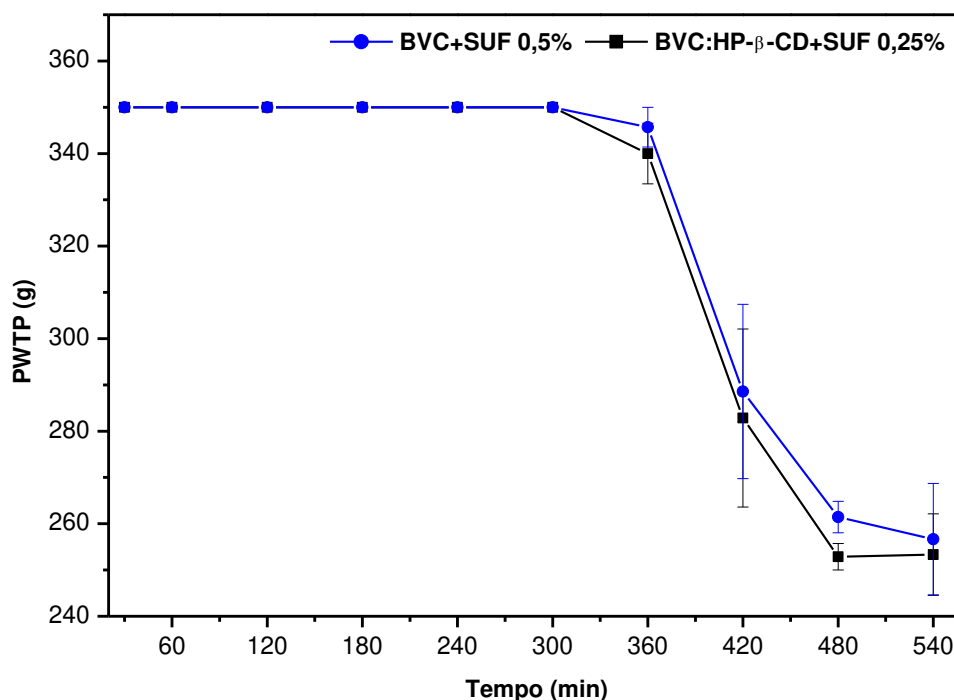


Figura 27. Curvas do efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com BVC (0,5%) e BVC:HP- β -CD (0,25%) associadas ao SUF a 38,8 μ M.

4. Avaliação da Farmacocinética em Coelhos

4.1 Validação da Metodologia

A Figura 28 (A) mostra o espectro de massas da BVC no modo sequencial de m/z 289,3; gerando íon fragmento de m/z 140,16 e do SUF (B) no modo sequencial de m/z 387,1; gerando íon fragmento de m/z 238,1.

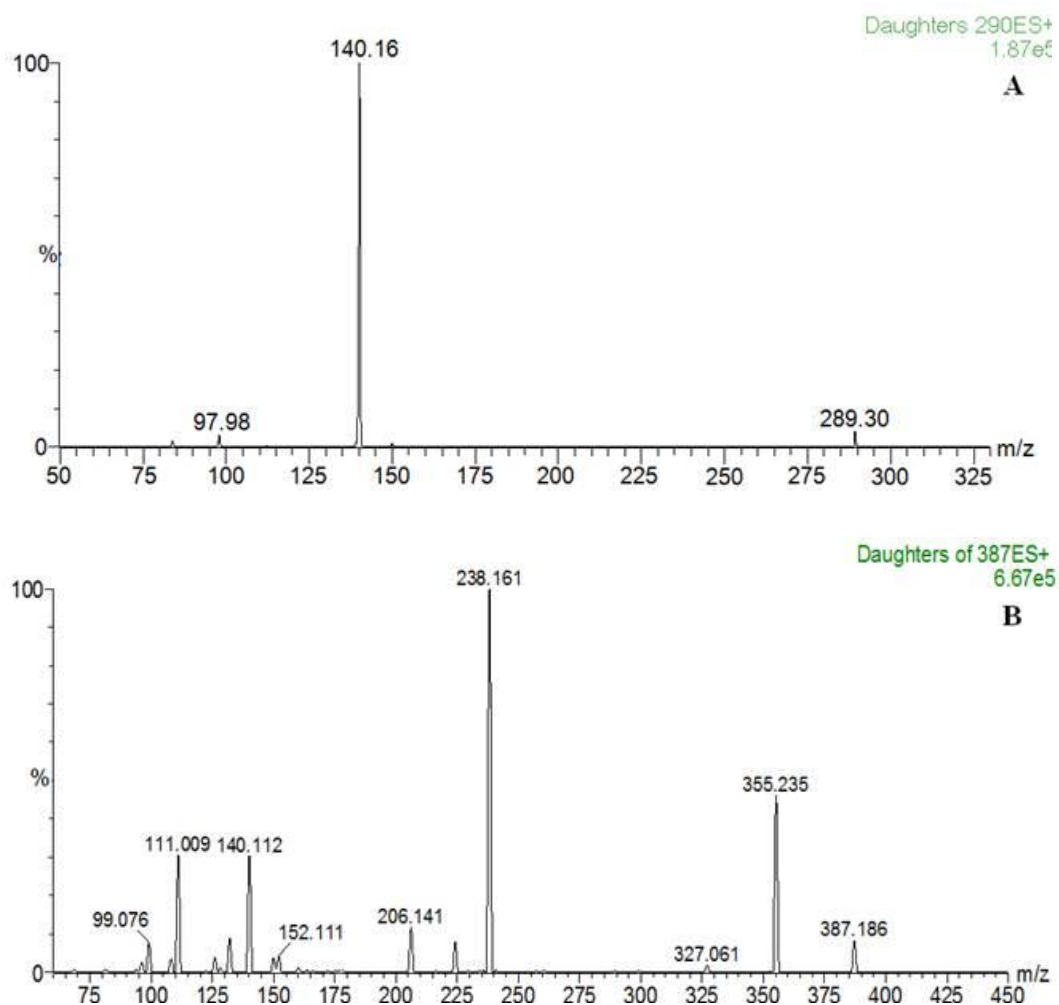


Figura 28. (A) Espectro de massa sequencial da bupivacaína, íon produto de m/z 140,16. Energia de colisão 20 eV. B) Espectro de massa sequencial do sufentanil, íon produto de m/z 238,1. Energia de colisão 20 eV.

Especificidade: As amostras de branco foram testadas utilizando as condições cromatográficas e os procedimentos de extração descritos anteriormente, e não foram

observadas interferências no tempo de retenção do SUF e do PI. O mesmo foi observado para a BVC.

Linearidade: A curva de calibração do SUF foi gerada através da análise de quantidades crescentes de fármaco. As concentrações foram definidas em testes preliminares, incluindo a primeira quantificação de amostras, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas. Para definir a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, foram geradas três curvas de calibração com seis concentrações do fármaco (SUF) e PI. Foi observada uma resposta adequada na faixa de 0,02 a 10 ng/mL. A curva de calibração apresentou excelente linearidade com coeficiente de correlação $r=0,99$. Os desvios observados foram menores que 20% em relação à concentração nominal para o limite de quantificação (0,02 ng/mL) e menores que 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. A Tabela 8 apresenta as concentrações obtidas com a curva de calibração do SUF, nestes experimentos.

Tabela 8. Curva de Calibração (Linearidade) do SUF.

Fármaco	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração média experimental (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
SUF	0,02	0,02	0,00	100,00
SUF	0,20	0,19	4,80	96,83
SUF	1,00	1,02	2,32	102,03
SUF	2,00	2,04	2,52	102,05
SUF	5,00	5,09	4,34	101,71
SUF	10,00	9,70	4,64	97,04

Equação da curva de calibração 1: $y = 0,663819x + 0,000378214$ (0,998702)

Equação da curva de calibração 2: $y = 0,714337x + 0,00254461$ (0,999551)

Equação da curva de calibração 3: $y = 0,718538x + 0,00304766$ (0,999242)

Para BVC também foram geradas três curvas de calibração com seis padrões contendo BVC e o PI (ropivacaína). Foi observada uma resposta adequada na faixa de 0,3 a 120 ng/mL.

A curva de calibração apresentou excelente linearidade com coeficiente de correlação $r=0,99$. Os desvios observados foram menores que 20% em relação à concentração nominal para o limite de quantificação (0,3 ng/mL) e menores que 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. A Tabela 9 apresenta as concentrações obtidas com a curva de calibração da BVC, nestes experimentos.

Tabela 9. Curva de Calibração (Linearidade) da BVC.

