



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



## **CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Cláudia Lopes Brilhante Bhering

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Cristina Volpato

Ano de Conclusão do Curso: 2010

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

Assinatura do(a) Orientador(a)

Cláudia Lopes Brilhante Bhering

**“EFICÁCIA ANESTÉSICA DA PREPARAÇÃO  
LIPOSSOMAL DE ROPIVACAÍNA EM BLOQUEIO DO  
NERVO ALVEOLAR INFERIOR EM RATOS”**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Odontologia da  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba –  
UNICAMP, para obtenção do Diploma de  
Cirurgião Dentista.

Orientadora: Maria Cristina Volpato

**Piracicaba – 2010**

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

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª. / 8099

B469e	<p>Bhering, Cláudia Lopes Brilhante. Eficácia anestésica da preparação lipossomal de ropivacaína em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos / Cláudia Lopes Brilhante Bhering. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. 38f. : il.</p> <p>Orientador: Maria Cristina Volpato. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Lipossomas. 2. Anestesia local. I. Volpato, Maria Cristina. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p>(eras/fop)</p>
-------	--

Dedico este trabalho aos meus pais Cláudio e Cremilda Brilhante, aos meus irmãos Ricardo e Nathália Brilhante, às minhas Tias Heloísa e Eliana Brilhante e ao meu namorado Rodrigo Cabral Adriano; pela força, apoio, carinho, confiança, e por terem me acompanhando ao longo desta trajetória.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pelo conforto nos momentos difíceis e por me acompanhar ao longo desta caminhada, colocando-me sempre a disposição de aprender e me dando forças para concretizar esta trajetória.

Aos meus pais Cláudio e Cremilda Brilhante pelo amor, apoio, carinho, dedicação e incentivo; por acreditarem em mim, estarem sempre ao meu lado e por não medirem esforços para realização deste sonho.

Aos meus irmãos Ricardo e Nathália Brilhante pelo incentivo, carinho, companheirismo e compreensão.

À toda minha família, em especial, às minhas Tias Heloísa e Eliana Brilhante, pela confiança e apoio, permitindo a concretização desta trajetória.

Ao meu namorado, Rodrigo Cabral Adriano, pelo amor, incentivo, companheirismo, e principalmente, pela compreensão e paciência, necessários nesta etapa da minha vida.

À orientadora deste estudo, Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, pelos ensinamentos necessários para condução do presente estudo, pelo apoio e compreensão, pelos conselhos, e sobre tudo pela amizade. Obrigada por tudo, especialmente por confiar em mim e por ter se tornado uma grande amiga.

À Equipe necessária para a realização do presente estudo: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Profa. Dra. Eneida de Paula; e às alunas de pós-graduação, Daniela Baroni e Patrícia Zago; obrigada pela ajuda que me deram para a execução das etapas deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica (Processos 2006/00121-9; 2008/09079-0), indispensável para realização deste projeto.

Aos meus colegas de turma pela convivência nesses quatro anos, carinho e companheirismo, em especial, à Julia, Maila, Juliana Mayumi, Nathalia, Flávia, Ingrid, Letícia, Débora Zaidan, Thamiris Orrico, Thawanne, Renata Furini, Eveline, Caio e Hugo que foram a minha segunda família durante esta etapa da minha vida.

## RESUMO

Este estudo avaliou a eficácia anestésica de três formulações de ropivacaína, em modelo de bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos. Trinta ratos Wistar adultos jovens, divididos aleatoriamente em 3 grupos (10 animais/grupo), receberam injeção de 0,2mL, para bloqueio do nervo alveolar inferior, de uma das seguintes formulações: ropivacaína lipossomal 0,5%; ropivacaína 0,5% e ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000. Os lados contra-laterais receberam solução de NaCl 0,9% (controle). Previamente à injeção, os animais foram anestesiados com ketamina (90mg/kg) e xilazina (Rompun, 10mg/kg), sendo fixados fios de cobre aos molares inferiores de ambos os lados, para permitir a aplicação dos estímulos elétricos (“pulp tester”) e avaliação da anestesia. Após sedação dos animais com diazepam (20mg/kg) e estando os mesmos responsivos a estímulos dolorosos, as formulações foram aplicadas. Dois minutos após a injeção foi iniciada a aplicação dos estímulos elétricos para avaliação dos parâmetros da anestesia. Os resultados foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis (latência e duração da anestesia) e Log-Rank (sucesso da anestesia) com nível de significância 5%. A formulação lipossomal não diferiu da solução de ropivacaína sem aditivos para todos os parâmetros analisados ( $p > 0,05$ ). A solução de ropivacaína com epinefrina apresentou maior sucesso e duração da anestesia que as demais formulações ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre as formulações com relação à latência da anestesia ( $p > 0,05$ ). Dentro das condições deste estudo, concluiu-se que a encapsulação da ropivacaína em lipossomas não aumenta sua eficácia na anestesia pulpar e que ropivacaína associada à epinefrina

apresenta maior taxa de sucesso e duração de anestesia pulpar que as formulações lipossomal e sem aditivos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lipossoma; Ropivacaína; Anestesia local; Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior.

