



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

DOSAGEM DE LIDOCAÍNA EM PLASMA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Pesquisador: Bruno de Souza Batista Gomes

RA: 023248

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Co-Orientadora: Profa. Giovana Radomile Tófoli

Ano de Conclusão do Curso: 2006

TCC 274

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

Bruno de Souza Batista Gomes

**DOSAGEM DE LIDOCAÍNA EM PLASMA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Diploma de Cirurgião-dentista.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

**Piracicaba
2006**

Dedico este trabalho aos meus pais, Rubens Batista Gomes Filho e Maria Inês de Souza Batista Gomes, aos meus irmãos, Ricardo de Souza Batista Gomes, Thaís de Souza Batista Gomes e Fábio de Souza Batista Gomes e minha namorada Luale Leão Ferreira pelo apoio e incentivo nestes anos de caminhada e conquistas.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Francisco Carlos Groppo e a mestranda Giovana Radomile Tófoli pela orientação neste trabalho e mais ainda por sua dedicação e amizade, sendo sempre queridos por todos os alunos.

Aos meus amigos Théo Bovo, Leonardo Marques, Leandro Marques, Anderson Raimundo e Ricardo Gomes pela amizade e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos amigos e companheiros da República KantaGalo FEFA, CARLÃO, TITI, JOJA, PAULETA e agregados BARATÃO, VITÃO, BINO, JOÃO MELLON e VÉIO pela convivência, ajuda e companheirismo nestes anos de luta e, antes de tudo, muita alegria juntos.....Obrigado

Aos meus pais, Rubens Batista Gomes Filho e Maria Inês de Souza Batista Gomes, pelo amor, carinho, respeito, dedicação recebidos em toda minha vida.

A minha namorada, Luale Leão Ferreira pelo apoio, dedicação e carinho ao longo desta caminhada.

Sumário

	p.
Lista de figuras.....	1
Lista de abreviaturas e siglas.....	2
Resumo.....	3
Objetivo.....	9
Materiais	9
Metodologia.....	10
Discussão.....	20
Conclusão.....	22
Referências bibliográficas.....	23

Lista de figuras

	p.
Figura 1: Cromatograma lidocaína em distintas concentrações com fase móvel 1.....	11
Figura 2: Cromatograma lidocaína em distintas concentrações com fase móvel 2.....	12
Figura 3: Cromatograma lidocaína em distintas concentrações com fase móvel 3.....	12
Figura 4: Cromatograma lidocaína em distintas concentrações com fase móvel 4.....	13
Figura 5: Cromatograma lidocaína em distintas concentrações com fase móvel 5.....	13
Figura 6: Cromatograma da lidocaína (verde) e do blank (azul) após a extração 1.....	14
Figura 7: Cromatograma da lidocaína (vermelho) e do blank (azul) após a extração 2.....	15
Figura 8: Cromatograma da lidocaína em distintas concentrações após a extração 3.....	18
Figura 9: Curva de calibração obtida com lidocaína em diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,79 µg/mL), utilizando a extração 3.....	17
Figura 10: Cromatograma da lidocaína em distintas concentrações após a extração 4.....	17
Figura 11: Cromatograma da lidocaína (vermelho) e do blank (azul) após a extração 5.....	18
Figura 12: Cromatograma LDC 50 µg/mL (azul), LDC 25 µg/mL (vermelho), LDC 12.5 µg/mL (verde) e LDC 6,25 µg/mL após a extração 6.....	19
Figura 13: Cromatograma da lidocaína (vermelho) e do blank (azul) após a extração 8.....	20
Figura 14: coluna de sílica Bond Elut Jr (Varian®).....	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL =	anestésico local
CD =	cirurgião dentista
CLAE =	cromatografia líquida de alta eficiência
Et al.	e outros
LDC =	lidocaína
MP =	mepivacaína
M =	molar
ml =	milímetros
NAOH =	hidróxido de sódio
nm =	nanômetro
PI =	padrão interno
RPM =	rotação por minuto
UV =	ultra violeta
µl =	microlitro

RESUMO:

Para evitar a ocorrência de reações tóxicas após o uso de anestésicos locais (AL) é necessário que o cirurgião dentista conheça a farmacocinética destes agentes após a injeção intraoral. O estudo da concentração plasmática de ALs com CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) pode determinar a farmacocinética dos AL e conseqüentemente sua segurança após a aplicação. Assim, o objetivo deste trabalho foi criar um método simples, *in vitro*, para determinação da concentração plasmática da lidocaína com CLAE. O plasma utilizado neste estudo foi doado pelo Hospital dos Fornecedores de Cana (Piracicaba-SP). Após adição de diferentes concentrações de lidocaína e mepivacaína (padrão interno), as amostras de plasma foram extraídas através de vários métodos diferentes. 50µL das amostras obtidas foram injetados no sistema de CLAE, a coluna utilizada foi LiChrospher 100 RP-18. Foram testadas várias condições cromatográficas para estabelecer a melhor fase móvel para quantificação da LDC em água e em plasma. O fluxo foi padronizado para todos os ensaios para 1,0 mL/min e o detector UV foi ajustado para 210nm. O limite de detecção e de quantificação foi 0,79µg/mL. Os resultados mostraram que a fase móvel que permitiu melhores quantificações de LDC em água foi a fase móvel composta por tampão fosfato de sódio dibásico a 0,05M (pH=5,8) e acetonitrila na proporção 70:30. Entretanto, o ensaio em plasma mostrou que a fase móvel composta de tampão fosfato de potássio monobásico a 0,01M (pH=5,8) e acetonitrila (80:20) apresentou melhor quantificação. O melhor método de extração, foi aquele onde foi empregada uma solução de precipitação (ácido perclórico a 20% e tampão fosfato de citrato, pH 5,8, 90:10 v/v) e água (50:50), solução de ajuste de pH (tampão fosfato-citrato e hidróxido de sódio a 1M, 110:40 v/v) e água (75:75). Concluímos que nenhum dos métodos mostrou-se satisfatório para a quantificação dos níveis séricos de LDC e que outras variáveis deverão ser observadas em futuros estudos.

INTRODUÇÃO:

Em 1904, com a descoberta da procaína, um anestésico local do grupo éster, tornou-se possível o controle da dor trans-operatória em Odontologia. Os anestésicos desse grupo foram gradualmente abandonados devido ao seu potencial alergênico. Hoje são utilizados como anestésicos tópicos (benzocaína). A lidocaína, primeiro anestésico do grupo amida, foi lançada em 1948, substituindo os compostos do grupo éster, pois os anestésicos deste grupo raramente provocam reações alérgicas (HAAS, 2002). Todos os agentes anestésicos locais (AL) disponíveis no comércio brasileiro pertencem ao grupo amida (RAMACCIATO *et al.*, 2003).