Fármaco	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração média experimental (ng/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
BVC	0,30	0,30	0,33	100,00
BVC	3,00	2,98	3,11	99,31
BVC	10,00	9,86	0,26	98,56
BVC	30,00	29,96	0,57	99,87
BVC	60,00	60,89	0,85	101,48
BVC	120,00	120,80	1,17	100,67

Equação da curva de calibração 1: $y = 0,0240853x + 0,00320462$ ($r=0,999925$)

Equação da curva de calibração 2: $y = 0,0243906x + 0,00171228$ ($r = 0,999768$)

Equação da curva de calibração 3: $y = 0,0247751x + 0,00130424$ ($r = 0,999881$)

Exatidão e Precisão: A precisão e exatidão do método de detecção foram calculados pelas variações intra e inter-lote, em três concentrações distintas, alta (CA 8ng/mL), média (CM 4ng/mL) e baixa (CB 0,06ng/mL), utilizando-se várias determinações por concentração. A precisão e a exatidão foram determinadas em um mesmo lote (intra-lote) e em lotes diferentes (inter-lotes). A precisão intra-lotes apresentou valores na faixa de 1,22 a 12,31% e a inter-lotes de 2,83 a 5,99%. A exatidão apresentou valores de 93,33 a 106,67% (intra-lotes) e 95,59 a 103,00% (inter-lotes).

Para BVC foram calculadas as variações intra e inter-lote de três concentrações distintas, alta (CA 90ng/mL), média (CM 45ng/mL) e baixa (CB 0,9ng/mL), utilizando-se várias determinações por concentração. A precisão e a exatidão foram determinadas em um mesmo lote (intra-lote) e em lotes diferentes (inter-lotes). A precisão intra-lotes apresentou

valores na faixa de 0,93 a 5,77 % e a inter-lotes de 1,29 a 4,46%. A exatidão apresentou valores de 95,74 a 106,00% (intra-lotes) e 99,52 a 102,16% (inter-lotes).

Limite de quantificação (LQ): O LQ do SUF foi determinado como o menor valor mensurável de SUF com um DP de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão, através da análise de, no mínimo, cinco amostras de padrões. O LQ determinado foi de 0,02ng/mL. As Tabelas 10 e 11 mostram os resultados da precisão e exatidão intra e inter-lote do LQ de SUF.

Tabela 10. Resultados das análises intra-lote do controle de qualidade LQ do SUF.

	LQ (1) ng/mL	LQ (2) ng/mL	LQ (3) ng/mL
Média	0,019	0,019	0,018
DP	0,001	0,001	0,002
CV (%)	6,935	6,099	13,608
Exatidão (%)	95,833	95,833	90,000

Concentração nominal: LQ=0,02ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação.

Tabela 11. Resultados inter-lotes do controle de qualidade LQ do SUF.

	LQ (1) ng/mL	LQ (2) ng/mL	LQ (3) ng/mL
Réplicas	0,019	0,019	0,018
Média		0,019	
DP		0,001	
CV (%)		3,587	
Exatidão (%)		93,889	

Concentração nominal: LQ=0,02 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação média das réplicas inter-lotes de LQ (1), LQ (2) e LQ (3).

O LQ da BVC também apresentou o menor valor mensurável com um DP de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão. O LQ determinado foi de 0,3 ng/mL. As Tabelas 12 e 13 mostram os resultados da precisão e exatidão intra e inter-lote do LQ da BVC.

Tabela 12. Resultados das análises intra-lote do controle de qualidade LQ da BVC.

	LQ (1) ng/mL	LQ (2) ng/mL	LQ (3) ng/mL
Média	0,308	0,301	0,308
DP	0,036	0,027	0,016
CV (%)	11,614	8,809	5,214
Exatidão(%)	102,667	100,389	102,5

Concentração nominal: LQ= 0,3 ng/mL, DP= desvio padrão, CV= coeficiente de variação.

Tabela 13. Resultados inter-lotes do controle de qualidade LQ da BVC.

	LQ (1) ng/mL	LQ (2) ng/mL	LQ (3) ng/mL
Réplicas	0,308	0,301	0,308
Média		0,306	
DP		0,004	
CV (%)		1,247	
Exatidão (%)		101,852	

Concentração nominal: LQ=0,3ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação média das réplicas inter-lotes de LQ (1), LQ (2) e LQ (3).

Os resultados obtidos na validação dos métodos estão de acordo com os preceitos da resolução 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e indicam que os métodos são altamente específicos e seletivos nas faixas analíticas avaliadas. Além disso, os métodos descritos são rápidos (tempo de corrida analítica de 2.5 min. para ambos os fármacos) e adequados para dosagens de SUF e BVC.

4.2 Análise da Concentração Plasmática e do Perfil Farmacocinético de Bupivacaína e Sufentanil por Espectrometria de Massas

Diversos estudos que avaliaram a farmacocinética de fármacos complexados com CD encontraram que estes carreadores são capazes de alterar os padrões farmacocinéticos dos fármacos (Chen & Wang, 2001; Fernandes et al., 2003; Rasheed et al., 2008). A Tabela 14 apresenta as concentrações médias de BVC (ng/mL), obtidas após a administração intratecal em coelhos das formulações: BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF.

De maneira geral, observou-se que os grupos BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF apresentaram as menores concentrações plasmáticas de BVC, o que pode ser claramente visualizado na Figura 29. Na comparação entre os grupos BVC e BVC:HP- β -CD a ocorrência de diferença estatística ($p < 0,01$ para os tempos 15 e 360 min. e $p < 0,001$ para os demais tempos) demonstra que a complexação da BVC com HP- β -CD reduz a concentração plasmática disponível com a ocorrência de um menor pico plasmático e valores mais constantes. Este resultado se deve, provavelmente, à incapacidade de estruturas de maiores diâmetros (ciclodextrina) atravessarem as barreiras biológicas, o que resulta em maior tempo de permanência do complexo, próximo ao local de aplicação (Stella & He, 2008).

Resultado semelhante foi verificado na comparação entre os grupos BVC e BVC:HP- β -CD+SUF ($p < 0,01$ para os tempos 15 e 360 min. e $p < 0,01$ para os demais tempos), demonstrando que a presença de SUF não alterou de maneira significativa os níveis plasmáticos da BVC complexada, provavelmente em função da baixa concentração de SUF (1,125 μ g) em relação à concentração de BVC (375 μ g).

O maior pico plasmático de BVC foi visualizado para o grupo tratado com BVC+SUF, 15 min. após a administração. Em contraste, o grupo BVC:HP- β -CD+SUF apresentou o menor pico plasmático, no mesmo intervalo de medida, evidenciando a diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$ - 300 min.; $p < 0,01$ - 120, 240 e 360 e $p < 0,001$ para os demais tempos). A comparação entre BVC+SUF vs BVC:HP- β -CD apresentou um perfil semelhante ($p < 0,05$ - 300 e 420 min.; $p < 0,01$ - 90, 120 e 240 e $p < 0,001$ para os demais).

Assim, os grupos que receberam administração do complexo BVC:HP- β -CD associado ou não ao SUF tiveram picos plasmáticos menores e mais uniformes, o que é um perfil farmacocinético desejável e que contribui para redução de efeitos adversos da BVC. Esses

resultados evidenciam que o complexo BVC:HP- β -CD realmente consiste num sistema de libera  o modificada do fármaco.

Tabela 14. Concentra  o (média $\pm$ desvio padrão) de BVC (ng/mL) medida no plasma de coelhos, após a inje  o intratecal dos grupos: BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF a 0,5%. (n = 5/grupo).

Tempo	BVC	BVC+SUF	BVC:HP- β -CD	BVC:HP- β -CD+SUF
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
15	32,81 $\pm$ 10,63	39,55 $\pm$ 17,65	6,27 $\pm$ 2,60 ^{b**, d***}	5,15 $\pm$ 3,08 ^{c**, e***}
30	25,73 $\pm$ 4,64	20,57 $\pm$ 4,96	4,59 $\pm$ 2,89 ^{b***, d***}	4,34 $\pm$ 3,29 ^{c***, e***}
45	21,83 $\pm$ 2,55	17,58 $\pm$ 7,06	3,80 $\pm$ 2,74 ^{b***, d***}	3,45 $\pm$ 2,81 ^{c***, e***}
60	19,07 $\pm$ 2,32	13,68 $\pm$ 3,70 ^{a*}	3,04 $\pm$ 2,61 ^{b***, d***}	1,81 $\pm$ 0,679 ^{c***, e***}
90	14,81 $\pm$ 2,69	9,07 $\pm$ 3,05 ^{a**}	2,38 $\pm$ 2,24 ^{b***, d**}	1,50 $\pm$ 0,55 ^{c***, e***}
120	12,43 $\pm$ 3,66	7,70 $\pm$ 2,44 ^{a*}	1,69 $\pm$ 0,93 ^{b***, d**}	1,09 $\pm$ 0,61 ^{c***, e**}
180	7,99 $\pm$ 1,01	4,82 $\pm$ 2,14 ^{a**}	0,74 $\pm$ 0,49 ^{b***, d***}	0,75 $\pm$ 0,24 ^{c***, e***}
240	6,59 $\pm$ 1,12	3,47 $\pm$ 2,25 ^{a**}	0,37 $\pm$ 0,30 ^{b***, d**}	0,40 $\pm$ 0,31 ^{c***, e**}
300	5,27 $\pm$ 1,25	2,31 $\pm$ 1,42 ^{a***}	0,27 $\pm$ 0,26 ^{b***, d*}	0,30 $\pm$ 0,32 ^{c***, e*}
360	4,63 $\pm$ 0,92	2,64 $\pm$ 2,89	0,06 $\pm$ 0,13 ^{b**}	0,12 $\pm$ 0,26 ^{c**}
420	3,08 $\pm$ 0,59	1,36 $\pm$ 0,96 ^{a**}	0,08 $\pm$ 0,18 ^{b***, d*}	0,00 $\pm$ 0,00
480	2,79 $\pm$ 0,54	1,28 $\pm$ 0,91 ^{a**}	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
540	2,40 $\pm$ 0,63	1,28 $\pm$ 1,00 ^{a*}	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

