

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

CRISTINA SARAGIOTTO CALDAS

**EFICÁCIA ANESTÉSICA DAS PREPARAÇÕES LIPOSSOMAIS UNI
E MULTILAMELARES DE MEPIVACAÍNA, EM BLOQUEIO DOS
NERVOS INFRAORBITAL E ALVEOLAR INFERIOR E
INFILTRAÇÃO SUBCUTÂNEA EM FERIDA CIRÚRGICA, EM
RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristina Volpato

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Cristina Saragiotto Caldas, e orientada pela Profa. Dra. Maria Cristina Volpato.

Assinatura do orientador

PIRACICABA

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

C126e Caldas, Cristina Saragiotto, 1986-
Eficácia anestésica das preparações lipossomais uni e multilamelares de mepivacaína, em bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, em ratos / Cristina Saragiotto Caldas. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Maria Cristina Volpato.
Coorientador: Francisco Carlos Groppo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Lipossomas. 2. Anestesia. I. Volpato, Maria Cristina, 1962- II. Groppo, Francisco Carlos, 1966- III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Anesthetic efficacy of uni and multilamellar liposomal mepivacaine formulations in infraorbital and inferior alveolar nerve blocks and subcutaneous infiltration in surgical wound, in rats

Palavras-chave em Inglês:

Liposomes

Anesthesia

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Maria Cristina Volpato [Orientador]

Daniele Ribeiro de Araújo

Carina Denny

Data da defesa: 28-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata CRISTINA SARAGIOTTO CALDAS aprovada.

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

Profa. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Daniele Ribeiro de Araújo".

Profa. Dra. DANIELE RIBEIRO DE ARAÚJO

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

Profa. Dra. CARINA DENNY

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rita e Beto, que desde pequena me ensinaram a correr atrás das minhas vontades e objetivos. Sem eles eu nada seria;

dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, por meio do Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), por meio do diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior;

À Prof. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP;

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia, e Terapêutica, Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e Prof. Dr. José Ranali, pelos ensinamentos e conhecimento passados;

À Prof. Dra. Eneida de Paula, do Instituto de Biologia da UNICAMP, coordenadora do projeto temático (Processo FAPESP #2006/00121-9), ao qual este trabalho está vinculado;

À Maribel Correia da Silva e Marcio Aparecido Paschoal, funcionários do laboratório de biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela disponibilidade de ajudar sempre;

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro, como bolsa de mestrado (Processo # 2009/11848-5);

À minha orientadora Prof. Dra. Maria Cristina Volpato, pela paciência, calma, atenção, ensinamentos, amizade e sorrisos para tranquilizar em momentos difíceis;

Aos meus pais, Rita e Beto, que sempre estiveram ao meu lado, que me ajudaram a seguir em frente quando fraquejei, que com amor e carinho me ensinaram a viver com alegria e paciência e que sempre estiveram com as mãos esticadas para me ajudar a levantar quando tropecei. Obrigada pelo apoio e carinho, amo vocês;

À minha avó Cleuza, que com paciência e muito amor me ensinou desde pequena a encarar a vida de frente, que pôde proporcionar minha graduação em odontologia e que

com carinho sempre me recebeu em sua casa para as deliciosas férias escolares, meu sincero muito obrigada;

Ao meu irmão Rodrigo, que apesar das brigas constantes, me ensinou a morar longe dos nossos pais, que sempre se preocupou comigo e sempre esteve disposto a me ajudar quando precisei. Gor, você sabe o quanto é importante e exatamente por isso me preocupo tanto com você. Te amo, irmão!

Ao meu namorado e principalmente amigo Gabriel, por toda paciência que tem comigo, pelo carinho e companheirismo de todos os dias. Príncipe, obrigada por todo amor, paciência, conselhos, força, amizade e dedicação;

À minha amiga “gêmea” Fabiana Nolasco. Sem você o mestrado não teria a menor graça e não seria o que foi, você fez parte da minha rotina, do meu grupo de trabalho e das minhas distrações. Bibi, obrigada por um ano todo de conversas a todo momento, academia, aulas, seminários, viagens a São Paulo, fofocas no cair da noite. Com você aprendi muita coisa. Obrigada por essa amizade, você é demais, mana!

Ao meu outro colega de grupo, Luciano Serpe, sem você nossos experimentos com os ratos seriam muito mais difíceis, com a sua presença os ratos ficavam mais calmos e você soube nos deixar mais tranquilas com seu otimismo. Nunca vou esquecer os longos dias que passamos no biotério com nossas conversas e cantorias;

As minhas “roommates” queridas Lívia Galvão, Ariene Arcas e Sonia Fernandes. Obrigada por todas as conversas, risadas, conselhos, festas, confissões, aventuras, nossas jantadas deliciosas. Sem vocês a vida em Piracicaba não seria a mesma coisa;

A todos os colegas de mestrado: Ana Paula, Bibi, Camilinha, Cleiton, Lívia, Luciano, Luiz, Marcos e Marcelo, por todas as festas, churrascos, viagens, conversas e principalmente estudos e seminários compartilhados;

Aos outros colegas da Farmacologia: Inês, Salete, Talita, Bruno Bigode, Carina Denny, Luciana Lóci, Bruno Burns, Luciana Berto e Myrella;

Aos professores e amigos Juliana Ramacciato, Rogério Heládio e Leandro Pereira pelo companheirismo, conselhos e amizade. Sem essa influência, talvez hoje não estivesse na farmacologia. Obrigada por desde a graduação se preocuparem comigo. Obrigada pela

ajuda, aulas e atenção para que eu pudesse passar na prova de mestrado, pela força que sempre me deram. Sou muito grata a vocês;

A Srta. Maria Elisa dos Santos pela paciência, por estar sempre disposta a ajudar, tornando tudo mais fácil e rápido e à Eliane e José Carlos pela ajuda no laboratório;

Aos amigos e pessoas que embora não citadas colaboraram e me incentivaram para que este trabalho fosse realizado e concluído.

Enquanto houver sol

Sérgio Britto

Quando não houver saída
Quando não houver mais solução

Ainda há de haver saída

Nenhuma idéia vale uma vida

Quando não houver esperança

Quando não restar nem ilusão

Ainda há de haver esperança

Em cada um de nós, algo de uma criança

Enquanto houver sol, enquanto houver sol

Ainda haverá

Enquanto houver sol, enquanto houver sol

Quando não houver caminho

Mesmo sem amor, sem direção

A sós ninguém está sozinho

É caminhando que se faz o caminho

Quando não houver desejo

Quando não restar nem mesmo dor

Ainda há de haver desejo

Em cada um de nós, aonde Deus colocou

Enquanto houver sol, enquanto houver sol

Ainda haverá

Enquanto houver sol, enquanto houver sol

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia anestésica de duas formulações de mepivacaína encapsulada em lipossomas (uni e multilamelar) com concentração lipídica 8 mM, comparando-as com solução de mepivacaína com epinefrina em três modelos: bloqueio do nervo infraorbital (BNIO), bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI) e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (ISFC), em ratos. Em cada experimento os animais receberam injeção de uma das seguintes formulações: mepivacaína 2% associada à epinefrina 1:100.000 (Mepi-Epi), mepivacaína 3% lipossomal unilamelar (Mepi-LUV) e mepivacaína 3% lipossomal multilamelar (Mepi-MLV) e os respectivos controles: solução de NaCl 0,9%, suspensão lipossomal unilamelar e suspensão lipossomal multilamelar sem anestésico. Para o BNIO (30 ratos) e BNAI (51 ratos) os animais foram divididos em 3 grupos, e receberam uma das formulações contendo mepivacaína no lado direito e a respectiva formulação controle no lado esquerdo, sendo respectivamente 0,1 mL no BNIO e 0,2 mL no BNAI. Após o BNIO foram avaliados duração e sucesso da anestesia no lábio superior, por pinçamento. Após o BNAI foram avaliados latência, duração e sucesso da anestesia pulpar por estímulo elétrico. Para a ISFC, 48 ratos foram divididos em 6 grupos, sendo submetidos a estímulo inflamatório na pata traseira direita (incisão e sutura). Após 24h os animais que apresentaram hipernocicepção (diminuição de pelo menos 20% na sensibilidade à pressão - analgesímetro de von Frey) receberam injeção de 0,1 mL de uma das formulações, contendo mepivacaína ou controle, ao lado da ferida cirúrgica. A anestesia local foi avaliada com analgesímetro de von Frey a cada 10 minutos. Os resultados foram submetidos aos testes Log-Rank, Tukey, Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls ($\alpha=5\%$). Nos três modelos estudados, a solução de Mepi-Epi promoveu maior sucesso e duração da anestesia ($p<0,05$), enquanto as formulações lipossomais não diferiram entre si ($p>0,05$). Para o experimento do BNAI, não foram observadas diferenças entre as formulações ($p>0,05$) para latência da anestesia. Conclui-se que a encapsulação em lipossomas uni ou multilamelares foi menos eficaz do que a epinefrina em aumentar a eficácia anestésica da mepivacaína em todos os modelos estudados.

Palavras-chave: lipossoma, mepivacaína, anestésico local.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the anesthetic efficacy of two liposomal (unilamellar and multilamellar, 8mM lipid concentration) mepivacaine formulations compared to mepivacaine with epinephrine in three models: infraorbital nerve block (IONB), inferior alveolar nerve block (IANB) and subcutaneous infiltration in surgical wound (SISW) in rats. In each model animals received one of the following formulations: 2% mepivacaine with 1:100,000 epinephrine, (Mepi-Epi), liposomal unilamellar 3% mepivacaína (Mepi-LUV), liposomal multilamellar 3% mepivacaína (Mepi-MLV), and the respective controls: 0.9% NaCl solution, and liposomal unilamellar and liposomal multilamellar suspensions without the local anesthetic. For IONB (n= 30) and IANB (n= 51) the animals were divided into 3 groups, which received one of the formulations containing mepivacaine in the right side and the respective control formulation in the left side; 0.1 mL and 0.2mL were respectively injected for IONB and IANB. After IONB the success and duration of anesthesia was evaluated by upper lip pinching. After IANB the onset, duration and success of pulpal anesthesia were evaluated by electric stimulus. For SISW experiment the 48 rats were divided into 6 groups and submitted to an inflammatory stimulus in the right hind paw (incision and suture). After 24 h the animals that presented hypernociception (at least 20% decrease in the baseline response to force - von Frey anesthesiometer) received a 0.1mL injection of one of mepivacaína or control formulations at the side of the surgical wound. Local anesthesia was evaluated each 10 min with von Frey anesthesiometer. Data were submitted to Log-Rank, Tukey, Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls tests ($\alpha=5\%$). Mepi-Epi provided higher success and duration of anesthesia ($p<0.05$) in the three studied models; no difference was observed between the liposomal formulations ($p>0.05$). No differences in the anesthesia onset were observed among formulations for IANB ($p>0.05$). It is concluded that the encapsulation in unilamellar and multilamellar liposomes was less effective than epinephrine to improve mepivacaine anesthetic efficacy in all studied models.

Key-words: liposome, mepivacaine, local anesthetic.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Anestesia Local	3
2.2 Mepivacaína	4
2.3 Sistemas de Liberação Controlada – Lipossomas	5
2.4 Modelos de Estudo de Eficácia Anestésica em Ratos	9
2.4.1 Bloqueio do Nervo Infraorbital	9
2.4.2 Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior	9
2.4.3 Infiltração Subcutânea em Ferida Cirúrgica	10
3. PROPOSIÇÃO	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Animais	13
4.2 Delineamento experimental	13
4.3 Material	14
4.4 Preparação das Suspensões Lipossomais	15
4.5 Avaliação da Eficácia Anestésica	16
4.5.1 Bloqueio do Nervo Infraorbital	16
4.5.2 Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior	17
4.5.3 Infiltração Subcutânea em Ferida Cirúrgica	20
4.6 Análise Estatística	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Bloqueio do Nervo Infraorbital	23
5.2 Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior	25
5.3 Infiltração Subcutânea em Ferida Cirúrgica	28

	Página
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO 1	47

1 INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais têm sido utilizados há mais de cem anos no controle da dor durante e após procedimentos operatórios em medicina e odontologia (de Jong, 1994; Roberts & Sowray, 1995). Nesse período a segurança e a eficácia dessas formulações têm aumentado consideravelmente por meio do desenvolvimento de novas moléculas de sais anestésicos, bem como pela incorporação de aditivos ou uso de sistemas de liberação que aumentam a duração da anestesia e diminuem a toxicidade desses fármacos (Kuzma *et al.*, 1997; de Araújo *et al.*, 2003).

Embora as aminas simpatomiméticas promovam aumento considerável da duração da anestesia e sejam bastante efetivas em procedimentos odontológicos, nem sempre esse tempo é suficiente, em procedimentos médicos, como no controle da dor pós-operatória, que pode durar dias, havendo ainda o problema da toxicidade inerente destes coadjuvantes terapêuticos sobre o sistema cardiovascular (Lafont *et al.*, 1996).

