

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

FABIANA PINCHETTI NOLASCO

**EFICÁCIA ANESTÉSICA DAS PREPARAÇÕES
LIPOSSOMAS UNI E MULTILAMELARES DE
PRILOCAÍNA, EM BLOQUEIO DOS NERVOS ALVEOLAR
INFERIOR, INFRAORBITAL E EM 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 Medicamentosa.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo
Co-orientação: Profa. Dra. Maria Cristina Volpato

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Fabiana Pinchetti Nolasco, e orientada pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo.

Assinatura do orientador

**PIRACICABA
2012**

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

N712e Nolasco, Fabiana Pinchetti, 1987-
Eficácia anestésica das preparações lipossomais uni e multilamelares de prilocaína, em bloqueio dos nervos alveolar inferior, infraorbital e em infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, em ratos / Fabiana Pinchetti Nolasco. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Anestésicos. 2. Lipossomas. 3. Anestesia. I. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. II. Volpato, Maria Cristina, 1962- III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Anesthetic efficacy of 3% prilocaine unilamellar and multilamellar liposomal formulation in infraorbital and inferior alveolar nerve blocks and subcutaneous infiltration in surgical wound, in rats

Palavras-chave em Inglês:

Anesthetics

Liposomes

Anesthesia

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Maria Cristina Volpato

Carina Denny

Juliana Cama Ramacciato

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 FABIANA PINCHETTI NOLASCO aprovada.

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

Profa. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Juliana Cama Ramacciato".

Profa. Dra. JULIANA CAMA RAMACCIATO

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

Profa. Dra. CARINA DENNY

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Adriana, pelo apoio, força, amor, carinho e principalmente por estar ao meu lado em tudo. Obrigada por me incentivar e guiar-me no caminho do conhecimento e por sempre acreditarem na minha capacidade. À minha irmã, Cris, pelo companheirismo, amizade, irmandade e carinho. Vocês fazem a minha vida ser melhor a cada dia

Sou sempre, eternamente grata, por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, **UNICAMP**, na pessoa do Magnífico Reitor, Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP, por meio do Diretor Prof. Dr. Jaques Jorge Junior.

À Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, **coordenadora dos Cursos de Pós- Graduação da FOP/UNICAMP** e à Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, **coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP**.

Aos **professores e amigos da Área de Farmacologia**, Anestesiologia, e Terapêutica Medicamentosa, Prof. Francisco Carlos Groppo, Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e Prof. Dr. José Ranali, pela formação profissional, pessoal, pela amizade e incentivo.

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de estudo para realização deste trabalho (Processo 2009/11797-1).

À **Profa. Dra. Eneida de Paula** responsável pelo Laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP e coordenadora do projeto temático (FAPESP processo 2006/00121-9) ao qual o presente projeto está vinculado, por toda atenção e colaboração no desenvolvimento do mesmo.

Ao **Márcio Aparecido Paschoal** técnico do Laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, que foi muito prestativo a cada momento que precisei. Obrigada imensamente por fazer elaboração das formulações lipossomais.

Ao meu **orientador** Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, pela atenção, paciência, confiança e amizade, pelos ensinamentos e incentivo de sempre. Exemplo de garra e caráter. Obrigada por todos os momentos e por acreditar em mim desde o começo.

À minha **co-orientadora** Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, pela paciência, carinho, atenção que é infinita. Agradeço imensamente a tudo que aprendi, principalmente no finalzinho desta fase. Levo comigo uma gratidão enorme por ajudar a olhar a vida como um todo, de outra forma.

À **Michelle Franz Montan** que colaborou com o projeto imensamente. Com muita paciência, carinho e boa vontade. Obrigada por estar sempre ali nos momentos em que precisamos.

Aos meus queridos **Pais**, pela força de sempre, carinho e conselhos. Por sempre respeitarem as minhas escolhas. Pelo grande investimento na minha educação e por me proporcionarem tudo o que precisei durante toda minha vida. Nada disso seria possível sem o apoio e amor incondicional que recebo sempre. Em muitos momentos não os tive perto de mim, mas sempre senti a força e carinho para que seguisse em frente. Meu amor e gratidão são eternos! Muito Obrigada!!!

À minha irmã, **Cristina**, pelo carinho que sempre me recebe em casa, pelas risadas e brincadeiras que iluminam sempre a minha vida. Além de ser a minha SIS considero você uma grande amiga, e tenho certeza que cresceremos juntas na vida. Obrigada por cada momento único que sempre passamos juntas, sinto muita falta sua no meu dia-a-dia!! Amo muito você Cris!

Ao meu namorado, **Pedro Gatti**, pelo companheirismo, carinho, amor, paciência, ajuda, companhia, estímulo e amizade. Sua presença me confortou nos momentos de trabalho, alegria e agonia. Ter você ali sempre, fez total diferença. Só tenho a te agradecer por

tudo. Love you heaps!!

*Aos queridos **Jorge, Selena, Lucas, Carol, Luiza, Claudia e Claudio** pelo carinho que recebo sempre, pela força e pelos grandes momentos que passo ao lado de cada um. Com certeza, a concretização desse trabalho e o sucesso desta fase teve ajuda de cada um. Agradeço muito por tudo. Cada um tem um lugar especial no meu coração.*

*Aos amigos, **Juliana Cama Ramacciato, Rogério Heládio Lopes Motta, Cristiane Bergamaschi Motta e Leandro Augusto Pinto Pereira**, responsáveis pela minha decisão de fazer pós-graduação em Farmacologia, pelos conselhos, pelo incentivo e principalmente pela amizade. Sinto saudades, mas não esqueço nunca!*

*A **Srta. Maria Elisa dos Santos**, pela gentileza, amizade, carinho e competência de sempre.*

*A **todos os amigos da Área de Farmacologia**, Ana Paula, Camila, Cleiton, Cris (gêmea), Lívia, Marcos, Marcelo, Luciano, Inês, Luiz, Salete, Bigode, Burnes, Talita, Sônia, Luciana, Myrella, Carina, Michelle Franz Montan Braga Leite, e Paulo por todos os momentos compartilhados, estudos e momentos de descontração.*

*À minha irmã gêmea, **Cris Caldas**, que me apoiou, ajudou e foi responsável pela força de cada dia de estudo e dedicação, desde o processo seletivo, até a última impressão dos exemplares. Com você aprendi muito e me diverti muito. Com certeza, Piracicaba não teria a mesma graça se não estivéssemos juntas desde o começo! Amo você mana! Obrigada!!*

*Às grandes e eternas amigas **Sumaira e Taila**, que mesmo distantes pudemos dividir momentos difíceis e momentos de alegria. Obrigada por me incentivarem, por acreditarem*

em mim e por dividir tudo em nossas vidas. Vocês são muito importantes, morro de saudades e amo muito!!

*A minha amiga e companheira **Dainelle Elaine**, que desde o início de nossa amizade só me faz dar risada, pensar e refletir. A distância é pouco para podermos mensurar o nível de amizade, a gratidão e a saudade!!Mas será sempre aquela amiga, de sempre!!!*

*A **todos os funcionários**, do laboratório, do botério, da limpeza, do bandejão e xerox, pois sem o esforço de cada um, nada seria possível. A contribuição de vocês é muito importante.*

*Aos **alunos** da graduação que ajudaram a crescer o meu desejo de dar aula.*

*Aos **animais** que contribuíram com suas vidas para a realização deste trabalho.*

*Aos **amigos e pessoas** que embora não citados contribuíram imensamente para o sucesso deste trabalho e desta fase. Muito Obrigada!*

*Eu te desejo não parar tão cedo
pois toda idade tem prazer e medo
e com os que erram feio e bastante
que você consiga ser tolerante*

*Quando você ficar triste
que seja por um dia e não o ano inteiro
e que você descubra que rir é bom
mas que rir de tudo é desespero*

Desejo

*que você tenha a quem amar
e quando estiver bem cansado
ainda exista amor pra recomeçar,
pra recomeçar*

*Eu te desejo muitos amigos
mas que em um você possa confiar
e que tenha até inimigos
pra você não deixar de duvidar*

*Quando você ficar triste
que seja por um dia e não o ano inteiro
e que você descubra que rir é bom
mas que rir de tudo é desespero*

Desejo que você tenha a quem amar...

*Desejo que você ganhe dinheiro
pois é preciso viver também
e que você diga a ele pelo menos uma vez
quem é mesmo o dono de quem*

Desejo que você tenha a quem amar...

Amor para recomeçar – Frejat

RESUMO

O presente estudo avaliou a eficácia anestésica das formulações: prilocaína 3% encapsulada em lipossomas unilamelares (Prilo-LUV, concentração lipídica 4mM), prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares (Prilo-MLV, concentração lipídica 8mM) e prilocaína 3% com felipressina 0,03UI/mL (Prilo-Feli), em três modelos, bloqueio do nervo infraorbital (BNIO), bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI) e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (ISFC). Foram usadas como controle formulações lipossomais unilamelar e multilamelar sem anestésico e solução de NaCl 0,9%. No BNIO e BNAI as formulações anestésicas foram injetadas do lado direito e os controles no esquerdo. Para o BNIO, 30 ratos (10 animais/grupo) receberam 0,1 mL de uma das formulações próximo ao forame infraorbital. Foi avaliada a duração da anestesia por pinçamento do lábio superior, a cada 5 minutos. Para o BNAI 45 ratos (15 animais/grupo) receberam 0,2 mL das formulações próximo ao forame mandibular. Foram avaliados sucesso, latência e duração da anestesia pulpar com estímulo elétrico (“pulp tester”). Para a ISFC 36 ratos (6 animais/grupo) foram submetidos à incisão na pata traseira direita e 24 horas após, receberam 0,1 mL das formulações nas duas patas traseiras (com e sem incisão); a anestesia foi avaliada pelo analgesímetro de von Frey. Os resultados foram submetidos aos testes de Log-Rank, Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls e Friedman ($\alpha=5\%$). No BNIO, a Prilo-Feli proporcionou duração de anestesia maior que a Prilo-LUV ($p<0,05$); Prilo-MLV não diferiu das demais ($p>0,05$). A Prilo-Feli proporcionou maior sucesso de anestesia ($p<0,05$) que a Prilo-LUV e Prilo-MLV, sem diferença entre estas ($p>0,05$). Para o BNAI Prilo-Feli proporcionou maior sucesso e duração de anestesia que as formulações lipossomais ($p<0,05$); Prilo-MLV apresentou maior sucesso de anestesia que Prilo-LUV ($p<0,05$), mas não diferiu desta com relação à duração da anestesia ($p>0,05$). Não houve diferenças entre formulações com relação à latência ($p>0,05$). Para a ISFC, nas patas com hipernocicepção Prilo-Feli proporcionou maior duração de anestesia que Prilo-LUV

e Prilo-MLV ($p < 0,05$), sem diferença entre estas ($p > 0,05$); nas patas sem hipernocicepção não houve diferenças entre as formulações ($p > 0,05$). Com relação ao sucesso da anestesia, em ambas as condições, com e sem hipernocicepção, Prilo-Feli mostrou maior sucesso que Prilo-LUV e Prilo-MLV ($p < 0,05$), sem diferença entre estas ($p > 0,05$). Conclui-se que a encapsulação da prilocaína em lipossomas unilamelares e multilamelares resultou em menor eficácia anestésica em comparação á solução de prilocaína com felipressina nos modelos avaliados.

Palavras-chave: Lipossomas, Prilo-Feli, Prilo-LUV, Prilo-MLV, Hipernocicepção

ABSTRACT

The present study assessed the anesthetic efficacy of the following formulations: 3% prilocaine with 0.03 UI/mL felypressin (Prilo-Fely), 3% prilocaine encapsulated in unillamellar liposomes (Prilo-LUV, 4 mM lipid concentration) and 3% prilocaine encapsulated in multillamellar liposomes (Prilo-MLV, 8 mM lipid concentration) in three models, in rats: infraorbital nerve block (IONB), inferior alveolar nerve block (IANB), and subcutaneous infiltration in surgical wound (SISW). The following were used as controls: unillamellar liposomal suspension, multillamellar liposomal suspension and 0.9% NaCl solution. For IONB and IANB the anesthetic formulations were injected in the right side and the respective controls in the left side. For IONB, 30 rats (10 animals per group) received 0.1mL of the anesthetic formulations near the infraorbital foramen. The duration of anesthesia was assessed by upper lip pinching every 5 minutes. For IANB, 45 rats (15 animals per group) received 0.2mL of the anesthetic formulations near the right mandibular foramen. The success, onset and duration of pulpal anesthesia were assessed by electric pulp tester. For SISW, 36 animals (6 animals per group) were submitted to incision in the right hind paw and 24h after they received 0.1mL of the formulations in both hind paws (with and without incision). Anesthesia was evaluated with von Frey anesthesiometer. Data were submitted to Log-Rank, Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls and Friedman tests ($\alpha= 5\%$). For IONB Prilo-Fely presented longer anesthesia duration than Prilo-LUV ($p<0.05$); Prilo-MLV did not differ from the others ($p>0.05$). Prilo-Fely promoted higher anesthesia success ($p<0.05$) than Prilo-LUV and Prilo-MLV, with no difference between these two formulations ($p>0.05$). For IANB Prilo-Fely provided higher success and duration of anesthesia than the liposomal formulations ($p<0.05$); Prilo-MLV presented higher anesthesia success than Prilo-LUV ($p<0.05$), but did not differ from the latter concerning anesthesia duration ($p>0.05$). No differences among the formulations were observed for BNAI anesthesia onset ($p>0.05$). For SISW in the

hypernociceptive paws, Prilo-Fely provided longer anesthesia duration than Prilo-LUV and Prilo-MLV ($p < 0.05$), with no difference between these two formulations ($p > 0.05$); in the non hypernociceptive paws no differences were observed among the formulations ($p > 0.05$). In both conditions, with and without hypernociception, Prilo-Fely presented higher anesthesia success ($p < 0.05$) than Prilo-LUV e Prilo-MLV, with no difference between these two formulations ($p > 0.05$). It can be concluded that the encapsulation of prilocaine in unilamellar and multilamellar liposomes provided lower anesthetic efficacy when compared to prilocaine with feypressin in the evaluated models.

Key Words: Liposomes, Prilocaine, Local anesthetics, Hypernociception.