## ABSTRACT

This study evaluated the anesthetic efficacy of three ropivacaine formulations in a model of inferior alveolar nerve (IAN) block in rats. Thirty adult male Wistar rats randomly divided into three groups (10 animals/group), received a 0,2mL injection of of the following formulations as an IAN block: 0.5% lipossomal ropivacaine, 0.5% ropivacaine and 0.5% ropivacaine with 1:200,000 epinephrine. The contralateral side received the same volume of 0.9% NaCl solution (control). Before the IAN block, the animals were anesthetized with ketamine (90mg/kg) and xilazine (10mg/kg), and a copper wire was fixed to the madibular molars of both sides, to allow the application of eletrical stimuli (“pulp tester”) and evaluation of the anesthesia. After sedation with diazepam (20mg/kg) and being the animals responsive to painfull stimuli, the formulations were injected. Two minutes after the injection electric stimulus were applied to the teeth to evaluate anesthesia parameters. The results were submitted to the Kruskal-Wallis (onset and duration of anesthesia) and Log-Rank tests (anesthesia sucess) with 5% significance level. The lipossomal formulation did not differ from the ropivacaine solution without addtives for all the evaluated parameters ( $p>0.05$ ). Ropivacaine with epinephrine showed higher sucess and duration of anesthesia than the other formulations ( $p<0.05$ ). There was no difference among the formulations regarding onset of anesthesia ( $p>0.05$ ). Within the conditions of this study, it can be concluded that lipossome encapsulation of ropivacaine did not increase its efficacy in pulpal anesthesia and that ropivacaine associated with epinephrine shows higher sucess rate and duration of pulpal anesthesia than the liposomal ropivacaine and plain ropivacaine formulations.

**KEYWORDS:** Liposome; Ropivacaine, Local Anesthesia; Inferior Alveolar Nerve Block

# SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. PROPOSIÇÃO.....	5
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
4.1 Animais.....	6
4.2. Material.....	7
4.2.1. Preparação da suspensão lipossomal.....	7
4.2.2. Preparação das soluções de ropivacaína 0,5% e ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000.....	8
4.3. Procedimento experimental.....	9
4.3.1. Técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior (NAI).....	11
4.3.2. Avaliação das anestésias.....	11
4.4. Análise estatística.....	13
5. RESULTADOS.....	14
6. DISCUSSÃO.....	17
7. CONCLUSÕES.....	21
8. REFERÊNCIAS .....	22
9. ANEXO.....	27

# 1. INTRODUÇÃO

A necessidade de formulações anestésicas locais mais seguras tem levado a vários estudos, enfocando a própria molécula do anestésico local e ainda os aditivos associados, visando o aumento da eficácia anestésica e diminuição da toxicidade.

Dentre os aditivos, os mais estudados são os lipossomas e as ciclodextrinas. Os lipossomas são conhecidos desde a década de 1960 e o interesse pelos mesmos tem aumentado, inclusive com a publicação de trabalhos avaliando formulações lipossomais anestésicas em odontologia. Tem sido relatado que a encapsulação em lipossomas pode aumentar a eficácia anestésica e diminuir a toxicidade dos sais anestésicos.

Dentre os sais anestésicos de duração longa, a ropivacaína é apontada como o menos tóxico, em decorrência de ser um isômero levógiro puro. Embora não esteja ainda disponível para uso odontológico, as características favoráveis da ropivacaína, associadas aos bons resultados obtidos com formulações lipossomais em trabalhos anteriores, motivou o presente estudo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os anestésicos locais têm ampla aplicação na clínica médica e odontológica, uma vez que são as substâncias mais utilizadas para o controle efetivo da dor. Podem ser definidos como agentes farmacológicos com a propriedade de produzir uma interrupção reversível na condução de estímulos nervosos por se ligarem a sítios específicos dos canais de sódio voltagem-dependentes, impedindo o influxo do referido íon.

Apesar da baixa toxicidade relatada na literatura em relação ao uso odontológico de anestésicos locais em adultos, o aumento da necessidade de tratamento odontológico de pacientes portadores de doenças crônicas, especialmente as que acometem o sistema cardiovascular, torna importante a busca de soluções anestésicas que apresentem menor toxicidade, mantendo a mesma eficácia.

A ropivacaína, anestésico local de longa duração de ação do grupo das amidas e comercializado na forma de isômero levógiro puro, possui características peculiares, como menor potencial de acúmulo tecidual e meia vida plasmática, alto índice terapêutico (Delfino *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Ramacciato & Meechan, 2006) e menor efeito tóxico aos sistemas nervoso central e cardiovascular (McClure, 1996; Nancarrow *et al.*, 1989; Feldman *et al.*, 1989), comparada à bupivacaína.

Estudos comparando a ropivacaína tópica à lidocaína mostram que a primeira apresentou boa eficácia e segurança, promovendo perda de sensibilidade à dor por tempo suficiente em cirurgia de catarata, sem que houvesse necessidade de anestesia complementar na maioria dos casos

(Martini *et al.*, 2002). Mesmo ainda não estando disponível no mercado para o uso odontológico, dados na literatura mostram que a ropivacaína na concentração de 0,5% associada à epinefrina 1:200.000 tem se mostrado efetiva quando em anestesia infiltrativa na maxila (Kennedy *et al.*, 2001). Axelsson & Isacsson, em 2004, verificaram que a ropivacaína na concentração de 0,75% também se mostrou efetiva para anestesia infiltrativa na maxila bem como para anestesia do nervo alveolar inferior, apresentando latência rápida e longa duração de ação.

Visando diminuir os possíveis efeitos tóxicos gerados por anestésicos locais e outros fármacos, bem como prolongar o efeito destes, novos métodos de introdução de drogas no organismo têm sido pesquisados. Dentre estes, ressalta-se a encapsulação de substâncias em lipossomas, vesículas de 50nm a 1000nm de diâmetro, formadas pela interação de lipídeos suspensos em uma fase aquosa (Banerjee, 2001; Grant, 2002). Estas vesículas são classificadas como uni ou multilamelares de acordo com a presença de uma ou mais bicamadas lipídicas (Grant, 2002).

A liberação prolongada promovida pelas formulações lipossomais permite um aumento do efeito do anestésico local, pois o mesmo pode permanecer em concentração efetiva no local de ação por tempo maior. Em decorrência, a absorção para a corrente sanguínea é mais lenta, resultando em níveis plasmáticos menores e, conseqüentemente, em menor toxicidade aos sistemas nervoso central e cardiovascular (Boogaerts *et al.*, 1993 a,b; Boogaerts *et al.*, 1994; Mowat *et al.*, 1996; de Araujo *et al.*, 2003). Ressalta-se, ainda, o fato de que os lipossomas são biocompatíveis, biodegradáveis e têm reduzido risco de toxicidade, antigenicidade, imunogenicidade e lesões

histológicas, especialmente por seus monômeros constituintes (fosfatidilcolina e colesterol) serem semelhantes aos das membranas biológicas (Malinovsky *et al.*, 1997; Grant, 2002).