A anestesia local é o método de controle da dor mais empregado em Odontologia. Pode-se estimar que os dentistas brasileiros utilizem cerca de 250 milhões de tubetes anestésicos por ano (RANALI, 2002). Embora seja um método seguro, alguns cuidados são indispensáveis para a sua execução. Um dos mais importantes é a escolha correta do anestésico local a ser utilizado, considerando-se tipo de procedimento a ser realizado e o estado geral de saúde do paciente, pois as soluções anestésicas possuem características próprias em relação ao período de latência, potência e duração da anestesia (SOARES, 2002).

Além disso, é necessário respeitar as dose máximas permitidas, pois a toxicidade dos anestésicos locais está associada à administração extravascular de grandes doses destes agentes (COVINO & GIDDON, 1981). Outro fator que aumenta a toxicidade dos anestésicos locais é a realização de rápidas injeções intravasculares (COVINO & GIDDON, 1981). Assim é de fundamental importância que o Cirurgião dentista (CD) tenha domínio das técnicas anestésicas para realizar uma técnica segura e de qualidade (RANALI, 2002). Assim o procedimento de aspiração não deve ser negligenciado durante a anestesia, pois além de as injeções intravasculares serem a maior causa de complicações imediatas após anestesia local (KNOLL-KOHLER, 1991), a toxicidade dos

anestésicos locais pode ser aumentada em até 200 vezes após injeção intravascular (MEECHAN & ROOD, 1992).

O sistema nervoso central é o local mais susceptível aos efeitos tóxicos destas drogas, em caso de intoxicação podem ocorrer sinais e sintomas excitatórios seguidos de depressão (COVINO & GIDDON, 1981). Além disso, os anestésicos locais são cardiotoxicos exercendo efeitos indiretos mediados centralmente e diretos no miocárdio, relacionados com a interação dos anestésicos com canais iônicos. A cardiotoxicidade indireta produz efeitos iniciais estimulantes, seguidos de depressão com o aumento da dose. Ações diretas causam efeitos cronotrópico, dromotrópico e inotrópico negativos (GRAF, 2001).

Várias são as formulações anestésicas locais hoje disponíveis para anestesia odontológica sendo que as soluções disponíveis no mercado nacional podem ser compostas por outros quatro sais anestésicos: prilocaína, mepivacaína, bupivacaína e articaína (RAMACCIATO *et al.*, 2003). A lidocaína é utilizada há mais de 50 anos em Odontologia, na concentração de 2%, apresenta tempo de latência de 2 a 3 minutos e curta duração de ação (5 a 10 minutos) de anestesia pulpar, quando não está associada a vasoconstritor e 1 hora quando está associada a algum vasoconstritor (Malamed, 2001).

Apesar de ser incomum, pode ocorrer superdosagem de anestésicos locais em Odontologia (MEECHAN, 1998). Existem relatos de overdose de anestésicos locais e nestes casos os pacientes apresentaram convulsões e parada cardíaca seguida de morte (MALAMED, 1999). Assim para evitar estas reações é necessário que o CD, além de usar técnicas anestésicas apropriadas e respeitar as doses máximas das soluções anestésicas, conheça a farmacocinética dos AL após a injeção intraoral.

O estudo da concentração plasmática de AL pode determinar a farmacocinética dos agentes anestésicos e conseqüentemente sua segurança após a aplicação. Apesar

desta importância, a rota de penetração e a distribuição tecidual dos agentes anestésicos não estão totalmente determinadas (KANJANAWATTANA et al., 2001).

Assim, a determinação plasmática de anestésico local é um método útil para a prática clínica (ADAMS, 1989). Estudos farmacêuticos para a análise plasmática de drogas requerem métodos analíticos sensíveis (LE GUEVELLO, 1993). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) é um método utilizado em vários estudos para determinar o nível plasmático de anestésicos locais após sua aplicação (ADAMS et al., 1989; VLEETER et al., 1996). Embora existam vários métodos para quantificação dos diversos componentes de uma solução anestésica local, a farmacopéia Americana recomenda a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência ou performance (CLAE ou HPLC) como sendo o método mais preciso e confiável (USP, 1995).

A CLAE é um método de separação que resulta da distribuição de uma substância entre a fase estacionária não polar e a fase móvel polar. A fase móvel, a qual é normalmente constituída por um tampão em determinada proporção com um solvente orgânico, contém a amostra analisada e será passada pela fase estacionária que consiste de uma coluna cilíndrica com partículas sólidas empacotadas (KANJANAWATTANA et al., 2001). A CLAE analisa qualitativa e quantitativamente fazendo a separação dos constituintes de um composto, baseado em uma fase sólida estacionária (coluna) e em uma fase móvel líquida.

Uma bomba impulsiona a fase móvel contida em um reservatório. Um injetor manual ou automático introduz a amostra na fase móvel que a arrasta até a coluna. Um detector e um integrador de dados mede a quantidade dos constituintes por comparação com padrões (USP, 1995).

Vários estudos utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de níveis sanguíneos após injeção de AL. LOTFI et al. (1997) utilizou a CLAE para determinação simultânea de lidocaína e bupivacaína no plasma humano, o

método determinou a farmacocinética completa durante a anestesia peribulbar dos dois anestésicos estudados, apesar de serem administrados em doses diferentes.

GROEN *et al.* (1998) também investigou a farmacocinética da bupivacaína, mepivacaína e seus isômeros ópticos após a injeção peridural das misturas racêmicas das duas drogas. Foram coletadas amostras de sangue de seis pacientes cirúrgicos durante 24 horas após a administração. Os autores encontraram picos plasmáticos diferentes para as misturas racêmicas e para os isômeros, e concluíram que os isômeros têm distribuição sistêmica diferente da mistura racêmica, assim é preferível o uso dos isômeros do que a mistura.

Outro estudo também estudou a farmacocinética dos isômeros da mepivacaína em dez voluntários que receberam a mistura racêmica deste AL via intravenosa. O sangue foi analisado durante até 8 horas após o início da infusão e a concentração plasmática foi determinada por CLAE. Os isômeros apresentaram farmacocinética distintas, provavelmente devido a diferentes ligações protéicas que ocorrem no plasma (BURM *et al.*, 1997).

KAKIUCHI *et al* (2002) desenvolveram um método para quantificação de lidocaína 1,5% e seus metabólitos no plasma com CLAE após anestesia peridural contínua em 5 pacientes com câncer. Os autores concluíram que o método foi útil e confiável e, além disso, fornece informações importantes sobre o metabolismo e toxicidade dos anestésicos locais.

Em Odontologia existem alguns estudos que determinaram os níveis plasmáticos de AL. OERTEL *et al.* (1999) dosou com CLAE a concentração de articaína 4% no soro de indivíduos jovens e idosos após a infiltração submucosa de duas doses diferentes deste AL e determinou os parâmetros farmacocinéticos desta droga. Os resultados mostraram que o clearance e o volume de distribuição foram menores nos idosos, assim os autores concluíram que o metabolismo da articaína é idade dependente.