*Análise estatística: (ANOVA - Tukey-Kramer). *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05. (a) BVC vs BVC+SUF; (b) BVC vs BVC:HP- β -CD; (c) BVC vs BVC:HP- β -CD+SUF; (d) BVC+SUF vs BVC:HP- β -CD e (e) BVC+SUF vs BVC:HP- β -CD+SUF.*

   interessante registrar que, ao planejarmos trabalhar com a formula  o BVC:HP- β -CD+SUF consideramos a possibilidade de o SUF deslocar a BVC do complexo, uma vez que a forma  o de complexos de inclusão    um processo dinâmico e mantido por intera  es fracas

(Loftsson & Duchêne, 2007). Se isso acontecesse o SUF poderia formar complexos com a CD, competindo com a BVC pela cavidade hidrofóbica daquela. Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, determinamos a constante de associação da BVC:HP- β -CD (15 M^{-1} , Araújo et al, 2005) enquanto que para o complexo SUF:HP- β -CD essa constante é de 515 M^{-1} (Volobuef et al., 2009), ambos em pH 7,4. Assim, apesar da maior afinidade do SUF pela HP- β -CD, os perfis farmacocinéticos similares, observados para BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF indicam que não houve competição significativa do SUF com a BVC pela cavidade da HP- β -CD, nas condições de ensaio.

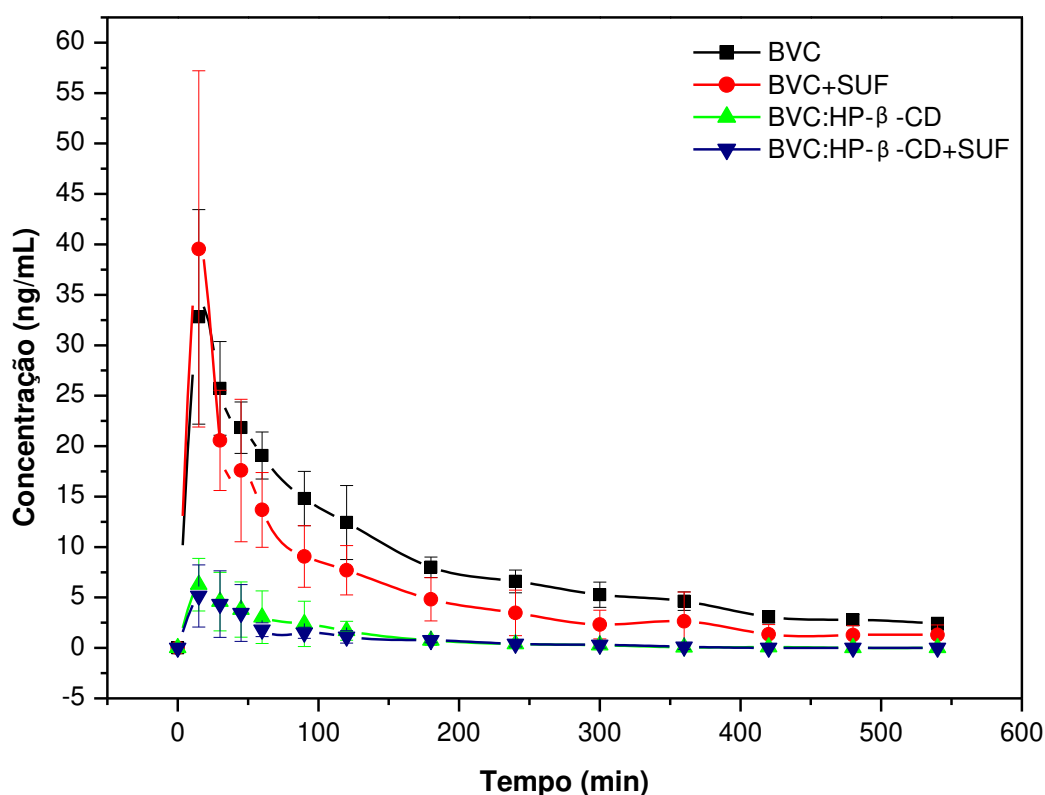


Figura 29. Concentração plasmática média de BVC ($\pm$ D.P.) x tempo após a injeção intratecal dos grupos: BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF a 0,5% (n = 5/grupo).

As concentrações médias de SUF (ng/mL) dos grupos: SUF; BVC+SUF e BVC:HP- β -CD+SUF são apresentadas na Tabela 15. O maior pico plasmático foi visualizado para o SUF livre (0,17 ng/mL) 15 min. após a administração intratecal (Figura 30).

Nota-se uma grande variação na curva de concentração plasmática do SUF, provavelmente causada pelas baixíssimas concentrações plasmáticas medidas (infra nM) e de 3-4 ordens de grandeza menores do que as de BVC.

Tabela 15. Concentração (média $\pm$ desvio padrão) de SUF (ng/mL) medida no plasma de coelhos após a injeção intratecal dos grupos: SUF; BVC+SUF e BVC:HP- β -CD+SUF a 38,8 μ M (n = 5/grupo).

Tempo	SUF	BVC+SUF	BVC:HP- β -CD+SUF
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
15	0,17 $\pm$ 0,07	0,10 $\pm$ 0,06	0,09 $\pm$ 0,05
30	0,12 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,08	0,12 $\pm$ 0,08
45	0,09 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,03
60	0,06 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02
90	0,06 $\pm$ 0,07	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02
120	0,04 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01
180	0,02 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
240	0,01 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
300	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
360	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
420	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
480	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
540	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

Análise estatística: (ANOVA - Tukey-Kramer).

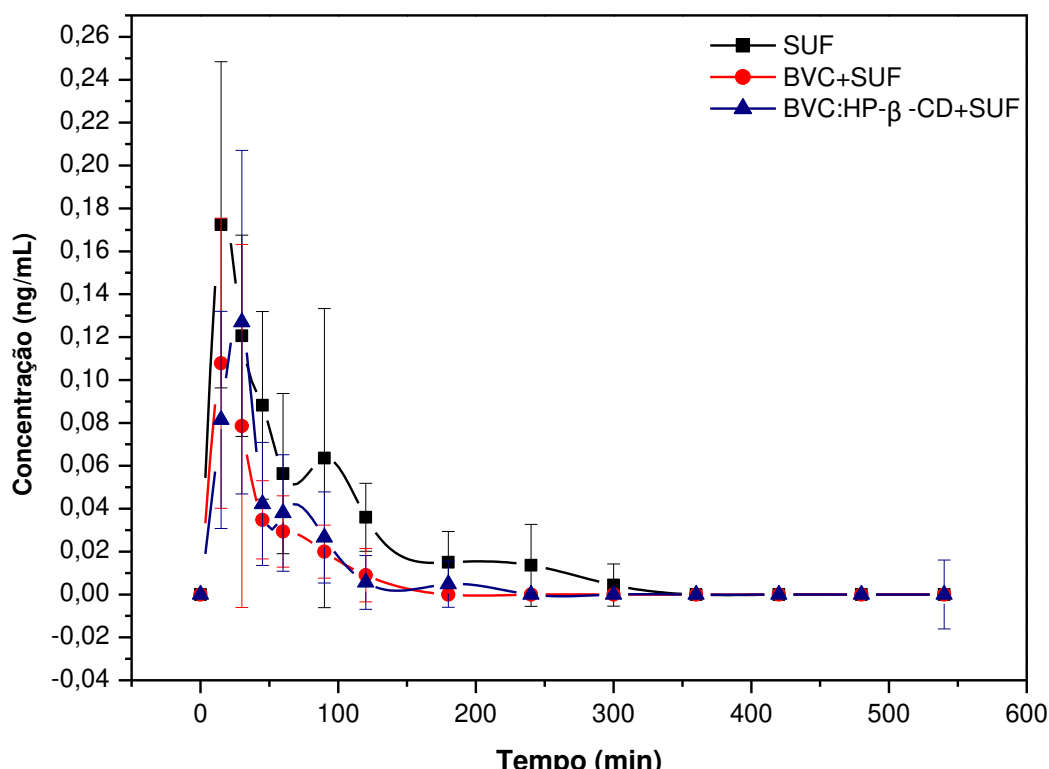


Figura 30. Concentração plasmática média de SUF ($\pm$ D.P) x tempo após a injeção intratecal dos grupos: SUF; BVC+SUf e BVC:HP- β -CD+SUf a 0,5% (n = 5/grupo).