Os sistemas de liberação prolongada de drogas têm sido pesquisados há quatro décadas, com resultados relevantes. Dentre estes se destacam os lipossomas, as ciclodextrinas e os polímeros (de Araújo *et al.*, 2003; de Paula *et al.*, 2010). Os lipossomas são esferas constituídas por uma ou mais bicamadas de lipídeos, sendo classificados, quanto ao número de bicamadas, como lipossomas uni e multilamelares, respectivamente. Devido a essa característica podem carrear tanto fármacos lipossolúveis (no interior da bicamada), quanto hidrossolúveis (no interior aquoso da esfera) (Grant, 2002). Por sua constituição semelhante à das membranas biológicas, não promovem antigenicidade ou lesões histológicas após sua administração (Malinovsky *et al.*, 1997).

Trabalhos recentes tem mostrado resultados positivos com a encapsulação de prilocaína e mepivacaína em lipossomas unilamelares grandes de 400 nm (de Araújo *et al.*, 2004; Cereda *et al.*, 2006), quando comparados com os sais anestésicos sem aditivos. No modelo de bloqueio do nervo infraorbital em ratos, Cereda *et al.* (2006) obtiveram aumento no tempo de recuperação da sensibilidade de 56% e 30%, respectivamente para a mepivacaína 2% e para a prilocaína 2%, nesse tipo de encapsulação, em relação aos respectivos anestésicos locais sem aditivos.

Especificamente para a mepivacaína, esses resultados foram confirmados no estudo de Tófoli *et al.* (2011), que observaram maior duração da anestesia no canino superior, após técnica infiltrativa na maxila em humanos, com mepivacaína 3% encapsulada em lipossomas unilamelares em relação à solução comercial de mepivacaína 3%. Nesse estudo foi demonstrado ainda que, mesmo em concentração menor (2%) a mepivacaína encapsulada em lipossomas apresentava duração de ação semelhante à da solução comercial na concentração de 3%. Entretanto, esse tipo de encapsulação (em lipossoma unilamelar de 400 nm, com concentração 5 mM de lipídeos) não foi capaz de aumentar a duração da anestesia de forma comparável à epinefrina, tendo a solução de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 apresentado eficácia significativamente superior à da formulação sem aditivos e das formulações lipossomais.

Tem sido demonstrado que lipossomas multilamelares podem aumentar de forma significativa a duração da anestesia da bupivacaína (Lafont *et al.*, 1994; Boogaerts *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 2004), e ainda de diminuir a concentração plasmática máxima desse anestésico (Davidson *et al.*, 2010).

Esses resultados sugerem que o aumento da concentração lipídica ou o aumento do número de bicamadas lipídicas poderia promover aumento da encapsulação do anestésico local e, conseqüentemente, da eficácia anestésica.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia anestésica de duas formulações lipossomais (uni e multilamelar) de mepivacaína em comparação com a solução de mepivacaína com epinefrina disponível comercialmente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANESTESIA LOCAL

O controle da dor ainda é um grande desafio tanto na medicina quanto na odontologia. Dentre os fármacos utilizados para esta finalidade, os anestésicos locais são seguramente os mais empregados. Estes agem bloqueando a passagem de íon sódio para o interior do neurônio, impedindo assim a propagação do impulso nervoso, tornando possível a realização de procedimentos dolorosos sem que o paciente tenha consciência da dor. O bloqueio da condução dos íons sódio pode ocorrer pela ligação a um local específico no canal de sódio ou ainda por alteração na membrana, mudando a conformação dos canais de sódio (Ragsdale *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1999). Essa capacidade de impedir a condução de impulsos dolorosos também é usada no controle da dor pós-operatória (Hawkins & Moore, 2002; Malamed, 2005).

O isolamento da cocaína a partir da folha de *Erythroxylum coca* por Niemann, em 1860, e sua introdução como anestésico local em procedimentos oftalmológicos por Carl Koller, em 1884, deram início à era da anestesia local, levando à síntese de vários ésteres menos tóxicos e ao uso de adjuvantes terapêuticos, como os vasoconstritores, que permitiam o aumento da eficácia anestésica (de Jong, 1994; Roberts & Sowray, 1995).

Com a descoberta da lidocaína, na década de 1940, os anestésicos locais do grupo éster, conhecidos por sua alergenicidade expressiva, foram rapidamente substituídos pelas amidas (Malamed, 2005). Atualmente os poucos casos registrados de alergia podem ser devido ao acréscimo de antioxidantes ou conservantes na solução (Haas, 2002).

O desenvolvimento, o aperfeiçoamento e a melhora tanto dos agentes anestésicos, quanto das técnicas de aplicação destes fármacos, são provavelmente os maiores progressos na odontologia ao longo do tempo, tornando o tratamento odontológico confortável, menos doloroso e assim, menos estressante para o paciente (Ramacciato *et al.*, 2003).

Nas doses usadas clinicamente todos os anestésicos locais apresentam ação vasodilatadora, o que limita a duração da anestesia e pode contribuir para a toxicidade dos mesmos. Assim, já em 1903, Braun recomendava a adição de epinefrina para aumentar o

efeito da cocaína (Malamed, 2005). Desde então vasoconstritores têm sido adicionados aos anestésicos locais para melhorar sua ação.

Dentre os vasoconstritores disponíveis para uso odontológico, a epinefrina se destaca como o mais potente, sendo amplamente utilizada. Apesar de contribuir para a redução da toxicidade dos anestésicos locais, por permitir uso de doses menores, os vasoconstritores também apresentam toxicidade e podem promover reações adversas, principalmente sobre o sistema cardiovascular, em pacientes que já apresentam comprometimento do mesmo (Malamed, 2005).

Essa toxicidade também pode se manifestar quando são utilizadas doses maiores, no controle da dor pós procedimentos na área médica, o que tem motivado a pesquisa com outros aditivos como agonistas α_2 -adrenérgicos (Brkovic *et al.*, 2005) e opióides (Robaux *et al.*, 2004) e sistemas de liberação de fármacos (de Araújo *et al.*, 2003).

2.2 MEPIVACAÍNA

O sal anestésico cloridrato de mepivacaína foi sintetizado em 1957 por A. F. Ekenstam e introduzido na Odontologia em 1960 como solução a 2% associada ao vasoconstritor sintético levonordefrina, e em 1961 como solução a 3% sem vasoconstritor. (Malamed, 2005).

Por pertencer à classe química das amino-amidas, a mepivacaína raramente provoca reação alérgica ou sensibilização cruzada (Baluga *et al.*, 2002). É considerada como anestésico de duração intermediária e tem como vantagem a maior duração de anestesia em comparação à lidocaína, quando utilizada sem adição de vasoconstritores (Malamed, 2005). Devido à menor potência vasodilatadora, apresenta duração de anestesia pulpar de 20 a 40 minutos (infiltração e bloqueio, respectivamente), sendo clinicamente viável seu uso em odontologia sem adição de vasoconstritor. Quando associada a um vasoconstritor, o tempo de anestesia pulpar aumenta significativamente (60 a 90 minutos) (Malamed, 2005). A potência e toxicidade da mepivacaína são semelhantes às da lidocaína (Malamed, 2005; Porto *et al.*, 2007; Moore & Hersh, 2010); o tempo de meia-vida plasmática é em torno de 114 minutos (de Jong, 1994).

A possibilidade de anestesia efetiva, mesmo sem uso de vasoconstritor, torna a mepivacaína uma opção segura para pacientes com comprometimento cardiovascular severo, com contra-indicação absoluta ao uso de vasoconstritores (Haas, 2002), podendo ser também uma alternativa para procedimentos em que não há a necessidade de anestesia pulpar com uma longa duração de ação (Malamed, 2005).

Atualmente, a mepivacaína é disponível para uso odontológico no Brasil em quatro formulações: na concentração de 3% sem vasoconstritor e na concentração 2% associada à epinefrina 1:100.000 ou à norepinefrina 1:100.000 ou ainda à corbadrina 1:20.000 (Ramacciato *et al.*, 2010).

2.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA - LIPOSSOMAS

Ultimamente tem crescido o interesse por formulações de liberação controlada, pois elas podem contornar propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos, como a solubilidade em membranas ou distribuição em meio aquoso, melhorando a farmacocinética e farmacodinâmica, além de reduzirem a toxicidade local e sistêmica (de Araújo *et al.*, 2003). Os sistemas de liberação mais estudados são os lipossomas, as ciclodextrinas e os biopolímeros (de Paula *et al.*, 2010).

Lipossomas são vesículas que podem ser formadas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídios suspensas em uma fase aquosa; o núcleo também é aquoso e totalmente fechado (Grant, 2002). Essa conformação permite a interação tanto com moléculas de caráter hidrofílico, quanto hidrofóbico (Grant & Bansinath, 2001).

A constituição das bicamadas lipídicas, compostas por fosfolipídios naturais e colesterol semelhantes às das membranas biológicas, confere aos lipossomas baixo risco de antigenicidade e de promover lesões histológicas (Malinovsky *et al.*, 1997).

O tamanho (diâmetro) dos lipossomas pode variar entre 50 nm a 1000 nm (Grant, 2002), sendo este um fator importante para sua biodistribuição. Assim, lipossomas menores que 120 nm atravessam rapidamente os capilares, enquanto que os maiores tendem a permanecer no sítio da injeção, podendo promover efeito mais prolongado (Grant & Bansinath, 2001).

Nos Estados Unidos já existem medicamentos associados a lipossomas, como é o caso do anestésico tópico LMX 4[®] (lidocaína a 4%, creme em veículo lipossomal) (de Araújo *et al.*, 2003). No Brasil, o número de medicamentos associados a carreadores vem aumentando, como é o caso do quimioterápico doxorrubicina (Caelyx[®]) e do antifúngico anfotericina B (Ambisome[®]) (ANVISA, 2012).

Os lipossomas têm se mostrado eficientes como sistema de liberação controlada de anestésicos locais, uma vez que melhoram a disponibilidade dos compostos, a duração do efeito e a meia-vida, e reduzem a toxicidade sistêmica, diminuindo o pico de concentração plasmática (Grant, 2002; Yu *et al.*, 2002; de Araujo *et al.*, 2003; Davidson *et al.*, 2010). Devido à natureza anfífila dos anestésicos locais, eles interagem com esse sistema de liberação controlada e podem ser encontrados, principalmente, na região da bicamada (de Paula & Schreier, 1995, 1996).

O aumento da eficácia anestésica em formulações lipossomais tem sido relatado em diversos estudos. Cereda e colaboradores, em 2004, observaram prolongamento do efeito anestésico da prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares (concentração lipídica de 4 mM), em bloqueio do nervo infraorbital em ratos, quando comparada à solução sem aditivos. Contudo, não houve diferença estatística em relação à formulação lipossomal com a prilocaína associada ao vasoconstritor não adrenérgico felipressina.

Em estudo posterior, Cereda *et al.* (2006) compararam formulações lipossomais unilamelares (concentração lipídica de 4 mM) de prilocaína, mepivacaína e lidocaína com as respectivas formulações sem aditivos no mesmo modelo de bloqueio e obtiveram como resultado o aumento da intensidade do efeito anestésico em relação às soluções sem aditivos de todos os anestésicos. A mepivacaína foi o sal anestésico que obteve o maior aumento na eficácia.

Pesquisadores do mesmo grupo (de Araújo *et al.*, 2008) também encontraram melhora significativa na eficácia anestésica da ropivacaína lipossomal unilamelar (concentração lipídica de 4 mM) em relação à ropivacaína sem aditivos, observando aumento da duração da anestesia nos dois tipos de bloqueio estudados, infraorbital e ciático.

Contudo, estudos que comparam formulações lipossomais com formulações contendo vasoconstritores como adjuvantes terapêuticos não encontraram aumento da eficácia anestésica. Berto, em 2010, avaliando a eficácia anestésica de soluções de articaína sem aditivos, lipossomal unilamelar (concentração lipídica de 4 mM) e contendo epinefrina em bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior de ratos, concluiu que apesar das formulações lipossomais de articaína apresentarem melhor eficácia quando comparadas as soluções puras, não superaram a eficácia anestésica pulpar da articaína associada à epinefrina.

Igualmente Wiziack Zago *et al.* (2011) observaram menor eficácia anestésica da prilocaína lipossomal unilamelar (concentração lipídica de 4 mM) comparada à prilocaína associada à felipressina em técnica infiltrativa na maxila em humanos. Neste estudo a eficácia da formulação lipossomal de prilocaína não diferiu da solução sem aditivos do mesmo sal.

No mesmo modelo, em humanos, Franz-Montan *et al.* (2011) observaram maior taxa de sucesso e duração da anestesia com a ropivacaína associada a epinefrina. Da mesma forma que Wiziack Zago *et al.*, 2011, Franz-Montan *et al.*, 2011 não observaram diferença na eficácia entre o anestésico local (no caso, a ropivacaína) sem aditivos e encapsulado em lipossomas unilamelares.