KANJANAWATTANA et al. (2001) desenvolveram um método para detecção de lidocaína na polpa dental com CLAE. Foram utilizados dois cães que receberam injeção de lidocaína 2% com adrenalina 1:100.000 na mucosa maxilar e mandibular na região caninos esquerdos, após o tratamento e extração tecidual das polpas dentais, foi feita a dosagem do AL com CLAE. Os autores concluíram que a CLAE é um método confiável e reprodutível para a determinação da concentração de lidocaína na polpa dental.

A farmacocinética da lidocaína e da prilocaína foi determinada com a medida da concentração plasmática com CLAE após a aplicação tópica EMLA na mucosa oral de 12 voluntários. A concentração máxima medida foi de 418 ng/ml para a lidocaína e de 223 ng/ml para a prilocaína, em todos os voluntários os níveis plasmáticos de AL estavam abaixo dos níveis tóxicos (VICKERS *et al*, 1997).

OERTEL *et al* (1993) avaliaram a distribuição da articaína 4% e de lidocaína 2% após a injeção submucosa na região de molares superiores. O sangue foi colhido do alvéolo 2-14 minutos após a injeção, as amostras foram tratadas com um método que controla a hidrólise *in vitro* após a colheita do sangue. Os níveis sangüíneos da articaína foram maiores o que corresponde a maior concentração da droga após a injeção.

Apesar de existirem diversos estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a dosagem de AL com CLAE, em Odontologia há poucos estudos que determinaram a farmacocinética dos AL após a injeção intraoral com este método. Assim é importante determinar um método simples e barato *in vitro* para uso futuro em estudos *in vivo* que determinem a farmacocinética e segurança de AL após a aplicação intraoral.

OBJETIVOS:

A farmacopéia Americana (USP, 1995) recomenda a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência ou performance (CLAE ou HPLC) para dosagem de anestésicos locais no plasma. Devido à importância da determinação da farmacocinética dos anestésicos locais em Odontologia, o objetivo deste trabalho foi determinar um método simples e barato *in vitro* para determinação dos níveis plasmáticos de anestésicos, que possa ser utilizado no futuro em estudos *in vivo* que determinem a farmacocinética de AL após a aplicação intraoral.

MATERIAL , MÉTODOS e RESULTADOS

Para facilitar o entendimento da metodologia, os resultados obtidos a partir delas serão apresentados na seqüência em que os métodos foram desenvolvidos.

MATERIAIS:

Reagentes e padrões analíticos

Para a determinação de um método de dosagem de anestésicos locais no plasma com CLAE foram utilizados fosfato de potássio mono e di-básico, fosfato de sódio mono e di-básico, acetonitrila (grau HPLC), ácido fosfórico, hidróxido de sódio, ácido perclórico, acetato de sódio, lidocaína (LDC) e mepivacaína (PI) como padrão interno

METODOLOGIA:***Condições de cromatografia***

O sistema de CLAE utilizado é constituído por uma bomba ternária Varian 9010, um detector Varian UV-VIS 9050 acoplado ao software integrador Millennium 5.0. As amostras foram injetadas manualmente através de injetor tipo reodine. A coluna utilizada foi LiChrospher 100 RP-18 (endcapped, 150 x 4.6 mm x 5 µm). A fase móvel inicial foi constituída por tampão fosfato 0,01 M (pH 5,8) e acetonitrila (80:20), a qual foi degaseificada por sonicador. O fluxo será 1,0 ml por minuto e o volume da injeção foi de 50µl, com o detector a 210 nm.

Efeito da composição da fase móvel sobre a concentração

Foram realizados os testes avaliando a constituição de fase móvel e pH das mesmas. As variações que demonstraram os melhores resultados foram utilizadas para a dosagem final de lidocaína no plasma.

Para esta determinação inicial foram utilizadas amostras de lidocaína diluídas em água ultra purificada com concentrações diversas a partir de 5 µg/mL (0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2.5 e 5). A mepivacaína a 50 µg/mL foi utilizada como padrão interno (PI) em todas as amostras.

As seguintes fases móveis foram avaliadas:

- 1 – Tampão fosfato de sódio di-básico 0,05M (pH=5,8) e acetonitrila (70:30);
- 2 – Tampão fosfato de sódio monobásico 0,05 M (pH=4,7) e acetonitrila (70:30);
- 3 – Tampão fosfato de potássio 0,01M (pH=5,8) e acetonitrila (70:30);
- 4 – Tampão fosfato de potássio 0,01M (pH=4,7) e acetonitrila (70:30);
- 5 – Tampão fosfato de sódio di-básico 0,05M (pH=6,5) e acetonitrila (70:30).

As fases móveis foram testadas utilizando dois comprimentos de onda distintos 210nm e 254 nm. Os melhores resultados foram obtidos com 210nm e este comprimento de onda foi utilizado para a dosagem final de lidocaína no plasma. Todas as fases móveis foram degaseificadas em banho ultrassônico previamente ao uso. O pH foi ajustado com ácido fosfórico ou com hidróxido de sódio 1M.

Foram observados os melhores resultados utilizando-se a fase móvel 1 [Tampão fosfato de sódio dibásico 0,05M (pH=5,8) e acetonitrila (70:30)]. Esta fase móvel permitiu a dosagem de lidocaína, nas menores concentrações, e do PI impedindo a sobreposição dos picos cromatográficos (Figura 1).

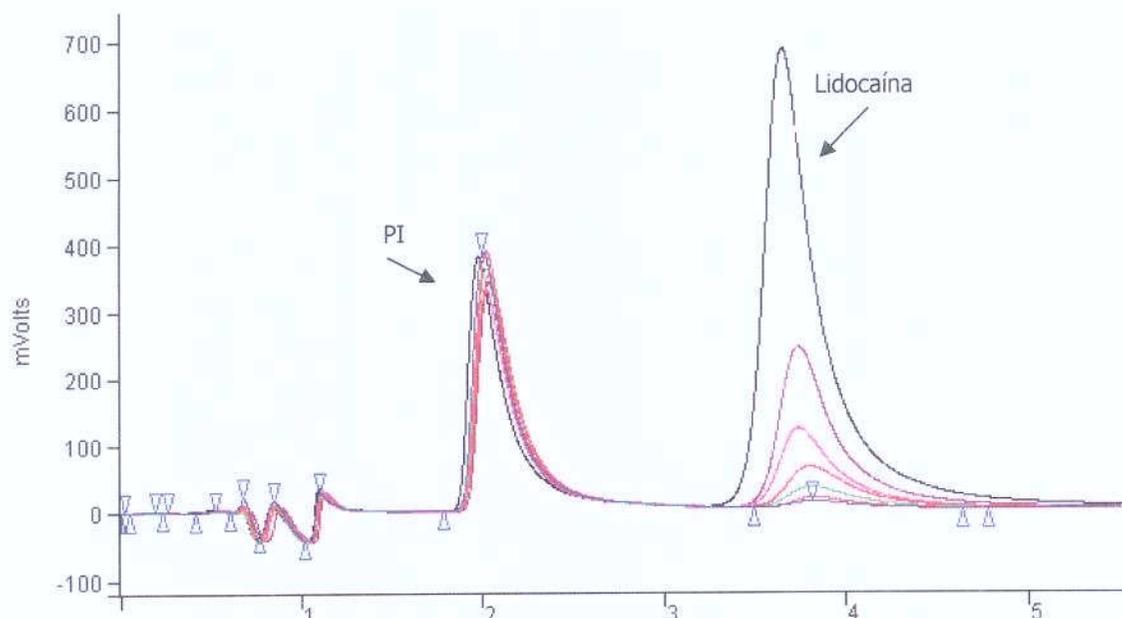


Figura 1: Cromatograma lidocaína em distintas concentrações com fase móvel 1.