Cinco estudos são relatados na literatura sobre a eficácia uso de anestésicos encapsulados em lipossomas, em humanos, para uso odontológico (Franz-Montan *et al.*, 2007; Franz-Montan *et al.*, 2009; Franz-Montan *et al.*, 2010; Tófoli *et al.*, 2010; Zago *et al.*, 2010). Destes, dois avaliaram uso tópico, mostrando o aumento da eficácia da ropivacaína (Franz-Montan *et al.*, 2007) e da benzocaína (Franz-Montan *et al.*, 2010) em formulação lipossomal. Os demais estudos avaliaram a eficácia de formulações lipossomais de mepivacaína (Tófoli *et al.*, 2010), de ropivacaína (Franz-Montan *et al.*, 2009), e de prilocaína (Zago *et al.*, 2010) em infiltração na maxila.

No primeiro foi observado aumento da eficácia anestésica da mepivacaína lipossomal em comparação à formulação sem vasoconstritor (Tófoli *et al.*, 2010). A encapsulação de ropivacaína (Franz-Montan *et al.*, 2009) e de prilocaína (Zago *et al.*, 2010), entretanto, não mostraram vantagem em relação às formulações associadas a vasoconstritor (respectivamente, epinefrina e felipressina) e nem em relação às soluções sem aditivos. Pode haver, portanto, respostas diferentes para os vários sais anestésicos, sendo ainda possível a existência de diferença entre infiltração e bloqueio. Essa possibilidade motivou a realização deste estudo pré-clínico, em animais.

### **3. PROPOSIÇÃO**

O presente estudo teve como objetivo avaliar, comparativamente, a eficácia de três preparações anestésicas locais de ropivacaína:

- Ropivacaína 0,5% lipossomal;
- Ropivacaína 0,5%;
- Ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP sob nº 1598-1 (**ANEXO 1**). Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos, machos, provenientes do CEMIB-UNICAMP, os quais permaneceram em ambiente com temperatura controlada, ciclos claro-escuro de 12/12h e com água e comida *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos com 10 animais cada, os quais receberam, injeção de 0,2mL (técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior -NAI- descrita no item 4.3.1) no lado direito, de uma das seguintes preparações anestésicas:

- preparação lipossomal de ropivacaína 0,5%;
- solução de ropivacaína 0,5%;
- solução de ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000.

O lado contra-lateral (esquerdo) recebeu injeção de 0,2mL de NaCl 0,9% no mesmo local (próximo ao forame mandibular), funcionando como controle negativo. As injeções foram realizadas por um único pesquisador e as avaliações da anestesia por outro pesquisador, cego quanto às soluções injetadas. Previamente às injeções, os animais foram levemente sedados com diazepam, procedimento este que não interferia na resposta do animal ao estímulo a ser usado.

## **4.2. MATERIAL**

Para a realização deste estudo foram utilizadas as seguintes preparações: solução comercial de ropivacaína 1% (Naropin®, Astra-Zeneca do Brasil Ltda), solução comercial de epinefrina 1mg/ml (Drenalin®, Ariston Ind. Quím. Farm. Ltda.), solução de NaCl 0,9% estéril (Equiplex Ind. Farm., Brasil) e suspensão lipossomal de ropivacaína 0,5%. A preparação das formulações está descrita nos itens 4.2.1 e 4.2.2. Foram utilizados na formulação da suspensão lipossomal de ropivacaina: cloridrato de ropivacaína (DFL Ind. Com. Ltda), acetato de  $\alpha$ -tocoferol, fosfatidilcolina de ovo, colesterol (Sigma Chem. Co.) e tampão HEPES 20mM com NaCl 0,9% (Q-biogene). Para a anestesia geral dos animais foram utilizados ketamina (Dopalen®) e xilazina (Rompun®), injetados via intramuscular e para sedação foi utilizado diazepam (Valium® injetável 10mg/2mL, Roche, Quim. Farm. SA) injetado via intraperitoneal.

Foram utilizadas seringas centesimais de 1mL (BD®) acopladas a agulhas descartáveis de 1 polegada (BD 30G) e 13 X 4,5 (BD PrecisionGlide® - 26G – 1/2”), respectivamente para a injeção das preparações anestésicas e de xilazina / ketamina.

A avaliação da anestesia pulpar foi realizada pelo aparelho “pulp tester” (Vitality Scanner modelo 2006 - Analytic Technology, Redmond, EUA).

### **4.2.1. Preparação da suspensão lipossomal**

A suspensão lipossomal foi preparada no laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob orientação da Profa. Dra. Eneida de Paula. Vesículas multilamelares foram preparadas pelo método de hidratação de filme seco retirando-se alíquotas de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e  $\alpha$ -

tocoferol (na proporção molar de 4:3:0,07) de uma solução estoque em clorofórmio e evaporando-se sob fluxo de N<sub>2</sub> seguido de vácuo por 2h, à temperatura ambiente (Boogaerts *et al.*, 1993 a,b; Fraceto *et al.*, 2002). Após a secagem foi adicionado o tampão HEPES 20mM, pH 7,4 com NaCl 154 mM, e a dispersão foi agitada por 5 minutos em vórtex, passando a apresentar vesículas multilamelares concêntricas, separadas por cavidades aquosas.