Os parâmetros farmacocinéticos da BVC (C_{max} ; T_{max} ; ASC_{0-540} ; $ASC_{0-\infty}$ e $t_{1/2}$ beta), estão listados na Tabela 16. É possível visualizar a ocorrência de um maior valor médio da concentração plasmática máxima (C_{max}) para o grupo BVC+SUf, quando comparado aos grupos BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUf ($p < 0,001$). Perfil semelhante ($>$ concentração plasmática) é verificado também para a BVC livre, em comparação com os mesmos grupos ($p < 0,01$). Os picos plasmáticos dos fármacos BVC e BVC+SUf podem ser visualizados na Figura 30; no entanto, apesar dos maiores valores de C_{max} para os fármacos livres, em relação aos complexados, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no tempo para atingir a concentração plasmática máxima (T_{max}) entre os grupos.

Os fármacos livres (BVC e BVC+SUf) apresentaram tempo médio de meia vida ($t_{1/2}$ beta) de 1,8 e 3,1h, enquanto que para os fármacos complexados (BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUf) esse tempo foi de aproximadamente 4,7 e 4,8h, respectivamente. A ocorrência do

menor $t_{1/2}$ para os fármacos livres mostram seu desaparecimento mais rápido da circulação, quando comparados aos fármacos complexados.

A área sob a curva (ASC) de 0 a 540min. dos grupos BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF foi cerca de 9 e 11 vezes menor, respectivamente ($p<0,001$), em comparação com a BVC livre. Do mesmo modo, o grupo BVC+SUF apresentou maior ASC, sendo cerca de 6 vezes maior, em relação a BVC:HP- β -CD e cerca de 7 vezes maior em relação ao grupo BVC:HP- β -CD+SUF ($p<0,01$). A maior ASC obtida para a BVC livre e associada ao SUF pode ser explicada pela grande diferença de concentração plasmática, principalmente no início da curva. Na análise da ASC de 0 ao infinito, a BVC livre e associada ao SUF, também apresentaram os maiores valores médios de ASC em relação aos grupos complexados (BVC vs BVC:HP- β -CD e BVC vs BVC:HP- β -CD+SUF - $p<0,001$ / BVC+SUF vs BVC:HP- β -CD e BVC+SUF vs BVC:HP- β -CD+SUF - $p<0,01$). De modo geral, o grupo BVC:HP- β -CD apresentou características de lenta liberação, as quais não foram alteradas após a associação do complexo ao coadjuvante SUF.

A Figura 31 mostra a correlação entre as concentrações plasmáticas de BVC das formulações BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF e o bloqueio sensorial das mesmas formulações, ambos em 0,5%. É importante ressaltar que mesmo sendo utilizados diferentes modelos animais para realização dos experimentos (Ratus norvegicus - bloqueio sensorial e coelhos albinos da raça Nova Zelândia – determinação da concentração plasmática e perfil farmacocinético), foi possível verificar a ocorrência de maiores picos plasmáticos com os menores tempos de bloqueio sensorial para os fármacos livres (Figura 32 - A: BVC e B: BVC+SUF). Em oposição, as formulações complexadas associadas ou não ao SUF (Figura 32 - C: BVC:HP- β -CD e D: BVC:HP- β -CD+SUF), apresentaram os menores picos plasmáticos com a ocorrência de um aumento no bloqueio sensorial, o que caracteriza liberação sustentada do AL.

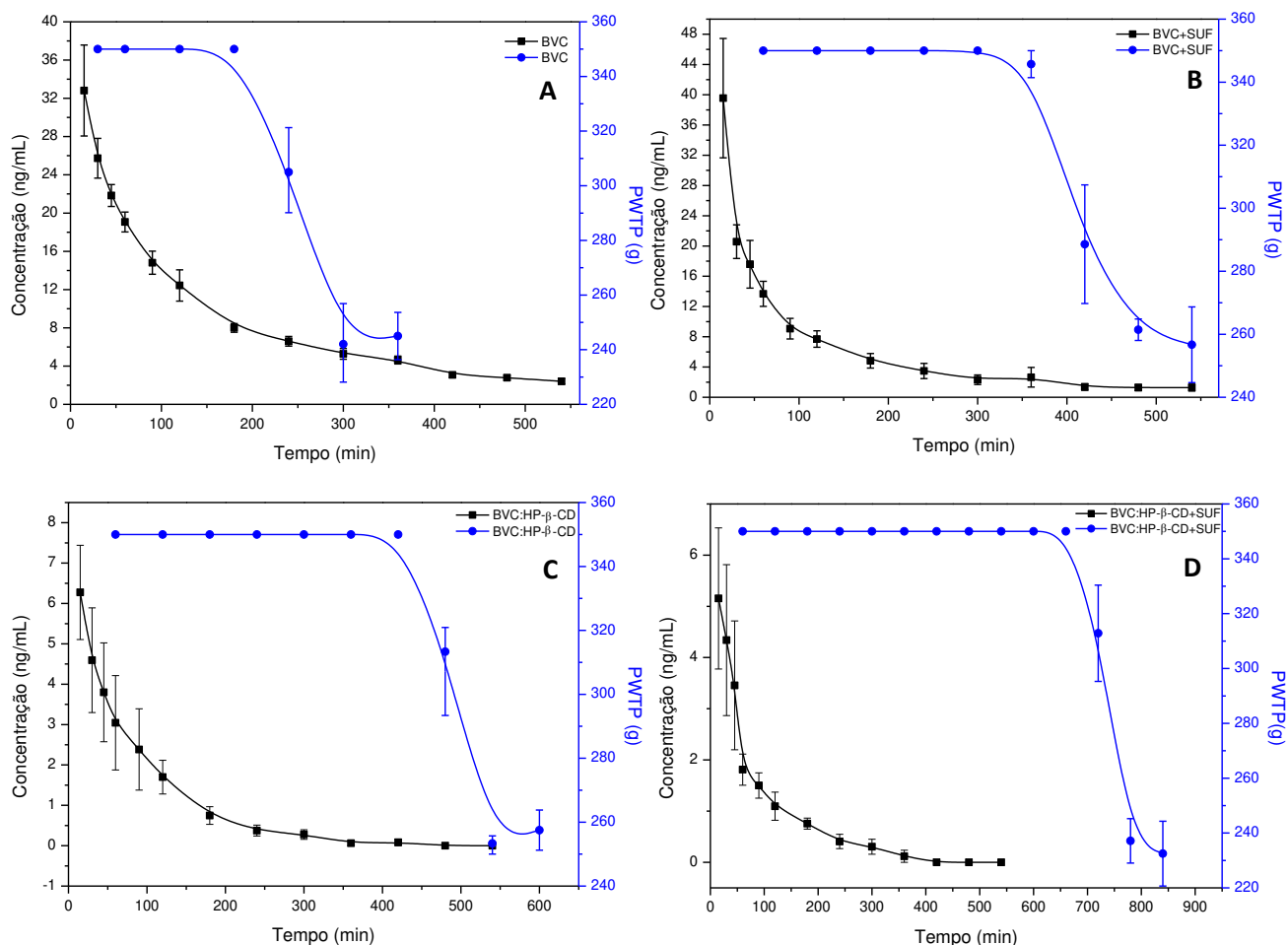


Figura 31. Concentração plasmática média de bupivacaína medida em coelhos ($\pm$ erro padrão) x tempo, após a injeção intratecal das formulações: (A) BVC; (B) BVC+SUF; (C) BVC:HP- β -CD e (D) BVC:HP- β -CD+SUF em 0,5% e bloqueio sensorial do nervo caudal em ratos: curvas de efeito x tempo no teste PWTP para as mesmas formulações em igual concentração ($\pm$ erro padrão).

Na Tabela 17 são apresentados os parâmetros farmacocinéticos (C_{max} ; T_{max} ; ASC_{0-540} ; $ASC_{0-\infty}$ e $t_{1/2\beta}$) do SUF dos grupos SUF; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD+SUF, não tendo sido detectadas diferenças estatísticas entre eles ($p > 0,05$).

Tabela 16. Parâmetros farmacocinéticos (média $\pm$ D.P.) da BVC (ng/L) medida no plasma de coelhos, após a injeção intratecal de BVC; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD e BVC:HP- β -CD+SUF.

Parâmetro (média $\pm$ D.P.)	BVC	BVC+SUF	BVC:HP- β -CD	BVC:HP- β -CD+SUF
C _{máx} (ng/L)	33,06 $\pm$ 10,52	39,55 $\pm$ 17,65	6,27 $\pm$ 2,61 ^{b**d***}	5,17 $\pm$ 3,06 ^{c***e***}
T _{máx} (h)	0,30 $\pm$ 0,112	0,25 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,00	0,35 $\pm$ 0,22
ASC ₀₋₅₄₀ (ng-h/L)	75,55 $\pm$ 9,59	51,37 $\pm$ 15,66 ^{a**}	8,63 $\pm$ 5,90 ^{b***d***}	6,87 $\pm$ 4,09 ^{c***e***}
ASC _{0-∞} (ng-h/L)	86,52 $\pm$ 10,47	65,37 $\pm$ 37,99	12,33 $\pm$ 7,99 ^{b***d**}	8,06 $\pm$ 5,13 ^{c***e**}
t $\frac{1}{2}$ beta (h)	1,83 $\pm$ 1,08	3,10 $\pm$ 0,95	4,68 $\pm$ 6,54	4,85 $\pm$ 8,62

Análise estatística: (ANOVA - Tukey-Kramer). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. (a) BVC vs BVC+SUF; (b) BVC vs BVC:HP- β -CD; (c) BVC vs BVC:HP- β -CD+SUF; (d) BVC+SUF vs BVC:HP- β -CD e (e) BVC+SUF vs BVC:HP- β -CD+SUF.