A fase móvel 2 [Tampão fosfato de sódio monobásico 0,05 M (pH=4,7) e acetonitrila (70:30)] não permitiu a dosagem de lidocaína, pois houve sobreposição dos picos cromatográficos da lidocaína e do PI (Figura 2).

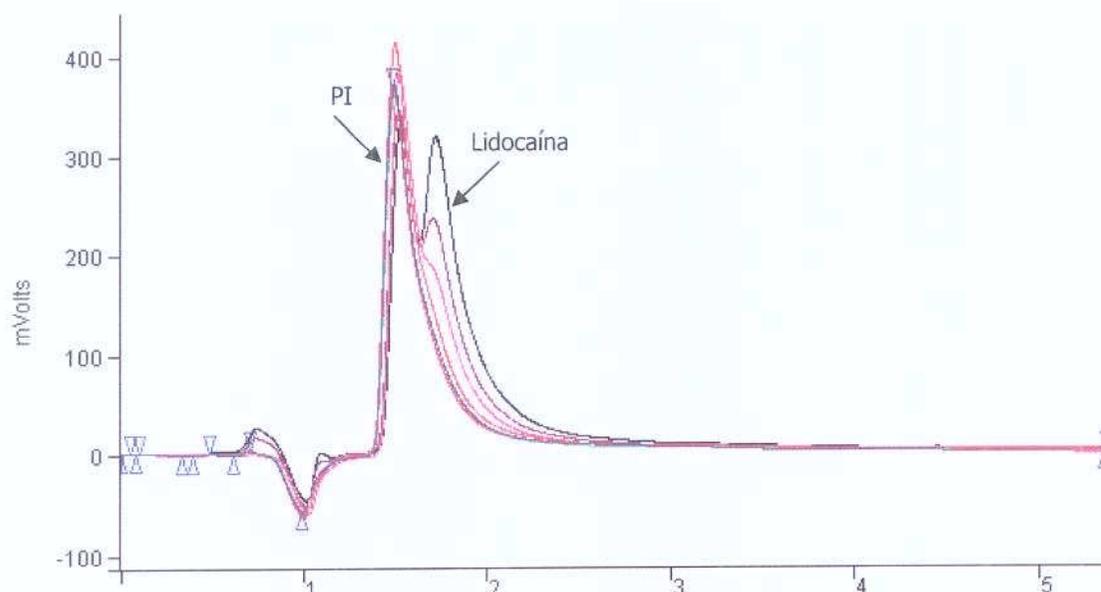


Figura 2: Cromatograma lidocaína em distintas concentrações com fase móvel 2.

A fase móvel 3 [Tampão fosfato de potássio 0,01M (pH=5,8) e acetonitrila (70:30)] não permitiu a dosagem de lidocaína, apesar de não ter ocorrido sobreposição dos picos cromatográficos da lidocaína e do PI, esta fase móvel não permitiu detectar as menores concentrações de lidocaína (Figura 3).

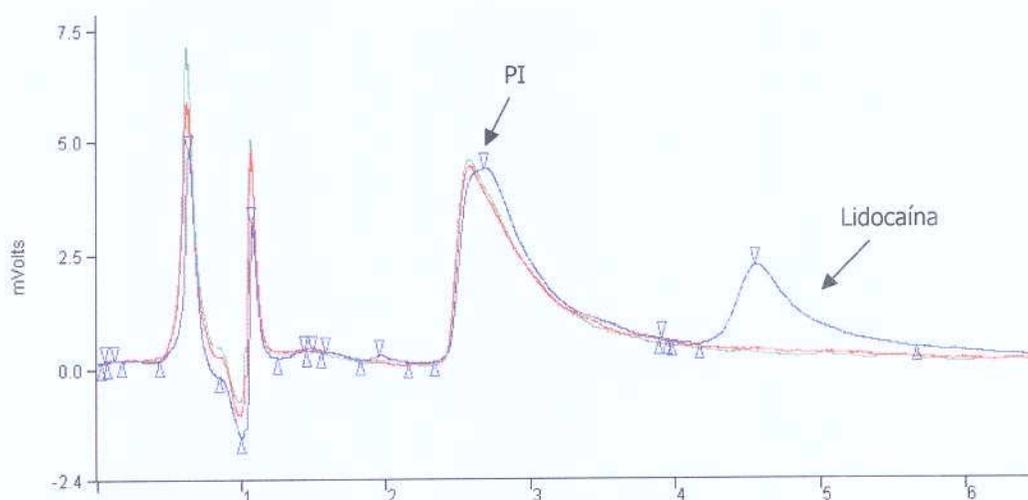


Figura 3: Cromatograma lidocaína em distintas concentrações com fase móvel 3.

A fase móvel 4 [Tampão fosfato de potássio 0,01M (pH=4,7) e acetonitrila (70:30)] não permitiu a dosagem de lidocaína, pois também ocorreu sobreposição dos picos cromatográficos da lidocaína e do PI (Figura 4).

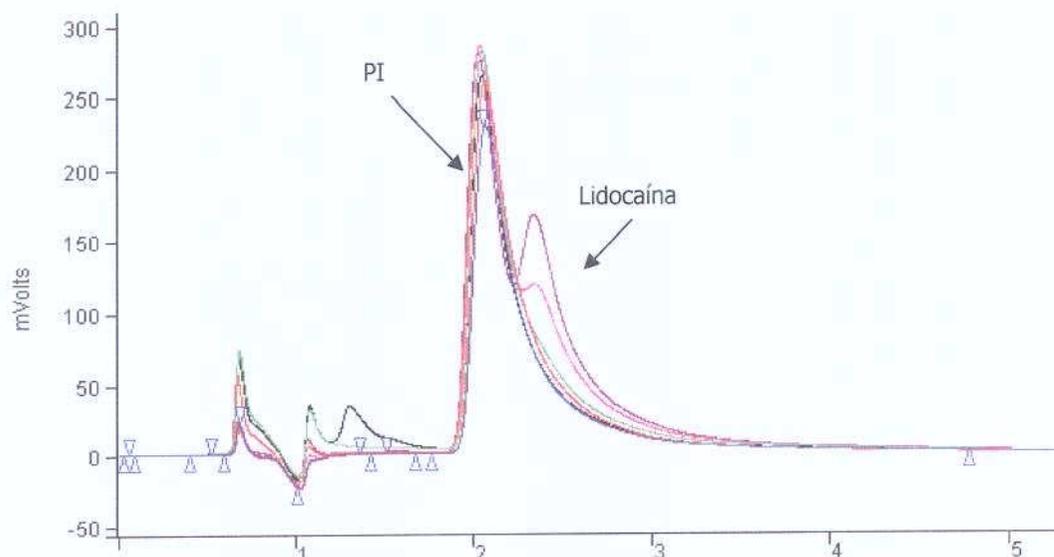


Figura 4: Cromatograma lidocaína em distintas concentrações com fase móvel 4.