A seguir, as vesículas lipossomais unilamelares de 0,4µm foram preparadas por extrusão das vesículas multilamelares acima descritas (Extrusor Lipex Biomembranes Inc.). Assim, sob pressão de nitrogênio, à temperatura ambiente, a amostra de vesículas multilamelares foi injetada através de um disco de drenagem e duas membranas de policarbonato (Poretics) com poros de tamanho pré-determinado (0,4µm), por 12 vezes. Os lipossomas foram então mantidos em repouso por 2h, para o intumescimento das vesículas. A concentração lipídica dos lipossomas foi de 4mM.

Após a preparação das vesículas foi incorporado o anestésico local cloridrato de ropivacaína para a concentração de 0,5%. A formulação foi preparada em câmara de fluxo laminar (com materiais e soluções autoclavados a 1 atm e 121°C, por 20 min.) e após o preparo foi esterilizada em autoclave (Cereda *et al.*, 2006).

#### **4.2.2. Preparação das soluções de ropivacaína 0,5% e ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000**

Em virtude de a apresentação de ropivacaína comercial ser na forma de frasco ampola e haver diferença de concentração e composição entre esta e as

soluções propostas no estudo, as mesmas foram preparadas a partir da ropivacaína comercial.

As soluções de ropivacaína 0,5% e ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 foram preparadas imediatamente antes do uso, não sendo guardadas para uso posterior.

#### 4.2.2.1 *Solução de ropivacaína 0,5%*

Em frasco estéril foram adicionados 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril à 5mL de ropivacaina 1% (Naropin®), atingindo com isso, uma concentração de 0,5% do sal anestésico (ropivacaína).

#### 4.2.2.2 *Solução de ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000*

Em frasco estéril foram adicionados 4,95 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril e 0,05 mL de epinefrina 1:1000 (Drenalin®) à 5mL de ropivacaina 1% (Naropin®), atingindo com isso, uma concentração de 0,5% do sal anestésico (ropivacaína) e de 1:200.000 para a epinefrina.

Previamente às injeções anestésicas, os pHs das soluções anestésicas e da suspensão anestésica lipossomal foram aferidos através de pHmetro (ORION®, modelo 290<sup>a</sup>) acoplado a um micro-eletrodo (LAZAR BNC), para controle. As condições de análise do pH foram estabelecidas através de validação com soluções tampão Merck® (Merck S.A. Indústrias Químicas) com pH 4,0 e 7,0.

### **4.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

A fim de permitir a aplicação de estímulo elétrico aos dentes dos animais e assim avaliar as preparações anestésicas, foram fixados 2 fios de cobre (um de cada lado) na superfície oclusal dos molares inferiores dos animais, com

resina fotopolimerizável. Esse procedimento foi realizado sob anestesia geral com xilazina (10mg/kg) e Ketamina (90mg/kg) administrados por via intramuscular.

Após retorno da anestesia geral os animais foram sedados com diazepam (20mg/kg) por via intraperitoneal, mantendo reação a estímulos dolorosos (preensão da cauda) para permitir avaliação da percepção de dor ao estímulo elétrico aplicado ao dente. Este procedimento de sedação permite avaliação do animal por um período de 90 minutos, necessário para avaliação de anestésicos com tempo de duração maior, como é o caso da ropivacaína.

Uma vez constatada sedação do animal e resposta à preensão da cauda, os molares de cada lado foram testados por meio da aplicação do estímulo elétrico (com uso do aparelho “pulp tester”, descrição a seguir) na extremidade do fio externa à cavidade oral do animal. Esta medida foi considerada como sendo o limiar basal de cada lado do animal (média de três medições de cada lado). Em seguida foram aplicados 0,2 mL de uma das preparações anestésicas, no lado direito, próximo ao forame mandibular dos animais para bloqueio do Nervo Alveolar Inferior (NAI). O lado oposto recebeu o mesmo volume de solução de cloreto de sódio 0,9% (controle negativo). Imediatamente após o final da injeção, os estímulos elétricos foram aplicados a cada 2 minutos durante os primeiros 15 minutos, para estabelecer o tempo de latência das preparações. Os animais que apresentaram resposta aversiva ao estímulo elétrico (movimentação) após esse período, no lado em que foi injetada preparação anestésica, foram considerados como insucesso da anestesia. Os animais que apresentaram ausência de resposta aversiva continuaram a receber aplicação de estímulo elétrico a cada 5 minutos até a

observação de resposta aversiva do animal no lado direito (lado teste) ou até o período de 90 minutos (tempo de duração da sedação). A escolha do tempo de 2 minutos para avaliação da latência deve-se ao período refratário que a fibra nervosa apresenta após um estímulo, o que não permite que o teste elétrico seja feito de forma ininterrupta.

#### **4.3.1. Técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior (NAI)**

Neste estudo foi utilizada a técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior desenvolvida por Silva (2009). Esta técnica consiste na introdução de cerca de 13mm de uma agulha 13x4,5 pela face interna da mandíbula, na região do ângulo mandibular, formando um ângulo de 90° com a base da mandíbula, como mostrado na Figura 1. A agulha é introduzida tangenciando o ramo mandibular até a posição final de injeção, próximo ao forame mandibular, onde a solução é depositada.



Figura 1. Posição da agulha durante o bloqueio do NAI no rato.

#### **4.3.2. Avaliação das anestésias**

Foram avaliados os parâmetros latência, duração e grau de sucesso da anestesia por meio da aplicação de estímulo elétrico aos dentes (“pulp tester”).

O “pulp tester” é composto por uma unidade de produção de corrente elétrica e por um eletrodo, que a transmite ao dente. Ao aplicar o eletrodo sobre a coroa dental, a corrente liberada vence a resistência do esmalte e dentina, estimulando as fibras sensoriais mielinizadas de condução rápida na junção dentina-polpa e estimulando as fibras sensoriais pulpares (Certosimo & Archer, 1996), causando uma sensação descrita por voluntários como formigamento, pulsação, vibração ou dor (Cooley *et al.*, 1984). O limiar de estimulação é dado pela intensidade da corrente elétrica emitida, que é aumentada gradualmente e de forma automática pelo aparelho até o paciente perceber o estímulo (Chambers, 1982). Neste momento o eletrodo é retirado do contato com o dente. Em estudos com animais a percepção do estímulo (dor) é caracterizada por movimento corporal do animal, sendo então desconectado o eletrodo do fio de cobre acoplado ao dente do animal (Silva, 2009).