Tabela 17. Parâmetros farmacocinéticos (média $\pm$ D.P.) do SUF (ng/L) medida no plasma de coelhos, após a injeção intratecal de SUF; BVC+SUF; BVC:HP- β -CD+SUF..

Parâmetro (média $\pm$ D.P.)	SUF	BVC+SUF	BVC:HP- β -CD+SUF
C _{máx} (ng/L)	0,09 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,08
T _{máx} (h)	0,31 $\pm$ 0,12	0,30 $\pm$ 0,12	0,35 $\pm$ 0,14
ASC ₀₋₅₄₀ (ng-h/L)	0,08 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,13
ASC _{0-∞} (ng-h/L)	0,08 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,13
t $\frac{1}{2}$ beta (h)	2,72 $\pm$ 1,95	2,13 $\pm$ 2,90	1,66 $\pm$ 0,70

Análise estatística: (ANOVA - Tukey-Kramer).

V. CONCLUSÕES

- Nos ensaios *in vitro*, a complexação da BVC com HP- β -CD, associada ou não ao SUF (BVC: HP- β -CD+SUF), levou a uma menor citotoxicidade, quando comparada à associação entre BVC+SUF, na concentração de 3 mM para a linhagem 3T3 e nas concentrações de 2-4 mM para a linhagem NG97.
- Nos ensaios *in vivo* (bloqueio sensorial), observou-se que a injeção intratecal de BVC:HP- β -CD associada ao SUF, aumentou o limiar de anti-nocicepção dos animais em relação à BVC livre, SUF livre, BVC+SUF e BVC:HP- β -CD, mostrando um aumento na intensidade do bloqueio e duração da analgesia.
- A administração, por via intratecal, das formulações estudadas alterou de maneira concentração-dependente, a função motora dos animais, com perda reversível dos reflexos motores em todos os animais tratados. Os parâmetros avaliados (tempo de recuperação e efeito anestésico total) não diferiram estatisticamente entre os grupos analisados, mostrando que nem a complexação, nem a associação com SUF prolongaram o bloqueio motor, o que é bastante desejável na prática clínica.
- No perfil farmacocinético da BVC, o grupo BVC:HP- β -CD apresentou características de lenta liberação, com baixos níveis plasmáticos, que não foram alterados após a associação ao coadjuvante SUF. Portanto, a BVC:HP- β -CD, associada ou não ao SUF tem liberação modificada, compatível com os resultados de bloqueio sensorial, indicando a potencialidade dessa nova formulação para uso clínico, em procedimentos como anestesia obstétrica.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, F.; Bars, D. L.; Chauvin, M. Guirimand, F. (2001). Effects of intravenous and intrathecal sufentanil on a C-fibre reflex elicited by a wide range of stimulus intensities in the rat. **Eur. J. of Pharmac.** 411:93-106.
- Araújo, 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(5):653-661.
- Araújo, 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. Anesth.** 51:566-572.
- Araújo, D.R.; Braga, A.F.A.; Fraceto, L.F. & de Paula, E. (2005). Sistemas de liberação controlada com bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25): efeitos da complexação com ciclodextrinas no bloqueio do nervo ciático em camundongos. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 55(3):316-327.
- Araújo, D.R.; Braga, A.F.A.; Moraes, C.M.; Fraceto, L.F.; de Paula, E. (2006). Mistura com Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) de Bupivacaína Complexada com Ciclodextrinas e Anestesia por Via Subaracnóidea em Ratos. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 56 (5):495-506.
- Araújo, D. R.; Fraceto, L. F.; de Paula, E. (2008a). Anestésicos locais: Interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Quim. Nova.** 31(7):1775-1783.
- Araujo, D.R.; Tsuneda, S.S.; Cereda, C.M.S.; Carvalho, F.G.F.; Preté, P.S.C.; Fernandes, S.A.; Yokaichiya, F.; Franco, M. K.; Mazzaro, I.; Fraceto, L.F.; Braga, A.F.A.; De Paula, E. (2008b). Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. **Eur. J. Pharmac. Sci.** 33:60-71.
- Alonso, M. J. (2004). Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomed. Pharmacother.** 58:168-172.
- Babich, H.; Borenfreund, E. (1991). Cytotoxicity of T-2 Toxin and Its Metabolites Determined with the Neutral Red Cell Viability Assay. **Applied and Environmental Microbiology.** 57:2101-2103.
- Barash, M.K.; Stok, M.C. (2009). editors, Lippincott Williams & Wilkins: **Clin. Anesth.** 6 ed. Philadelphia:531-548.
- Bekers, O; Uitendaal, E. V.; Beijnen, J, H.; Bult, A.; Underberg, W. J. M. (1991). Cyclodextrins in the pharmaceutical Field. **Drug Develop. Ind. Pharm.** 17:1503-1549.
- Becker, D. E.; Reed, K. L. (2006). Essentials of Local Anesthetic Pharmacology. **Anesth. Prog.** 53:98-109.

- Bibby, D.; Davies, N. M.; Tucker, I. G. (2000). Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **Int. J. Pharmac.** 197:1-11.
- Blanco, M. D.; Bernardo, M. V.; Sastre, R. L.; Olmo, R.; Muniz, E.; Teijón, J. M. (2003). Preparation of bupivacaine-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres by spray drying: drug release studies and biocompatibility. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 55:229-236.
- Boersma, F. P.; Meert, T. F.; Vercauteren, M. (1992). Spinal sulfentanil in rats: part I: epidural versus intrathecal sulfentanil and morphine. **Acta Anesthesiol. Scand.** 36:187-192.
- Bourne, D. W. A. (1995). Mathematical modeling of pharmacokinetic data. **Tec. Pub. Inc**, Lancaster, PA, USA.
- Butterworth, J. F.; Strichartz, G. R. (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. **Anesthesiol.** 72(4):711-34.
- Brewster, M. E.; Loftsson, T. (2007). Cyclodextrin as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** 59(7):645-666.
- Cavalcanti, I. L. Gozzani, J. L.; Sampaio Filho, A. A.; Alves Neto, O.; Garcia, J. B. S. (2004). **Dor pós-operatória**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de anesthesiologia/SBA.
- Carvalho, J. C. A. (1994). Farmacologia dos Anestésicos Locais. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 44(1):75-82.
- Carvalho, F.D. G. (2007). Avaliação biológica de uma pré-formulação de Ropivacaína em Hidroxipropil-beta-ciclodextrina produzida em processo escalonável. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, Universidade de Campinas.
- Cereda, C. M. S.; Araújo, D. R.; Brunetto, G. B.; De Paula, E. (2004). Liposomal Prilocaine: preparation, characterization and in vivo evaluation. **J. Pharmacol. Pharm. Sci.** 7(2):235-240.
- Cereda, C. M. S., Araújo, D. R., Brunetto, G. B.; De Paula, E. (2006). Liposomal formulations of Prilocaine, Lidocaine and Mepivacaine prolong analgesic duration. **Can. J. Anaesth.** 53:1092-1097.
- Chen, S.; Wang, Y. (2001). Study on b-Cyclodextrin Grafting with Chitosan and Slow Release of Its Inclusion Complex with Radioactive Iodine. **J. of Appl. Pol. Sci.** 82:2414-2421.
- Clarkson, C. W.; Hondeghe, L. M. (1985). Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: Fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. **Anesthesiol.** 62:396-405.
- Cuvillon, P.; Nouvellon, E.; Ripart, J.; Boyer, J.C.; Dehour, L.; Mahamat, A.; Hermite, J.; Boisson, C.; Vialles, N.; Lefrant, J.Y.; La Coussaye, J.E. (2009). A Comparison of the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Bupivacaine, Ropivacaine (with Epinephrine) and Their Equal Volume Mixtures with Lidocaine Used for Femoral and Sciatic Nerve Blocks: A Double-Blind Randomized Study. **Anesth. Analg.** 108(2):641-649.
- Davis, M.E.; Brewster, M. E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nat. Rev.** 3:1023-1035.