Entretanto, ao avaliar a mepivacaína em técnica infiltrativa maxilar em humanos, Tófoli *et al.* (2011) observaram aumento da eficácia da mepivacaína lipossomal em relação a mepivacaína sem aditivos. Relataram maior duração de anestesia com a formulação lipossomal unilamelar de mepivacaína 3%, quando comparada às formulações de mepivacaína 3% sem aditivos e de mepivacaína lipossomal unilamelar a 2%, sem diferença entre essas últimas. Contudo, a formulação de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 foi mais eficaz que todas, apresentando duração de anestesia significativamente maior. Nesse estudo a concentração lipídica dos lipossomas foi de 5 mM.

Esses resultados mostram uma clara limitação na utilização dessas formulações lipossomais em anestesia pulpar, pois nenhuma proporcionou resultados similares aos obtidos com a adição de vasoconstritores.

Outros tipos de vesículas lipossomais, como os lipossomas multivesiculares e multilamelares também têm sido estudados. Grant *et al.* (2004) avaliaram a duração da anestesia de formulações lipossomais multivesiculares grandes (2439 nm) de bupivacaína nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%, comparadas à bupivacaína 0,5% sem aditivos, tendo como controles solução salina e suspensão lipossomal sem anestésico. O estudo consistiu da infiltração intradérmica de 0,5 mL das formulações na região lombar de seis voluntários. Como resultado foi observado que estas vesículas prolongaram a duração da anestesia de forma dose-dependente, com tempos muito superiores ao obtido com a bupivacaína sem aditivos (respectivamente de 1 h, 19 h, 38 h e 48 h, para a bupivacaína sem aditivo, e formulações lipossomais de bupivacaína 0,5%, 1% e 2%).

A comparação de suspensões lipossomais com soluções contendo epinefrina em procedimentos médicos também mostrou superioridade da encapsulação em lipossomas. Assim, Boogaerts *et al.* (1994), avaliando a infiltração epidural de bupivacaína 0,5% em suspensão lipossomal multilamelar e bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 para controle da dor pós-cirúrgicas (abdominal, vascular, urológica, torácica e ortopédica), observaram que a duração da anestesia aumentava de $3,2 \pm 0,4$ h para $6,25 \pm 1,13$ h com o uso da suspensão lipossomal. Posteriormente, Lafont *et al.* (1996) relataram aumento na duração do alívio da dor em paciente com câncer terminal de pulmão, com aumento da anestesia de 4 h com a solução de bupivacaína 0,25% com epinefrina 1:200.000 para 11 h com a formulação lipossomal multilamelar de bupivacaína 0,25%, administradas via cateter epidural.

Esses resultados abrem duas possibilidades de estudo para as formulações lipossomais, o uso de lipossomas unilamelares com maior concentração lipídica e de lipossomas multilamelares. Em ambos os casos, a maior concentração lipídica poderia aumentar a taxa de encapsulação e, possivelmente, aumentar a duração do efeito anestésico.

2.4 MODELOS DE ESTUDO DE EFICÁCIA ANESTÉSICA EM RATOS

2.4.1 Bloqueio do Nervo Infraorbital

O nervo infraorbital do rato emerge do crânio pelo forame infraorbital, situado logo abaixo da órbita, no espaço entre os molares e o dente incisivo de cada lado da maxila do animal. É responsável pela inervação do lábio superior e pele desta região, apresentando similaridade ao nervo infraorbital de humanos (Cereda *et al.*, 2006).

O bloqueio do nervo infraorbital no rato pode ser realizado pela injeção de solução anestésica próximo ao forame homônimo e foi descrito por Fink *et al.*, em 1975. Tem sido usado de forma consistente como modelo de avaliação de preparações anestésicas injetáveis (Hassan *et al.*, 1985a, b; Cereda *et al.*, 2004, Cereda *et al.*, 2006; de Araújo *et al.*, 2008; Berto, 2010) por apresentar facilidade de execução e reprodutibilidade (Cereda *et al.*, 2006). Fornece informação sobre intensidade e duração do bloqueio sensorial (Fink *et al.*, 1975), sendo considerado um importante modelo de estudo, principalmente para cirurgias orofaciais em odontologia (de Araújo *et al.*, 2008).

2.4.2 Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior

Em 1999, Naftel *et al.* descreveram a trajetória dos nervos que suprem os dentes mandibulares no rato, a partir de um estudo com anticorpos monoclonais em animais desde a fase embrionária (18^o dia) até o 90^o dia após o nascimento.

A partir desse estudo, Silva *et al.*, 2009 desenvolveram a técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos, com avaliação da anestesia por aplicação de estímulo elétrico, similar à utilizada em humanos e amplamente aceita para avaliação de soluções anestésicas (Hinkley *et al.*, 1991; Gallatin *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2004; Volpato *et al.*, 2005; Branco *et al.*, 2006; Franz-Montan *et al.*, 2011; Brunetto *et al.*, 2008; Kanaa *et al.*, 2009; Batista da Silva *et al.*, 2010; Meechan *et al.*, 2011; Wiziack Zago *et al.*, 2011; Tófoli *et al.*, 2011).

Nesta técnica os animais são submetidos à fixação de fios de cobre sobre a oclusal dos molares inferiores para permitir a aplicação do estímulo elétrico aos mesmos. Após o retorno da anestesia geral, os animais são sedados e submetidos à injeção da

formulação anestésica próximo ao forame mandibular. A abordagem do forame é feita pela face medial da base da mandíbula, na região do ângulo mandibular, introduzindo cerca de 13 mm da agulha (13 x 4,5 mm), sendo que a mesma deve formar um ângulo de aproximadamente 45° com a base da mandíbula. Assim, estando o animal sedado, porém responsivo ao estímulo elétrico e estímulos pressóricos dolorosos (preensão da cauda), pode ser feita a avaliação dos parâmetros da anestesia (latência, duração e sucesso da anestesia pulpar).

2.4.3 Infiltração Subcutânea em Ferida Cirúrgica

A infiltração de anestésicos locais por via subcutânea, em ferida cirúrgica, para controle de dor pós-operatória tem tido um sucesso limitado (Dahl *et al.*, 1994). A qualidade questionável da anestesia relatada nessas infiltrações pode ser resultante da rápida distribuição dos anestésicos a partir do local da injeção (Grant *et al.*, 1997), devido à vasodilatação decorrente do processo inflamatório instalado. Além disso, o pH ácido do local inflamado (em torno de 6,0) aumenta o número de moléculas na forma ionizada, a qual não consegue penetrar na membrana nervosa (Strichartz & Ritchie, 1987, apud Malamed, 2005).

Desta forma, para uma duração maior do efeito anestésico, o acréscimo da dose de anestésico poderia ser plausível se não fosse o potencial de toxicidade sistêmica desse grupo de drogas no organismo, limitando assim a dose total que pode ser administrada com segurança (Dahl *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1997).

Para diminuir o potencial de toxicidade dos anestésicos locais, a utilização de sistemas de liberação controlada como lipossomas, ciclodextrinas e biopolímeros é uma alternativa de grande interesse.

Para este tipo de estudo, vários modelos animais têm sido propostos, sendo o de hiperalgesia decorrente de ferida cirúrgica na pata bastante utilizado (Brennan *et al.* 1996; Grant *et al.*, 1997; Zahn & Brennan, 1999; Rivat *et al.*, 2009).

Este modelo fornece informação sobre a sensibilidade através da resposta de retirada da pata do animal frente à estimulação nociceptiva, quando aplicada força com

filamentos de von Frey, antes e após o desenvolvimento de hiperalgesia em ferida cirúrgica na superfície plantar do animal. Foi descrito por Vandermeulen *et al.* (1994) e Brennan *et al.* (1996) e modificado por Grant *et al.* (1997), que introduziram algumas alterações com relação à ferida cirúrgica e à intensidade de força utilizada para avaliação. Assim, neste último estudo o tamanho da ferida foi padronizado em 1 cm de extensão e 3 mm de profundidade, com posterior coadaptação e sutura das bordas com 3 pontos com fio de nylon 6.0. A força aplicada lateralmente à ferida variava de 0,0073 N a 0,456 N. Foi também estabelecido o critério para hiperalgesia pós-cirúrgica, considerado como redução de pelo menos 20% da sensibilidade à força exercida pelo analgesímetro de von Frey 24 h após a realização da ferida cirúrgica, em comparação à sensibilidade pré-incisão (Grant *et al.*, 1997).

Grant *et al.* (1997) demonstraram aumento da duração da anestesia nas patas inflamadas com a injeção de bupivacaína em suspensão lipossomal multilamelar em comparação à solução de bupivacaína sem aditivos. Demonstraram também que a toxicidade era diminuída, uma vez que foi possível injetar suspensões lipossomais com até 2% de bupivacaína, concentração essa fatal quando a bupivacaína é injetada sem aditivos. Mesmo com um quarto da concentração de bupivacaína, a suspensão lipossomal resultou em menor concentração plasmática ao longo tempo.

O termo hiperalgesia utilizado nestes estudos para definir o estado de sensibilidade aumentada a estímulo pressórico pode não ser o mais adequado, de acordo com Parada *et al.* (2003), pois a aplicação de força com o analgesímetro de von Frey em ratos não permite a diferenciação entre hiperalgesia (sensação dolorosa aumentada a estímulo nociceptivo) e alodinia (sensação dolorosa a estímulo que usualmente não provoca dor). Desta forma, esses autores propuseram o termo hipernocicepção para esse tipo resposta, o qual tem sido usado atualmente por vários autores (Cunha *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2008; Napimoga *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2009; Pena-dos-Santos *et al.*, 2009) e será utilizado também no presente estudo.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar, comparativamente, a eficácia anestésica de duas preparações lipossomais (uni e multilamelar, com concentrações lipídicas de 8 mM) de mepivacaína com a solução comercialmente disponível de mepivacaína associada à epinefrina, em três modelos animais (bloqueio do nervo infraorbital, bloqueio do nervo alveolar inferior e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/ UNICAMP), sob protocolo nº 1939-1 e aprovado em 03 de setembro de 2009 (Anexo 1). Foram utilizados 105 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos, machos, pesando 300-400 g, os quais permaneceram em ambiente com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclos claro-escuro controlados (12/12 h) e com água e comida *ad libitum*.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste estudo foram avaliadas três formulações contendo mepivacaína, com o respectivo controle negativo, descritos a seguir.

Formulações com mepivacaína:

- solução de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000
- suspensão lipossomal unilamelar de mepivacaína 3%
- suspensão lipossomal multilamelar de mepivacaína 3%

Formulações controle:

- solução de cloreto de sódio 0,9%
- suspensão lipossomal unilamelar
- suspensão lipossomal multilamelar

A avaliação da eficácia anestésica das formulações foi realizada nos seguintes modelos experimentais (descritos de forma detalhada no item 4.5):

- Bloqueio do nervo infraorbital;
- Bloqueio do nervo alveolar inferior;
- Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica.

Em cada experimento, os animais foram divididos de forma aleatória, de acordo com o delineamento mostrado na Figura 1.

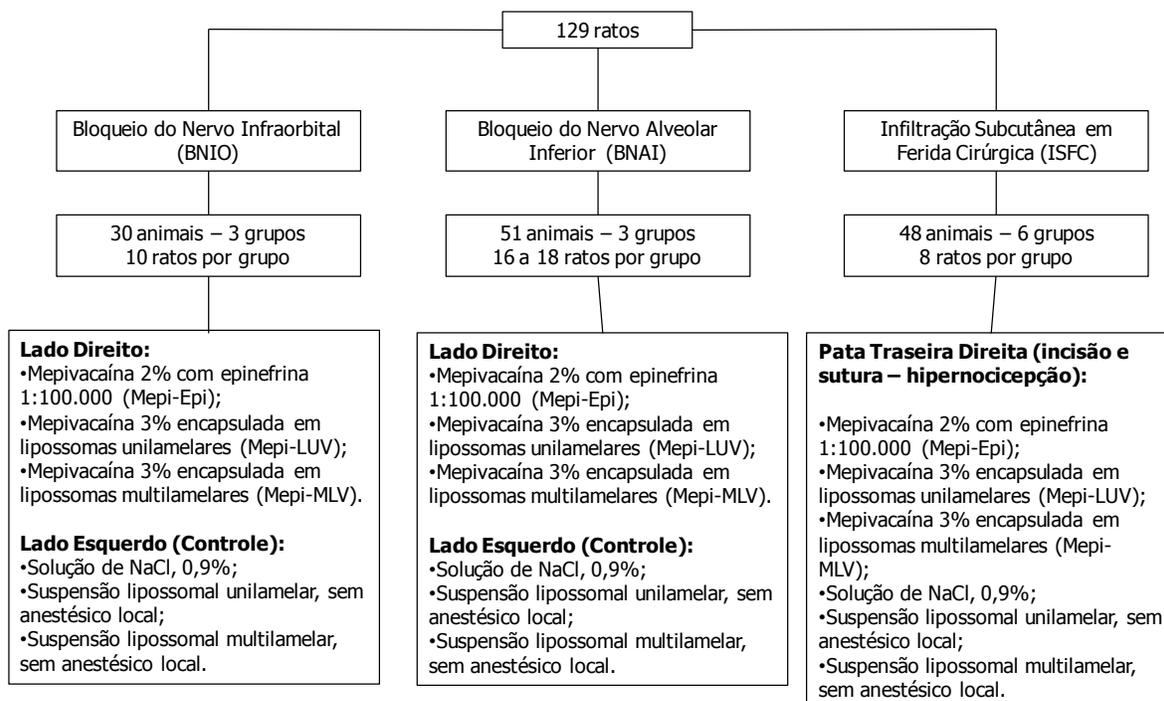


Figura 1. Delineamento experimental dos três estudos para avaliação da eficácia anestésica.