A fase móvel 5 [Tampão fosfato de potássio 0,01M (pH=6,5) e acetonitrila (70:30)] não permitiu a dosagem de lidocaína, apesar de não ter ocorrido sobreposição dos picos cromatográficos da lidocaína e do PI, esta fase móvel não permitiu detectar as menores concentrações de lidocaína (Figura 5).

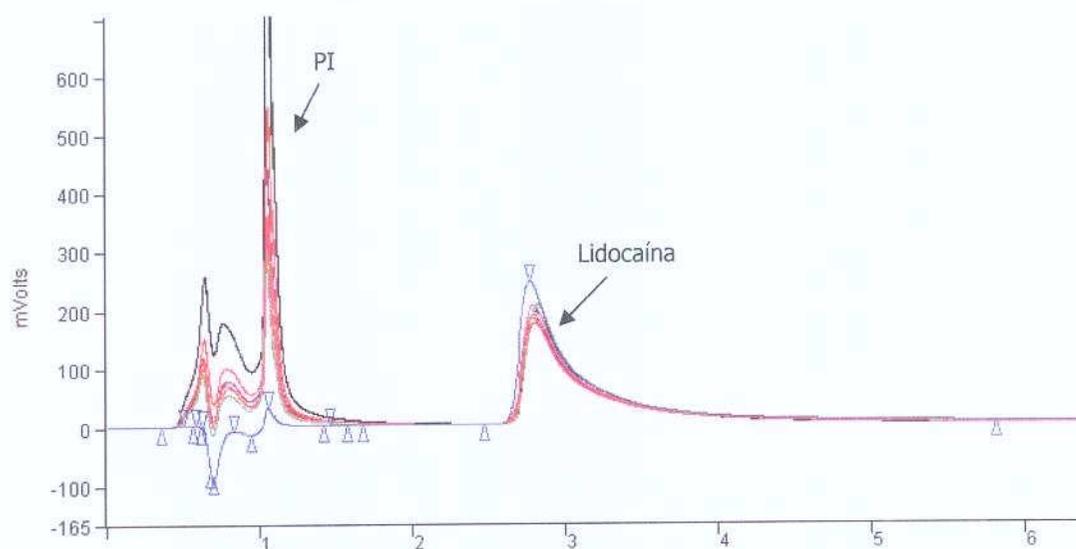


Figura 5: Cromatograma lidocaína em distintas concentrações com fase móvel 5.

Lidocaína nas amostras de plasma

Todo o plasma utilizado neste estudo foi doado pelo Hospital dos fornecedores de

cana de Piracicaba. O plasma e as substâncias químicas utilizadas foram descartados ao final do mesmo de acordo com o programa de gerenciamento de resíduos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Para os ensaios de quantificação, as amostras individuais sofreram diluições progressivas de lidocaína a partir de 10 µg/mL (5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.15). A fase móvel utilizada para os testes iniciais foi trocada por uma que mostrou melhores resultados no plasma. Composta de tampão fosfato de potássio monobásico 0,01M (pH=5,8) e acetonitrila (80:20).

Efeito da extração sobre a concentração

As amostras contendo LDC foram submetidas aos processos de extração descritos a seguir. Os resultados foram comparados em termos de precisão e linearidade e a melhor combinação de extração foi adotada para a próxima fase.

Método de extração 1 - 500 µL de plasma + 500 µL de acetonitrila, agitação em vortex por 60 s, sendo a mistura mantida por 15 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi injetado no sistema cromatográfico. Esta extração não se mostrou eficiente, pois eliminou pequena quantidade de proteínas plasmáticas, o que impossibilitou a detecção da LDC e do PI (Figura 6).

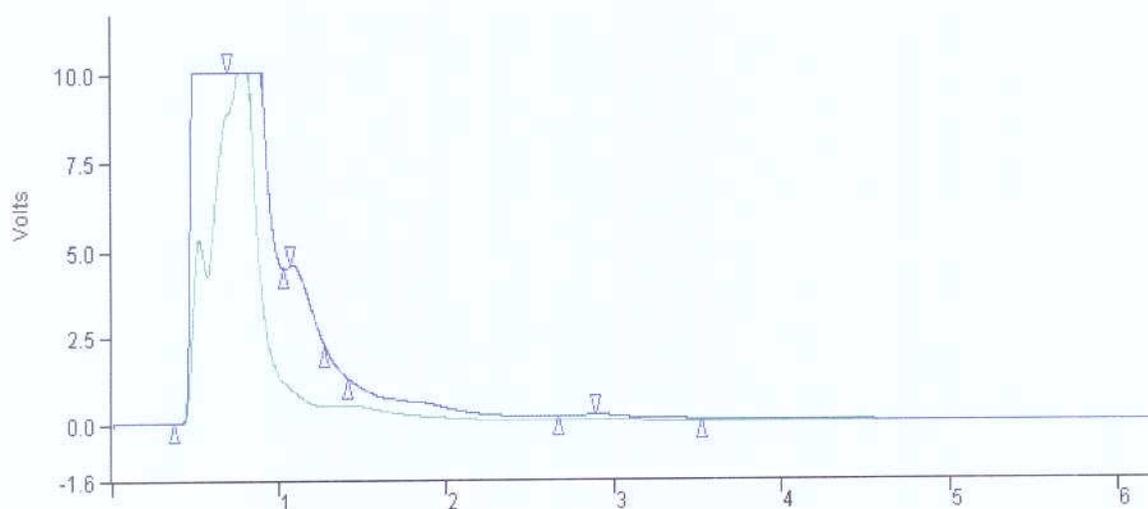


Figura 6: Cromatograma da lidocaína (verde) e do blank (azul) após a extração 1.

Método de extração 2 – 500 μL de plasma + 250 μL de solução de precipitação.