- Denizot, F.; Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for the cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Meth.** 89:271-277.
- 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. **Bioch. Biophys. Acta** 1240:25-33.
- de Paula, E.; Schreier, S. (1996). Molecular and physicochemical aspects of local anestheticmembrane interaction. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29:877-894.
- de Paula, E.; Schreier, S.; Jarrel H.C., Fraceto, L.F. (2008). Preferential location of lidocaine and etidocaine in lecithin bilayers as determined by EPR, fluorescence and ²H NMR. **Biophys. Chim.** 132(1):47-54.
- de Paula, E.; Cereda, C. M. S.; Tofoli, G. R.; Franz-Montan, M.; Fraceto, L. F.; Araujo D. R. (2010). Drug Delivery Systems for Local Anesthetics. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation.** 4(1):23-34.
- Dietis, N.; Rowbotham, D. J.; Lambert D. G. (2011). Opioid receptor subtypes: fact or artifact? **Br. J. of Anaesth.** 107(1):8-18.
- Dollo, G.; Thompson, D. O.; Le Corre, P.; Chevanne, F.; Le Verge, R. (1998). Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- β -CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. **Int. J. Pharm.** 164:11-19.
- Duarte, D. F. (2005). Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 55(1):135-146.
- Duchêne, D.; Wouessidjewe, D.; Ponchel, G. (1999). Cyclodextrins and carrier systems. **J. Control. Rel.**, Amsterdam. 62:263-268.
- Durán, N.; Mattoso, L. H. C.; Morais, P. C. **Nanotecnol.**, São Paulo: Artliber, 2006.
- Eguchi, M. (2004). Recent Advances in Selective Opioid Receptor Agonists and Antagonists. **Med. Res. Rev.** 24(2):182-212.
- Feldman, H. S.; Covino, B. G. (1988). Comparative motor-blocking effects of bupivacaine and ropivacaine, a new amino amide local anesthetic, in the rat and dog. **Anesth. Analg.** 67:1047-1052.
- Fernandes, C. M.; Ramos, P.; Falcão, A. C.; Veiga, F. J. (2003). Hydrophilic and hydrophobic cyclodextrins in a new sustained release oral formulation of nicardipine: in vitro evaluation and bioavailability studies in rabbits. **J. Control. Rel.** 88(1):127-34.
- Ferreira, P. E. M.; Martini, R. K. (2001). Cocaína: lendas, história e abuso. **Rev. Bras. Psiquiatr.** 23(2):96-99.
- Ferreira M. B. C.; Perla A. S. (2007). Dores crônicas orofaciais. In: Wannmacher L, Ferreira M. B. C. **Farmacol. Clin. Dent.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 231-249.

- Fletcher, D.; Le Corre, P.; Guilbaud, G.; Le Verge, R. (1997). Antinociceptive effect of bupivacaine encapsulated in poly(D,L)-lactide-co-glycolide microspheres in the acute inflammatory pain model of carrageenin-injected rats. **Anesth. Analg.** 84:90-94.
- Fraceto, L. F.; Oyama, S. JR.; Nakaie, C. R.; Spisni, A.; de Paula, E., Pertinhez, T. A. (2006). Interaction of local anesthetics with a peptide encompassing the IV/S4-S5 linker of the Na⁺ channel. **Biophys. Chem.** 20:29-39.
- Franz-Montan, M.; Silva, A. L. R.; Cogo, K.; Bergamaschi, C.; Volpato, M. C.; Ranali, J.; de Paula, E.; Groppo, F. C. (2007). Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia in human oral mucosa. **Anesth. Analg.** 104(6):1528-1531.
- Frazier, D. T.; Narahashi, T.; Yamada, M. (1970). The site of action and active form of local anesthetics. II. Experiments with quaternary compounds. **J. Pharm. Exp. Ther.** 171(1):45-51.
- Friedman, P.M.; Fogelman, J.P.; Nouri, K.; Levine, V.J.; Ashinoff, R. (1999). Comparative study of the efficacy of four topical anesthetics. **Dermatol. Surg.** 25: 950-954.
- Gantenbein, M.; Attolini, L.; Bruguierolle, B. (1996). Potassium channel agonists modify the local anesthetic activity of bupivacaine in mice. **Can. J. Anaesth.** 43:871-876.
- Gantenbein, M.; Abat, C.; Attolini, L.; Pisano, P.; Emperaire, N.; Bruguierolle, B. (1997). Ketamine effects on bupivacaine local anaesthetic activity and pharmacokinetics of bupivacaine. **Life Sci.** 61:2027-2033.
- Gautier, P.; Dekock, M. S.; Steenberge, A. V.; Miclot, D.; Fanerd, L.; Hody, J. H. (1999). A double-blind comparison of 0.125% ropivacaine with sufentanil and 0.125% bupivacaine with sufentanil for epidural labor analgesia. **Anesthesiol.** 90(3):772-778.
- Gillette, M. A.; Mani, D. R.; Carr, S. A. (2005). Place of pattern in proteomic biomarker discovery. **J. Proteom. Res.** 4(4):1143-1154.
- Golembiewski, J. (2007). Local Anesthetics. **J. PeriAnesth. Nur.** 22(4):285-288.
- Gorner, T.; Gref, R.; Michenot, D.; Sommer, F.; Tran, Mn.; Dellacherie, E. (1999). Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix. **J. Control. Rel.** 57:259-268.
- Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, Mc.; Illum, L.; Davis, S. S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **J. Control. Rel.** 57:171-185.
- Gozzani, J. L. (1994). Opióides e Antagonistas. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 44(1):65-73.
- Groban L. (2003). Central nervous system and cardiac effects from long-acting amide local anesthetic toxicity in the intact animal model. **Reg. Anesth. Pain Med.** 28(1):3-11.
- Gutstein, H. B.; Akil, H. Analgésicos opióides. In: Gilman A. G.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E. (2003). editores. Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill:427-464.
- Haas L. F. (1995). Coca shrub (*Erythroxylum coca*). **J. Neurol. Neurosurg. Psych.** 50(1):25.

- Hingson R. A, Edwards W. B. (1943). Continuous caudal analgesia: An analysis of the first ten thousand confinements thus managed with the report of the authors' first thousand cases. **JAMA**. 123:538-546.
- Irie, T.; Uekama, K. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm. Sci.** 86:147-162.
- Knudsen, K.; Suurkula, M. B.; Blomberg. S.; Sjøvall, J.; Edvardsson, N. (1997). Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. **Br. J. Anesth.** 78:507-514.
- Koehler, A.; Oertel, R.; Kirch, W. (2005). Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacaine, prilocaine and ropivacaine in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**. 1088(1-2):126-130.
- 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.
- Lagan, G.; McLure, H. A. (2004). Review of local anaesthetic agents. **Cur. Anesth. & Crit. Care**. 15:247-254.
- Lang, L. J.; Stein, C. (2009). Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Cur. Opin. Pharmacol.** 9:3-8.
- Lee, J. H.; Chung, K. H.; Lee, J. Y.; Chun, D. H.; Yang, H. J.; Ko, T. K.; Yun, W. S. (2011). Comparison of fentanyl and sufentanil added to 0.5% hyperbaric bupivacaine for spinal anesthesia in patients undergoing cesarean section. **Korean. J. Anesthesiol.** 60:103-108.
- Lee, J. K.; Kim, D. B.; Kim, J. I.; Kim, P. Y. (2000). In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. **Toxicol. in Vitro**. 14:345-349.
- Leon-Casasola, O. (2008). Implementing Therapy With Opioids in Patients With Cancer. **Oncol. Nur. Forum**. 35(6):7-12.
- Li, H-L., Galue, A.; Meadows, L.; Ragsdale, D. S. (1999). A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. **Mol. Pharmacol.** 55:134-141.
- Li, H-L; Hadid, D.; Ragsdale, D. S. (2002). The batrachotoxin receptor on the voltage-gated sodium channel is guarded by the channel activation gate. **Mol. Pharmacol.** 61:905-912.
- Lilker, S.; Rofaee, A.; Balki, M; Carvalho, J. C. A. (2009). Comparison of fentanyl and sufentanil as adjuncts to bupivacaine for labor epidural analgesia. **J. Clin. Anesth.** 21:108-112.
- Loftsson, T.; Brewster, M. E. (1997). Cyclodextrin as pharmaceutical excipients. **Pharm. Technol. Eur.** 5:26-34.
- Loftsson, T.; Brewster, M. E. (2011). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. **J. Pharm. Pharmacol.** 63:1119-1135.
- Loftsson, T.; Duchêne, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int. J. Pharm.** 329:1-11.