4.3 MATERIAL

Drogas e reagentes: mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre[®] – DFL Ind. Com. SA, Rio de Janeiro, Brasil), cloridrato de mepivacaína (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), suspensão lipossomal multilamelar de mepivacaína a 3%, suspensão lipossomal unilamelar de mepivacaína a 3%, suspensão lipossomal multilamelar, suspensão lipossomal unilamelar, solução de cloreto de sódio 0,9% (Equiplax Ind. Farm., Brasil), acetato de α -tocoferol (Sigma Chem. Co.), fosfatidilcolina de ovo (Sigma Chem. Co.), tampão HEPES 20 mM com NaCl 150 mM (Q-biogene), colesterol (Sigma Chem. Co.), xilazina (Rompun[®]), ketamina (Dopalen[®]), isoflurano (Isoforine, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), tiopental (Thiopentax[®] injetável, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), gel de ácido fosfórico a 37% (MAGIC ACID Gel, Vigodente[®]), adesivo fotopolimerizável (MAGIC BOND, Vigodente[®]) e resina fotopolimerizável (Z100, 3M ESPE[®]).

Instrumental: agulhas descartáveis 13 X 4,5 (BD PrecisionGlide[®] - 26G, Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR, Brasil), seringas centesimais de 1 mL (BD[®] Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR, Brasil), agulhas descartáveis 25 X 7 (BD PrecisionGlide[®] - 22G, Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR, Brasil), lâmina de bisturi descartável n. 10, cabo de bisturi, porta-agulhas de Mayo-Hegar, tesoura de Metzemaum curva, fio de sutura de nylon monofilamento preto 6-0 com agulha (BRASUTURE Ind Com Imp Exp Ltda, São Sebastião da Grama, SP, Brasil), gaze estéril, mesa cirúrgica para ratos, pincel para aplicação de adesivo e espátula para resina composta.

Aparelhos: fotopolimerizador (Gnatus[®]), capela para exaustão de gases (Ideoxima Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto-SP), *pulp tester* elétrico Vitality Scanner modelo 2006 (Analytic Technology, Redmond, EUA) e analgesímetro digital von Frey (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e gaiolas para analgesímetro de von Frey (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil),.

4.4 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES LIPOSSOMAIS

A preparação das suspensões lipossomais foi realizada sob orientação da Profa. Dra. Eneida de Paula, no laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP.

A partir de uma solução estoque em clorofórmio, foram retiradas alíquotas de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol (na proporção molar de 4:3:0,07), que foram submetidas à secagem por evaporação sob fluxo de N₂ seguido de vácuo por 2 h, à temperatura ambiente (Boogaerts *et al.*, 1993 a,b; Fraceto *et al.*, 2002). Após esse procedimento foi adicionado tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 com NaCl 154 mM, seguido de agitação em vórtex por 5 minutos. Com esse método, conhecido como hidratação de filme seco, obteve-se uma suspensão com vesículas multilamelares concêntricas (concentração lipídica 8 mM), a qual foi utilizada como controle. A partir dessa suspensão obteve-se a formulação lipossomal multilamelar de mepivacaína 3% pela incorporação de cloridrato de mepivacaína. A porcentagem de encapsulação da mepivacaína foi de 36%.

A suspensão unilamelar foi obtida a partir da suspensão multilamelar, que foi filtrada, sob pressão de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 12 vezes em um extrusor (Extrusor Lipex Biomembranes Inc.), composto de um disco de drenagem e duas membranas de policarbonato (Poretics) com poros de 0,4 µm, obtendo-se assim vesículas unilamelares de 0,4 µm. Após esse processo, os lipossomas (com concentração lipídica de 8 mM) foram mantidos em repouso por 2 h, para o intumescimento das vesículas. Essa preparação foi utilizada no lado controle. A partir dessa suspensão, obteve-se a formulação lipossomal unilamelar de mepivacaína 3% pela incorporação de cloridrato de mepivacaína.

As formulações lipossomais uni e multilamelares foram preparadas em câmara de fluxo laminar (com materiais e soluções autoclavados a 1 atm e 121°C, por 20 min.) e após o preparo foram esterilizadas em autoclave (Cereda *et al.*, 2006).

Previamente às injeções anestésicas, os pHs das suspensões lipossomais e da preparação comercial foram aferidos, em triplicata, com pHmetro (ORION[®], modelo 290^a) 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.

4.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANESTÉSICA

4.5.1 Bloqueio do Nervo Infraorbital

O bloqueio do nervo infraorbital no rato foi adaptado de Fink *et al.* (1975), e é usado para avaliar a eficácia anestésica em tecido mole da região orofacial (lábio superior), permitindo obtenção de resultados altamente reprodutíveis.

Injeção das soluções

Foram utilizados neste estudo 30 ratos, sendo 10 animais para cada preparação anestésica e respectivo controle, conforme descrito no item 4.2.

Após sedação leve com tiopental (25 mg/kg) por via intraperitoneal, e comprovação de que o animal respondia à estimulação dolorosa através da preensão da cauda, cada rato recebeu 0,1 mL de uma das formulações contendo mepivacaína próximo

ao forame infraorbital do lado direito. O lado esquerdo serviu como controle (cada animal foi seu próprio controle), recebendo o mesmo volume da respectiva formulação controle.

A agulha (13 x 4,5 mm) foi introduzida no fórnice do vestíbulo entre o incisivo e o primeiro molar, mais próximo desse último, em direção ao forame infraorbital, localizado logo abaixo da órbita.

Avaliação da anestesia

A avaliação da anestesia foi realizada por pinçamento vigoroso no lábio do animal, sendo atribuído os escores 0 para presença de resposta aversiva e 1 para ausência de resposta. Este teste foi realizado a cada 5 minutos até que o animal apresentasse o primeiro sinal de resposta aversiva.

4.5.2 Bloqueio do Nervo Alveolar Inferior

Neste modelo, descrito por Silva *et al.* (2009), os animais são submetidos a anestesia geral para colocação de fios de cobre na superfície oclusal dos molares inferiores, permitindo a aplicação de estímulo elétrico para avaliação da anestesia pulpar.

Neste experimento foram utilizadas as mesmas formulações usadas no bloqueio do nervo infraorbital, com a mesma distribuição de aplicação, formulações contendo mepivacaína no lado direito e controles sem anestésico no lado esquerdo (Figura 1). Foram utilizados 51 ratos, distribuídos em 3 grupos, conforme delineamento experimental mostrado na Figura 1.

Os animais foram submetidos à anestesia geral com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (90 mg/kg) administradas por via intramuscular. Dois fios de cobre com as extremidades desencapadas foram fixados (um de cada lado) na superfície oclusal dos molares inferiores dos ratos, com resina composta fotopolimerizável, ficando assim uma extremidade em contato com os molares inferiores e a outra fora da cavidade oral. A fixação dos fios foi realizada da mesma forma utilizada em restaurações com resina fotopolimerizável em humanos, com condicionamento do esmalte dental com ácido fraco (gel de ácido fosfórico a 37%), lavagem com água, secagem com jato de ar, aplicação do

sistema adesivo, polimerização do mesmo com luz emitida por fotopolimerizador, aplicação da resina e polimerização da mesma (Guedes-Pinto & Issáo, 2006).

Como o animal apresenta pequena abertura bucal, a fixação dos fios permite a aplicação de estímulo elétrico aos dentes dos animais, facilitando a avaliação dos parâmetros da anestesia.

Após retorno da anestesia geral, os animais foram sedados com tiopental (25 mg/kg) por via intraperitoneal, mantendo reação a estímulos dolorosos (preensão da cauda), permitindo assim a avaliação da percepção de dor ao estímulo elétrico aplicado ao dente.

Após verificação da sedação do animal e resposta à preensão da cauda, os molares inferiores de ambos os lados foram testados através da aplicação do estímulo elétrico (com uso do aparelho “pulp tester”) na extremidade do fio externa à cavidade oral do animal. Este teste foi considerado como sendo o limiar basal de cada lado do animal (média de três medições de cada lado). Após as medições basais, foram aplicados 0,2 mL de uma das formulações anestésicas, no lado direito, próximo ao forame mandibular dos animais para bloqueio do nervo alveolar inferior. O lado esquerdo recebeu o mesmo volume da formulação controle respectiva e serviu como controle negativo.

Após a injeção, os estímulos elétricos foram aplicados a cada 2 minutos durante os primeiros 10 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.

Técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI)

A técnica realizada nesse experimento (Silva *et al.*, 2009) consiste na introdução de cerca de 11 a 13 mm de uma agulha 13 x 4,5 pela face medial da mandíbula, na região do ângulo mandibular, formando um ângulo de 30 a 45° com a base da mandíbula. A agulha é introduzida por via extra-oral na porção interna da base da mandíbula, até a posição final, próximo ao forame mandibular, onde a formulação

anestésica é injetada. A Figura 2 mostra a posição final de injeção da formulação nessa técnica.



Fig. 2. Posição da agulha na técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior, desenvolvida por Silva *et al.* (2009).

Avaliação das anestésias

Foram avaliados os parâmetros latência, duração e grau de sucesso da anestesia por meio da aplicação de estímulo elétrico aos dentes com auxílio do aparelho “pulp tester”, o qual emite corrente elétrica de forma alternada, aumentando gradualmente a voltagem até 300 V (sendo este aumento mostrado na tela do aparelho em uma escala arbitrária que vai de 0 a 80) (Dreven *et al.*, 1987). O estímulo é emitido de automática, assim que o eletrodo é colocado em contato com o esmalte dental ou superfície que conduza corrente elétrica. A corrente emitida estimula as fibras nervosas sensoriais pulpares (Certosimo & Archer, 1996), sendo a percepção do estímulo (dor) caracterizada por movimento corporal repetitivo do animal (erguer a cabeça, movimentar os músculos faciais ou as vibríças), sendo então desconectado o eletrodo do fio de cobre acoplado ao dente do animal.

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

- **Tempo de latência:** intervalo de tempo entre o final da injeção da formulação anestésica e o início de ausência de resposta ao teste elétrico.

- Duração da anestesia: tempo entre o início da anestesia e o tempo imediatamente anterior ao de obtenção de duas respostas aversivas consecutivas, ou seja, intervalo de tempo no qual o animal não apresenta resposta ao estímulo elétrico máximo emitido pelo aparelho.
- Sucesso da anestesia: a anestesia foi considerada como sucesso quando o animal apresentava latência de no máximo 10 minutos e permanecia anestesiado por pelo menos 10 minutos.

4.5.3 Infiltração Subcutânea em Ferida Cirúrgica

Neste experimento foi utilizado o modelo de resposta de retirada da pata a estímulo nociceptivo através da aplicação de força com analgesímetro eletrônico de von Frey, após desenvolvimento de hipernocicepção decorrente de ferida cirúrgica, metodologia modificada por Grant *et al.* (1997) a partir do modelo descrito por Vandermeulen *et al.* (1994) e Brennan *et al.* (1996).

Foram utilizados 48 ratos, sendo 8 por grupo de estudo (Figura 1). Os animais foram mantidos da forma usual, em gaiolas plásticas com cama de maravalha (proveniente de pinus, sem contato externo), água e ração à vontade, em sala com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e períodos claro/escuro estabelecidos em 12 h.

No primeiro dia de experimento os ratos foram colocados em gaiolas plásticas (23 x 20 x 18 cm - largura x profundidade x altura) com fundo aramado (trama de 0,5 x 0,5 cm) para permitir a passagem do dispositivo do analgesímetro de von Frey, com o qual é aplicada força na pata do animal. Essas gaiolas possuem um espelho angulado abaixo do fundo aramado, permitindo a observação do animal. Cada animal foi colocado em uma gaiola por 15-20 min para condicionamento. Após esse período foi avaliada a sensibilidade basal da pata traseira direita pela aplicação de força com intensidade crescente (variando de 0,0073 N a 0,456 N) com o analgesímetro de von Frey. A aplicação da força foi realizada pela parte inferior da gaiola, sendo interrompida quando o animal levantava a pata ao estímulo ou não respondia ao estímulo máximo (0,456 N) aplicado. Este teste foi realizado em triplicata, em intervalos de 5 min. Nessa primeira avaliação os animais que não

levantavam a pata no intervalo de força descrito foram descartados do estudo. Foi considerada como sensibilidade basal a média das três medidas que eliciaram o reflexo de elevação da pata.

Em seguida os animais foram anestesiados com isoflurano (colocado em um algodão no fundo de um béquer), em uma capela com exaustão, e submetidos à incisão na superfície plantar da pata traseira direita. A incisão foi realizada com lâmina de bisturi n.10, (1 cm de extensão por 3 mm de profundidade) e suturada com 3 pontos de sutura (fio de nylon 6-0). A extensão da incisão foi padronizada por meio de paquímetro, medindo diretamente na pata do animal; a padronização da profundidade foi realizada com auxílio do próprio chanfro da lâmina de bisturi. Como o chanfro mede 4 mm, durante a incisão a lâmina foi introduzida de forma a deixar 1 mm deste para fora dos tecidos.