Os parâmetros latência, duração e sucesso da anestesia foram assim considerados:

- Tempo de latência (TL): intervalo de tempo entre o final da injeção da solução anestésica e o início de ausência de resposta ao teste elétrico.
- Duração da anestesia (DA): período de tempo compreendido entre o início da anestesia e o tempo imediatamente anterior ao de obtenção de duas respostas aversivas consecutivas, ou seja, intervalo de tempo no qual o animal não apresentava resposta ao estímulo máximo.

- Sucesso da anestesia: considerado quando o animal apresentava latência de até 15 minutos e duração de anestesia de pelo menos 10 minutos (quando o animal não apresentava resposta aversiva pelo menos no primeiro tempo de avaliação após o tempo de latência).

#### **4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis (latência e duração da anestesia) e Log-Rank (sucesso da anestesia), com nível de significância 5%. Para a análise foi utilizado o pacote estatístico BioEstat 5.0 (Instituto Mamiramuá, Belém, PA).

## 5. RESULTADOS

As taxas de sucesso das anestésias obtidas para cada formulação são mostradas na Figura 2. A solução de ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 promoveu maior taxa de sucesso quando comparada à solução de ropivacaína 0,5% sem aditivos ( $p=0,0013$ ) e à formulação de ropivacaína 0,5% lipossomal ( $p=0,0011$ ). Não foram observadas diferenças significantes entre a solução de ropivacaína 0,5% e a formulação lipossomal de ropivacaína 0,5% ( $p=0,5617$ ).

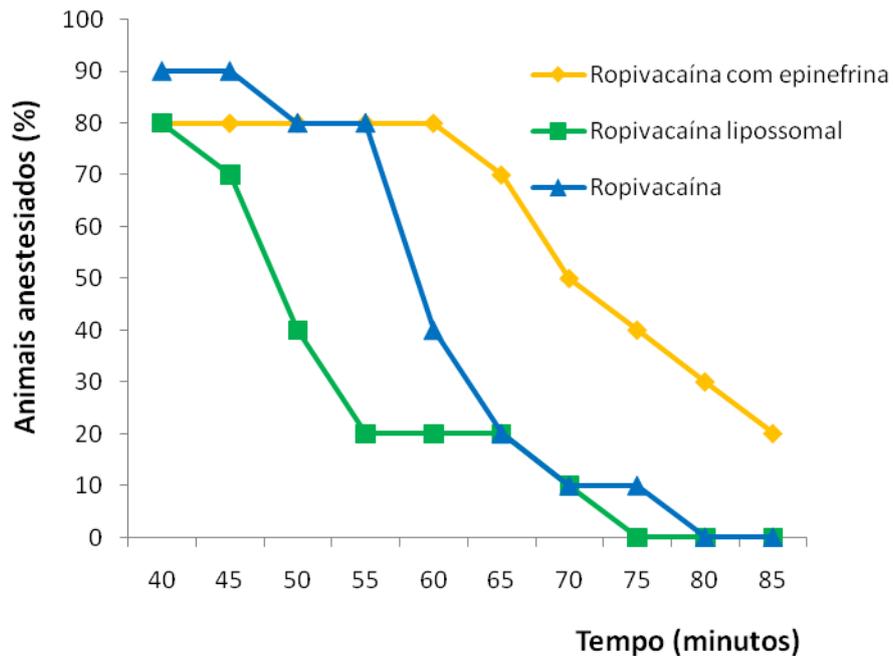


Figura 2. Porcentagem de animais apresentando molares anestesiados após bloqueio do nervo alveolar inferior com formulações a base de ropivacaína.

A Figura 3 mostra os resultados de latência da anestesia obtidos com as formulações à base de ropivacaína. Não foram observadas diferenças significantes entre as formulações ( $p=0,7063$ )

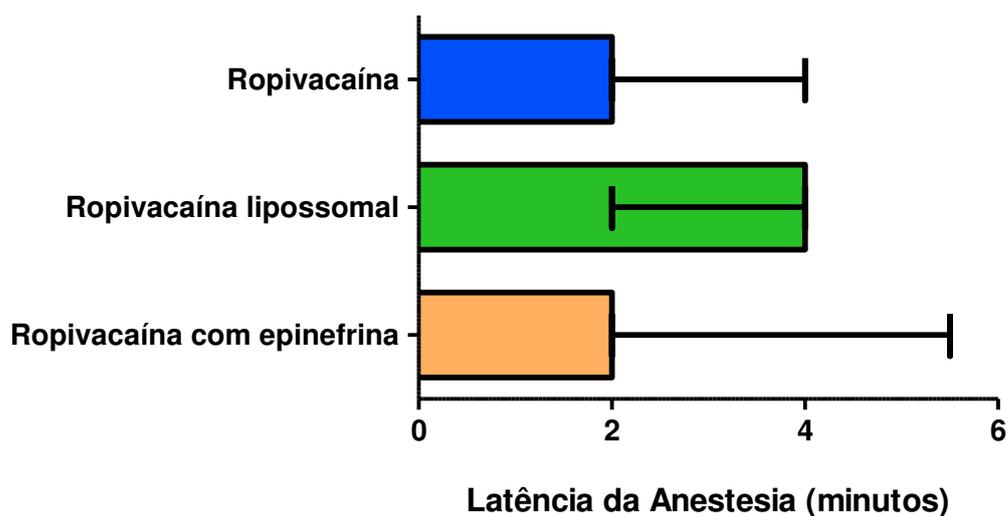


Figura 3. Tempo de latência (mediana e desvio interquartil, em minutos) da anestesia em molares inferiores, após bloqueio do nervo alveolar inferior com formulações a base de ropivacaína.