- Loftsson, T.; Masson, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int. J. Pharm.** 225:15-30.
- Malamed, S. F. (2001). **Manual de anestesia local**. 4.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 rela membrane/partitioning at pH 7.4. **Biophys. Chem.** 110:213-221.
- Matioli, G. (2000). Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. Maringá: Eduem.
- McDonald, J.; Lambert, D. G. (2011). Opioid mechanisms and opioid drugs. **Anaesth. Inten. Care Med.** 12:1.
- McLure, H. A.; Rubin, A. P. (2005). Review of local anaesthetic agents. **Minerva Anesthesiol.** 71:59-74.
- McNicol, E.; Horowicz-Mehler, N.; Fisk, R. A.; Bennett, K.; Gialeli-Goudas, M.; Chew, P. W. (2003). Management of opioid side effects in cancer-related and chronic noncancer pain: A systematic review. **J. Pain.** 4(5):231-256.
- Medzihradzsky, K. (2003). The Chemistry of the Opioid Receptor Binding Sites. **J. Pept. Sci.** 9:333-353.
- Menezes M. S. (2005). Anatomia e Fisiopatologia da dor. In: Manica, J. **Anesthesiol.: Princípios e Técnicas**. 3° ed.Porto Alegre:Ed.Arte Médica.5:1251-57.
- Mercado, P. Weinberg,G. L. (2011). Local Anesthetic Systemic Toxicity: Prevention and Treatment. **Anesthesiol. Clin.** 29:233-242.
- Mestre, C.; Péliissier, T.; Fialip, J.; Wilcox, G.; Eschalier, A. (1994). A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **J. Pharm. Toxic. Meth.** 32:197-200.
- Moraes, C.M.; Abrami, P.; de Paula, E.; Braga, A. F. A.; Fraceto, L. F. (2007a). Study of the interaction between S(-) bupivacaine and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Inter. J. Pharm.** 331:99-106.
- Moraes, C. M.; Abrami, P.; Gonçalves, M. M.; Filho, N. A.; Fernandes, S. A.; de Paula, E.; Fraceto, L. F. (2007b). Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil-beta-ciclodextrina. **Quim. Nova.** 30(4):777-784.
- Moriarty, K. M.; Alagna, S. W.; Lake C. R. (1984). Psychopharmacology. An historical perspective. **Psychiatr. Clin. North Am.** 7(3):411-33.
- Motiani, P.; Chaudhary, S.; Bahl, N.; Sethi, A. K. (2011). Intrathecal sufentanil versus fentanyl for lower limb surgeries – A randomized controlled trial. **J. Anaesth. Clin. Pharmacol.** 27(1):67-73.
- Neal, J. M.; Bernards, C. M.; Butterworth, J. F.; Gregorio, G. D.; Drasner, K.; Hejtmanek, M. R.; Mulroy, M. F.; Rosenquist, R.W.; Weinberg, G. L. (2010). ASRA Practice Advisory on Local Anesthetic Systemic Toxicity. **Reg. Anesth. Pain Med.** 35(2):152-161.

- Oliveira, R.; Santos, D.; Coelho, P. (2009). Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480. 6:70-83.
- Ossipov, M. H.; Dussor, G. O.; Porreca, F. (2010). Central modulation of pain. **J. Clin. Invest.** 120(11):3779-3787.
- 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. Lipos. Res.** 14:51-59.
- Pinto, L. M. A.; Fraceto, L. F.; Santana, M. H. A., Pertinhez, T. A., Oyama, J. R. S., de de Paula, E. (2005). Physico-chemical characterization of Benzocaine-beta-Cyclodextrin inclusion complexes. **J. Pharmac. Biomed. Anal.** 39:956-963.
- Polakovic, M.; Gorner, T.; Gref, R.; Dellacherie, E. (1999). Lidocaine loaded biodegradable nanospheres II. Modelling of drug release. **J. Control. Release.** 60: 169-177.
- Pugsley, M. K. (2002). The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system. **Rev. Pharmacol. Ther.** 93:51-75.
- Ragsdale, D. S.; McPhee, J. C.; Scheuer, R.; Catterall, W. A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. **Sci.** 265(5179):1724-1728.
- Ragsdale, D. S.; McPhee, J. C.; Scheuer, R., Catterall, W. A. (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93:9270-9275.
- Ragsdale, D. S.; Avoli, M. (1998). Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. **Brain Res. Rev.** 26:16-28.
- Rajewski, R. A.; Stella, V. J. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo Drug delivery. **J. Pharm. Sci.** 85:1142-1169.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. (2004). **Farmacol**, 5.ed, Rio de Janeiro: Elsevier.
- Rasheed, A.; Ashok Kumar, C. K.; Sravanthi, V. V.N. S. S. (2008). Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. **Sci Pharm.** 76:567-598.
- Ratajczak-Enselme, M.; Estebe, J. P.; Dollo, G.; Chevanne F.; Bec, D.; Malinovsky, J. M.; Ecoffey, C.; Le Corre, P. (2009). Epidural, intrathecal and plasma pharmacokinetic study of epidural ropivacaine in PLGA-microspheres in sheep model. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 72(1):54-61.
- Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. (1998). **Complexation thermodynamics of cyclodextrins.** 98:1875-1918.
- Ribeiro, A. O. (2004). Estudo da interação entre sistemas luminescentes e α e β - ciclodextrina em solução aquosa. Ribeirão Preto. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.
- Rocha, A. P. C., Lemonica, L.; Barros G. A. M. (2002). Uso de Medicções por Via Subaracnóidea no Tratamento da Dor Crônica. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 52(5):628-643.

- Rosenberg, P. H.; Veering, B. T.; Urmev, W. F. (2004). Maximum recommended doses of local anesthetics: A multifactorial concept. **Reg. Anesth. Pain Med.** 29:564-575.
- Ruetsch, Y. A.; Boni, T.; Borgeat, A. (2001). From Cocaine to Ropivacaine: The History of Local Anesthetic Drugs. **Benth. Sci. Publish.** 1(3):175-182.
- Sakata R. K.; Issy, A. M. (2008). **Fármacos para tratamento da dor.** São Paulo: ed. Malone:45-77.
- Satoh, H.; Minami, M. (1995). Molecular pharmacology of the opioid receptors. **Pharmacol. Ther.** 68:343-364.
- Simonetti, M. P. B.; Andrade, M. P. (1996). Anestésicos locais e opióides encapsulados em lipossoma: um avanço farmacotécnico em progresso. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 46:35-42.
- Smith, H. S., Deer, T. R., Staats, P. S., Singh, V., Sehgal, N., Cordner, H. (2008). Intrathecal Drug Delivery. **Pain Physician.** 11:89-104.
- Stella, V. J.; He, Q. (2008). Cyclodextrins. **Toxicologic. Pathology.** 36:30-42.
- Strichartz, G. R. (1987). Local anesthetics. Germany: **Springer-Verlag Berlin Heidelberg.**
- Sugimoto M, Uchida I, Fukami S, Takenoshita, M.; Mashimo, T.; Yoshiya, I. (2000). The alpha and gamma subunit-dependent effects of local anesthetics on recombinant GABA receptors. **Eur. J. Pharmacol.** 401:329-337.
- Tofoli, G. R. Cereda, C. M. S.; Araujo D. R.; de Paula, E.; Junior, R. B.B.; Junior, J. P.; Meurer, E.; Barros, F. A. P.; Groppo, F. C.; Volpato, M. C.; Ranali J. (2010). Pharmacokinetic and local toxicity studies of liposome-encapsulated and plain mepivacaine solutions in rats. **Drug Delivery.** 17(2):68-76.
- Trescot, A. M.; Datta, S.; Lee, M.; Hansen, H. (2008). Opioid Pharmacology. **Pain Physician.** 11:133-153.
- Tsuchiya, H.; Ueno, T.; Mizogami, M.; Takakura, K. (2010). Local anesthetics structure-dependently interact with anionic phospholipid membranes to modify the fluidity. **Chem. Biol. Interact.** 183(1):19-24.
- Ullman, M. D.; Bowers, L. D.; Burtis, C. A. (1998). Cromatografia. In: Burtis, C. A.; Ashwood, E. R. **Fundamentos de química clínica.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 8:103-120.
- Vale, N. B. (1998). Sesquicentenário da Anestesia Obstétrica. **Rev. Bras. Anesthesiol.** 48(5):424-440.
- Vallejo, R.; Barkin, R. L.; Wang, V. C. (2011). Pharmacology of Opioids in the Treatment of Chronic Pain Syndromes. **Pain Physician.** 14:343-360.
- Van de Velde, M.; Dreelinck R.; Dubois, J.; Kumar, A.; Deprest, J.; Lewi, L.; Vandermeersch, E. (2007). Determination of the Full Dose-Response Relation of Intrathecal Bupivacaine, Levobupivacaine, and Ropivacaine, Combined with Sufentanil, for Labor Analgesia. **Anesthesiol.** 106:149-156.
- Veiga, F; Pecorelli, C; Ribeiro, L. (2006). **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica.** Minerva Coimbra.