Após esse procedimento os animais foram colocados em gaiolas plásticas com cama de maravalha, onde permaneceram até o dia seguinte, com água e alimentação a vontade.

Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram novamente colocados nas gaiolas com fundo aramado, e permaneceram por 15-30 min para condicionamento. Em seguida, a sensibilidade da pata traseira direita foi testada em intervalos de 5 min pela aplicação de força com o analgesímetro de von Frey (com intensidade crescente variando de 0,0073 N a 0,456 N, como descrito anteriormente) lateralmente à incisão. A resposta foi considerada hiperalgésica (hipernocicepção) se a retirada da pata ocorria com a aplicação de força 20% menor que a observada na sensibilidade basal. De acordo com Grant *et al.* (1997), os animais que não apresentassem hipernocicepção deveriam ser descartados do estudo.

Os ratos com hipernocicepção foram divididos em 6 grupos (8 animais/grupo) e receberam, ao lado da incisão na pata traseira direita, a injeção de 0,1 mL de uma das formulações contendo mepivacaína ou controle, conforme descrito no item 4.2 e mostrado na Figura 1.

Cinco minutos após a infiltração das preparações foi iniciada a aplicação de força com o analgesímetro de von Frey da forma já descrita, com força crescente até o animal apresentar o reflexo de retirada da pata ou até a aplicação da força máxima de 0,456

N. A aplicação da força na pata traseira direita foi realizada lateralmente à incisão, ou seja, no local de aplicação das preparações. Os testes foram aplicados a cada 10 minutos.

A ausência de reflexo de retirada da pata (elevação da pata) foi considerada como anestesia local completa. A duração da anestesia foi considerada como o tempo decorrido entre a infiltração da preparação até o último tempo no qual o animal não apresentou reflexo de retirada da pata.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do software BioEstat 5.0 para Windows® (Instituto Mamirauá, Belém, PA).

Para a avaliação dos resultados foram utilizados os seguintes testes: Log-Rank (sucesso da anestesia nos bloqueios do nervo infraorbital e alveolar inferior e na infiltração subcutânea em ferida cirúrgica), Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls (duração da anestesia no bloqueio do nervo infraorbital, latência no bloqueio do nervo alveolar inferior e duração da anestesia no modelo de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica) e Tukey (duração da anestesia no bloqueio do nervo alveolar inferior).

5 RESULTADOS

A média e o desvio padrão do pH das formulações estudadas foram 3,94 ($\pm 0,07$), 5,09 ($\pm 0,01$), 5,71 ($\pm 0,25$), e 7,02 ($\pm 0,02$) respectivamente para as formulações de mepivacaína com epinefrina, mepivacaína encapsulada em lipossoma multilamelar, mepivacaína encapsulada em lipossoma unilamelar e soro fisiológico.

Em todos os modelos estudados não foi observada anestesia nos locais injetados com as formulações controle.

5.1 BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL

Todos os animais apresentaram anestesia no lábio superior no lado que recebeu as formulações contendo mepivacaína, desde o primeiro tempo de avaliação.

As Figuras 3 e 4 mostram o sucesso e a duração da anestesia, respectivamente. A formulação de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepi-Epi) apresentou maior taxa de sucesso ($p < 0,05$, teste de Long Rank) e de duração da anestesia ($p < 0,05$, testes de Kruskal Wallis e Student-Newman-Keuls) que as formulações lipossomais unilamelar (Mepi-LUV) e multilamelar (Mepi-MLV) de mepivacaína 3%, sem diferenças entre estas ($p > 0,05$).

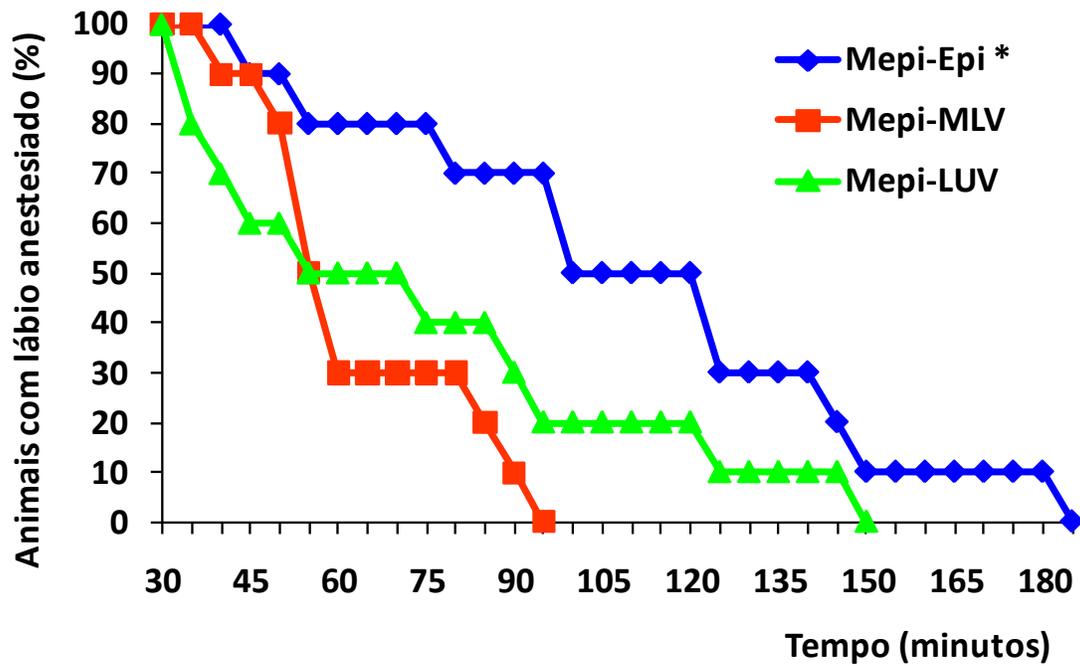


Figura 3. Porcentagem de animais apresentando o lábio superior anestesiado ao longo do tempo, após bloqueio do nervo infraorbital com formulações lipossomais unilamelar (Mepi-LUV) e multilamelar (Mepi-MLV) de mepivacaína 3% e mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepi-Epi) (10 animais/grupo; Log-Rank, * $p < 0,05$ para a Mepi-Epi em relação às demais formulações).

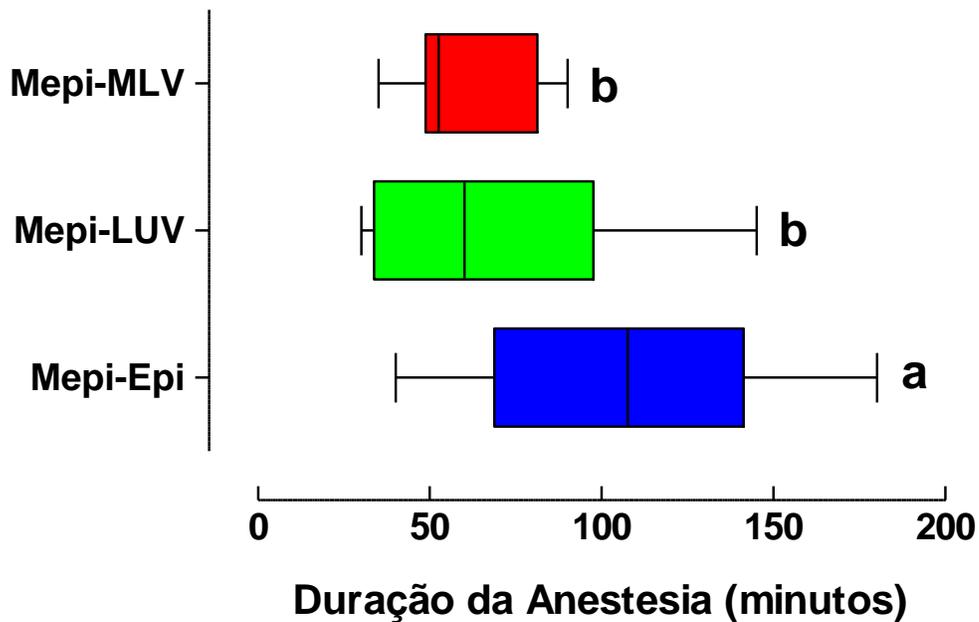


Figura 4. Duração da anestesia (em minutos) após bloqueio do nervo infraorbital, em ratos, com formulações lipossomais unilamelar (Mepi-LUV) e multilamelar (Mepi-MLV) de mepivacaína 3% e mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepi-Epi). (Linha central: mediana; caixa: 1^o e 3^o quartis; suíças: valores máximo e mínimo) (10 animais/grupo; Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls; letras distintas: $p < 0,05$).

5.2 BLOQUEIO DO NERVO ALVEOLAR INFERIOR

Os resultados de latência da anestesia após bloqueio do nervo alveolar inferior com as formulações de mepivacaína são mostrados na Figura 5. Não foram observadas diferenças entre as formulações ($p > 0,05$, teste de Kruskal Wallis).

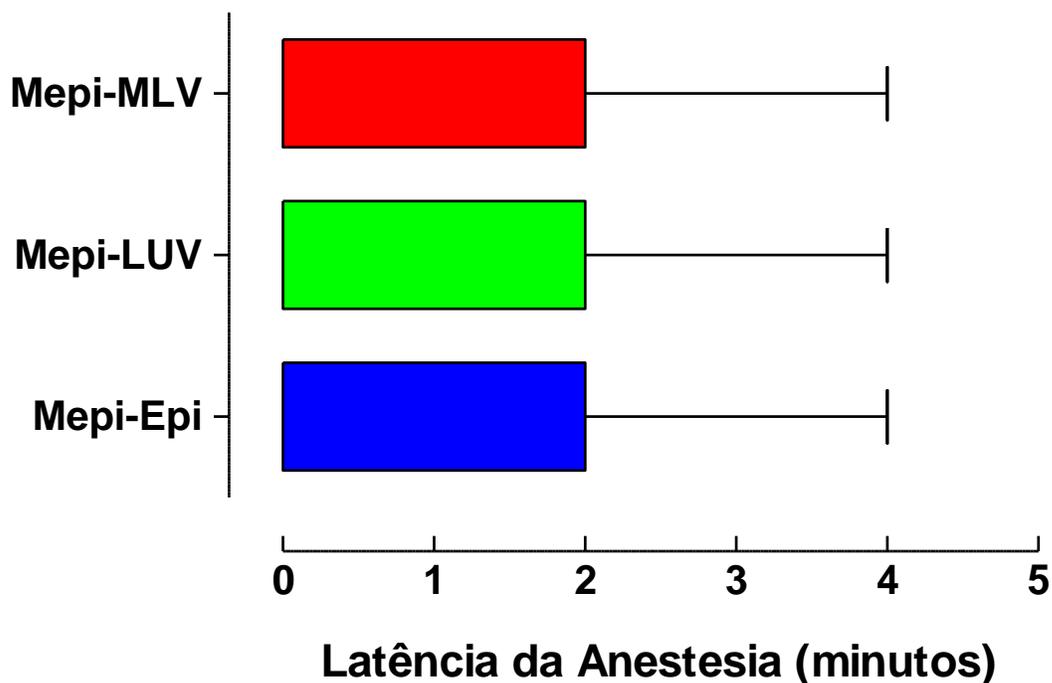


Figura 5. Latência da anestesia (mediana e desvio interquartílico, em minutos) após bloqueio do nervo alveolar inferior, em ratos, com formulações lipossomais unilamelar (Mepi-LUV) e multilamelar (Mepi-MLV) de mepivacaína 3% e mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepi-Epi) (n= 16 a 18/grupo; Kruskal-Wallis; $p>0,05$).

As Figuras 6 e 7 mostram, respectivamente, os resultados de sucesso e duração da anestesia após o bloqueio do nervo alveolar inferior nos animais. A solução de mepivacaína com epinefrina apresentou maior taxa de sucesso ($p<0,0001$, teste de Log-Rank) e de duração da anestesia ($p<0,05$, teste de Tukey) que as formulações lipossomais. Não foram observadas diferenças entre estas últimas para os dois parâmetros avaliados ($p>0,05$).