Esta solução é composta por ácido perclórico a 20% e tampão fosfato de citrato, pH 5,8, 90:10 (v/v). A mistura foi agitada em vortex por 60 s e submetida à centrifugação a 14.000 rpm durante 15 min, 450 μL do sobrenadante foram misturados com 500 μL de uma solução de ajuste de pH (tampão fosfato de citrato, hidróxido de sódio 1M, 110:40 (v/v). Após este preparo as amostras foram injetadas no sistema cromatográfico. A extração não se mostrou eficaz (Figura 7), pois não eliminou um quantidade suficiente de proteínas que possibilitasse a detecção de LDC.

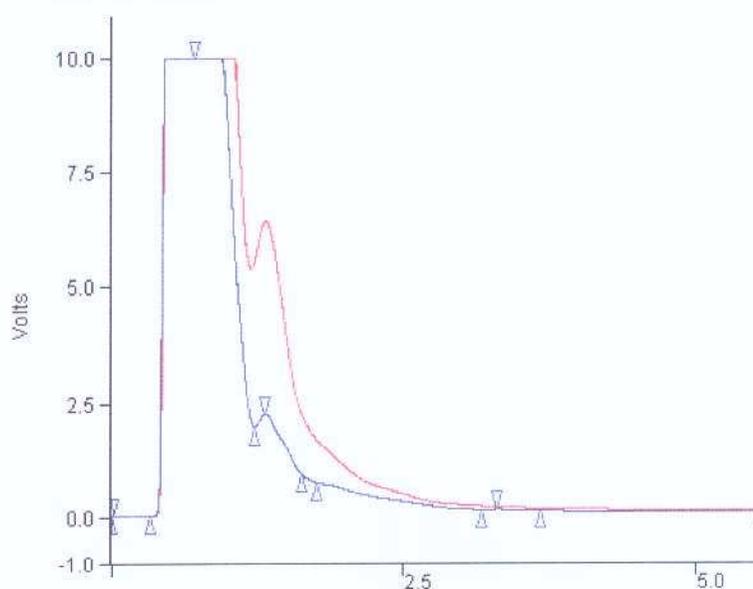


Figura 7: Cromatograma da lidocaína (vermelho) e do blank (azul) após a extração 2.

Método de extração 3 – 500 μL de plasma + 250 μL de solução de precipitação.

Esta extração foi semelhante à segunda, porém as proporções utilizadas na solução de precipitação e na solução de ajuste de pH foram diferentes, sendo estas:

Solução de precipitação (ácido perclórico 20%+tampão citrato de fosfato)	Solução de ajuste de pH (tampão fosfato de citrato +NaOH)
30:70	90:60
50:50	75:75
70:30	60: 90

Ao final das extrações, o pH das amostras foi medido e estas foram injetadas no sistema cromatográfico. O pH obtido para as amostras foi:

Extração	PH
Proporção sol. de precipitação 30:70, sol. ajuste de pH (90:60)	7,0
Proporção sol. de precipitação 50:50, sol. ajuste de pH (75:75)	6,0
Proporção sol. de precipitação 70:30, sol. ajuste de pH (60:90)	6,0

Os resultados foram comparados em termos de precisão e linearidade e o melhor método [extração com solução de precipitação 50:50, solução de ajuste de pH (75:75)] foi adotado para a próxima fase. Esta extração se mostrou eficaz para a detecção de LDC no plasma, porém não foi possível detectar quantidades muito pequenas, a menor quantidade detectada $0,79\mu\text{mL}$. Assim, novos métodos de extração foram tentados. A figura 8 mostra os cromatogramas obtidos e a Figura 9 mostra a curva de calibração obtida.

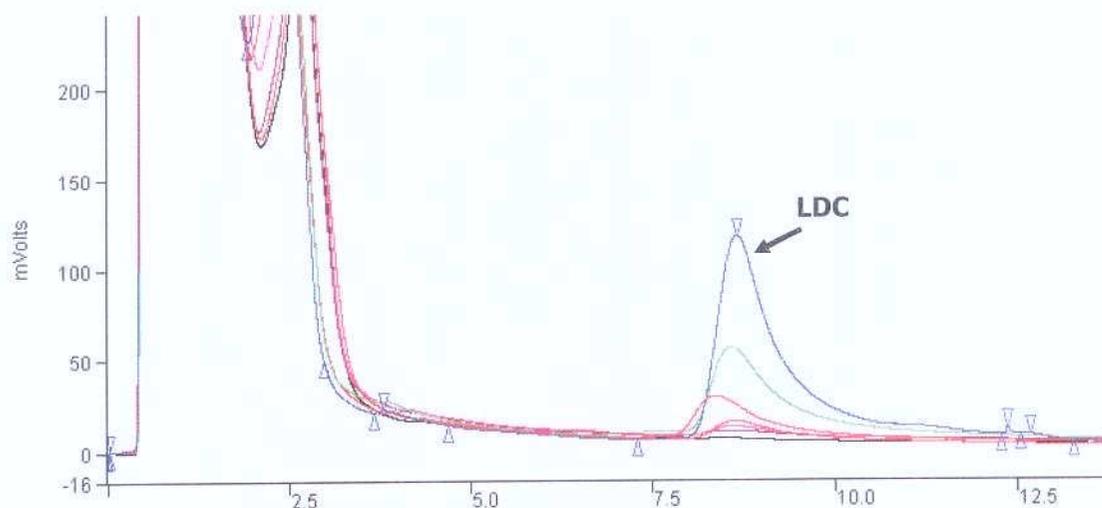


Figura 8: Cromatograma da lidocaína em distintas concentrações após a extração 3.

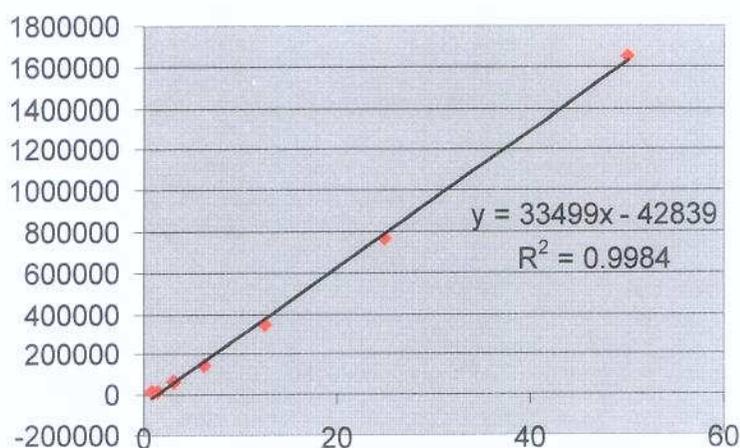


Figura 9: Curva de calibração obtida com lidocaína em diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,79 µg/mL), utilizando a extração 3.