LISTA DE ABREVIATURAS

BNIO	-	Bloqueio do nervo infraorbital
BNAI	-	Bloqueio do nervo alveolar inferior
ISFC	-	Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica
Prilo-MLV	-	Prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares
Prilo-LUV	-	Prilocaína 3% encapsulada em lipossomas unilamelares
Prilo-Feli	-	Prilocaína 3% associada à felipressina 0,03 UI/mL
NaCl	-	Cloreto de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Anestésicos locais.....	4
2.2 Prilocaína	6
2.3 Sistemas de liberação controlada de medicamentos - lipossomas	7
2.4 Modelos de estudo de eficácia anestésica em ratos.....	10
2.4.1 Bloqueio do nervo infraorbital	10
2.4.2 Bloqueio do nervo alveolar inferior.....	11
2.4.3 Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica	12
3 PROPOSIÇÃO	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Animais	15
4.2 Delineamento experimental	15
4.3 Material	16
4.4 Preparação das suspensões lipossomais	18
4.4.1 Preparação da suspensão lipossomal multilamelar de prilocaína	18
4.4.2 Preparação da suspensão lipossomal unilamelar de prilocaína	19
4.5 Avaliação da eficácia anestésica	19
4.5.1 Bloqueio do nervo infraorbital (BNIO)	20
4.5.2 Bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI).....	21
4.5.2.1 Avaliação da sensibilidade pulpar com aplicação de estímulo elétrico pelo “pulp tester”.....	23
4.5.2.2 Técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior	25
4.5.2.3 Avaliação dos parâmetros da anestesia	25
4.5.3 Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica	26
4.6 Análise Estatística.....	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Bloqueio do nervo infraorbital (BNIO)	30
5.2 Bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI)	33

5.3 Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica.....	35
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO 1	59

1 INTRODUÇÃO

O controle da dor durante a realização de procedimentos e no pós-operatório, em medicina e odontologia, constitui um importante campo de estudo na área de anestesiologia. Apesar dos avanços conseguidos em mais de 120 anos, desde a descoberta das propriedades da cocaína em promover anestesia local, ainda há um longo caminho a ser percorrido para obtenção de anestésicos mais eficazes e com baixo potencial de toxicidade (Friedman & Friedland, 2006; Rang & Dale, 2007).

agentes vasoconstritores para permitir maior duração da anestesia (Jansson, 2008; Malamed, 2005). O aumento da duração da anestesia, por sua vez, faz com que menores volumes de anestésico sejam necessários, diminuindo assim o risco de toxicidade ao paciente (Volpato & Ranali, 2011).

utilizado na odontologia, por apresentar baixa atividade vasodilatadora (50% menor que a lidocaína), pode ser usada sem adição de vasoconstritores ou associada à epinefrina em baixa concentração (1:200.000), ou ainda à felipressina, um vasoconstritor derivado da vasopressina, com menor potência vasoconstritora do que as aminas simpatomiméticas. Quando associada à epinefrina ou sem vasoconstritores, a prilocaína é utilizada na concentração de 4%, enquanto na associação com felipressina a concentração é de 3% (Malamed, 2005). Apenas a formulação contendo felipressina é disponível comercialmente no Brasil (Andrade, 2006; Ramacciato et al., 2010).

Embora a incidência de toxicidade decorrente do uso de anestésicos locais seja rara, especialmente em odontologia, devido às baixas doses utilizadas, sua ocorrência é possível (Volpato & Ranali, 2011).

Visando o aumento da eficácia anestésica e diminuição da toxicidade de fármacos, vários sistemas de liberação controlada têm sido pesquisados, como biopolímeros, ciclodextrinas e lipossomas. Estes últimos são vesículas compostas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídeos, que circundam o interior aquoso, podendo assim encapsular tanto moléculas hidrofílicas, quanto hidrofóbicas (Grant & Bansinath, 2001). Por apresentarem constituição semelhante à das membranas biológicas são biocompatíveis, atraindo o interesse no uso dos mesmos (Malinovsky *et al.*, 1997; Cereda *et al.*, 2008).

Vários fármacos, como medicamentos para tratamento de câncer, antivirais e antifúngicos tem sido comercializados nos Estados Unidos da América, tendo lipossomas como carreadores (Stuart *et al.*, 2000; Law *et al.*, 2000; Kotwani *et al.*, 2002).

Tem sido demonstrado em modelos animais e em humanos que a encapsulação de anestésicos locais pode aumentar a duração da anestesia e também diminuir a toxicidade dos mesmos, quando comparados às respectivas soluções sem aditivos (Boogaerts *et al.*, 1995; Cereda *et al.*, 2004; Grant *et al.*, 2004; Cereda *et al.*, 2006; Davidson *et al.*, 2010; Tófoli *et al.*, 2011)

Entretanto, a encapsulação de anestésicos locais em lipossomas unilamelares (com concentração lipídica 4 mM) não promove eficácia anestésica equivalente àquela conseguida com soluções contendo vasoconstritores (Wiziack Zago *et al.*, 2011; Franz-Montan *et al.*, 2011). Por outro lado, foi observado que a encapsulação da bupivacaína em lipossomas multilamelares foi eficaz em aumentar a duração da anestesia, em comparação com a solução contendo epinefrina, para controle da dor pós-cirúrgica, em dor crônica e dor decorrente de câncer (Boogaerts *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1996). De acordo com Grant & Bansinath (2001), lipossomas com várias bicamadas tendem a liberar o fármaco mais

lentamente do que lipossomas unilamelares, podendo assim promover maior duração do efeito.

A partir desses achados, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia anestésica de duas formulações de prilocaína, encapsulada em lipossomas unilamelares e em lipossomas multilamelares, comparada com a solução de prilocaína com felipressina, em três modelos experimentais, em ratos: bloqueio do nervo infraorbital, bloqueio do nervo alveolar inferior e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Anestésicos locais

O termo anestesia (do grego “an” - privação, “aísthesis” - sensação) significa “sem capacidade de sentir” (Fortes & Pacheco, 1968). A anestesia local pode ser definida como a falta de sensibilidade, especialmente tátil e dolorosa (Fortes & Pacheco, 1968), em uma região circunscrita do corpo, decorrente da inibição da condução nervosa. Pode ser conseguida por vários métodos, sendo os anestésicos locais os agentes mais empregados para esta finalidade (Malamed, 2005).

Atualmente, o mecanismo de ação mais aceito para o bloqueio da condução nervosa pelos anestésicos locais é a “teoria do receptor específico”, a qual propõe que os anestésicos locais, na forma catiônica, se ligam em sítios específicos da porção axoplasmática dos canais de sódio (Strichartz & Ritchie, 1987, *apud* Malamed, 2005).

Por seu caráter básico, baixa solubilidade em água e instabilidade ao serem expostos ao ar, os anestésicos locais são comercializados como sais (cloridrato) dissolvidos em água ou soro fisiológico. Nessa solução são encontradas, de forma simultânea, moléculas com e sem carga (ionizadas e não ionizadas). Apenas a forma não ionizada é capaz de atravessar a membrana axoplasmática e penetrar no axoplasma. Uma vez no interior do axônio, volta a ser reestabelecido o equilíbrio entre as formas ionizada e não ionizada, sendo que apenas a forma ionizada é que se liga na porção interna dos canais de sódio, impedindo a passagem deste íon, estabelecendo assim o bloqueio da condução nervosa (de Jong, 1994; Malamed, 2005).

A descoberta da capacidade de bloqueio da condução nervosa pela cocaína foi um marco na medicina e na odontologia, pois embora não sendo

o agente ideal, permitiu o desenvolvimento de vários outros, mais eficazes e seguros (Friedman & Friedland, 2006).

Em sequência ao uso da cocaína e de vários derivados do mesmo grupo (ésteres), como a procaína, tetracaína, cloroprocaína e benzocaína, surgiram as amidas, com menor potencial alergênico, sendo a lidocaína o primeiro deste grupo a ser comercializado, a partir de 1948 (de Jong, 1994) e, ainda hoje tido como anestésico local padrão de comparação (Malamed, 2005). Após a síntese da lidocaína, outras amidas foram sintetizadas, como a prilocaína (em 1953), mepivacaína, bupivacaína (em 1957) e articaína (em 1969).

À exceção da cocaína (e possivelmente da ropivacaína, embora esta ainda seja motivo de controvérsia), todos os anestésicos locais apresentam ação vasodilatadora (Cederholm *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1993; Gherardini *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 2000; Malamed, 2005; Wienzek *et al.*, 2007; Keramidas & Rodopoulou, 2007; Jansson, 2008).

Devido as suas propriedades vasodilatadoras, os anestésicos locais são frequentemente associados a vasoconstritores para obtenção de maior duração durante o procedimento anestésico. O aumento na duração da anestesia permite uso de menores doses, diminuindo também a probabilidade de superdosagem e reações tóxicas (Volpato & Ranali, 2011).

Além do aumento da duração da anestesia, os vasoconstritores também promovem o controle da hemostasia, melhorando a visualização do campo operatório, facilitando assim a realização do procedimento cirúrgico (Naftalin & Yagiela, 2002). Especificamente em odontologia, são utilizados dois tipos de vasoconstritores, as aminas simpatomiméticas (epinefrina, norepinefrina, corbadrina e fenilefrina) e derivados da vasopressina (felipressina) (Ramacciato *et al.*, 2010).

2.2 Prilocaína

Um dos anestésicos locais mais comumente empregados no mercado brasileiro (Andrade, 2006), a prilocaína (também conhecida como propitocaina) foi sintetizada em 1953 por Lofgren e Tegnér e comercializada nos Estados Unidos a partir de 1965 após a aprovação pela *Food and Drug Administration* (Malamed, 2005). Comparada ao anestésico local padrão, a lidocaína, apresenta capacidade vasodilatadora 50% menor e toxicidade 40% menor (Åkerman *et al.*, 1966; Malamed, 2005).

Sua estrutura química é N-2-fenil-metil-2-propilamino-propilamida, apresentando pKa de 7,9, ligação a proteínas plasmáticas de 55% e solubilidade aproximada em lipídeos de 1,5 (Malamed, 2005). Por ser uma amina secundária (ao contrário da lidocaína e mepivacaína, que são aminas terciárias), não precisa ser previamente desalquilada, sendo prontamente hidrolisada pelas amidases hepáticas em ortotoluidina e N-propilalanina; o produto final da biotransformação é o dióxido de carbono (de Jong, 1994). Além do fígado, outros locais também podem, em menor grau, contribuir para a biotransformação da prilocaína, como os pulmões e os rins (Åkerman *et al.*, 1966). A eficiência da biotransformação da prilocaína pode ser comprovada pela pequena fração de droga intacta excretada na urina (de Jong, 1994).

A prilocaína é comercializada na concentração de 4% sem vasoconstritor ou associada à epinefrina 1:200.000 em vários países da Europa, nos EUA, no Canadá e outros países. No Brasil está disponível apenas na concentração de 3% associada à felipressina 0,03UI/mL (Ramacciato *et al.*, 2010).

A dose máxima de prilocaína recomendada por sessão de atendimento, para uso odontológico, é de 6 mg/kg, não devendo ultrapassar 400 mg (Malamed, 2005). Quando em dose superior à recomendada, ou ainda

em pacientes com dificuldade de oxigenação (alterações hematológicas, insuficiência respiratória ou insuficiência cardíaca congestiva), pode causar metemoglobinemia, condição na qual há aumento da quantidade de metemoglobina circulante, com prejuízo à oxigenação (Malamed 2005).

2.3 Sistemas de liberação controlada de medicamentos - lipossomas

Nos últimos anos tem crescido o interesse por formas de liberação controlada de medicamentos que permitam o aumento da duração do efeito e diminuição da toxicidade, especialmente em bloqueios anestésicos na área médica.

Dentre as formas de liberação controlada de medicamentos atualmente em estudo destacam-se as ciclodextrinas, as nanocápsulas e os lipossomas. Estes últimos tem se destacado, havendo várias formulações disponíveis para uso comercial com este tipo de encapsulação, dentre os quais se destacam o anestésico tópico o LMX 4[®] (lidocaína a 4%, creme em veículo lipossomal), comercializado nos EUA (de Araújo *et al.*, 2003), o antifúngico anfotericina B (Ambisome[®]) e o quimioterápico doxorubicina (Caelyx[®]), registrados na ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012).

Os lipossomas consistem de esferas microscópicas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas, constituindo os lipossomas uni e multilamelares. A composição das bicamadas, semelhante à das membranas biológicas, faz com que esses carreadores apresentem baixa toxicidade intrínseca (alergenicidade e capacidade de promover lesões histológicas) (Malinovsky *et al.*, 1997). O uso de anestésicos locais encapsulados nestas esferas tem como vantagens a liberação lenta do fármaco, prolongando a duração da anestesia, reduzindo assim a toxicidade para os sistemas

cardiovascular e nervoso central (Boogaerts *et al.*, 1993a; Bucalo *et al.*, 1998; Gayoso, 2009; Berto, 2010).

O tamanho dos lipossomas pode variar consideravelmente, de 50 nm a 1000 nm (Banerjee, 2001; Grant, 2002). Este é um fator importante, pois pode afetar a biodistribuição; lipossomas grandes tendem a permanecer por mais tempo no local onde foram injetados, podendo promover efeito mais prolongado, enquanto que lipossomas menores que 120 nm atravessam rapidamente os capilares (Grant & Bansinath, 2001).

Estudos recentes em animais mostraram 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 as formulações sem aditivos. No modelo de bloqueio do nervo infraorbital em ratos, Cereda *et al.* (2006) obtiveram aumento do efeito anestésico de 56% e 30%, respectivamente para a prilocaína 2% e para a mepivacaína 2%, nesse tipo de encapsulação, quando comparadas às formulações sem aditivos.

Entretanto, apesar de proporcionar aumento da duração da anestesia, a encapsulação em lipossomas unilamelares não aumenta à duração quando comparada à formulação de anestésico associado a vasoconstritor, como observado por Cereda *et al.* (2004). Estes autores não observaram diferença quando eram comparadas as formulações de prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares e prilocaína com felipressina, em bloqueio do nervo infraorbital em ratos.

Para a articaína (nas concentrações de 3% e 4%) a encapsulação em lipossomas unilamelares promoveu menor duração de anestesia no bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior, em ratos, em comparação à articaína 4% com epinefrina 1:100.000, embora tenham aumentado a duração em comparação à articaína (3 % e 4%) sem aditivos (Berto, 2010).

Em humanos, três estudos também mostraram resultados semelhantes. Franz Montan *et al.* (2011) observaram menor duração de anestesia pulpar no canino superior com a ropivacaína encapsulada em lipossomas unilamelares em comparação à ropivacaína associada à epinefrina, após a realização de técnica anestésica infiltrativa na maxila.

Wiziack Zago *et al.* (2011), utilizando o mesmo modelo experimental em humanos relataram maior duração de anestesia da prilocaína 3% associada à felipressina em comparação às formulações de prilocaína 3% encapsulada em lipossomas unilamelares e prilocaína 3% sem ativos, não sendo observadas diferenças na eficácia anestésica destas duas últimas formulações.

Na avaliação de formulações de mepivacaína, Tófoli *et al.* (2011) observaram aumento da duração da anestesia com a formulação de mepivacaína 3% encapsulada em lipossomas unilamelares em relação à formulação de mepivacaína 3% sem aditivos e de mepivacaína 2% encapsulada em lipossomas unilamelares, sem diferença entre estas duas últimas formulações. Porém, da mesma forma que os estudos anteriores, também estes autores obtiveram maior duração de anestesia com a solução de mepivacaína 2% associada à epinefrina do que com as formulações lipossomais unilamelares.