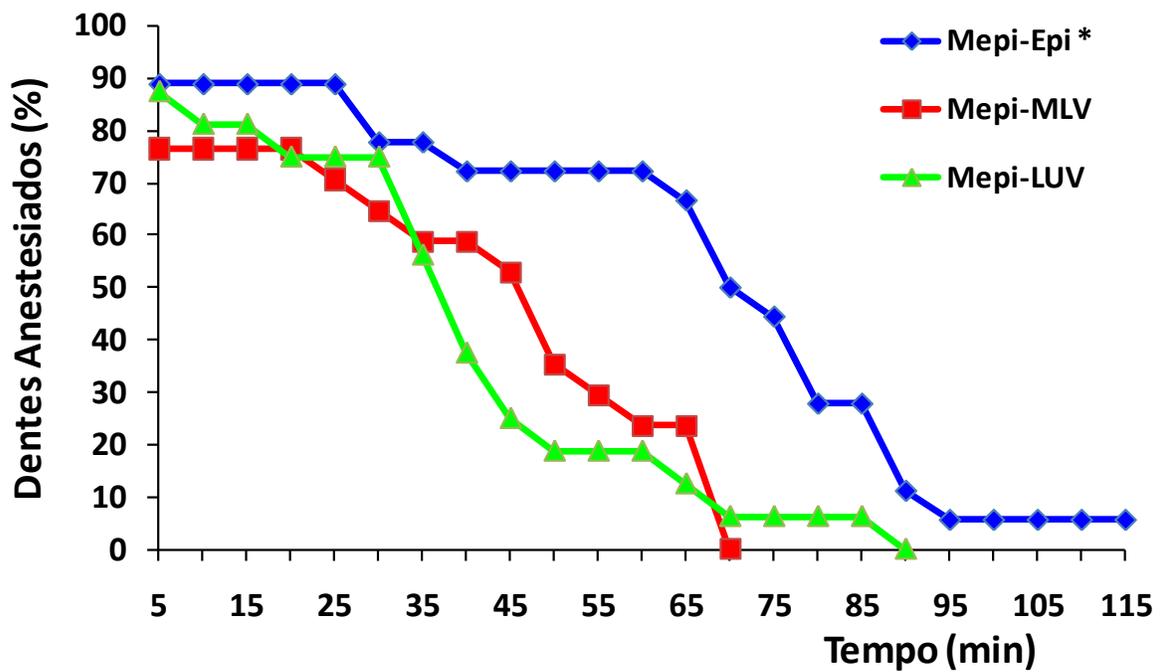


Figura 6. Porcentagem de animais apresentando os molares inferiores do lado direito anestesiados, após bloqueio do nervo alveolar inferior com formulações lipossomais unilamelar (Mepi-LUV) e multilamelar (Mepi-MLV) de mepivacaína 3% e mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepi-Epi) (n= 16 a 18/grupo; Log-Rank, * p<0,0001 para a Mepi-Epi em relação às demais formulações).

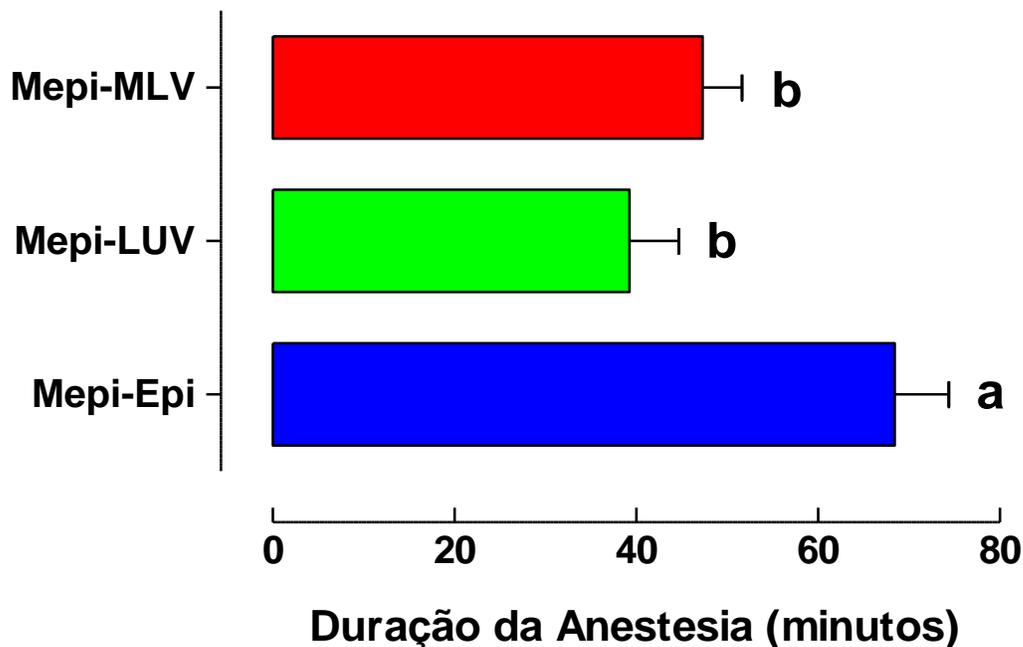


Figura 7. Duração da anestesia (média e erro padrão da média, em minutos) após bloqueio do nervo alveolar inferior, em ratos, com formulações lipossomais unilamelar (Mepi-LUV) e multilamelar (Mepi-MLV) de mepivacaína 3% e mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepi-Epi). (n= 16 a 18/grupo; Tukey; letras distintas: $p < 0,05$).

5.3 INFILTRAÇÃO SUBCUTÂNEA EM FERIDA CIRÚRGICA

Todos os animais deste estudo apresentaram redução de pelo menos 20% na sensibilidade à aplicação de força pelo analgesímetro de von Frey 24 h após a indução de inflamação na pata traseira direita. Desta forma, nenhum animal foi descartado.

Os resultados de sucesso e duração da anestesia após infiltração das formulações lipossomais unilamelar (Mepi-LUV) e multilamelar (Mepi-MLV) de mepivacaína 3% e mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepi-Epi) ao lado da ferida cirúrgica são mostrados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Da mesma forma que para o bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior, também neste modelo de estudo a solução de mepivacaína com epinefrina apresentou maior taxa de sucesso ($p < 0,05$, teste de Log-Rank) e de duração da anestesia ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls) que as formulações de mepivacaína encapsulada em lipossomas. Não foram observadas diferenças entre as formulações de mepivacaína encapsulada em lipossomas unilamelares e multilamelares para os dois parâmetros avaliados ($p > 0,05$).

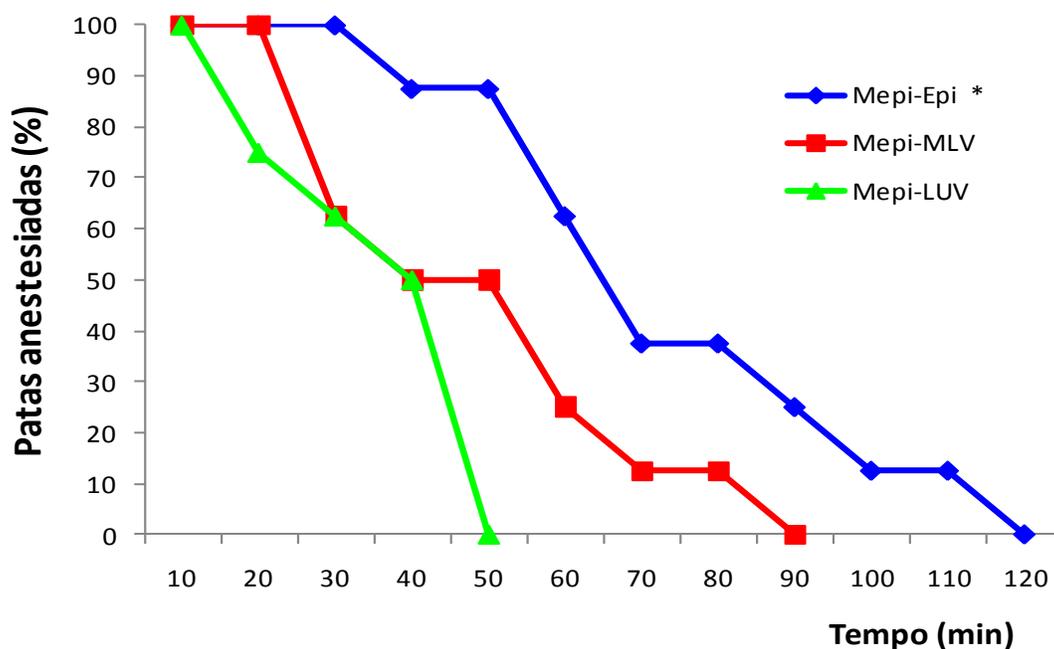


Figura 8. Porcentagem de animais apresentando anestesia na pata traseira direita (submetida a inflamação), após injeção das formulações lipossomais unilamelar (Mepi-LUV) e multilamelar (Mepi-MLV) de mepivacaína 3% e mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepi-Epi) (8 animais/grupo; Log-Rank, * $p < 0,05$ para a Mepi-Epi em relação às demais formulações).

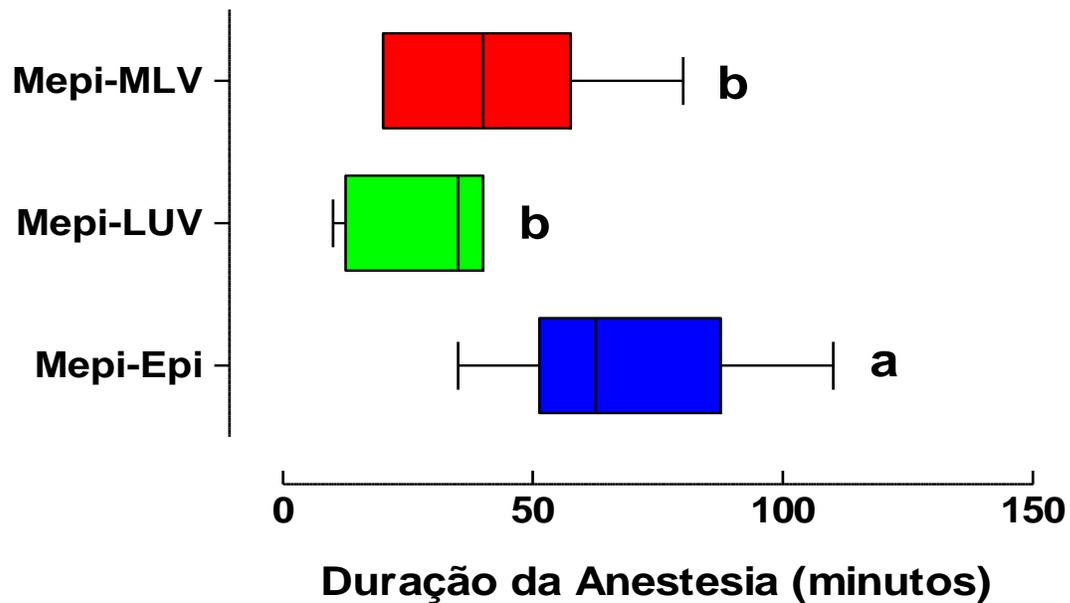


Figura 9. Duração da anestesia (em minutos) após injeção das formulações lipossomais unilamelar (Mepi-LUV) e multilamelar (Mepi-MLV) de mepivacaína 3% e mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepi-Epi) nas patas submetidas a inflamação. (Linha central: mediana; caixa: 1^o e 3^o quartis; suíças: valores máximo e mínimo). (8 animais/grupo; Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls; letras distintas: $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Estudos anteriores comprovaram a eficácia da encapsulação de mepivacaína em lipossomas unilamelares, com concentração lipídica 5 mM, em aumentar a duração da anestesia em bloqueio do nervo ciático em camundongos (de Araújo *et al.*, 2004) e do nervo infraorbital em ratos (Cereda *et al.*, 2006), quando comparada à solução de mepivacaína sem aditivos. Resultados semelhantes foram obtidos também para a lidocaína e prilocaína em bloqueio do nervo infraorbital de ratos (Cereda *et al.*, 2006) e para a ropivacaína nos bloqueios do nervo infraorbital em ratos e do nervo ciático em camundongos (de Araújo *et al.*, 2008).

Entretanto, embora possa haver aumento significativo da duração da anestesia com a encapsulação, este sistema não é potente o bastante para aumentar a anestesia de forma a tornar a formulação equivalente à solução de mepivacaína com epinefrina. Mesmo tendo sido usada neste estudo concentração lipídica maior, e ainda lipossomas com várias bicamadas que poderiam proporcionar liberação continuada do anestésico por tempo maior (Grant & Bansinath, 2001), as formulações lipossomais avaliadas no presente estudo apresentaram menor eficácia que a solução contendo epinefrina. Deve-se ter em conta também que a concentração de mepivacaína nas formulações lipossomais estudadas foi maior que a da solução de mepivacaína com epinefrina.

No presente estudo não foi incluída para comparação a formulação de mepivacaína sem aditivos porque esta apresenta aplicação clínica limitada. É digno de nota ainda que Cereda *et al.* (2004), apesar de terem observado aumento da duração da prilocaína encapsulada em lipossomas em relação à prilocaína sem aditivos, não observaram diferença quando a formulação lipossomal foi comparada à solução de prilocaína com felipressina. No presente estudo, a formulação com vasoconstritor foi mais eficaz que as lipossomais, o que deve ser creditado, provavelmente, à maior potência vasoconstritora da epinefrina em comparação à da felipressina.

Da mesma forma que Cereda *et al.* (2004 e 2006), que avaliaram formulações de lidocaína, prilocaína e mepivacaína encapsuladas em lipossomas e sem aditivos, em

bloqueio do nervo infraorbital, no presente estudo todos os animais apresentaram anestesia do lábio superior já no primeiro tempo de avaliação, sem diferença entre as formulações. Isso mostra que mesmo nas formulações lipossomais havia quantidade de anestésico não encapsulado em quantidade suficiente para produzir bloqueio imediato da condução do impulso nervoso nos estudos citados.