Método de extração 4- 500 µL de plasma + 250 µL de solução de precipitação [ácido perclórico a 20% e tampão fosfato de citrato pH 5.8 (50:50, v/v)]. A mistura foi agitada em vortex por 60s e submetida à centrifugação a 14.000 rpm durante 15 min. Quatrocentos e cinquenta microlitros do sobrenadante foram misturados à 150 µL da solução de ajuste de pH [tampão fosfato de citrato + hidróxido de sódio 1M na proporção 75:75 (v/v)]. Após este preparo as amostras foram injetadas. Os resultados obtidos não foram satisfatórios ficando, o limite de detecção acima do esperado. (Figura 10)

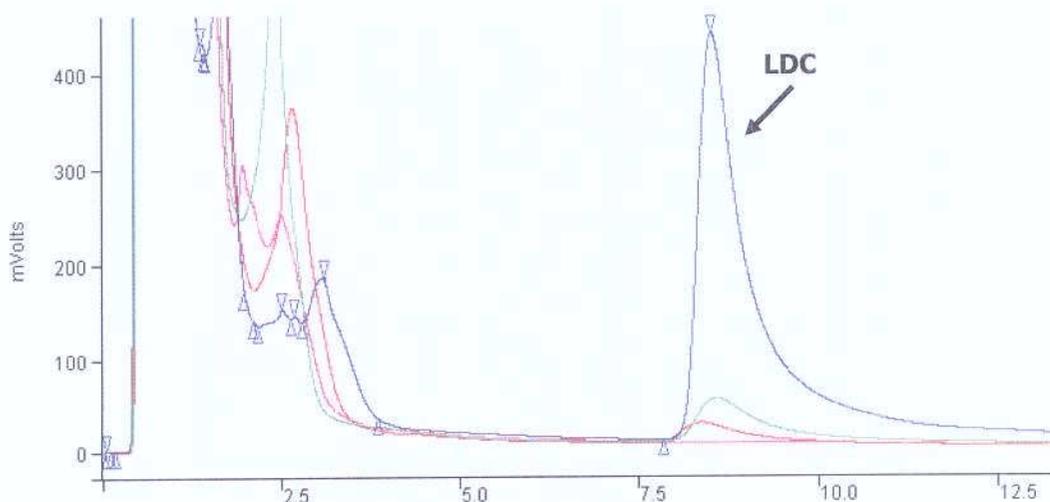


Figura 10: Cromatograma da lidocaína em distintas concentrações após a extração 4.

Método de extração 5 – As amostras de plasma foram preparadas das seguintes maneiras:

- 500 μL de plasma + 500 μL de acetonitrila, agitação em vortex por 60 s .
- 500 μL de plasma + 250 μL de solução de precipitação (ácido perclórico 20% e tampão fosfato de citrato pH 5.8, 50:50, v/v), agitação em vortex por 60 s.

As amostras de plasma com LDC foram submetidas à aquecimento por 15 min com temperatura de 45°. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 min e o sobrenadante foi injetado no sistema.

Os resultados obtidos também não foram satisfatórios, não sendo possível detectar LDC. (Figura 11).

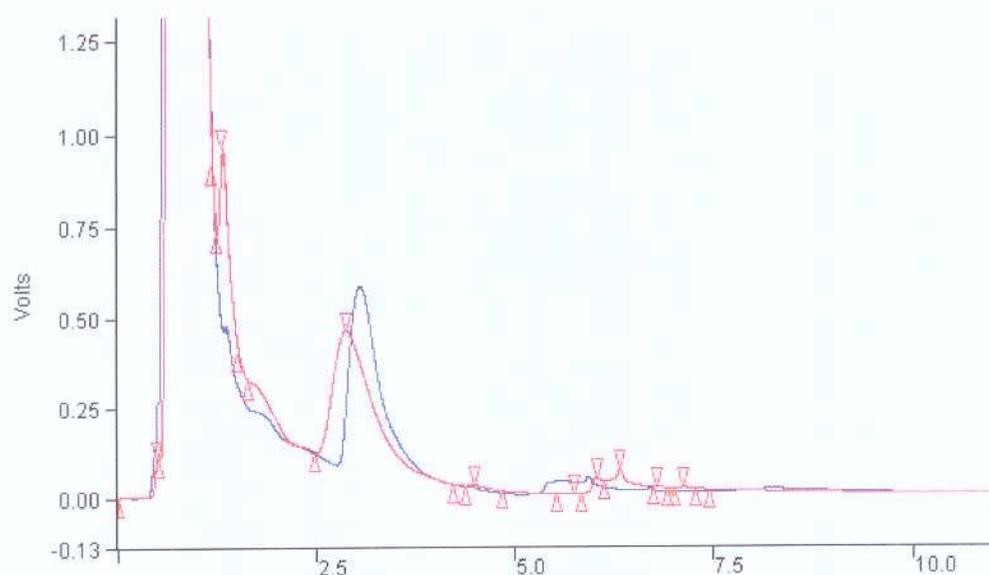


Figura 11: Cromatograma da lidocaína (vermelho) e do blank (azul) após a extração 5.

Método de extração 6 – Vinte e cinco microlitros de LDC nas seguintes concentrações 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$, foram colocadas sobre um filtro de papel. Em seguida foram adicionados 50 μL de acetonitrila. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 14.000rpm. O sobrenadante foi injetado no sistema com loop de 20 μL . Não foram obtidos resultados satisfatórios com este método de extração,

somente LDC em grandes quantidades foram detectadas (50 e 25 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 12).

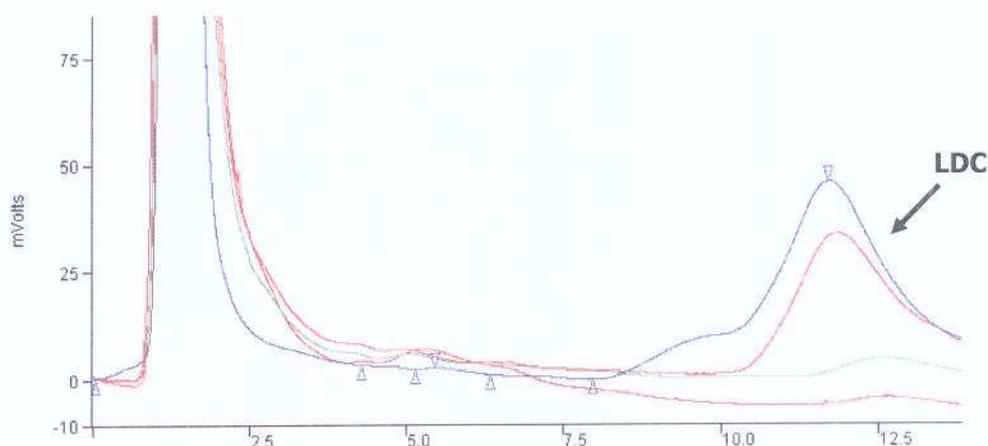


Figura 12: Cromatograma LDC 50 $\mu\text{g/mL}$ (azul), LDC 25 $\mu\text{g/mL}$ (vermelho), LDC 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (verde) e LDC 6,25 $\mu\text{g/mL}$ após a extração 6.