Outras publicações têm relatado que lipossomas multilamelares podem promover aumento da duração da anestesia da bupivacaína quando essas formulações são comparadas a soluções de bupivacaína contendo epinefrina. Assim, Boogaerts *et al.* (1994) relataram aumento da duração do efeito anestésico com suspensão lipossomal multilamelar de bupivacaína 0,5% em comparação com a solução de bupivacaína 0,5% com epinefrina, quando essas formulações eram utilizadas em infiltração epidural para controle da dor pós-cirúrgica (em cirurgias abdominais, vascular, torácica, ortopédica e urológica). Da mesma forma, Lafont *et al.* (1996) observaram

aumento do tempo de remissão da dor em paciente com câncer de pulmão, de 4 horas para 11 horas, respectivamente com as formulações de bupivacaína 0,25% com epinefrina 1:200.000 e bupivacaína 0,25% encapsulada em lipossomas multilamelares, administradas via cateter epidural.

Conforme relatado por Grant & Bansinath (2001), o aumento do número de bicamadas pode aumentar o tempo de permanência do lipossoma no tecido, promovendo liberação mais lenta do fármaco e aumento da duração de seu efeito. Não há, até o momento, publicações a respeito da eficácia anestésica da prilocaína encapsulada em lipossomas multilamelares.

2.4 Modelos de estudo de eficácia anestésica em ratos

2.4.1 Bloqueio do nervo infraorbital

Este modelo de estudo permite a avaliação da anestesia em tecidos moles na região orofacial (lábio superior). Tanto no rato, quanto no ser humano, o nervo infraorbital emerge do forame infraorbital, o qual situa-se no osso maxilar, logo abaixo da órbita, entre os dentes molares e incisivos, em ambos os lados. O nervo infraorbital inerva o lábio superior e pele desta região (Fink *et al.*, 1975; Abe *et al.*, 1989).

O bloqueio anestésico do nervo infraorbital foi descrito em 1975, por Fink *et al.*, os quais concluíram que esse modelo era adequado para a comparação da eficácia de soluções anestésicas. Consiste basicamente na palpção do forame e introdução de uma agulha até o mesmo, onde é depositado o volume de 0,1ml de solução anestésica. Após a injeção, a anestesia é avaliada por pinçamento do lábio no lado em que foi injetada a solução anestésica e observação da reação do animal. A ausência de resposta aversiva (movimentação do animal e vocalização) indica que o lábio está anestesiado.

Posteriormente a esta publicação, outros estudos foram conduzidos no mesmo modelo para comparar a duração da anestesia de diversas formulações, como lidocaína 2%, prilocaína 2%, bupivacaína 0,5% e etidocaína 0,5% associadas a dextranos (Hassan *et al.*, 1985a,b) e lidocaína a 2% comparada à bupivacaína 0,25% (Abe *et al.*, 1989).

Desde então, esse modelo de avaliação da eficácia anestésica em tecido mole tem sido usado de forma consistente, sendo de simples avaliação, permitindo obtenção de resultados altamente reprodutíveis (Cereda *et al.*, 2004, Cereda *et al.*, 2006; de Araújo *et al.*, 2008; Berto, 2010).

2.4.2 Bloqueio do nervo alveolar inferior

Em 1999 Naftel *et al.* descreveram a inervação da mandíbula (dentes e tecidos periodontais) em ratos, desde o período intra-uterino até o 90^o dia após o nascimento. A partir desta descrição, Silva *et al.* (2009) desenvolveram uma técnica para bloqueio do nervo alveolar inferior, permitindo assim o estudo da eficácia de soluções anestésicas na polpa dental.

Esta técnica consiste na introdução de 11 a 13 mm de uma agulha 13 x 4,5 mm pela face medial do ramo mandibular, na região do ângulo da mandíbula, em direção ao forame mandibular, formando um ângulo de 30^o a 45^o com a base da mandíbula. Com esta técnica a ponta do bisel da agulha fica próxima ao forame mandibular, onde é injetada a solução anestésica, no volume de 0,2 mL (Silva *et al.*, 2009; Gayoso, 2009; Berto, 2010).

Previamente à injeção do anestésico os animais são submetidos à fixação de fios de cobre aos molares mandibulares de ambos os lados, o que permite a aplicação de estímulo elétrico para avaliação da sensibilidade basal do animal e, posteriormente, para a avaliação da anestesia. A ausência de resposta aversiva do animal (movimentação da cabeça, das vibríças e

vocalização) ao estímulo elétrico no lado em que é injetada a solução anestésica indica que o nervo foi bloqueado. O lado não anestesiado serve de controle para avaliar o funcionamento do aparelho emissor de impulsos elétricos (“pulp tester”), bem como a responsividade do animal (Berto, 2010; Bhering, 2010).

A avaliação da eficácia anestésica com a aplicação de estímulos elétricos também é realizada em estudos em humanos, sendo amplamente aceita (Brunetto *et al.*, 2008; Kanaa *et al.*, 2009; Batista da Silva *et al.*, 2010; Meechan *et al.*, 2011; Franz-Montan *et al.*, 2011; Zago, 2011; Tófoli *et al.*, 2011).

2.4.3 Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica

O modelo de desenvolvimento de hiperalgesia após realização de ferida cirúrgica foi descrito inicialmente por Vandermeulen *et al.* (1994) e Brennan *et al.* (1996) e posteriormente modificado por Grant *et al.* (1997).

Neste modelo é possível avaliar a sensibilidade do animal a estímulos pressóricos com aplicação de filamentos de von Frey na pata do animal, na qual foi desenvolvida hiperalgesia após a realização de uma ferida cirúrgica na superfície plantar. Na pata com hiperalgesia observa-se diminuição do limiar (valor de pressão) no qual o animal retira a pata da fonte de estímulo (resposta de retirada da pata). Esse modelo é interessante, pois permite a avaliação do efeito de anestésicos locais, analgésicos e anti-inflamatórios na resposta de tecidos inflamados a estímulo pressórico (Grant *et al.*, 1997; Brennan *et al.*, 2005).

Em 1997 Grant *et al.* fizeram algumas alterações no modelo proposto por Vandermeulen *et al.* (1994) e Brennan *et al.* (1996), estabelecendo o intervalo de força de 0,0073 N até 0,456 N. Esta força máxima foi estabelecida, pois a aplicação de força maior é suficiente para promover a elevação da pata do animal em qualquer situação, na presença ou

ausência de processo inflamatório (hiperalgesia). Também foi estabelecido neste estudo o valor mínimo de 20% na redução do limiar de retirada da pata após a realização da ferida cirúrgica para que a mesma seja considerada como hiperalgésica.

Neste estudo Grant *et al.* (1997) compararam a duração da anestesia após infiltração de formulações de bupivacaína encapsulada em lipossomas multilamelares e bupivacaína sem aditivos ao lado da ferida cirúrgica. Observaram que a encapsulação em lipossomas aumentou a duração da anestesia nas patas submetidas à hiperalgesia mostrando a eficácia deste tipo de formulação, mesmo em condição de inflamação, na qual há diminuição do limiar de sensibilidade.

Como a avaliação da hiperalgesia com o analgesímetro de von Frey em ratos não permite a diferenciação entre alodínia (definida como sensação dolorosa causada por estímulo que normalmente não evoca dor) e hiperalgesia (definida como sensação dolorosa aumentada a estímulo que causa dor), Parada *et al.* (2003) propuseram que essa percepção seja referida como hipernocicepção.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia anestésica da prilocaína a 3% encapsulada em lipossomas multilamelares e em lipossomas unilamelares, em comparação com a solução anestésica comercial de prilocaína 3% com felipressina 0,03 UI/mL, em três modelos experimentais, em ratos: bloqueio do nervo infraorbital, bloqueio do nervo alveolar inferior e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, os quais avaliam, respectivamente, anestesia de tecidos moles da região orofacial, anestesia pulpar e anestesia em tecidos inflamados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA/Unicamp) sob o protocolo de número 1937-1 (Anexo 1).

Foram utilizados 111 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos, machos, com peso aproximado de 300 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP), os quais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba em ambiente com temperatura e umidade controlada ($\pm 22^\circ \text{C}$), ciclos claro-escuro estabelecidos (a cada 12 horas) e com água e comida *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos distintos para os três experimentos.

4.2 Delineamento experimental

Neste trabalho foram utilizados três modelos experimentais, em ratos: bloqueio do nervo infraorbital (BNIO), bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI) e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica (ISFC), para avaliação da eficácia anestésica das seguintes formulações:

- a) prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares – Prilo-MLV;
- b) prilocaína 3% encapsulada em lipossomas unilamelares – Prilo-LUV;
- c) prilocaína 3% com felipressina 0,03UI/mL – Prilo-Feli.

O delineamento dos três modelos de estudo é mostrado no fluxograma da figura 1.

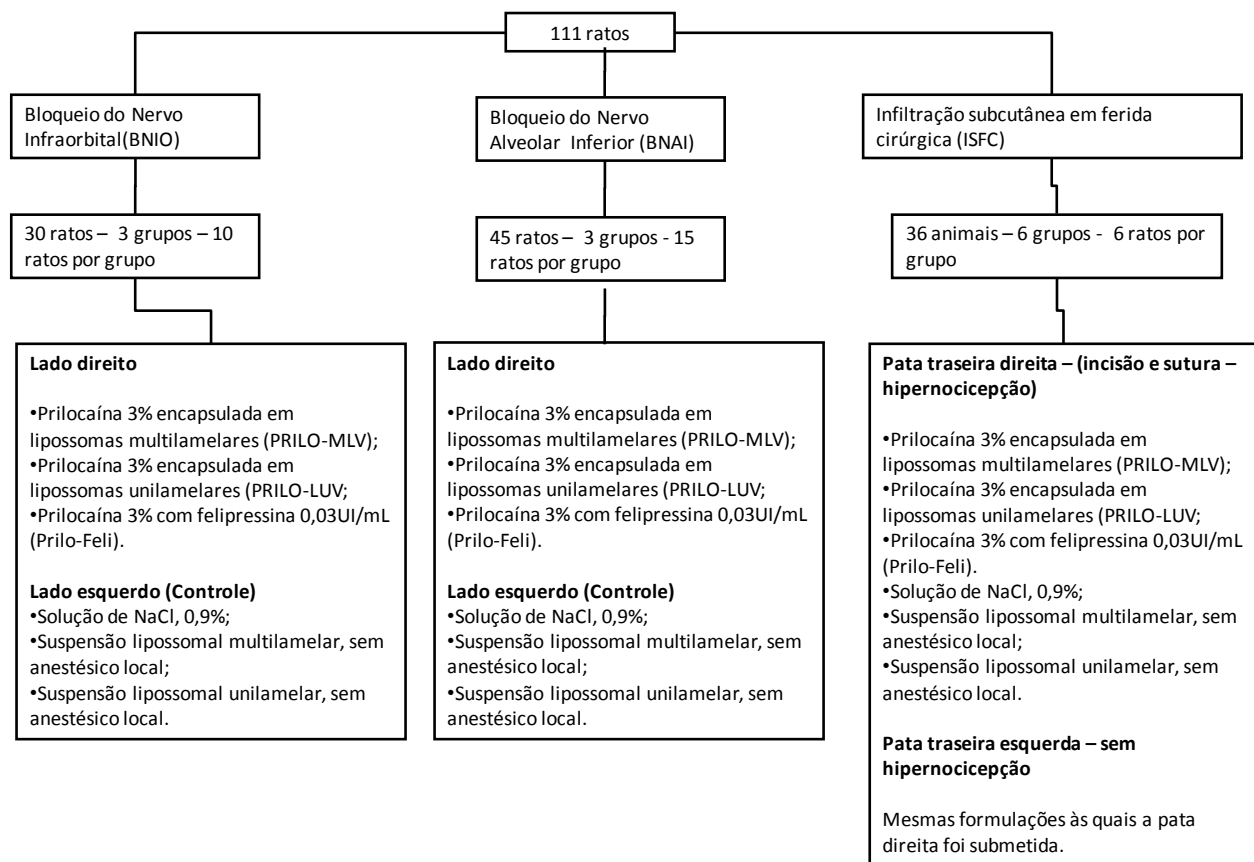


Figura 1 - Delineamento experimental dos três modelos de estudo utilizados para avaliar a eficácia anestésica de formulações de prilocaína.

4.3 Material

Foram utilizadas as seguintes formulações: solução comercial de prilocaína 3% com felipressina 0,03 UI/mL (Citocaína[®] – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), suspensão lipossomal unilamelar de prilocaína a 3%, suspensão lipossomal multilamelar de prilocaína a 3%, suspensão lipossomal multilamelar sem anestésico, suspensão lipossomal unilamelar sem anestésico e solução de cloreto de sódio 0,9% (EquiPLEX Ind. Farm., Brasil).

A preparação das formulações lipossomais está descrita no item 4.4. para o preparo destas formulações foram utilizados: cloridrato de prilocaína (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), acetato de α -tocoferol, fosfatidilcolina de ovo e colesterol (Sigma Chem. Co.) e tampão HEPES 20 mM com NaCl 0,9% (Q-biogene).

Para a anestesia geral dos animais foram utilizados quetamina (Dopalen[®]) e xilazina (Rompun[®]) e isoflurano (Isoflurine[®], Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil); para a sedação foi utilizado tiopental sódico (Thiopentax[®] injetável 1 g sem diluente, Cristália[®] – Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil).

Para a administração das formulações de estudo foram utilizadas agulhas descartáveis 13 X 4,5 (BD PrecisonGlide[®] - 26 G, Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR, Brasil), acopladas a seringas centesimais de 1 mL (BD[®]). Para a injeção dos anestésicos gerais foram utilizadas agulhas descartáveis 25 X 7 (BD PrecisonGlide[®] - 22 G, Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR, Brasil).

Além deste material, no bloqueio do nervo infraorbital foi utilizada pinça dente de rato. No bloqueio do nervo alveolar inferior foram utilizados fios de cobre desencapados nas duas extremidades, pinça clínica para algodão, gaze estéril, algodão, mesa cirúrgica para ratos, solução a base de ácido fosfórico a 37% em forma de gel (MAGIC ACID Gel, Vigodente[®]), adesivo fotopolimerizável (MAGIC BOND, Vigodente[®]), pincel com cerdas macias, micro-aplicador descartável (Microbrush[®], Vigodent SA Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), resina composta fotopolimerizável (Charisma[®] seringa, Haraeus Holding, Hanau, Alemanha), espátula para resina composta, aparelho fotopolimerizador (Gnatus[®]), mesa operatória especial para inserção dos fios na cavidade oral do animal e manutenção da abertura bucal e “pulp tester” elétrico Vitality Scanner modelo 2006 (Analytic Technology, Redmond, EUA).