O modelo de bloqueio do nervo infraorbital, apesar de ser realizado na região orofacial avalia apenas a anestesia em tecido mole, no lábio superior. Para poder avaliar a eficácia das formulações lipossomais quanto à anestesia pulpar foi também utilizado no presente estudo o modelo de bloqueio do nervo alveolar inferior, idealizado por Silva *et al.* (2009).

No bloqueio do nervo alveolar inferior não foram observadas diferenças no tempo de latência entre as formulações. Embora a solução de mepivacaína com epinefrina tenha apresentado pH menor que as demais, é provável que o próprio tecido no qual as formulações foram injetadas tenha conseguido tamponar de forma eficiente esse pH mais baixo, fazendo com que uma proporção suficiente de moléculas de anestésico estivessem na forma não ionizada e, portanto, disponíveis para atravessar a membrana axoplasmática. Uma vez no axoplasma, onde o pH é 7,4, houve novamente o equilíbrio entre moléculas não ionizadas e ionizadas. Estas últimas constituem a forma capaz de se ligar à porção interna do canal de sódio, promovendo o bloqueio do impulso nervoso (Strichartz & Ritchie, 1987).

Outro fator que também pode afetar a latência é a distância do local de injeção (Moore & Hersh, 2010). No presente estudo é possível inferir que as formulações foram injetadas bem próximas ao nervo alveolar inferior, pois a mediana foi de 2 minutos para as três formulações, ou seja, já no primeiro tempo de avaliação a maioria dos animais já apresentava anestesia nos molares inferiores. Apenas 19% dos animais que receberam mepivacaína com epinefrina apresentavam latência maior ou igual a 6 minutos; dos animais que receberam formulação lipossomal, apenas 7% (com cada formulação) apresentaram latência maior que 6 minutos.

Com relação às formulações lipossomais, considerando a encapsulação máxima de 36% para formulações com concentração lipídica de 8 mM, utilizada no presente estudo, tem-se 64% das moléculas na forma livre, passíveis portanto de exercerem ação imediata, o que pode explicar a ausência de diferença entre as formulações.

Estudos com o mesmo modelo animal de bloqueio do nervo alveolar inferior também não relataram diferença na latência entre formulações anestésicas associadas a vasoconstritores, sem aditivos ou encapsuladas em lipossomas (com concentração lipídica 5 mM ou 4 mM) (Gayoso, 2009; Bhering, 2010).

Gayoso (2009), ao comparar formulações de prilocaína lipossomal unilamelar (pH 6,5), prilocaína sem aditivos (pH 5,2) e prilocaína com felipressina (pH 4,25), também observou latência de 2 minutos para todas as formulações, sendo que apenas 28% dos animais apresentaram latência de 6 minutos com a formulação contendo vasoconstritor. Bhering (2010), por sua vez, relatou medianas de 2 minutos para as soluções de ropivacaína sem aditivos e com epinefrina e de 4 minutos para a suspensão lipossomal de ropivacaína, sem diferença estatística entre as formulações.

Com relação à anestesia pulpar, Bhering (2010) e Berto (2010) observaram maior duração de anestesia nos molares dos animais quando a epinefrina estava associada ao sal anestésico. No estudo de Berto (2010) foram comparadas articaína 4% com epinefrina 1:100.000, articaína 3% lipossomal, articaína 4% lipossomal, articaína 4% e articaína 3%. Neste último estudo, embora as formulações lipossomais (com concentração lipídica de 4 mM) tenham apresentado maior duração de anestesia pulpar que as formulações sem aditivos, todas foram menos eficazes que a solução contendo epinefrina.

Esses resultados são semelhantes aos observados em humanos, em técnica infiltrativa na maxila, com as formulações lipossomais de mepivacaína (Tófoli *et al.*, 2011), ropivacaína (Franz-Montan *et al.*, 2011) e de prilocaína (Wiziack Zago *et al.*, 2011), as quais não apresentaram diferença significativa na latência, mas demonstraram menor eficácia anestésica que as soluções contendo vasoconstritor, epinefrina ou felipressina.

A concentração de mepivacaína nas formulações lipossomais avaliadas no presente estudo foi escolhida com base no estudo de Tófoli *et al.* (2011). Estes autores

observaram, em infiltração na maxila de humanos, que a mepivacaína 3% encapsulada em lipossomas unilamelares proporcionou maior duração de anestesia que a mepivacaína 3% sem aditivos e que a formulação de mepivacaína 2% encapsulada em lipossomas unilamelares, sem diferença entre estas duas últimas. Entretanto, todas promoveram duração de anestesia menor que a solução de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000. Assim, no presente estudo foram estudadas formulações lipossomais uni e multilamelares com maior concentração lipídica (8 mM) que a utilizada por Tófoli *et al.* (2011) (5 mM) e com a concentração de mepivacaína mais eficaz relatada por estes autores. Da mesma forma que demonstrado no estudo de Tófoli *et al.* (2011), no presente estudo a solução de mepivacaína com epinefrina 1:100.000 promoveu maior duração de anestesia pulpar que as formulações lipossomais.

Embora a maior concentração lipídica e o maior número de bicamadas possam promover liberação mais lenta das moléculas de anestésico local e aumentar seu efeito no local injetado (Grant & Bansinath, 2001), os lipossomas não apresentam vasoatividade. Assim, à medida que as moléculas de anestésico local são liberadas para o tecido, apresentam o mesmo comportamento de um anestésico local sem aditivos. Nessa condição, dependendo da capacidade vasodilatadora do anestésico local, o número de moléculas liberadas pelos lipossomas pode não ser suficiente para o aumento da duração da anestesia pulpar (Wiziack Zago *et al.*, 2011), o que pode explicar a maior taxa de sucesso e duração da solução contendo epinefrina como vasoconstritor.

O terceiro experimento (Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica) foi baseado nos estudos de Vandermeulen *et al.* (1994) e Brennan *et al.* (1996), adaptado por Grant *et al.* (1997), que analisaram a resposta da retirada da pata do animal frente a estímulos nociceptivos através da aplicação de força com filamentos de von Frey após o desenvolvimento de hipernocicepção em ferida cirúrgica plantar.

O experimento de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, assim como o bloqueio do nervo infraorbital, também avalia a anestesia em tecidos moles, embora em região e com técnica anestésica diferentes. O experimento do nervo infraorbital avalia técnica de bloqueio na região orofacial, enquanto o da ferida cirúrgica na pata avalia infiltração próxima a terminações nervosas na região plantar, em tecido inflamado. No

presente estudo, todos os animais submetidos à ferida cirúrgica apresentaram hipernocicepção, considerada como redução de pelo menos 20% no valor de sensibilidade à força com o analgesímetro em relação à apresentada pelo animal antes da realização da ferida cirúrgica.

O estímulo inflamatório desencadeia uma série de eventos podendo resultar em alterações no sistema nervoso periférico, promovendo sensibilização de nociceptores, e, ainda, alterações em nível central, com aumento da atividade dos neurônios do corno dorsal (Brennan *et al.*, 2005)

Embora possa haver variação entre espécies e também em relação ao estímulo causador da inflamação, em ratos e camundongos, após o estímulo inflamatório inicial (como a administração de carragenina, por exemplo) ocorre a liberação de uma cascata de citocinas, sendo inicialmente liberada a TNF- α , a qual estimula a liberação de IL-1 β . Em sequência final estão as prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas, responsáveis pelo aumento da excitabilidade neuronal (por ativação dos segundos mensageiros). O aumento da excitabilidade dos nociceptores pode ser medido pela diminuição do limiar de resposta a estímulo mecânico, como a força exercida pelo analgesímetro de von Frey (Cunha *et al.*, 2005).

Em decorrência da inflamação, também ocorre vasodilatação local e diminuição do pH tecidual, que pode passar de 7,4 a 6,0 (Malamed, 2005). Apesar desta possível alteração de pH, que poderia retardar o início do efeito anestésico, todas as formulações promoveram anestesia já no primeiro tempo de avaliação, da mesma forma que no estudo de bloqueio do nervo infraorbital. Possivelmente o tempo de espera entre o final da injeção e a primeira avaliação tenha sido longo o suficiente, impedindo assim que a interferência do pH fosse notada. Entretanto, o tempo de espera não poderia ser menor, uma vez que o animal precisava ser recolocado na gaiola com fundo aramado para observação e deveria ter um mínimo de tempo antes de ser avaliado.

Neste modelo, Grant *et al.* (1997) observaram aumento da duração da anestesia de 23 min com a administração de bupivacaína 0,5% sem aditivos, para 180 min com a bupivacaína 2% encapsulada em lipossomas multilamelares. Em camundongos, Grant *et al.*

(2003) relataram aumento da duração da anestesia (avaliada como ausência de vocalização do animal à aplicação de estímulo elétrico na pele do abdômen) de 1 h para 3 h, 6 h e 26 h, após injeção subcutânea com formulações de bupivacaína 0,5% sem aditivos e bupivacaína 0,5%, 1% e 2% encapsulada em lipossomas multivesiculares grandes, respectivamente. Nestes dois estudos não foi avaliada formulação contendo vasoconstritor.

O aumento da eficácia da bupivacaína encapsulada em lipossomas multilamelares em relação à formulação contendo vasoconstritor foi relatado por Boogaerts *et al.* (1994). Estes autores observaram aumento da duração da analgesia pós-operatória (entendida como período sem dor) com a injeção epidural de bupivacaína encapsulada em lipossomas multilamelares em comparação à bupivacaína associada à epinefrina 1:200.000. Neste estudo, entretanto, não houve randomização dos tratamentos e nem cegamento na avaliação dos resultados. Além disso, foram comparados pacientes submetidos a vários tipos de cirurgias, que podem resultar em graus diversos de sensibilidade dolorosa.

No presente trabalho, conforme observado nos modelos de bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior, também na infiltração subcutânea em ferida cirúrgica foram observadas sucesso e duração de anestesia maiores com a solução de mepivacaína com epinefrina do que com as formulações de mepivacaína encapsulada em lipossomas.

Em consonância com os resultados obtidos anteriormente em técnica infiltrativa maxilar em humanos para a prilocaína (Wiziack Zago *et al.*, 2011), mepivacaína (Tófoli *et al.*, 2011) e ropivacaína (Franz-Montan *et al.*, 2011), os resultados do presente estudo mostram que não há vantagem no uso de anestésicos locais encapsulados em lipossomas, para injeção na odontologia, pois a associação com vasoconstritores, atualmente em uso, é mais potente e apresenta maior tempo de estabilidade. As soluções contendo vasoconstritor podem ser armazenadas por 12 meses ou mais, sem alteração significativa na concentração do vasoconstritor (Ramacciato, 2003), enquanto que a suspensão lipossomal é estável por um mês, conforme demonstrado por Cereda *et al.* (2008) para a prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares.

Por outro lado, este tipo de sistema de liberação controlada de medicamentos pode ter futuro promissor para uso tópico, conforme já demonstrado nos estudos de Franz-Montan *et al.* (2007) e Baroni (2010).

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a encapsulação em lipossomas unilamelares e multilamelares foi menos eficaz que a epinefrina em aumentar a taxa de sucesso e a duração da anestesia promovidas pela mepivacaína.

REFERÊNCIAS*

1. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/default.asp>. Acesso em 02/01/2012.
2. Baluga JC, Casamayou R, Carozzi E, López N, Anale R, Borges R, Alvarez E, Baez C, Cedrés C, Guelfi C, Larrosa H, Sassi R, Polero Y. Allergy to local anaesthetics in dentistry. Myth or reality? *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2002; 30(1): 14-9.
3. Baroni DB. Eficácia anestésica da lidocaína encapsulada em lipossomas, em anestesia tópica palatina. Dissertação de mestrado, Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2010.
4. Batista da Silva C, Berto LA, Volpato MC, Ramacciato JC, Motta RH, Ranali J, Groppo FC. Anesthetic efficacy of articaine and lidocaine for incisive/mental nerve block. *J Endod*. 2010; 36(3): 438-41.
5. Berto LA. Eficácia anestésica da formulação lipossomal de articaína em ratos [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010 [acesso 2010 Set 23]. Disponível em: <http://cutter.unicamp.br/document/?code=000478868>.
6. Bhering CLB. Eficácia anestésica da preparação lipossomal de ropivacaína em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos [monografia]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010 [acesso 2011 Abr 07]. Disponível em: <http://cutter.unicamp.br/document/?code=000784594>.
7. Brkovic B, Todorovic L, Stojic D. Comparison of clonidine and epinephrine in lidocaine anaesthesia for lower third molar surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 34(4): 401-6.
8. Boogaerts J, Declercq A, Lafont N, Benameur H, Akodad EM, Dupont JC, Legros FJ. Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. *Anesth Analg*. 1993a; 76(3): 553-5.