Na Figura 4 é mostrada a duração da anestesia pulpar para cada uma das formulações testadas. A solução de ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 promoveu maior duração de anestesia que as formulações de ropivacaína 0,5% ( $p=0,0226$ ) e ropivacaína 0,5% lipossomal ( $p=0,0008$ ), não sendo observada diferença estatisticamente significante entre as duas últimas ( $p= 0,2448$ ).

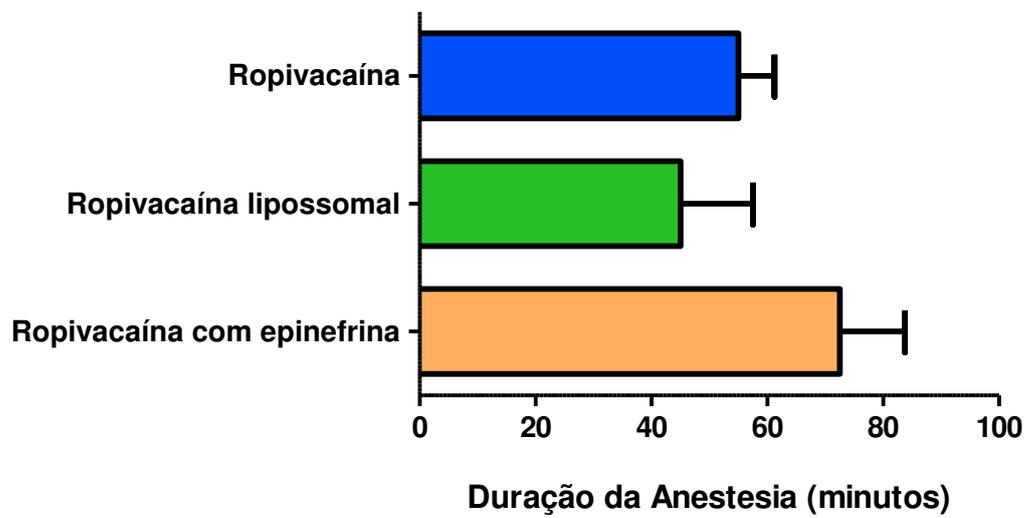


Figura 4. Duração da anestesia (mediana e desvio interquartilico, em minutos) em molares inferiores, após bloqueio do nervo alveolar inferior, em ratos, com formulações a base de ropivacaína.

## 6. DISCUSSÃO

A ropivacaína é um anestésico local de longa duração de ação, introduzido mais recentemente em medicina, mas ainda não disponível para uso odontológico em tubetes. Alguns poucos trabalhos avaliaram a eficácia anestésica da ropivacaína em técnica de bloqueio e infiltração, em odontologia (Kennedy et al., 2001; Ernberg & Koop, 2002; Axelsson & Isacsson, 2004; El-Sharrawy & Yagiela, 2006).

Em bloqueio do nervo alveolar inferior, em humanos, com solução de ropivacaína sem aditivos são relatados, para a anestesia pulpar, sucesso entre 40 a 50%, latência de 2 a 8 minutos e duração de 2,5h a 5,9h, dependendo da concentração e volume utilizados (Ernberg & Koop, 2002; Axelsson & Isacsson, 2004). Em estudo avaliando a latência cirúrgica (sem avaliação do dente com estímulo elétrico) El-Sharrawy & Yagiela (2006) observaram latência entre 2 a 4 minutos.

No presente estudo, apesar das diferenças de modelo experimental e metodologia, os resultados obtidos com a solução de ropivacaína sem aditivos são compatíveis com os relatados por esses autores, como pode ser observado nas Figuras 2, 3 e 4. A maior diferença entre os resultados é a duração da anestesia, que no rato foi menor que o observado em humanos. Essa diferença provavelmente deve-se às diferenças entre as espécies.

Com relação à solução de ropivacaína com epinefrina, Palma (2004), após bloqueio do nervo alveolar inferior (previamente à exodontia de terceiros molares inferiores) observou sucesso, latência e duração da anestesia pulpar no segundo molar inferior, respectivamente de 100%, 5,4min e 4h.

Não há estudos que avaliem, de forma objetiva (com uso de estímulo elétrico), a influência da adição de epinefrina a soluções de ropivacaína sobre a anestesia pulpar, após bloqueio do nervo alveolar inferior. Entretanto, em estudo com técnica infiltrativa na maxila em 40 indivíduos, Kennedy et al. (2001) demonstraram que, embora não haja diferença na taxa de sucesso da anestesia entre soluções de ropivacaína com e sem epinefrina, a duração é maior com a ropivacaína associada à epinefrina. O mesmo foi observado por Franz-Montan (2009), no mesmo tipo de técnica anestésica, em humanos.

No presente estudo, apesar de ter sido usado o bloqueio do nervo alveolar inferior, em ratos, também foi observada maior duração da anestesia com a solução contendo epinefrina do que com a solução sem aditivos. Assim, embora estudos com estruturas isoladas tenham demonstrado que a ropivacaína apresenta efeito vasoconstritor (Timponi et al., 2006; Tokinaga et al., 2007; Wienzek et al., 2007), os estudos em odontologia (Kennedy et al., 2001, Franz-Montan, 2009) e em medicina (Liddle et al., 1998) não comprovam esse efeito nas doses e concentrações usadas clinicamente.

O encapsulamento de anestésicos em lipossomas tem sido proposto como forma de aumentar a duração do efeito anestésico, bem como de diminuir a concentração plasmática dos mesmos, possibilitando, assim, a redução da toxicidade.