No experimento de infiltração subcutânea em ferida cirúrgica foram utilizados lâmina de bisturi descartável n. 10 (Solidor[®], Suzhou Kyuan medical apparatus Co. Ltd. Beiqiao Town, Suzhou City, China), cabo de bisturi, porta-agulhas de Mayo-Hegar e tesoura de Metzemaum curva. Para a sutura foi utilizado 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, capela para exaustão de gases (Ideoxima Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto-SP), aparelho para aplicação de força com intensidade controlada analgesímetro digital von Frey (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e gaiolas com fundo aramado para uso com o analgesímetro de von Frey (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil)

4.4 Preparação das suspensões lipossomais

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

4.4.1 Preparação da suspensão lipossomal multilamelar de prilocaína

A preparação dos lipossomas multilamelares foi realizada pelo método de hidratação de filme seco, utilizando fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol na proporção molar de 4:3:0,07, a partir de uma solução estoque em clorofórmio, submetida à evaporação do solvente sob fluxo de N₂ e a vácuo por 2h, à temperatura ambiente (Boogaerts *et al.*, 1993 a, b). Em seguida a esse procedimento, foi adicionado o tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 com NaCl 154 mM, sendo a dispersão submetida a agitação em vórtex durante 5 minutos. Com esse procedimento formaram-se lipossomas

multilamelares (vesículas concêntricas), separadas por cavidades aquosas, com concentração lipídica de 8 mM. A essa preparação foi incorporado cloridrato de prilocaína, atingindo concentração final de 3%. A preparação sem anestésico foi utilizada como controle em todos os experimentos.

4.4.2 Preparação da suspensão lipossomal unilamelar de prilocaína

A suspensão de lipossomas unilamelares foi obtida a partir da suspensão lipossomal multilamelar descrita no item 4.3.1, a qual foi introduzida, sob pressão de nitrogênio, à temperatura ambiente, em um extrusor (Extrusor Lipex Biomembranes Inc.), passando através de um disco de drenagem e duas membranas de policarbonato (Poretics) com poros de 0,4 µm, por 12 vezes. Esse processo permitiu a obtenção de lipossomas unilamelares de 0,4µm (400 nm). Após esse procedimento, a suspensão foi mantida em repouso por 2 horas para o intumescimento dos lipossomas. A concentração lipídica dos lipossomas foi de 4 mM. Em seguida, foi incorporado o sal de cloridrato de prilocaína na concentração final de 3%. Da mesma forma que para a preparação multilamelar, a suspensão sem anestésico foi utilizada como controle em todos os experimentos.

Todas as preparações foram submetidas à aferição de pH (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

A eficácia anestésica foi avaliada em três modelos experimentais:

- a) Bloqueio do nervo infraorbital (Fink *et al.*, 1975);
- b) Bloqueio do nervo alveolar inferior (Silva *et al.*, 2009);

- c) Infiltração anestésica em ferida cirúrgica (Vandermeulen *et al.*, 1994; Brennan *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 1997).

4.5.1 Bloqueio do nervo infraorbital (BNIO)

Este modelo experimental é utilizado para avaliar a anestesia de tecidos moles da região perioral. Conforme mostrado na figura 1, neste experimento foram utilizados 30 ratos (10
), Prilo-MLV, Prilo-LUV e PRILO-Feli.

Após sedação leve com tiopental sódico (25
), cada animal recebeu 0,1mL de uma das formulações contendo prilocaína próximo ao forame infraorbital do lado direito (figura 2). O lado esquerdo foi utilizado como controle, unilamelar ou multilamelar recebida no lado direito. A agulha foi introduzida no sulco vestibular, na região compreendida entre o incisivo central e o primeiro molar inferior, sendo direcionada ao forame infraorbital que se localiza logo abaixo da órbita.

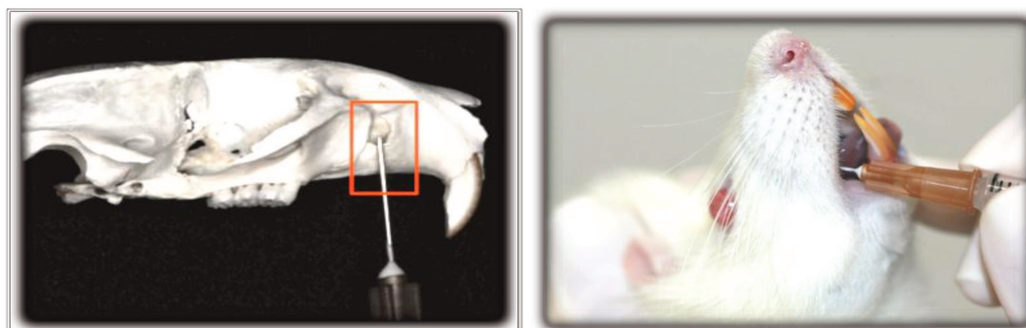


Figura 2 - Posição final da agulha no bloqueio do nervo infraorbital.

A anestesia do lábio superior
(figura 3) 0” para presença de
resposta aversiva e “1” para ausência de resposta, de acordo com o modelo
descrito por Cereda *et al.* (2004; 2006
obtenção o primeiro sinal de resposta aversiva, obtendo-se assim a
duração da anestesia.

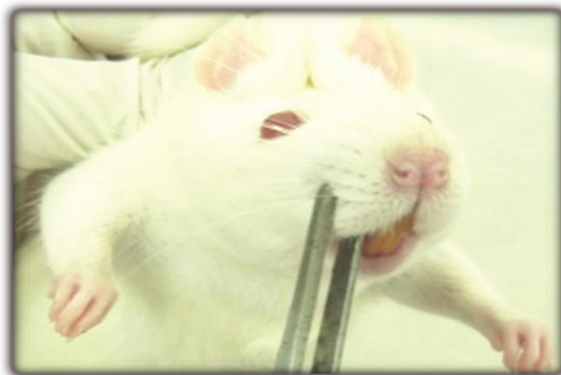


Figura 3-Pinçamento do lábio superior do rato para avaliação da anestesia.

4.5.2 Bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI)

Este modelo experimental avalia a anestesia pulpar nos molares inferiores. Neste estudo a avaliação da eficácia do bloqueio anestésico do nervo alveolar inferior foi

, conforme mostrado na figura 1.

O experimento foi dividido em duas etapas: preparação dos animais para o estudo (fixação de fios de cobre aos molares inferiores) e avaliação da anestesia propriamente dita.

A primeira etapa iniciou-se com a anestesia geral dos animais, realizada com xilazina (10 mg/kg) e quetamina (90 mg/kg), pela via

intramuscular. Após a anestesia geral, com os animais posicionados na mesa cirúrgica com a boca aberta (figura 4A), permitindo a visualização dos molares inferiores, foi aplicado gel de ácido fosfórico 37% na superfície oclusal dos molares por 20 segundos. Em seguida, a superfície oclusal dos molares foi lavada e secada com algodão, sendo aplicado o sistema de união fotopolimerizável com o micro-aplicador descartável, o qual foi submetido à fotopolimerização. Foram então adaptados dois fios de cobre, com as extremidades desencapadas, na superfície oclusal dos molares inferiores do lado direito e esquerdo (figura 4B), sendo os mesmos fixados com resina fotopolimerizável. Assim, cada lado ficou com um fio de cobre fixado à oclusal dos molares, permanecendo a outra extremidade do fio fora da cavidade oral para permitir a aplicação dos estímulos elétricos nos dentes dos animais.

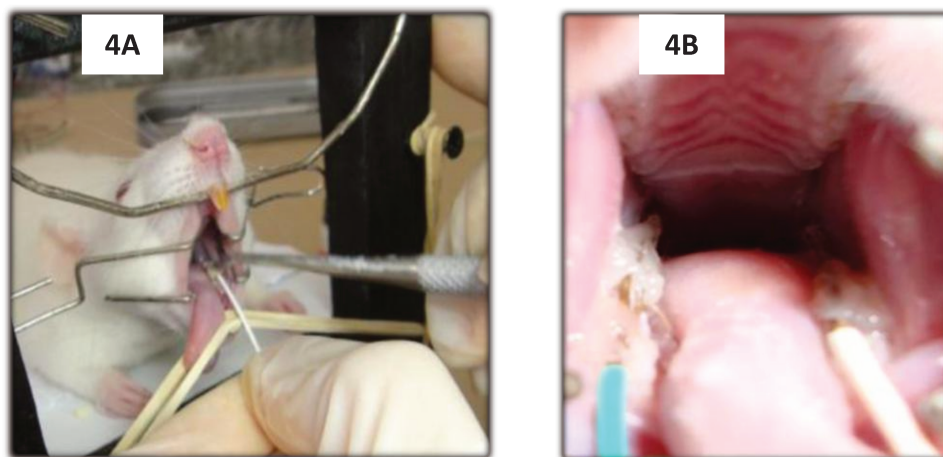


Figura 4 – A) animal em posição na mesa clínica com abertura total da cavidade oral e; B) adaptação dos fios de cobre à superfície oclusal dos molares inferiores.

Após o retorno da anestesia geral iniciou-se a etapa de avaliação das formulações anestésicas. Os animais foram sedados com tiopental sódico (25 mg/kg, por via intraperitoneal), para que os mesmos pudessem permanecer na gaiola sem movimentação excessiva, mas mantendo a

percepção de dor, permitindo assim a aplicação de estímulo elétrico aos dentes e avaliação da anestesia pulpar.

Após a sedação foi avaliada a sensibilidade basal dos dentes ao estímulo elétrico emitido pelo “pulp tester”, conforme descrito no item 4.4.2.1. Em seguida à avaliação da sensibilidade basal, os animais foram submetidos ao bloqueio do nervo alveolar inferior, como descrito no item 4.4.2.2, sendo então avaliados os parâmetros da anestesia (item 4.4.2.3).

4.5.2.1 Avaliação da sensibilidade pulpar com aplicação de estímulo elétrico pelo “pulp tester”

O “pulp tester” utilizado nesse experimento (Vitality Scanner modelo 2006 - Analytic Technology, Redmond, EUA) é um aparelho composto por um fio terra e uma unidade de produção de corrente elétrica, a qual é transmitida ao dente por um eletrodo colocado em contato com os mesmos. A corrente elétrica é transmitida ao dente de forma intermitente, com aumento gradual da voltagem, que varia de 15 a 300 V. Esse aumento é mostrado em uma escala arbitrária de 0 a 80, mostrada no visor do aparelho. Ao ser aplicado ao dente, o estímulo é transmitido do esmalte à dentina, estimulando as fibras sensoriais pulpares, sendo este estímulo percebido como sensação de vibração, calor ou dor pelos voluntários (Certosimo & Archer, 1996).

A avaliação da sensibilidade pulpar com estímulo elétrico é amplamente utilizada para comprovação da anestesia pulpar em estudos de eficácia anestésica (Brunetto *et al.*, 2008; Kanaa *et al.*, 2009; Batista da Silva *et al.*, 2010; Meechan *et al.*, 2011; Franz-Montan *et al.*, 2011; Wiziack Zago *et al.*, 2011; Tófoli *et al.*, 2011). Este uso baseia-se nos estudos Dreven *et al.* (1987) e Certosimo & Archer (1996), que demonstraram ausência de dor em procedimentos operatórios em dentes previamente anestesiados e que não respondiam ao estímulo elétrico máximo emitido pelo aparelho. Assim, a

ausência de percepção ao estímulo máximo gerado pelo aparelho após a injeção de anestésico local indica anestesia pulpar.

No presente estudo a aplicação do estímulo elétrico foi feita na extremidade do fio de cobre externa à cavidade oral, até que o estímulo fosse percebido pelo animal (quando o dente não estava anestesiado) ou até que fosse atingido o estímulo máximo do aparelho (condição em que o dente apresentava-se anestesiado), sendo então desconectado o eletrodo do fio de cobre. A percepção do estímulo (dor) pelo animal foi caracterizada pela movimentação da cabeça e/ou da vibríças, ou ainda por vocalização do mesmo (Silva *et al.*, 2009).

Previamente ao bloqueio do nervo alveolar inferior foi avaliada a sensibilidade basal de resposta pulpar dos animais por meio da aplicação do estímulo elétrico aos dentes em triplicata, sendo a sensibilidade basal considerada como a média das três medidas. O intervalo de tempo entre cada aplicação foi de 2 minutos e a avaliação foi realizada nos molares mandibulares dos lados direito e esquerdo.

Após a realização do bloqueio do nervo alveolar inferior com cada formulação, foram aplicados estímulos elétricos a cada 2 minutos, durante 10 minutos, por meio do *pulp tester* elétrico estabelecendo a latência das preparações. Os animais que mostraram algum tipo de resposta aversiva com a aplicação do estímulo elétrico no lado direito (no qual foram injetadas as formulações contendo prilocaína) durante este período foram considerados como insucesso da anestesia. Aqueles que continuavam não respondendo aos estímulos elétricos continuaram a ser avaliados, sendo o estímulo elétrico aplicado a cada 5 minutos. O estímulo elétrico também foi aplicado do lado esquerdo (onde foram injetadas as formulações controle) nos mesmos tempos em que foi avaliado o lado direito, a fim de garantir que o animal continuava respondendo e que o “pulp tester” estava funcionando de forma adequada.

4.5.2.2 Técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior

A anestesia do nervo alveolar inferior foi realizada de acordo com o descrito por Silva *et al.* (2009). Após palpação do ângulo da mandíbula, foi introduzida uma agulha 13 mm x 4,5 mm nesta região, pela face medial do ramo mandibular, formando um ângulo de 30° a 45° com a base da mandíbula (figura 5). A agulha foi inserida em cerca de 11 a 13 mm, em direção ao forame mandibular, onde foi realizada a injeção das formulações.



Figura 5 - Técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior do rato

4.5.2.3 Avaliação dos parâmetros da anestesia

Foram avaliados nesse experimento a latência, a duração e o grau de sucesso da anestesia pulpar nos molares inferiores, considerados da seguinte forma:

- a) tempo de latência: intervalo de tempo entre o final da injeção da solução anestésica e o início de ausência de resposta aversiva do animal ao teste elétrico;

- b) 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 apresentou resposta ao estímulo elétrico máximo emitido pelo aparelho;
- c) sucesso da anestesia: quando o animal apresentou latência de no máximo 10 minutos e permaneceu anestesiado por pelo menos 10 minutos.

4.5.3 Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica

O modelo utilizado foi o descrito por Brennan (1996), com as modificações feitas por Grant *et al.* (1997) para promover inflamação e hipernocicepção na pata e assim ser avaliada a eficácia anestésica em tecidos moles em condição de redução do limiar à dor.

Neste experimento foram utilizados 36 ratos, sendo 6 animais para cada formulação. Os animais permaneceram em gaiolas com maravalha, sob as condições descritas no item 4.1.

No dia do experimento, foi utilizada uma gaiola específica, com o fundo aramado (23 x 20 x 18 cm - largura x profundidade x altura e trama de 0,5 x 0,5 cm) que permite a passagem da ponta do analgesímetro de von Frey para a aplicação de força na pata do animal.