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

9. Boogaerts JG, Lafont ND, Luo H, Legros FJ. Plasma concentrations of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome-associated and plain solutions to rabbits. *Can J Anaesth.* 1993b; 40(12): 1201-4.
10. 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.
11. Branco FP, Ranali J, Ambrosano GM, Volpato MC. A double-blind comparison of 0.5% bupivacaine with 1:200,000 epinephrine and 0.5% levobupivacaine with 1:200,000 epinephrine for the inferior alveolar nerve block. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101(4): 442-7.
12. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain.* 1996; 64(3): 493-501.
13. Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Mechanisms of Incisional Pain. *Anesthesiology Clin N Am.* 2005; 23: 1 – 20.
14. Brunetto PC, Ranali J, Ambrosano GM, de Oliveira PC, Groppo FC, Meechan JG, Volpato MC. Anesthetic efficacy of 3 volumes of lidocaine with epinephrine in maxillary infiltration anesthesia. *Anesth Prog.* 2008; 55(2): 29-34.
15. 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.
16. Cereda CM, de Araújo DR, Brunetto GB, de Paula E. Liposomal prilocaine: preparation, characterization and in vivo evaluation. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2004; 7: 235–40.
17. Cereda CM, Tófoli GR, de Brito Junior RB, de Jesus MB, Fraceto LF, Groppo FC, de Araujo DR, de Paula E. Stability and local toxicity evaluation of a liposomal prilocaine formulation. *J Liposome Res.* 2008;18(4):329-39.
18. Certosimo AJ, Archer RD. A clinical evaluation of the electric pulp tester as an indicator of local anesthesia. *Oper Dent.* 1996; 21(1): 25-30.
19. Cunha TM, Verri WA Jr, Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *Journal of Leukocyte Biology.* 2008 2; 83(4): 824-32.

20. Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102 (5): 1755-60.
21. Dahl JB, Moinich S, Kehlet H. Would infiltration with local anesthetics for postoperative pain relief. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994; 38: 7-14.
22. Davidson EM, Barenholz Y, Cohen R, Haroutiunian S, Kagan L, Ginosar Y. High-dose bupivacaine remotely loaded into multivesicular liposomes demonstrates slow drug release without systemic toxic plasma concentrations after subcutaneous administration in humans. *Anesth Analg*. 2010; 110(4): 1018-23.
23. Dreven LJ, Reader A, Beck M, Meyers WJ, Weaver J. An evaluation of an electric pulp tester as a measure of analgesia in human vital teeth. *Endod*. 1987;13(5):233-8.
24. de Araujo DR, Cereda CM, Brunetto GB, Pinto LM, Santana MH, de Paula E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. *Can J Anesth*. 2004; 51(6): 566-72.
25. de Araújo DR, Cereda CM, Brunetto GB, Vomero VU, Pierucci A, Neto HS, Oliveira ALR, Fraceto LF, Braga AFA, 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.
26. de Araújo DR, Pinto LMA, Braga AFA, de Paula E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: Aplicações Terapêuticas, *Rev. Bras. Anesthesiol*. 2003; 53(5): 653-61.
27. de Jong RH. *Local anesthetics*. 1. ed, St Louis: Mosby -Year Book, 1994.
28. de Paula E, Schreier S. Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1240(1): 25-33.
29. de Paula E, Schreier S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. *Braz J Med Biol Res*. 1996; 29(7): 877-94.
30. de Paula E, Cereda CM, Tofoli GR, Franz-Montan M, Fraceto LF, de Araújo DR. Drug delivery systems for local anesthetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2010; 4(1): 23-34.

31. Fink BR, Aasheim G, Kish SJ, Croley TS. Neurokinetics of lidocaine in the infraorbital nerve of the rat in vivo: Relation to sensory block. *Anesthesiology*. 1975; 42(6): 731-6.
32. 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.
33. Franz-Montan M, de Paula E, Groppo FC, Ranali J, Volpato MC.. Efficacy of liposome-encapsulated 0,5% ropivacaine in maxillary dental anaesthesia. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2011, doi: [10.1016/j.bjoms.2011.07.010](https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2011.07.010).
34. 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.
35. Gallatin E, Stabile P, Reader A, Nist R, Beck M. Anesthetic efficacy and heart rate effects of the intraosseous injection of 3% mepivacaine after an inferior alveolar nerve block. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000; 89(1):83-7.
36. Gayoso GR. Eficácia anestésica da prilocaína 3% lipossomal em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos [monografia]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009 [acesso 2011 Jul 1]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000771919>.
37. Grant GJ, Bansinath M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med*. 2001; 26(1): 61-3.
38. Grant GJ, Barenholz Y, Bolotin EM, Bansinath M, Turndorf H, Piskoun B, Davidson EM. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiology*. 2004; 101(1): 133-7.
39. Grant GJ, Lax J, Susser L, Zakowski M, Weissman TE, Turndorf H. Wound infiltration with liposomal bupivacaine prolongs analgesia in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997; 41(2): 204-7.
40. Grant GJ, Piskoun B, Bansinath M. Analgesic duration and kinetics of liposomal bupivacaine after subcutaneous injection in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003; 30(12): 966-8.

41. Grant SA. The Holy Grail: long-acting local anaesthetics and liposomes. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2002; 16(2): 345-52.
42. Guedes-Pinto AC, Issáo M. *Manual de Odontopediatria*. São Paulo: Editora Santos; 2006.
43. Haas, DA. An update on local anesthetics in dentistry. *J Can Dent Assoc.* 2002; 68(9): 546-51.
44. Hassan HG, Renck H, Lindberg B, Åkerman B, Hellquist R. Effects of adjuvants to local anaesthetics on their duration. I. Studies of dextrans of widely vary-ing molecular weight and adrenaline in rat infraorbital nerve block. *Acta Anaesthesiol Scand* 1985a; 29: 375–9.
45. Hassan HG, Renck H, Lindberg B, Lindquist B, Åkerman B. Effects of adjuvants to local anaesthetics on their duration. II. Studies of some substituted dex-trans and other macromolecules in rat infraorbital nerve block. *Acta Anaesthesiol Scand* 1985b; 29: 380–3.
46. Hawkins JM, Moore PA. Local anesthesia: advances in agents and techniques. *Dent Clin North Am.* 2002; 46(4): 719-32.
47. Hinkley SA, Reader A, Beck M, Meyers WJ. An evaluation of 4% prilocaine with 1:200,000 epinephrine and 2% mepivacaine with 1:20,000 levonordefrin compared with 2% lidocaine with:100,000 epinephrine for inferior alveolar nerve block. *Anesth Prog.* 1991; 38(3):84-9.
48. Kanaa MD, Whitworth JM, Corbett IP, Meechan JG. Articaine buccal infiltration enhances the effectiveness of lidocaine inferior alveolar nerve block. *Int Endod J.* 2009; 42(3):238-46.
49. Kuzma PJ, Kline MD, Calkins MD, Staats PS. Progress in the development of ultra-long-acting local anesthetics. *Reg Anesth.* 1997; 22(6): 543-51.
50. Lafont ND, Boogaerts JG, Legros FJ. Use of liposome-associated bupivacaine for the management of a chronic pain syndrome. *Anesth Analg.* 1994; 79(4): 818.
51. Lafont ND, Legros FJ, Boogaerts JG. Use of liposome-associated bupivacaine in a cancer pain syndrome. *Anaesthesia.* 1996; 51(6): 578-9.

52. Li H-L, Galue A, Meadows L, Ragsdale DS. A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. *Mol. Pharmacol.* 1999; 55: 134-141.
53. Malamed SF. *Manual de anestesia local*. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
54. 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.
55. Meechan JG, Jaber AA, Corbett IP, Whitworth JM. Buccal versus lingual articaine infiltration for mandibular tooth anaesthesia: a randomized controlled trial. *Int Endod J.* 2011; 44(7):676-81.
56. Moore PA, Hersh EV. Local anesthetics: pharmacology and toxicity. *Dent Clin North Am.* 2010; 54(4): 587-99.
57. Naftel JP, Richards LP, Pan M, Bernanke JM. Course and composition of the nerves that supply the mandibular teeth of the rat. *Anat Rec* 1999; 256(4): 433-47.
58. Napimoga MH, Souza GR, Cunha TM, Ferrari LF, Clemente-Napimoga JT, Parada CA, Verri WA Jr, Cunha FQ, Ferreira SH. 15d-prostaglandin J2 inhibits inflammatory hypernociception: involvement of peripheral opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 324(1): 313-21.
59. Nunes BS, Rensonnet NS, Dal-Secco D, Vieira SM, Cavada BS, Teixeira EH, Moura TR, Teixeira CS, Clemente-Napimoga JT, Cunha FQ, Napimoga MH. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009; 379(6): 609-16.
60. Oliveira PC, Volpato MC, Ramacciato JC, Ranali J. Articaine and lignocaine efficiency in infiltration anaesthesia: a pilot study. *Br Dent J.* 2004; 197(1):45-6.
61. Parada CA, Vivancos GG, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(5): 2923-8.
62. Pena-dos-Santos DR, Severino FP, Pereira SA, Rodrigues DB, Cunha FQ, Vieira SM, Napimoga MH, Clemente-Napimoga JT. Activation of peripheral kappa/delta opioid

- receptors mediates 15-deoxy-(Delta12,14)-prostaglandin J2 induced-antinociception in rat temporomandibular joint. *Neuroscience*. 2009; 163(4):1 211-9.
63. Porto GG, Vasconcelos BC, Gomes AC, Albert D. Evaluation of lidocaine and mepivacaine for inferior third molar surgery. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007 Jan 1; 12(1): E60-4.
 64. Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of state-dependent block of sodium channels by local anesthetics. *Science*. 1994; 265: 1724-1728.
 65. Ramacciato JC. Avaliação da estabilidade química das soluções anestésicas locais comerciais e das propriedades físicas dos tubetes sob diferentes condições de armazenamento Ramacciato [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2003 [Acesso 2012 Jan 11]. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=000299551>.
 66. Ramacciato JC, Groppo FC, Ranali J, Volpato MC, Tófoli GR. Os avanços da anestesia local em Odontologia. *Rev Assoc Pau Cir Dent*. 2003; 57(6): 455-59.
 67. Ramacciato JC, Motta RHL, Pereira LAP, Groppo FC, Volpato, MC. Anestesia local em odontologia. In: Fonseca AS, Ranali J, Andrade OS, organizadores. *Odontologia clínica para o exercício profissional diferenciado*. 1 ed. Nova Odessa : Napoleão, 2010, p. 169-185.
 68. Ready LB, Fink BR. Experimental evaluation of local anaesthetic solutions using rat infraorbital nerve block. *Can Anaesth Soc J*. 1980; 27(1): 58-61.
 69. Rivat C, Vera-Portocarrero LP, Ibrahim MM, Mata HP, Stagg NJ, De Felice M, Porreca F, Malan TP. Spinal NK-1 receptor-expressing neurons and descending pathways support fentanyl-induced pain hypersensitivity in a rat model of postoperative pain. *Eur J Neurosci*. 2009; 29(4):727-37.
 70. Robaux S, Blunt C, Viel E, Cuvillon P, Nouguié P, Dautel G, Boileau S, Girard F, Bouaziz H. Tramadol added to 1.5% mepivacaine for axillary brachial plexus block improves postoperative analgesia dose-dependently. *Anesth Analg*. 2004; 98(4): 1172-7.
 71. Roberts DH, Sowray JH. *Analgesia local em odontologia*. 3. ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1995.

72. Silva RAP, Berto LA, Volpato MC, Ranali J, Paula ED, Groppo FC. Experimental model of inferior alveolar nerve block in rats. 87th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2009, Abstract 706. <http://iadr.confex.com/iadr/2009miami/webprogram/Paper116911.html>.
73. Strichartz GR, Ritchie JM. The action of local anesthetics on íon channels of excitable tissues. In: Strichartz GR, editor: Local anesthetics. New York: Springer Verlag, 1987. Apud Malamed SF. Manual de anestesia local. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
74. Tófoli 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. 2011; 21(1): 88-94.
75. Vandermeulen E, Gebhart GF, Brennan TJ. Effect of pre-emptive bupivacaine infiltration on animal model of incisional pain (Abstract). Anesthesiology 1994; 81: A986.
76. Volpato MC, Ranali J, Ramacciato JC, de Oliveira PC, Ambrosano GM, Groppo FC. Anesthetic efficacy of bupivacaine solutions in inferior alveolar nerve block. Anesth Prog. 2005; 52(4):132-5.
77. 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. 2011; 21(1): 81-7.
78. Yu HY, Li SD, Sun P. Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. J Pharm Pharmacol. 2002; 54(9): 1221-7.
79. Zahn PK, Brennan TJ. Primary and secondary hyperalgesia in a rat model for human postoperative pain. Anesthesiology. 1999; 90(3):863-72.

ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais - Unicamp



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1939-1**, sobre "Eficácia anestésica das preparações lipossomais uni e multilamelar de mepivacaína, em bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior e em ferida cirúrgica, em ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Volpato / Cristina Saragiotto Caldas, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **03 de setembro de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1939-1**, entitled "Anesthetic efficacy of uni and multilamelar liposomal mepivacaine formulations in infraorbital and inferior alveolar nerve blocks and surgical wound, in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 3, 2009**.

Campinas, 03 de setembro de 2009.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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