- Vercauteren, M.; Meert, T. F.; Boersma F.; Melis. W.; Adriaensen, H. (1992). Spinal sufentanil in rats: parts II: effect of adding bupivacaine to epidural sufentanil. **Acta Anaesthesiol. Scand.** 36:245-249.
- Vercauteren, M. P.; Hans, G.; De Decker, K.; Adriaensen, H. A. (2001). Levobupivacaine combined with sufentanil and epinephrine for intrathecal labor analgesia: A comparison with racemic bupivacaine. **Anesth. Analg.** 93:996-1000.
- Volobuef, C.; Moraes, C. M.; Nunes, L. A. S.; Cereda, C. M. S.; Fraceto, L. F.; Braga, A. F. A.; de Paula, E.; Araújo, D. R. (2009). Sufentanil-2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex For Pain Treatment: Characterization, Toxicity and Pharmacological Evaluation. **36th Annual Meeting & Exposition of the Control. Rel. Soc. (CRS)**, July 18 - 22, Copenhagen, Denmark.).
- Weiniger, C. F.; Golovanevski, M., Sokolsky-Papkov, M., Domb, A.J. (2010). Review of prolonged local anesthetic action. **Expert Opin. Drug Deliv.** 7(6):737-752.
- Welder, A. A. (1992). A primary culture system of adult rat heart cells for the evaluation of cocaine toxicity. **Toxicol.** 72:175-187.
- Welliver, M. McDnough J. P. (2007). Anesthetic related advances with cyclodextrins. **J. Sci. World.** 7:364-371.
- Wong, C.A.; Scavone, B. M.; Loffredi, M. (2000). The dose-response of intrathecal sufentanil added to bupivacaine for labor analgesia. **Anesthesiolog.** 92:1553-1558.
- Wong, C. A. (2009). Advances in labor analgesia. **J. of Women's Health.** 1:139-154.
- Woolf. C. J. (2010). What is this thing called pain? **J. Clin. Invest.** 120(11):3742-3744.
- Yagiela, J.A.; Neidle, E.A.; Dowd, F.J. (2000). **Farmacologia e terapêutica para dentistas.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Yamaguchi, E. T.; Carvalho, J. C. A.; Fonseca, U. S.; Hirahara, J. T.; Cardoso M. M. S. C. (2004). Sufentanil Subaracnóideo Associado à Bupivacaína Hiperbárica para Analgesia de Parto: É Possível Reduzir a Dose do Opióide? **Rev. Bras. Anesthesiol.** 54(2):145-152.

VII. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

1. Resumos Publicados em Anais de Congresso

- Queiroz, V. A.;** Araújo, D. R.; Cereda, C. M. S.; de Paula, E. Evaluation of the analgesic effect of bupivacaine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in association to sufentanil, after intrathecal administration in rats. In: XLII Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- Queiroz, V. A.;** Araújo, D. R.; Cereda, C. M. S.; de Paula, E. Efeito analgésico da associação do sufentanil ao complexo bupivacaína hidroxipropil-beta-ciclodextrina em ratos. II Workshop Temático - Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de Ação Prolongada: do Desenvolvimento ao Teste Clínico Odontológico, 2010. Campinas-SP.
- Queiroz, V. A.;** Guerreiro, T. M.; Scarelli, C.; de Paula, E.; Cereda, C. M. S. Avaliação da atividade analgésica dos anestésicos locais oxibuprocaina e proparacaína encapsulados em lipossomas. In: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), 2010, Águas de Lindóia - SP. Anais da XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), 2010.
- Souza, T. F.; Guerreiro, T. M.; **Queiroz, V. A.;** Cereda, C. M. S.; de Paula, E. Liposomal articaine: in vitro toxicity tests and in vivo evaluation of the analgesic effect. In: XXXIX Reunião anual da SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. Anais da XXXIX Reunião anual da SBBq, 2010.
- Scarelli, C.; **Queiroz, V. A.;** Guerreiro, T. M.; Cereda, C. M. S.; de Paula, E. Formulações Lipossomais para Oxibuprocaina e Proparacaína: Preparo e Caracterização. In: II Workshop Temático - Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de Ação Prolongada: do Desenvolvimento ao Teste Clínico Odontológico, 2010. Campinas-SP.
- Souza, T. F.; **Queiroz, V. A.;** Cereda, C. M. S.; de Paula, E. preparo e caracterização de uma formulação de liberação sustentada para articaína. II Workshop Temático - Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de Ação Prolongada: do Desenvolvimento ao Teste Clínico Odontológico, 2010. Campinas-SP.
- Scarelli, C.; **Queiroz, V. A.;** Guerreiro, T. M.; Cereda, C. M. S.; de Paula, E. Liposomal formulations for local anesthetics of ophthalmic interest. In: international liposome research days & lipids, liposomes & membrane biophysics, 2010, Vancouver - BC. International Liposome Research Days & Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics, 2010.
- Queiroz, V. A.;** Araújo, D. R.; Cereda, C. M. S.; de Paula, E. Evaluation of the analgesic effect of bupivacaine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in association to sufentanil, after intrathecal administration in rats. In: 1ª Workshop do Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular (BFM), 2011. Campinas-SP.
- Queiroz, V. A.;** Araújo, D. R.; Cereda, C. M. S.; de Paula, E. Avaliação da Citotoxicidade e da Atividade Analgésica do Complexo Bupivacaína Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina em

- Associação com Sufentanil. In: III Workshop Temático - Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de Ação Prolongada: do Desenvolvimento ao Teste Clínico Odontológico, 2011. Campinas-SP.
- Stoco, S. M.; Grillo, R.; Lancellotti, M.; **Queiroz, V. A.**; Fraceto, L. F.; de Paula, E. Araujo, D. R. Ropivacaine encapsulated in nanoparticles alginate-chitosan for topical anesthesia. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2011, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Stoco, S. M.; Grillo, R.; **Queiroz, V. A.**; Mello, N. F. S.; Fraceto, L. F.; Lancellotti, M.; de Paula, E.; Araújo, D.R. Ropivacaine for dermal anesthesia: permeation studies, cytotoxic effects and pharmacological evaluation. In: I Workshop do Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular (BFM), 2011. Campinas-SP.
- Stoco, S. M.; Grillo, R.; **Queiroz, V. A.**; Melo, N. F. S.; Fraceto, L. F.; Lancellotti, M.; de Paula, E.; Araújo, D. R. Géis de Ropivacaína Associada a Promotores de Absorção ou Encapsulada em Nanopartículas de Alginato-Quitosana para Anestesia Tópica. In: III Workshop Temático - Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de Ação Prolongada: do Desenvolvimento ao Teste Clínico Odontológico, 2011. Campinas-SP.
- Papini, J. Z. B.; **Queiroz, V. A.**; Cereda, C. M. S.; de Paula, E.; Araújo, D. R.; Tófoli, G. R. Avaliação da Atividade Anestésica E Da Toxicidade Local De Formulações De Ropivacaína. In: III Workshop Temático - Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de Ação Prolongada: do Desenvolvimento ao Teste Clínico Odontológico, 2011. Campinas-SP.
- Barbosa, R. M.; **Queiroz, V. A.**; Marcato, P.; Durán, N.; Araújo, D. R.; de Paula, E. Evaluation of Dibucaine-Loaded Cetyl Palmitate Lipid Nanosystems for Prolonged Drug Delivery. In: 8th International Congress of Pharmaceutical sciences, 2011. Ribeirão Preto-SP.

2. Formação complementar

Escola de Nanoestruturas em Interfaces Biológicas: Métodos e Aplicações. Curso promovido pelo Centro Brasileiro-Argentino de Nanotecnologia CBAN-CABNN. 12-16 de julho de 2010, 60 h. Rio de Janeiro-RJ.

CEMIB: 30 Anos de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Ciência de Animais de Laboratório. Workshop realizado pelo CEMIB - UNICAMP. 18-19 de março de 2009. Campinas-SP.

3. Atividades didáticas

Programa de estágio docente – PED, (grupo C), no segundo período letivo de 2010, com dedicação de 08 horas semanais, nas atividades da disciplina BS210-A – Morfofisiologia Humana II, sob a supervisão da Professora Doutora Eneida de Paula – IB -UNICAMP.

Programa de estágio docente – PED, (grupo C), no primeiro período letivo de 2011, com dedicação de 04 horas semanais, nas atividades da disciplina BB123-A – Bioquímica Básica, sob a supervisão da Professora Doutora Eneida de Paula – IB -UNICAMP.

VIII. ANEXOS

1:



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1957-1, sobre "Avaliação das atividades citotóxica e anestésica da bupivacaína complexada com hidroxipropil-beta ciclodextrina, em associações com sufentanil, clonidina ou cetoprofeno", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula / Dra. Cíntia Maria Saia Cereda / Viviane Aparecida Queiroz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 05 de outubro de 2009.

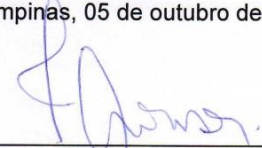
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1957-1, entitled "Evaluation of the cytotoxicity and anesthetic activity of a bupivacaine-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in association with sufentanil, clonidine or ketoprofen", 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 October 5, 2009.

Campinas, 05 de outubro de 2009.



Prof. Dr. Stephen Hyslop
Vice-Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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

2:



UNIVERSIDADE
SÃO FRANCISCO

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Bragança Paulista, 24 de Novembro de 2011.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOCINÉTICA DA BUPIVACAÍNA COMPLEXADA COM HIDROXIPROPIL-BETA-CICLODEXTRINA, EM ASSOCIAÇÃO COM O SUFENTANIL.

ÁREA DE CONHECIMENTO: Farmacologia

Autor(es): Prof(a). Dr (a). Giovana Tofoli

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 001.11.11

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária dia **24/11/2011** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Carlos Augusto Real Martinez
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Ars CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036