Os animais foram colocados na gaiola para aclimatação durante aproximadamente 30 minutos (figura 6). Ao concluir este período, a sensibilidade basal de ambas as patas traseiras foi avaliada com a aplicação de força crescente entre 0,0073 N a 0,456 N com o analgesímetro de von Frey (Grant *et al.*, 1997). O teste foi realizado em triplicata, com intervalos de 5 minutos, sendo a sensibilidade basal considerada como a média das três medidas.



Figura 6 - Gaiola com o fundo aramado e espelho com os animais em posição para aclimação.

Em seguida, os animais foram submetidos a anestesia geral com isoflurano e submetidos à incisão na superfície plantar da pata traseira direita para indução de inflamação e hipernocicepção. A incisão foi realizada com lâmina de bisturi número 10 (incisão de 1 cm de extensão e 3 mm de profundidade). A padronização da extensão da incisão foi realizada com paquímetro ajustado para 1 cm e colocado sobre a pata do animal quando da realização da incisão. A profundidade da incisão foi ajustada de acordo com o chanfro da lâmina de bisturi, deixando cerca de 1 mm para fora dos tecidos no momento da realização da incisão (figura 7A, B). Após a realização da incisão, a mesma foi suturada com 3 pontos simples, com fio de nylon 6-0 (figura 7C). Após esse procedimento, os animais foram mantidos em repouso em gaiolas plásticas durante 24 horas, com água e alimentação *ad libitum*.



Figuras 7 – A) lâmina de bisturi com chanfro de 4 mm; B) pata traseira com incisão de 1 cm de extensão; C) pata traseira após sutura com 3 pontos simples.

Decorrido esse período, os animais foram novamente colocados nas gaiolas específicas para o experimento (fundo aramado), onde permaneceram novamente por 30 minutos para aclimação. A sensibilidade das duas patas traseiras foi novamente testada, em triplicata, e em intervalos de 5 minutos, com a aplicação de força pelo analgesímetro de von Frey, lateralmente à incisão realizada na pata traseira direita e em local homólogo na pata traseira esquerda.

Os animais que apresentaram redução de pelo menos 20% na força necessária para promover a elevação da pata traseira direita (retirada da pata) foram considerados como hiperalgésicos (ou seja, apresentaram hipernocicepção ao estímulo de pressão) e continuaram no estudo (Grant *et al.*, 1997). Os animais que não apresentaram essa redução no limiar de sensibilidade foram descartados.

Após esse procedimento, os animais receberam 0,1 mL de uma das formulações em cada pata traseira (ao lado da ferida cirúrgica na pata traseira direita - com hipernocicepção, e em local homólogo na pata traseira esquerda - sem hipernocicepção). Este volume foi padronizado a partir dos resultados obtidos no estudo piloto. O volume de 0,3mL preconizado por Grant *et al.* (1997) mostrou-se excessivo, gerando extravasamento das formulações para fora do tecido.

Após a injeção das f

-
0,456 N. A aplicação da força foi realizada a cada 10 minutos.

A ausência de reflexo de retirada da pata quando da aplicação de força de 0,456 N foi considerada como anestesia. A duração da anestesia foi considerada como o tempo decorrido entre o término da infiltração da formulação na pata até o último tempo no qual o animal não apresentou reflexo de retirada da pata.

4.6 Análise Estatística

Foram utilizados os testes de Log-Rank (para comparação do sucesso da anestesia nos três modelos estudados), Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls (para avaliação da duração da anestesia nos três modelos e da latência no bloqueio do nervo alveolar inferior) e Friedman (para comparação da sensibilidade à força aplicada nas patas no período basal e 24 horas após a indução de hipernocicepção). Foi considerado o nível de significância de 5%. A análise dos resultados foi realizada com o software BioEstat 5.0 para Windows® (Instituto Mamirauá, Belém, PA).

5 RESULTADOS

Os pHs (média \pm desvio padrão) das formulações de prilocaína 3% com felipressina (Prilo-Feli) e prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares (Prilo-MLV) e em lipossomas unilamelares (Prilo-LUV) foram, respectivamente, $4,5 \pm 0,4$; $5,9 \pm 0,1$ e $6,3 \pm 0,2$.

Em todos os modelos estudados as formulações controle não proporcionaram anestesia nos locais nos onde foram injetadas.

5.1 Bloqueio do nervo infraorbital (BNIO)

Todos os animais apresentaram anestesia do lábio superior no lado direito (lado em que foi injetada formulação contendo prilocaína). As figuras 8 e 9 mostram, respectivamente, a taxa de sucesso e a duração da anestesia após bloqueio do nervo infraorbital.

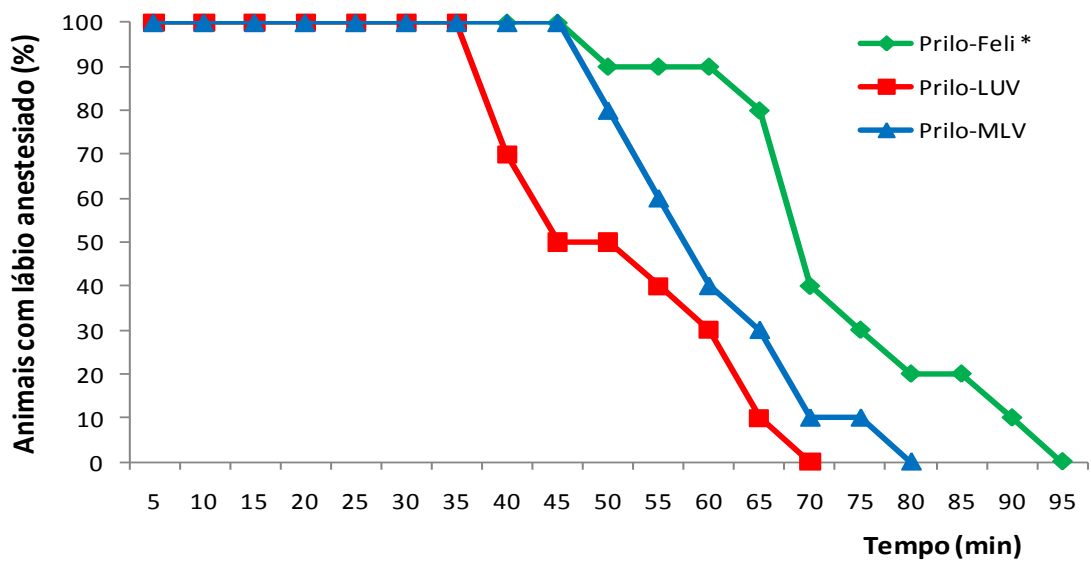


Figura 8 - Porcentagem de animais com o lábio superior anestesiado (sucesso da anestesia) ao longo do tempo, após bloqueio do nervo infraorbital com formulações de prilocaína 3% com felipressina (Prilo-Feli) e prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares (Prilo-MLV) e em lipossomas unilamelares (Prilo-LUV). (n=10/grupo; Log-Rank; * $p < 0,05$ para Prilo-Feli em relação às demais formulações)

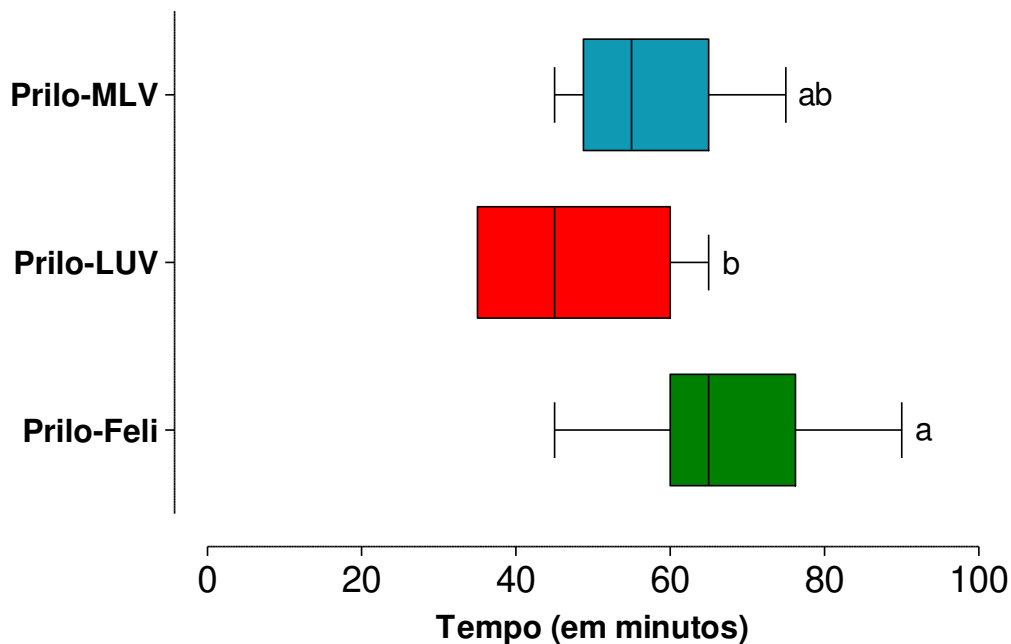


Figura 9 - Duração da anestesia (em min) após o bloqueio do nervo infraorbital em ratos com formulações de prilocaína 3% com felipressina (Prilo-Feli) e prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares (Prilo-MLV) e em lipossomas unilamelares (Prilo-LUV). A linha central representa a mediana, a caixa representa o 1º e 3º quartis e as suíças representam os valores máximo e mínimo. (n=10/grupo; Kruskal-Wallis; letras distintas indicam $p < 0,05$).

Como pode ser observado na figura 8 a solução de prilocaína 3% com felipressina 0,03UI/mL (Prilo-Feli) apresentou maior sucesso de anestesia (Log-Rank, $p < 0,01$) que as formulações de prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares (Prilo-LUV) e multilamelares (Prilo-MLV), sem diferença entre estas ($p > 0,05$). Pode-se observar ainda que tanto a Prilo-Feli quanto a Prilo-MLV proporcionaram anestesia em 100% dos animais durante 45 minutos.

Com relação à duração da anestesia, foi observada maior duração após injeção de Prilo-Feli do que com a injeção de Prilo-LUV (Kruskal-Wallis,

$p < 0,05$). A formulação de Prilo-MLV não apresentou diferenças em relação às demais formulações ($p > 0,05$).

5.2 Bloqueio do nervo alveolar inferior (BNAI)

Neste experimento não foram observadas diferenças entre as formulações com relação à latência da anestesia pulpar em molares inferiores (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Os resultados de latência após BNAI são mostrados na figura 10.

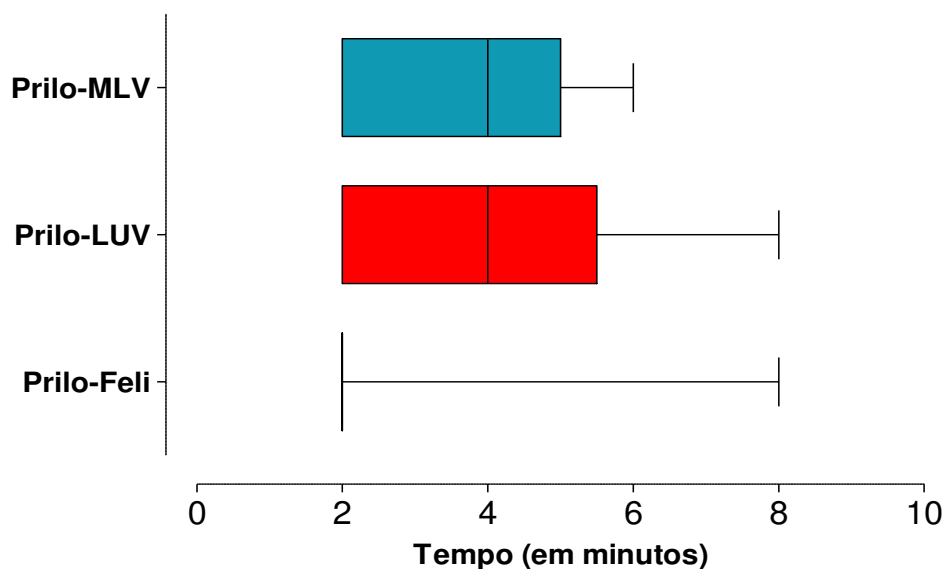


Figura 10 - Latência da anestesia (em min) após o bloqueio do nervo alveolar inferior, em ratos com formulações de prilocaína 3% com felipressina (Prilo-Feli) e prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares (Prilo-MLV) e em lipossomas unilamelares (Prilo-LUV). A linha central representa a mediana, a caixa representa o 1º e 3º quartis e as suíças representam os valores máximo e mínimo. ($n=15$ /grupo; Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

As figuras 11 e 12 mostram, respectivamente, o sucesso e a duração da anestesia pulpar após o BNAI com as formulações estudadas.

A Prilo-Feli proporcionou maior sucesso (Log-Rank, $p < 0,05$) e duração de anestesia pulpar (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) após o BNAI do que as demais formulações. Entretanto, observou-se que até 30 minutos de avaliação, as formulações Prilo-Feli e Prilo-MLV apresentavam sucesso similar, com 80% dos animais apresentando os molares anestesiados. A formulação Prilo-MLV proporcionou maior sucesso de anestesia que a formulação de prilocaína unilamelar (Prilo-LUV) ($p < 0,05$), mas não diferiu desta última com relação à duração da anestesia ($p > 0,05$).

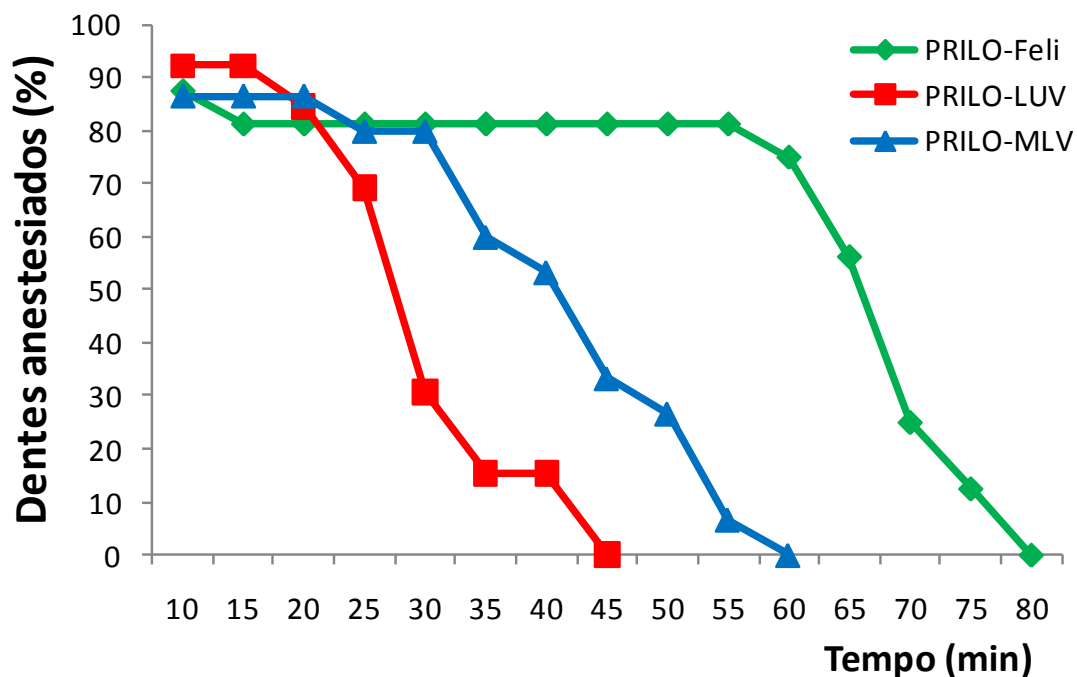


Figura 11 - Sucesso da anestesia (em %) nos molares inferiores após bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos com formulações de prilocaína 3% com felipressina (Prilo-Feli) e prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares (Prilo-MLV) e em lipossomas unilamelares (Prilo-LUV). (n=15/grupo; Log-Rank, $p < 0,05$ entre todas as formulações).