Araújo et al. (2008) observaram que o encapsulamento de ropivacaína em grandes vesículas unilamelares (400nm) aumentou de forma significativa a intensidade dos efeitos anestésicos nos bloqueios do nervo ciático em camundongos e do nervo infraorbital, quando esta formulação foi comparada à solução sem aditivos.

No entanto, no presente estudo a formulação de ropivacaína lipossomal não diferiu da solução sem aditivos, apresentando ambas menor taxa de sucesso e duração de anestesia pulpar, comparadas à solução de ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000, contrariando assim, as expectativas quanto ao uso de lipossomas para aumentar a duração da anestesia promovida pela ropivacaína, sem a necessidade de adição de vasoconstritores à formulação.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Franz-Montan (2009) que também verificou maior taxa de sucesso e duração de anestesia no canino superior com solução de ropivacaína a 0,5% com epinefrina 1:200.000 do que com a ropivacaína lipossomal e a ropivacaína sem aditivos, após infiltração maxilar dessas formulações em humanos.

Assim, os resultados obtidos em ambos os estudos indicam que a epinefrina deve estar associada à ropivacaína para alcançar eficácia anestésica para uso odontológico, pois a adição de um vasoconstritor tem mostrado resultados mais favoráveis.

A duração da anestesia pulpar observada para as soluções no presente estudo foi maior do que as observadas por Franz-Montan (2009), o que pode ser explicado devido às diferenças que envolvem a metodologia, uma vez que no presente estudo foi realizada técnica de bloqueio na mandíbula, ao passo que a autora realizou técnica infiltrativa na maxila. Além disso, deve também ser considerada a diferença de espécies.

De Araujo et al. (2008) verificou um tempo de duração bastante elevado para a formulação de ropivacaína lipossomal a 0,5% (115 minutos) em relação à ropivacaína a 0,5% (81 minutos) em bloqueio do nervo infraorbital, em ratos. Apesar de esses valores serem mais elevados do que os encontrados no

presente estudo e este ser um tipo de bloqueio utilizado em odontologia, neste estudo foi avaliado apenas a resposta aversiva do animal a preensão do lábio superior, ou seja, foi somente avaliada a anestesia em tecido mole do animal, enquanto que o presente estudo avaliou a duração da anestesia pulpar. Tanto em técnica infiltrativa, quanto em técnica de bloqueio, a duração da anestesia em tecidos moles é maior que a duração da anestesia pulpar.

Assim, apesar da ropivacaína apresentar encapsulação (24%) comparável à da bupivacaína (24,8%) e maior a da prilocaína (12%), mepivacaína (18%) e lidocaína (19,1%) (Cereda et al., 2004; Cereda et al., 2006), essa maior encapsulação parece ser eficaz apenas para aumentar a duração da anestesia em tecidos moles, mas não é suficiente para aumentar a eficácia deste anestésico com relação à duração da anestesia pulpar. Este resultado, embora desfavorável para bloqueios odontológicos, nos quais o objetivo primordial é o bloqueio da condução nervosa na polpa dental, não exclui a possibilidade de uso da ropivacaína lipossomal em bloqueio ou infiltrações pós-cirúrgicas na área médica, na qual o objetivo é o controle da dor em tecidos moles, ou ainda para permitir bloqueio motor, conforme observado no estudo de Araujo et al. (2008).

## **7. CONCLUSÕES**

A encapsulação da ropivacaína em lipossomas não aumenta sua eficácia na anestesia pulpar. A ropivacaína associada à epinefrina apresenta maior taxa de sucesso e duração de anestesia pulpar que as formulações lipossomal e sem aditivos.

## 8. REFERÊNCIAS\*

1. Axelsson S, Isacsson G. The efficacy of ropivacaine as a dental local anaesthetic. *Swed Dent J.* 2004; 28(2): 85-91.
2. Banerjee R. Liposomes: applications in medicine. *J Biomater Appl.* 2001; 16(1):3-21.
3. Boogaerts JG, Lafont ND, Declercq AG, Luo HC, Gravet ET, Bianchi JA, Legros FJ. Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. *J Clin Anesth.* 1994; 6(4):315-20.
4. Boogaerts J, Declercq A, Lafont N, Benameur H, Akodad E M, Dupont J-M, Legros FJ. Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. *Anesth Analg.* 1993a; 76(3): 553-5.
5. Boogaerts JG, Lafont ND, Luo HC, Legros FJ. Plasma concentration of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome associated and pain solutions to rabbits. *Can J. Anesth* 1993b; 40:1201-1204.
6. Cereda CM, de Araujo DR, Brunetto GB, De Paula E. Liposomal prilocaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation. *J Pharm Pharm Sci.* 2004; 15;7(2): 235-40.
7. Cereda CM, Brunetto GB, de Araujo DR, de Paula E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. *Can J Anaesth* 2006; 53(11):1092-7.
8. Certosimo AJ, Archer RD. A clinical evaluation of the electric pulp tester as an indicator of local anesthesia. *Operative Dent* 1996; 21:25-30.

9. Cooley RL, Stillely L, Lubow RM. Evaluation of a digital pulp tester. *Oral Surg* 1984; 58(4):437-42.
10. Chambers IG. The role and methods of pulp testing in oral diagnosis: a review. *Int. Endod. J* 1982; 15:1-15.
11. De Araujo DR, Pinto LMA, Braga AFA, de Paula E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: Aplicações Terapêuticas. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2003; 53(5):653-661.
12. De Araujo DR, Cereda CM, Brunetto GB, Vomero VU, Pierucci A, Neto HS, de Oliveira AL, Fraceto LF, Braga Ade F, de Paula E. Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. *J Pharm Pharmacol.* 2008; 60(11): 1449-57.
13. Delfino, J. et al. Estudo comparativo entre a bupivacaína 0,5% e ropivacaína 0,5% isobáricas na anestesia subaracnóidea para cirurgia ortopédica. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, Rio de Janeiro, 1999; 49(3): 160-164.
14. El-Sharrawy E, Yagiela JA. Anesthetic efficacy of different ropivacaine concentrations for inferior alveolar nerve block. *Anesth Prog.* 2006; 53(1): 3-7.
15. Ernberg M, Kopp S. Ropivacaine for dental anesthesia: a dose-finding study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60(9): 1004-10.
16. Feldman HS, Arthur GR, Covino BG. Comparative systemic toxicity of convulsant and supraconvulsant doses of intravenous ropivacaine, bupivacaine and lidocaine in the conscious dog. *Anesth Analg* 1989; 69: 794–801.