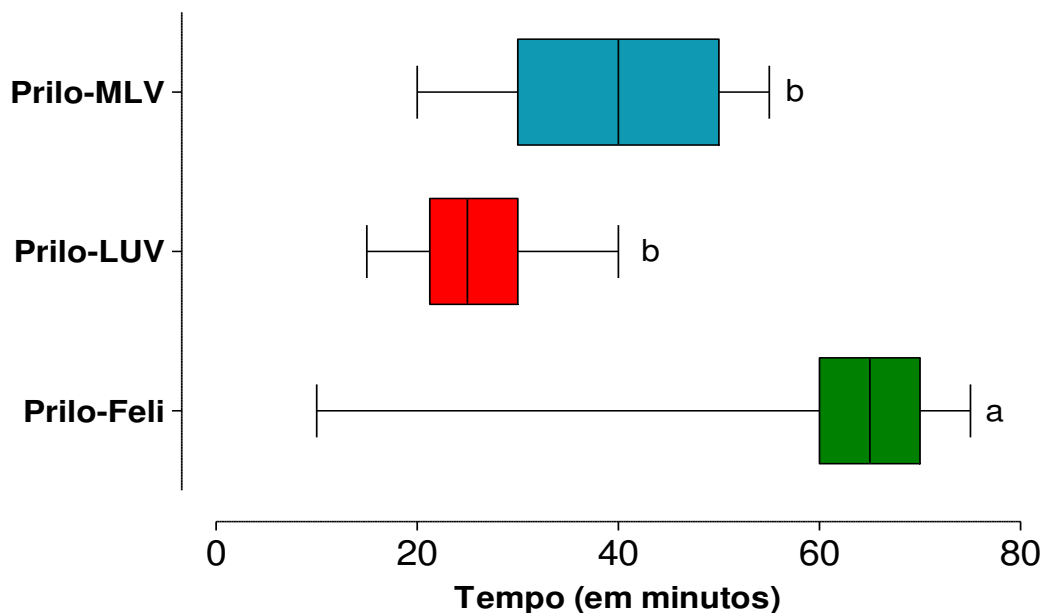


Figura 12 - Duração da anestesia (em min) nos molares inferiores após bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos com formulações de prilocaína 3% com felipressina (Prilo-Feli) e prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares (Prilo-MLV) e em lipossomas unilamelares (Prilo-LUV). A linha central representa a mediana, a caixa representa o 1º e 3º quartis e as suíças representam os valores máximo e mínimo. (n=15/grupo; Kruskal-Wallis; letras distintas indicam $p < 0,05$).

5.3 Infiltração subcutânea em ferida cirúrgica

As figuras 13, 14 e 15 mostram o efeito da inflamação na sensibilidade da pata direita dos animais previamente à administração das formulações anestésicas Prilo-LUV, Prilo-MLV e Prilo-Feli, respectivamente.

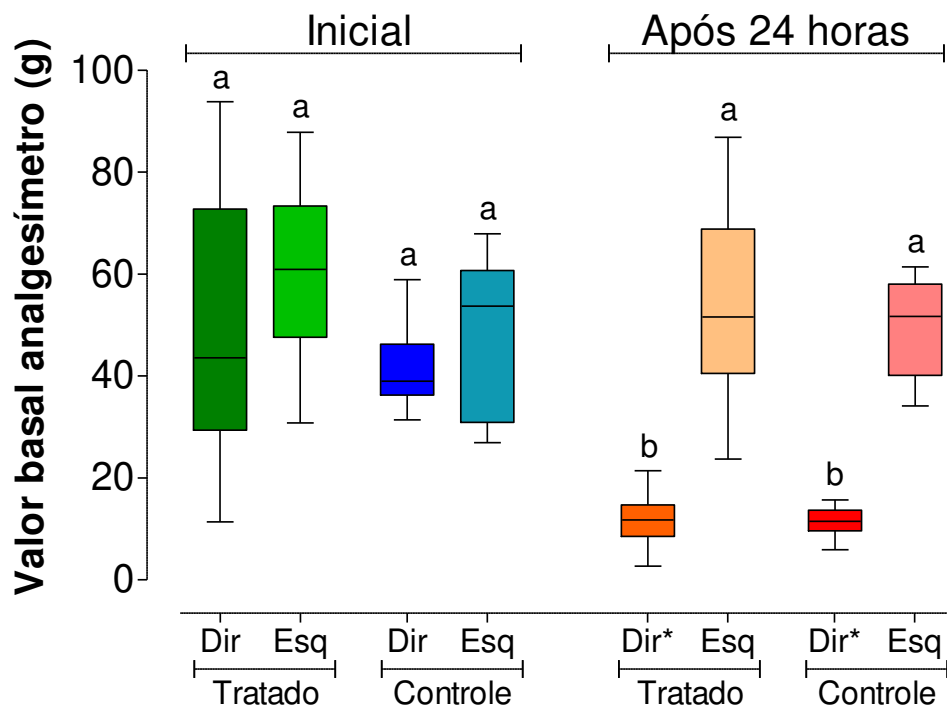


Figura 13 - Sensibilidade dolorosa das patas dos ratos previamente à administração da formulação Prilo-LUV. A linha central representa a mediana, a caixa o 1º e 3º quartis e as suíças os valores máximo e mínimo. Dir*: pata direita, com hipernocicepção; Esq: pata esquerda, sem hipernocicepção. Tratado: animais que posteriormente receberam a formulação Prilo-LUV; Controle: animais que posteriormente receberam formulação lipossomal unilamelar sem anestésico (n=6/grupo; Friedman; Letras distintas acima das barras representam diferenças estatisticamente significantes [p<0,05] entre os grupos, patas ou períodos).

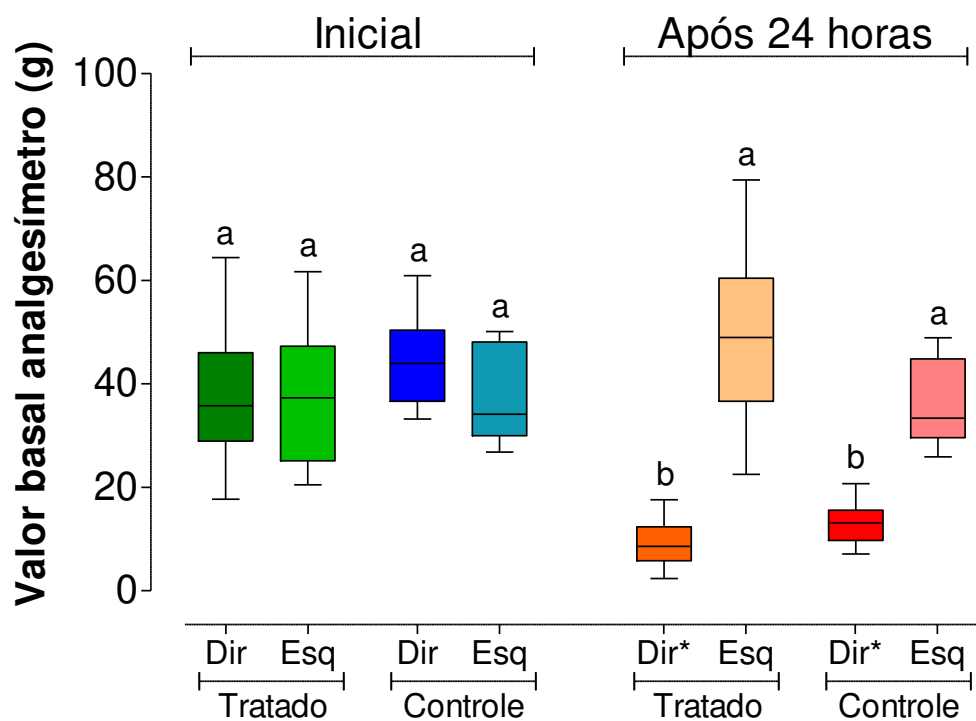


Figura 14 - Sensibilidade dolorosa das patas dos ratos previamente à administração da formulação Prilo-MLV. A linha central representa a mediana, a caixa o 1º e 3º quartis e as suíças os valores máximo e mínimo. Dir*: pata direita, com hipernocicepção; Esq: pata esquerda, sem hipernocicepção. Tratado: animais que posteriormente receberam a formulação Prilo-MLV; Controle: animais que posteriormente receberam formulação lipossomal multilamelar sem anestésico (n=6/grupo; Friedman; Letras distintas acima das barras representam diferenças estatisticamente significantes [p<0,05] entre os grupos, patas ou períodos).

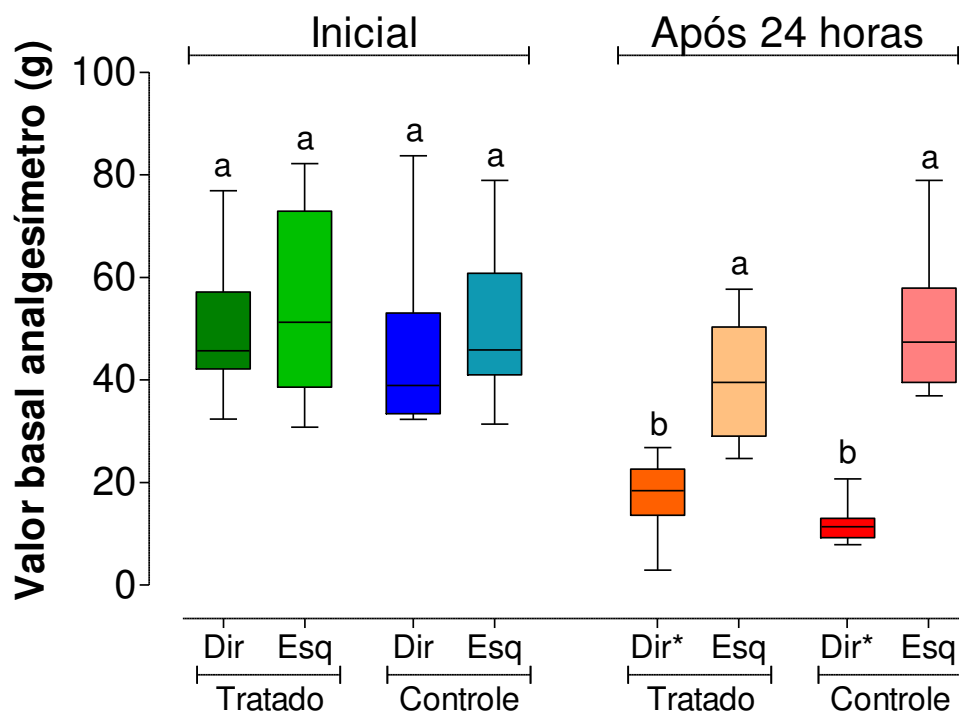


Figura 15 - Sensibilidade dolorosa das patas dos ratos previamente à administração da formulação Prilo-Feli. A linha central representa a mediana, a caixa o 1º e 3º quartis e as suíças os valores máximo e mínimo. Dir*: pata direita, com hipernocicepção; Esq: pata esquerda, sem hipernocicepção. Tratado: animais que posteriormente receberam a formulação Prilo-Feli; Controle: animais que posteriormente receberam solução de NaCl 0,9%. (n=6/grupo; Friedman; Letras distintas acima das barras representam diferenças estatisticamente significantes [$p < 0,05$] entre os grupos, patas ou períodos).

Não foram observadas diferenças (Friedman, $p > 0,05$) entre os valores de sensibilidade basal das patas direitas e esquerdas no período inicial (figuras 13, 14 e 15). Entretanto, 24 horas após a indução de hipernocicepção nas patas direitas, as mesmas apresentaram diminuição significativa no limiar de retirada da pata, tanto em relação aos valores basais iniciais das patas direita e esquerda, quanto em relação aos valores da pata esquerda no mesmo período de observação (24 horas após), como pode ser visto nas figuras 13, 14 e 15 (Friedman, $p < 0,05$).

A figura 16 mostra o sucesso da anestesia após a infiltração das formulações anestésicas nas patas traseiras direita e esquerda, respectivamente com e sem hipernocicepção. Em ambas as patas foi observado maior sucesso de anestesia com a formulação Prilo-Feli (Log-Rank, $p < 0,05$), sem diferença entre as formulações lipossomais ($p > 0,05$). Na comparação entre patas inflamadas e não inflamadas, foi observado menor sucesso de anestesia nas patas inflamadas para todas as formulações ($p < 0,05$).

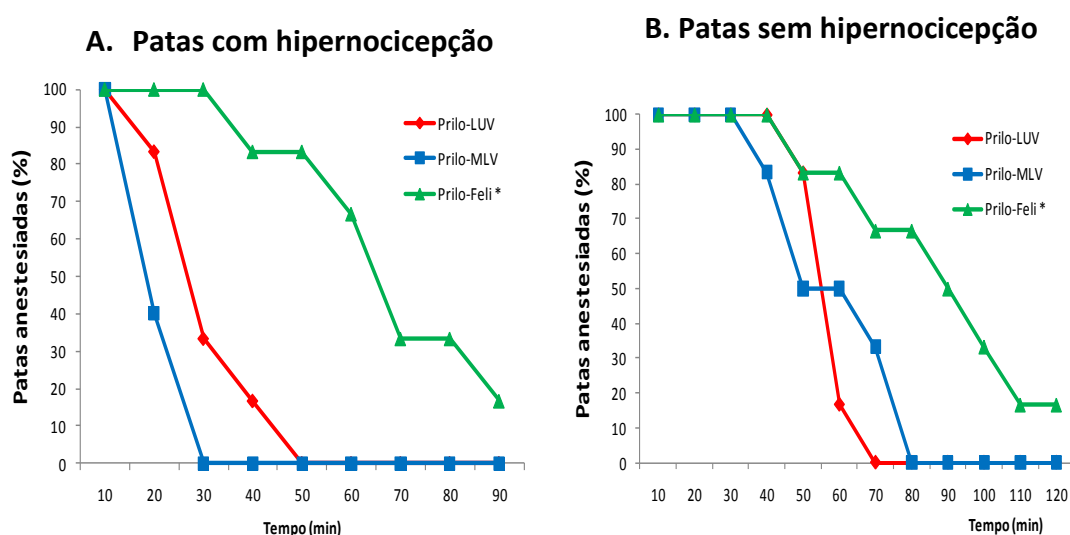


Figura 16 - Sucesso da anestesia (% de patas anestesiadas) nas patas dos ratos com hipernocicepção (A) e sem hipernocicepção (B) após infiltração subcutânea com as formulações de prilocaína 3% com felipressina (Prilo-Feli) e prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares (Prilo-MLV) e em lipossomas unilamelares (Prilo-LUV). ($n=6$ /grupo; Log-Rank; * indica diferença [$p < 0,05$] em relação às demais formulações).

A figura 17 mostra a duração da anestesia após infiltração das formulações anestésicas nas patas traseiras direita e esquerda (respectivamente com e sem hipernocicepção). Como pode ser observado na figura 18, a formulação de prilocaína 3% com felipressina 0,03 UI/mL (Prilo-Feli) promoveu maior duração de anestesia do que as formulações lipossomais na presença de hipernocicepção, (Kruskal-Wallis, Student-

Newman-Keuls, $p < 0,05$), sem diferença entre as formulações lipossomais ($p > 0,05$). Na ausência de hipernocicepção não foi observada diferença entre as formulações ($p > 0,05$). Quando comparadas as patas com e sem hipernocicepção, foi observada diferença apenas para a formulação Prilo-MLV, que proporcionou menor duração de anestesia na pata com hipernocicepção (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

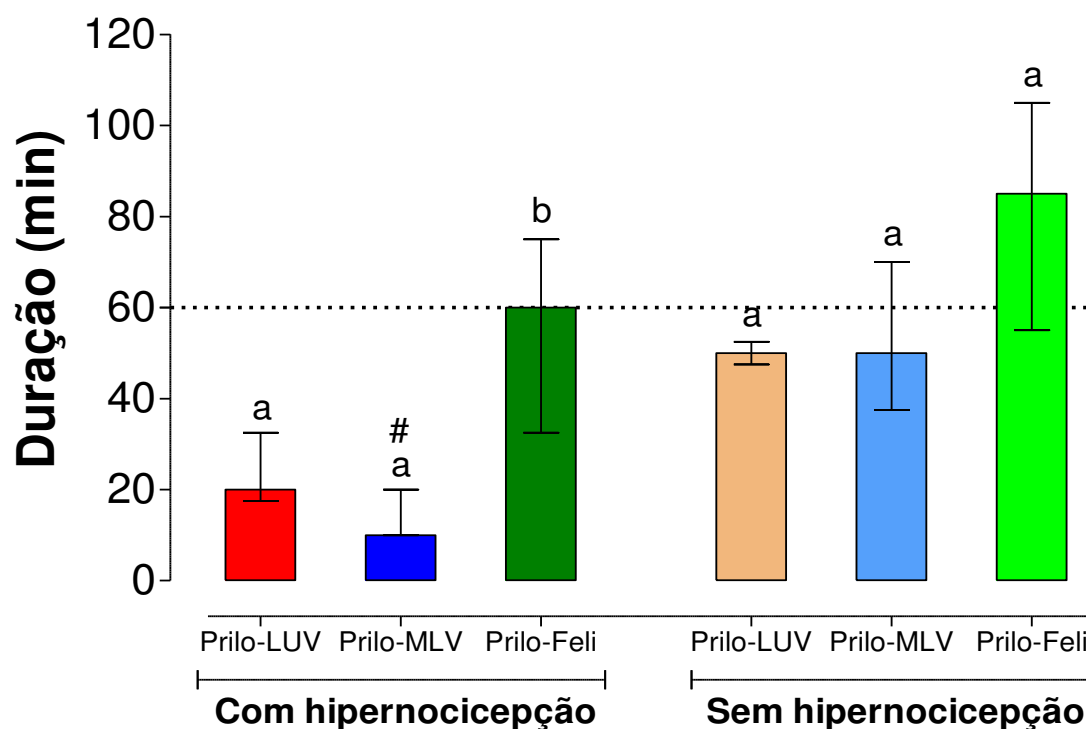


Figura 17 - Duração da anestesia (mediana \pm desvio interquartilico, em min) após infiltração subcutânea com as formulações de prilocaína 3% com felipressina (Prilo-Feli) e prilocaína 3% encapsulada em lipossomas multilamelares (Prilo-MLV) e em lipossomas unilamelares (Prilo-LUV), nas patas com e sem hipernocicepção ($n=6$ /grupo; Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls; letras distintas indicam diferenças [$p < 0,05$] entre as formulações considerando as patas com ou sem hipernocicepção separadamente; # representa diferença [$p < 0,05$] entre as patas com e sem hipernocicepção para uma mesma formulação).

6 DISCUSSÃO

Em 1975 Fink *et al.* (1975) idealizaram o modelo de bloqueio do nervo infraorbital do rato para avaliação da eficácia de formulações anestésicas locais. Desde então esta técnica tem sido utilizada para avaliar a anestesia de tecidos moles da região perioral, produzida por anestésicos locais associados a sistemas de liberação controlada (Hassan *et al.*, 1985a,b; Cereda *et al.*, 2004; Cereda *et al.*, 2006; de Araújo *et al.*, 2008).

Vários estudos demonstraram a eficácia da encapsulação em lipossomas unilamelares em aumentar a duração da anestesia de anestésicos locais como a prilocaína, lidocaína, mepivacaína, articaína e ropivacaína em relação à solução sem aditivos no modelo de bloqueio do nervo infraorbital em ratos (Cereda *et al.*, 2004; Cereda *et al.*, 2006; Berto, 2010; de Araújo *et al.*, 2008).

Entretanto, ao comparar a formulação de prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares com a prilocaína com felipressina, Cereda *et al.* (2004) não observaram diferença no tempo de recuperação do bloqueio (duração da anestesia) e no efeito anestésico total (área sob a curva). Ambas as formulações apresentaram duração de anestesia de 95 minutos (mediana).

No presente estudo foram observados resultados distintos, pois a prilocaína associada à felipressina proporcionou maior taxa de sucesso e de duração da anestesia que a prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares, sendo a duração da primeira de 65 minutos e da última de 45 minutos. Os resultados obtidos no presente estudo estão mais próximos dos obtidos por Wiziack Zago *et al.* (2011) em humanos. Estes autores observaram maior duração da anestesia em tecidos moles (gengiva) após a infiltração na maxila com solução de prilocaína com felipressina do que com a prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares.

A maior eficácia da solução contendo vasoconstritor também foi observada no estudo de Tófoli *et al.* (2011), após infiltração maxilar de formulações lipossomais unilamelares de mepivacaína 2% e 3% e de mepivacaína 2% com epinefrina, em humanos. Neste estudo a mepivacaína associada à epinefrina proporcionou maior duração de anestesia no lábio superior que as formulações lipossomais.

Com relação à formulação de prilocaína encapsulada em lipossomas multilamelares, esta também apresentou menor taxa de sucesso do que a prilocaína com felipressina no presente estudo. Entretanto, não houve diferenças entre estas com relação à duração da anestesia. É possível que o maior número de bicamadas lipídicas tenha proporcionado liberação mais lenta da prilocaína (Grant & Bansinath, 2001), fazendo com que a duração da formulação de prilocaína encapsulada em lipossomas multilamelares ficasse mais próxima daquela proporcionada pela prilocaína associada a vasoconstritor (felipressina).

Além da avaliação em tecidos moles, no presente estudo também foi utilizado o modelo de bloqueio do nervo alveolar inferior. Este modelo foi descrito pela primeira vez na literatura por Silva *et al.* (2009), tendo sido empregado também por outros autores (Gayoso, 2009; Berto, 2010; Bhering, 2010). É um modelo importante para a odontologia, pois permite avaliação da anestesia pulpar, a qual é necessária na maioria dos procedimentos.

Conforme já observado para a ropivacaína (Bhering, 2010) e para a própria prilocaína (Gayoso, 2009) no mesmo modelo de estudo, no presente trabalho também não foram observadas diferenças entre as formulações com relação à latência da anestesia pulpar. Os tempos de latência 2 minutos, 4 minutos e 4 minutos, respectivamente para a prilocaína com felipressina, e prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares e multilamelares também estão próximos dos obtidos por Gayoso (2009), que observaram 2 minutos de latência para todas as formulações estudadas (prilocaína com felipressina,

prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares e prilocaína sem aditivos).

Com relação ao sucesso, no presente estudo foram observadas taxas de sucesso da anestesia maiores que as obtidas por Gayoso (2009) (70%, 50% e 50%, respectivamente para a prilocaína com felipressina e prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares e prilocaína sem aditivos). Também a duração da anestesia foi maior que a observada por esta autora (30 minutos, 20 minutos e 10 minutos, respectivamente para a prilocaína com felipressina e prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares e prilocaína sem aditivos). Gayoso (2009) observou menor sucesso e duração de anestesia com a formulação sem aditivos do que com as demais formulações, não tendo observado diferença entre a prilocaína com felipressina e a prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares. Em decorrência desses resultados, no presente estudo não foi avaliada a solução de prilocaína sem aditivos.

Diferente do obtido por Gayoso (2009), no presente estudo a formulação de prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares proporcionou menor duração e taxa de sucesso do que a prilocaína com felipressina. Esta diferença pode ser provavelmente devida ao menor número de animais avaliados (10 ratos por grupo) no estudo de Gayoso (2009) e maior variabilidade de resultados, não sendo possível a observação de diferença entre os grupos.

No presente estudo, a prilocaína encapsulada em lipossomas multilamelares, embora tendo apresentado menor duração e taxa de sucesso de anestesia que a prilocaína com felipressina, apresentou maior sucesso que a prilocaína encapsulada em lipossomas unilamelares. Foi observado também que até o tempo de avaliação de 30 minutos após a injeção a prilocaína encapsulada em lipossomas multilamelares apresentou sucesso similar ao da

prilocaína com felipressina, promovendo anestesia pulpar em 80% dos animais.

Os resultados do presente estudo confirmaram os obtidos por Bhering (2010), que observou maior taxa de sucesso e duração da anestesia com a ropivacaína associada à epinefrina do que com a ropivacaína encapsulada em lipossomas unilamelares e ropivacaína sem aditivos, no bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos.

Da mesma forma, embora tenham avaliado técnica anestésica distinta da utilizada no presente estudo, bem como espécie diferente, Wiziack Zago *et al.* (2011), Tófoli *et al.* (2011) e Franz-Montan *et al.* (2011) observaram resultados semelhantes respectivamente para a prilocaína, mepivacaína e ropivacaína, as quais resultaram em maior taxa de sucesso e de duração da anestesia pulpar, quando associadas a vasoconstritor (felipressina no caso da prilocaína e epinefrina para as demais) do que quando encapsuladas em lipossomas unilamelares ou sem aditivos.

Os resultados do presente estudo mostram, portanto, que mesmo o aumento do número de bicamadas lipídicas não é suficiente para aumentar a taxa de sucesso e a duração da anestesia pulpar da prilocaína em relação à formulação de prilocaína com felipressina (disponível comercialmente). Embora a felipressina seja o vasoconstritor menos potente para uso odontológico (Malamed, 2005), ao promover diminuição do calibre dos vasos, reduz a velocidade de absorção da prilocaína e, desta forma, consegue prolongar a duração da anestesia. A encapsulação em lipossomas, entretanto, mesmo liberando mais lentamente a prilocaína, uma vez que esta sai das vesículas, pode promover vasodilatação e aumento da sua absorção para a circulação. Desta forma, a vasoconstrição parece ser um fator essencial para o prolongamento da anestesia pulpar.

Juntamente com os modelos de bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior, foi também utilizado no presente trabalho o modelo de

infiltração subcutânea em ferida cirúrgica, que permite a avaliação de formulações anestésicas em situação de maior desafio para a eficácia anestésica, a presença de inflamação, com conseqüente hipernocicepção. O modelo utilizado foi o descrito primeiramente por Vandermeulen *et al.* (1995) e Brennan *et al.* (1996), tendo sido desenvolvido para permitir o entendimento dos mecanismos de sensibilização que ocorrem após cirurgias e, assim, possibilitar o controle da dor pós-operatória. Posteriormente foram feitas modificações no modelo, tendo sido o mesmo também utilizado para avaliação de formulações anestésicas associadas a sistemas de liberação controlada de fármacos (Grant *et al.*, 1997).

Após o estímulo inflamatório, a lise tecidual, com liberação de mediadores da inflamação, vasodilatação e acúmulo de neutrófilos promove alteração significativa do pH, o qual pode baixar de 7,4 para 6,0 (Malamed, 2005). De acordo com Cunha *et al.* (2005), em ratos e camundongos o estímulo inflamatório (causado pela administração de carregenina e adjuvante completo de Freund, entre outros) elicia a liberação de uma cascata de citocinas, começando com TNF- α , a qual estimula a liberação de IL-1 β e, em seqüência final, as prostaglandinas e aminas simpatomiméticas, responsáveis pela ativação dos segundos mensageiros, os quais aumentam a excitabilidade neuronal, diminuindo o limiar dos nociceptores a estímulo mecânico. A seqüência de liberação das citocinas pode diferir entre espécies e também de acordo com o tipo de agente causador da inflamação (Cunha *et al.*, 2005).

A cascata de eventos decorrentes do estímulo inflamatório pode promover alterações no sistema nervoso periférico, com sensibilização dos nociceptores, conforme descrito, constituindo a denominada hiperalgesia primária. Além dessa alteração, também ocorre a hiperalgesia secundária, caracterizada pelo aumento nas respostas de transmissão neuronal da dor no sistema nervoso central – aumento da atividade dos neurônios do corno dorsal (Brennan *et al.*, 2005).

Neste modelo de inflamação, decorrente de incisão cirúrgica, Grant *et al.* (1997) observaram aumento da duração da anestesia de 23 minutos para 180 minutos quando eram administradas bupivacaína 0,5% sem aditivos e bupivacaína 2% encapsulada em lipossomas multilamelares. A utilização de bupivacaína na concentração de 2% foi possível devido à liberação lenta do anestésico pelos lipossomas; as mesmas concentração e dose utilizadas não seriam possíveis para a formulação sem aditivos, pois levariam à morte dos animais.