17. Fraceto LF, Pinto Lde M, Franzoni L, Braga AA, Spisni A, Schreier S, de Paula E. Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys Chem.* 2002; 99(3):229-43.
18. Franz-Montan M. Avaliação da eficácia anestésica e da concentração plasmática da ropivacaína encapsulada em lipossomas, em anestesia odontológica [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.
19. Franz-Montan M, Silva AL, Cogo K, Bergamaschi Cde C, Volpato MC, Ranali J, de Paula E, Groppo FC. Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. *Anesth Analg.* 2007; 104(6): 1528-31.
20. Franz-Montan M, Silva AL, Fraceto LF, Volpato MC, Paula E, Ranali J, Groppo FC. Liposomal encapsulation improves the duration of soft tissue anesthesia but does not induce pulpal anesthesia. *J Clin Anesth.* 2010; 22(5):313-7.
21. Grant SA. The Holy Grail: long-acting local anaesthetics and liposomes. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2002; 16(2): 345-52.
22. Kennedy M, Reader A, Beck M, Weaver J. Anesthetic efficacy of ropivacaine in maxillary anterior infiltration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(4):406-12.
23. Liddle AM, Hall AP, Arrowsmith J. Effect of infiltration with ropivacaine on blood loss during reduction mammoplasty. *Br J Anaesth* 1998; 81:974-5.
24. Malinovsky JM, Benhamou D, Alafandy M, Mussini JM, Coussaert C, Couarraze G, Pinaud M, Legros FJ. Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. *Anesth Analg.* 1997; 85(6):1331-6.

25. Martini E, Cavallini GM, Campi L, Lugli N, Neri G, Molinari P. Lidocaine versus ropivacaine for topical anesthesia in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2002; 28(6):1018-22.
26. McClure JH. Ropivacaine. *Br J Anaesth* 1996; 76: 300–7.
27. Mowat JJ, Mok MJ, MacLeod BA, Madden TD. Liposomal bupivacaine. Extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient. *Anesthesiology.* 1996; 85(3):635-43.
28. Nancarrow C, Rutten AJ, Runciman WB, Mather LE, Carapetis RJ, McLean CF, Hipkins SF. Myocardial and cerebral drug concentrations and the mechanisms of death after fatal intravenous doses of lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine in the sheep. *Anesth Analg.* 1989; 69(3):276-83.
29. Palma FR. Avaliação comparativa da latência, duração e analgesia pós-operatória, após bloqueio do nervo alveolar inferior com bupivacaína e ropivacaína, em pacientes submetidos à cirurgia de 3<sup>os</sup> molares inferiores inclusos [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.
30. Ramacciato JC, Meechan JG. Recent advances in local anaesthesia. *SADJ.* 2006; 61(9):396-8, 400, 402.
31. Silva RAP, Berto LA, Volpato MC, Ranali J, de Paula ED, Groppo FC, Experimental model of inferior alveolar nerve block in rats. 87th General Session and Exhibition o the International Association for Dental Research, 2009, Abstract 706.  
<http://iadr.confex.com/iadr/2009miami/webprogram/Paper116911.html>
32. Timponi CF, Oliveira NE, Arruda RM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Effects of the local anaesthetic ropivacaine on vascular reactivity in the mouse

- perfused mesenteric arteries. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006; 98(5): 518-20.
33. Tofoli GR, Cereda CM, Groppo FC, Volpato MC, Franz-Montan M, Ranali J, de Araújo DR, de Paula E. Efficacy of liposome-encapsulated mepivacaine for infiltrative anesthesia in volunteers. *J Liposome Res*. No prelo 2010.
  34. Tokinaga Y, Ogawa K, Yu J, Kuriyama T, Minonishi T, Hatano Y. Mechanism of the ropivacaine-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in rat aortic smooth muscle. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2007; 51(9): 1155-60.
  35. Wang RD, Dangler LA, Greengrass RA. Update on ropivacaine. *Expert Opin Pharmacother*. 2001; 2(12): 2051-63.
  36. Wienzek H, Freise H, Giesler I, Van Aken HK, Sielenkaemper AW. Altered blood flow in terminal vessels after local application of ropivacaine and prilocaine. *Reg Anesth Pain Med*. 2007; 32(3): 233-9.
  37. Wiziack Zago PM, Baroni DB, Groppo FC, de Paula E, Ranali J, Volpato MC. Anesthetic efficacy of liposomal prilocaine in maxillary infiltration anesthesia. *J Liposome Res*. No prelo 2010.

## 9. ANEXO



UNICAMP



CEEA/Unicamp

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

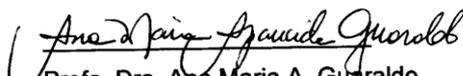
#### CERTIFICADO

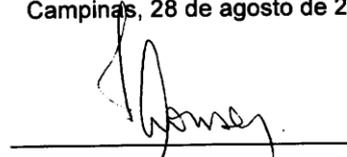
Certificamos que o Protocolo nº 1598-1, sobre "Eficácia anestésica da preparação lipossomal de ropivacaina em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Volpato / Cláudia Brilhante Behringer, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 28 de agosto de 2008.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1598-1, entitled "Anesthetic efficacy of lipossomal ropivacaine in inferior alveolar nerve block in rat", 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 August 28, 2008.

Campinas, 28 de agosto de 2008.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

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

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