A eficácia da formulação de bupivacaína 0,5% em lipossomas multilamelares também foi relatada em relação à bupivacaína associada à epinefrina. Boogaerts *et al.* (1994) relataram aumento do período sem dor no pós-operatório de pacientes submetidos a vários tipos de cirurgia, após a injeção epidural de bupivacaína encapsulada lipossomas multilamelares. Entretanto, este estudo não foi randomizado ou duplo-cego, e, conforme a avaliação dos próprios autores, foram comparados diferentes tipos de cirurgia, sendo a escala de três pontos usada para a avaliação menos precisa que a escala analógica visual. Neste estudo foi observado aumento do período sem dor, porém a bupivacaína encapsulada em lipossomas multilamelares não foi capaz de induzir anestesia cirúrgica e, portanto, não poderia ser utilizada para tal fim.

Contrariamente a estes achados, a encapsulação da prilocaína em lipossomas multilamelares, da mesma forma que em lipossomas unilamelares, não resultou em aumento da taxa de sucesso e da duração da anestesia nas patas submetidas à inflamação no presente estudo.

Na ausência de inflamação, embora as formulações lipossomais não tenham diferido da prilocaína associada à felipressina com relação à duração da anestesia, foi observada maior taxa de sucesso com esta última do que com as formulações lipossomais. Desta forma, os resultados positivos obtidos na comparação de formulações de anestésicos encapsulados em

lipossomas em relação a soluções anestésicas sem aditivos (de Araújo *et al.*, 2008), não são reproduzidos quando a comparação é feita com soluções contendo vasoconstritor, como no presente estudo.

Embora tratando-se de modelos diferentes, é interessante notar ainda que a taxa de sucesso é semelhante nos modelos de avaliação de tecido mole sem presença de hiperalgesia, ou seja, no bloqueio do nervo infraorbital (figura 9) e a infiltração subcutânea nas patas não submetidas a procedimento cirúrgico (figura 17B). Nestes dois modelos pode-se observar anestesia em pelo menos 80% dos animais no tempo de 50 minutos após a infiltração das formulações de prilocaína com felipressina e prilocaína encapsulada em lipossomas multilamelares, enquanto que a formulação lipossomal unilamelar de prilocaína resultou em 50% dos animais com anestesia neste tempo de estudo.

Na condição de presença de inflamação foi possível observar redução nítida da porcentagem de animais com a pata anestesiada para todas as formulações avaliadas (figura 17A, B), que pode ser atribuída à hiperssensibilização dos nociceptores. De fato, estudos em humanos com hiperalgesia decorrente de inflamação pulpar mostram a maior dificuldade em obter anestesia nestes casos, em comparação com dentes nos quais não há inflamação pulpar (Bigby *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2007; Tortamano *et al.*, 2009).

A avaliação dos resultados obtidos com os três modelos de estudo avaliados no presente trabalho mostra que a encapsulação em lipossomas unilamelares e multilamelares não aumenta a eficácia anestésica da prilocaína de forma comparável à observada com a associação de prilocaína com felipressina, em termos de taxa de sucesso e de duração de anestesia. O aumento do número de bicamadas lipídicas dos lipossomas não resultou em aumento da eficácia anestésica da prilocaína. Embora a taxa de sucesso da anestesia no bloqueio do nervo alveolar inferior tenha sido maior com a

formulação de prilocaína encapsulada em lipossomas multilamelares em relação à formulação com lipossomas unilamelares, esse foi um resultado pontual, tendo a formulação com vasoconstritor apresentado, de forma consistente, resultados melhores que os proporcionados pelas formulações lipossomais.

Aliados aos resultados obtidos anteriormente em estudos em humanos, voltados de forma específica para a odontologia (Wiziack Zago *et al.*, 2011; Tófoli *et al.*, 2011; Franz-Montan *et al.*, 2011), os resultados do presente estudo mostram que a encapsulação em lipossomas, tanto unilamelares, quanto multilamelares proporciona eficácia anestésica inferior àquela obtida com formulações contendo vasoconstritor, não havendo vantagem no seu uso. Entretanto, essas formulações podem ser bastante promissoras para uso tópico (Franz-Montan *et al.*, 2007; Franz-Montan *et al.*, 2010a, Franz-Montan *et al.*, 2010b; Baroni, 2010). Assim, pesquisas futuras devem focar este tipo de uso.

7 CONCLUSÃO

A encapsulação da prilocaína em lipossomas unilamelares e multilamelares resultou em menor eficácia anestésica em comparação à solução de prilocaína com felipressina nos três modelos estudados, bloqueio do nervo infraorbital, bloqueio do nervo alveolar inferior e infiltração subcutânea em ferida cirúrgica.

REFERÊNCIAS*

- 1) Abe S, Takashi S, Sumitono M, Furuya H. Effects of 2% lidocaine on the blockage of the infraorbital nerve in rats. *Anesth Prog.* 1989; 36(4-5):179-182.
- 2) Akerman B, Aström A, Ross S, Telc A. Studies on the absorption, distribution and metabolism of labelled prilocaine and lidocaine in some animal species. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1966;24(4):389-403.
- 3) ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [acesso 2012 Jan 02]. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/default.asp>.
- 4) Andrade ED. *Terapêutica medicamentosa em odontologia.* 2a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2006.
- 5) Banerjee R. Liposomes: applications in medicine. *J Biomater Appl.* 2001;16(1):3- 21.
- 6) Baroni DB. *Eficácia anestésica da lidocaína encapsulada em lipossomas, em anestesia tópica palatina [dissertação].* Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp; 2010.
- 7) Batista da Silva C, Berto LA, Volpato MC, Ramacciato JC, Motta RH, Ranali J, et al. Anesthetic efficacy of articaine and lidocaine for incisive/mental nerve block. *J Endod.* 2010;36(3):438-441.
- 8) Berto LA. *Eficácia anestésica da formulação lipossomal de articaína, em ratos [dissertação].* Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp; 2010.

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

- 9) Bigby J, Reader A, Nusstein J, Beck M, Weaver J. Articaine for supplemental intraosseous anesthesia in patients with irreversible pulpitis. *J Endod.* 2006;32(11):1044-7.
- 10) Bhering CLB. Eficácia anestésica da preparação lipossomal de ropivacaína em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos [trabalho de Conclusão de Curso]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2010.
- 11) Boogaerts J, Declercq A, Lafont N, Benameur H, Akodad EM, Dupont JC, et al. Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. *Anesth Analg.* 1993a;76(3):553-555.
- 12) Boogaerts J, Lafont N, Donnay M, Luo H, Legros FJ. Motor blockade and absence of local nerve toxicity induced by liposomal bupivacaine injected into the brachial plexus of rabbits. *Acta Anaesthesiol Belg.* 1995;46(1):19-24.
- 13) Boogaerts JG, Lafont ND, Declercq AG, Luo HC, Gravet ET, Bianchi JA, et al. Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. *J Clin Anesth.* 1994;6(4):315-20.
- 14) 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):1201-1204.
- 15) Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain.* 1996;64(3):493-501.
- 16) Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Mechanisms of Incisional Pain. *Anesthesiol Clin N Am.* 2005;23:1-20.

- 17) Brunetto PC, Ranali J, Ambrosano GM, de Oliveira PC, Groppo FC, Meechan JG, et al. Anesthetic efficacy of 3 volumes of lidocaine with epinephrine in maxillary infiltration anesthesia. *Anesth Prog.* 2008;55(2):29-34.
- 18) Bucalo BD, Mirikitani EJ, Moy RL. Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine, and EMLA using 30-minute application time. *Dermatol Surg.* 1998;24(5):537-541.
- 19) Burke D, Joypaul V, Thomson MF. Circumcision supplemented by dorsal penile nerve block with 0.75% ropivacaine: a complication. *Reg Anesth Pain Med.* 2000;25(4):424-7.
- 20) Cederholm I, Evers H, Löfström JB. Skin blood flow after intradermal injection of ropivacaine in various concentrations with and without epinephrine evaluated by laser Doppler flowmetry. *Reg Anesth.* 1992;17(6):322-8.
- 21) 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):1092-1097.
- 22) Cereda CM, de Araújo DR, Brunetto GB, de Paula E. Liposomal prilocaine: preparation, characterization and in vivo evaluation. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2004;7:235-240.
- 23) Cereda CM, Tófoli GR, de Brito Junior RB, de Jesus MB, Fraceto LF, Groppo FC, et al. Stability and local toxicity evaluation of a liposomal prilocaine formulation. *J Liposome Res.* 2008;18(4):329-339.
- 24) 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.
- 25) Cunha TM, Verri A, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *PNAS.* 2005;105(5):1755-1760.

- 26) 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.
- 27) de Araújo 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 Anaesth.* 2004;51(6):566-572.
- 28) de Araújo DR, Cereda CM, Brunetto GB, Vomero VU, Pierucci A, Neto HS, et al. Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(11):1449-1457.
- 29) 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):653-661.
- 30) 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. *J Endod.* 1987;13:233-8.
- 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. *Anesthesiol.* 1975;42(6):731-736.
- 32) Fortes H, Pacheco G. *Dicionário médico.* Rio de Janeiro: Fábio M de Mello; 1968.
- 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 Aug 8. [Epub ahead of print]

- 34) Franz-Montan M, de Paula E, Groppo FC, Silva AL, Ranali J, Volpato MC. Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010a;110(6):800-804.
- 35) Franz-Montan M, Silva AL, Cogo K, Bergamaschi CC, Volpato MC, Ranali J, et al. Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. *Anesth Analg.* 2007;104(6):1528-1531.
- 36) Franz-Montan M, Silva AL, Fraceto LF, Volpato MC, Paula E, Ranali J, et al. Liposomal encapsulation improves the duration of soft tissue anesthesia but does not induce pulpal anesthesia. *J Clin Anesth.* 2010b;22(5):313-317.
- 37) Friedman M, Friedland GW. *As dez maiores descobertas da medicina.* São Paulo: Companhia das Letras; 2006.
- 38) Gayoso GR. Eficácia anestésica da prilocaína 3% lipossomal em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos [trabalho de conclusão de curso]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2009.
- 39) Gherardini G, Samuelson U, Jernbeck J, Aberg B, Sjöstrand N. Comparison of vascular effects of ropivacaine and lidocaine on isolated rings of human arteries. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1995;39(6):765-8.
- 40) Grant GJ, Bansinath M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med.* 2001;26(1):61-3.
- 41) Grant GJ, Barenholz Y, Bolotin EM, Bansinath M, Turndorf H, Piskoun B, et al. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiol.* 2004;101(1):133-137.

- 42) 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):204-207.
- 43) Grant SA. The Holy Grail: long-acting local anaesthetics and liposomes. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2002;16(2):345-352.
- 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;29:375-379.
- 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;29:380-383.
- 46) Jansson JR. Vasoactivity of ropivacaine. *Reg Anesth Pain Med*. 2008;33(1):90-1.
- 47) 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):238-246.
- 48) Keramidas EG, Rodopoulou SG. Ropivacaine versus lidocaine in digital nerve blocks: a prospective study. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119(7):2148-52.
- 49) Khan AA, Owatz CB, Schindler WG, Schwartz SA, Keiser K, Hargreaves KM. Measurement of mechanical allodynia and local anesthetic efficacy in patients with irreversible pulpitis and acute periradicular periodontitis. *J Endod*. 2007;33(7):796-99.
- 50) Kotwani RN, Gokhale PC, Bodhe PV, Kirodian BG, Kshirsagar NA, Pandya SK. A comparative study of plasma concentrations of liposomal

amphotericin B (L-AMP-LRC-1) in adults, children and neonates. *Int J Pharm.* 2002;238(1-2):11-5.



- 51) 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.
- 52) Lafont ND, Legros FJ, Boogaerts JG. Use of liposome-associated bupivacaine in a cancer pain syndrome. *Anaesthesia.* 1996;51(6):578-9.
- 53) Law SL, Huang KJ, Chiang CH. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption. *J Control Release.* 2000;63(1-2):135-40.
- 54) Malamed SF. *Manual de anestesia local.* 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- 55) Malinovsky JM, Benhamou D, Alafandy M, Mussini JM, Coussaert C, Couarraze G, et al. Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. *Anesth Analg.* 1997;85:1331-1336.
- 56) 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.
- 57) Naftalin LW, Yagiela JA. Vasoconstrictors: indications and precautions. *Dent Clin North Am.* 2002;46(4):733-46.
- 58) 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):433-447.
- 59) Nakamura K, Toda H, Kakuyama M, Nishiwada M, Yamamoto M, Hatano Y, et al. Direct vascular effect of ropivacaine in femoral artery and vein of the dog. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1993;37(3):269-73.

- 60) 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.
- 61) 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*. Nova Odessa: Napoleão; 2010, p. 169-185.
- 62) Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia*. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
- 63) 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>
- 64) Stuart DD, Kao GY, Allen TM. A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. *Cancer Gene Ther*. 2000;7(3):466-75.
- 65) Strichartz GR, Ritchie JM. The action of local anesthetics on ion 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.
- 66) Tófoli GR, Cereda CM, Groppo FC, Volpato MC, Franz-Montan M, Ranali J, et al. Efficacy of liposome-encapsulated mepivacaine for infiltrative anesthesia in volunteers. *J Liposome Res*. 2011;21(1):88-94.

- 67) Tortamano IP, Siviero M, Costa CG, Buscariolo IA, Armonia PL. A comparison of the anesthetic efficacy of articaine and lidocaine in patients with irreversible pulpitis. *J Endod.* 2009;35(2):165-8.
- 68) Vandermeulen E, Gebhart GF, Brennan TJ. Effect of pre-emptive bupivacaine infiltration on animal model of incisional pain (Abstract). *Anesthesiology* 1994;81:A986.
- 69) Vandermeulen E. Pain perception, mechanisms of action of local anesthetics and possible causes of failure. *Rev Belge Med Dent.* 2000;55(1):29-40.
- 70) Volpato MC, Ranali J. Reações à superdosagem das soluções anestésicas locais. In: Andrade ED, Ranali J. *Emergências médicas em odontologia.* 3a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2011. p. 131-7.
- 71) Wienzek H, Freise H, Giesler I, Van Aken HK, Sielenkaemper AW. Altered blood flow in terminal vessels after local application of ropivacaine and prilocaine. *Reg Anesth Pain Med.* 2007;32(3):233-9.
- 72) Wiziack Zago PMW, 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):81-87.

ANEXO 1

Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA/Unicamp).



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

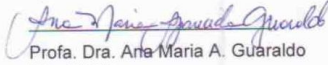
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1937-1, sobre "Eficácia anestésica das preparações lipossomais uni e multilamelar de prilocaína, em bloqueio dos nervos infraorbital e alveolar inferior e em ferida cirúrgica, em ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo / Fabiana Pianchetti Nolasco, 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.

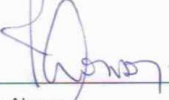
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1937-1, entitled "Anesthetic efficacy of uni and multilamelar liposomal prilocaine 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.



Prof. 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/>