Método de extração 7- O processo de extração utilizado a seguir foi uma extração de fase sólida. Para esta extração foi utilizada uma coluna de sílica Bond Elut Jr (Varian[®]) (foto abaixo), esta foi condicionada com 5ml de acetonitrila e em seguida 5ml de água ultra purificada. Lidocaína foi diluída no plasma nas seguintes concentrações 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 $\mu\text{g/mL}$. Foram adicionados 1,5mL de água ultrapurificada nas amostras de LDC, a mistura foi agitada vortex. As amostras foram passadas pela coluna lentamente, em seguida a coluna foi lavada com as seguintes substâncias: 2 mL de água ultrapurificada, 4ml de tampão fosfato de sódio pH 9,0 +acetonitrila (90:10), 1ml de tampão fosfato de potássio pH 4,0 + acetonitrila (60:40). Depois da aplicação do tampão fosfato pH 4, o resultante foi recolhido e injetado no sistema. Ao final das injeções os resultados não foram satisfatórios, não foi possível detectar LDC (Figura 13).

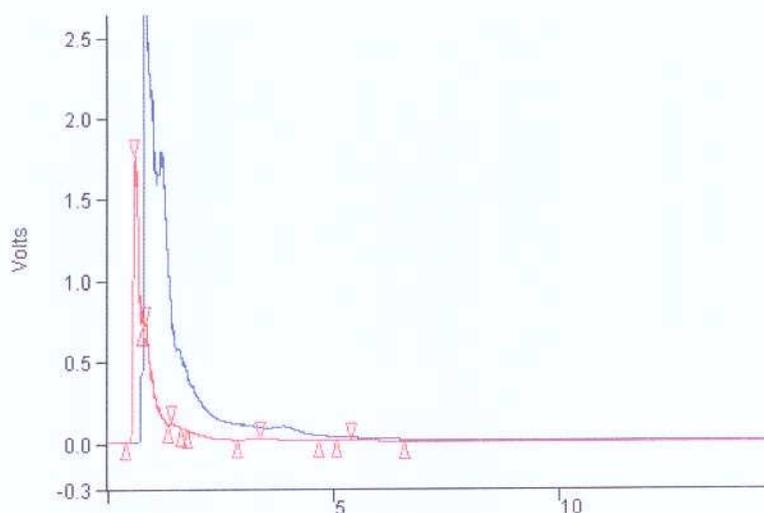


Figura 13: Cromatograma da lidocaína (vermelho) e do blank (azul) após a extração 8.



Figura 14: coluna de sílica Bond Elut Jr (Varian®).

Como nenhuma das extrações conseguiu aumentar o limite de detecção de lidocaína, a coluna foi submetida a uma limpeza, na qual os seguintes solventes foram passados com fluxo de 1ml/min durante uma hora cada um: água ultrapurificada, metanol, isopropanol, diclorometanol, isopropanol, metanol e água ultrapurificada

DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo criar um método simples e barato *in vitro* para determinação dos níveis plasmáticos de lidocaína, que pudesse ser utilizado no futuro em estudos *in vivo* para observar a farmacocinética da mesma após a aplicação intraoral.

Existem poucos estudos que determinaram a farmacocinética de lidocaína após injeção intra oral com o método CLAE.

KANG et al (1998) desenvolveram um método para detecção de lidocaína em plasma usando extração de fase sólida e detecção UV com comprimento de onda de 210 nm. O limite de quantificação atingido pelos autores do referido estudo foi de 0,02 µg/ml. Mesmo que o método descrito pelos autores tenha sido reproduzido de forma semelhante no presente estudo, não foi bem sucedido a obtenção do mesmo limite de quantificação. Provavelmente a razão deste insucesso foi a ocorrência de pequenas diferenças metodológicas. O pH da fase móvel parece ter sido a principal diferença entre o estudo realizado por Kang et al., no qual se estabeleceu em 5.9, e o presente estudo, que utilizou um pH de 5.8. Outra diferença que pode ser citada é a procedência dos equipamentos, que são de fabricantes diferentes; além disso, no presente estudo não foi utilizado um guarda-colunas. É pouco provável que estas pequenas diferenças tenham causado tamanha diferença entre os resultados obtidos. Algum outro fator deve ter influenciado e, no presente momento, estamos re-analisando os métodos para determinar as causas das diferenças.

Um dos principais fatores que podem ter contribuído para a não detecção de concentrações mais baixas da mepivacaína foi a sua alta ligação às proteínas plasmáticas. Esta pode chegar a 75% e a alta ligação protéica aos eritrócitos poderia também ser um fator importante (MALAMED, 2001). Assim, durante o processo de extração grande quantidade do anestésico pode ter sido perdida impossibilitando a sua detecção. Novos estudos, os quais deverão observar outras variáveis além daquelas estudadas no presente ensaio, são necessários para estabelecer um método ainda mais confiável de detecção da lidocaína no plasma sanguíneo.

CONCLUSÃO

Nenhum dos métodos propostos foi efetivo para permitir a quantificação da lidocaína em níveis menores que 0,79 µg/mL. Novos estudos, avaliando outras variáveis são necessários para entender os mecanismos que afetam a concentração da lidocaína no sangue humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADAMS HA *et al.* The quantitative analysis of amide local anesthetics using high pressure liquid chromatography and ultraviolet detection (HPLC/UV). *Reg Anaesth.*,1989; 12(3):53-57.

BURM AG *et al.* Pharmacokinetics of the enantiomers of mepivacaine after intravenous administration of the racemate in volunteers. *Anesth Analg.* 1997;84(1):85-9.

COVINO BG, GIDDON DB. Pharmacology of local anesthetic agents. *J Dent Res.*1981; 60 (8):1454-9.

GRAF BM. The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1(3):207-14.

GROEN K *et al.* Pharmacokinetics of the enantiomers of bupivacaine and mepivacaine after epidural administration of the racemates *Anesth Analg* 1998; 86(2):361-6

HAAS, DA. An update on local anesthetics in dentistry. *J Can Dent Assoc* 2002; 68 (9): 546-51.

KAKIUCHI Y *et al.* Chromatographic determination of free lidocaine and its active metabolites in plasma from patients under epidural anesthesia. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002;40(11):493-8.

KANJANAWATTANA S *et al.* Determination of Lidocaine in Dental Pulp by High-Performance Liquid Chromatography, 2001;27(1): 31-35

KNOLL-KOHLER E. Possible causes of incidents during dental anesthesia. *ZWR*1991;100(10):780-5

LE GUEVELLO P. *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of bupivacaine in plasma samples for biopharmaceutical studies and application to seven other local anaesthetics. *J Chromatogr*, 1993; 22(622): 284-290.

- LOTFI H *et al.* Simultaneous determination of lidocaine and bupivacaine in human plasma: application to pharmacokinetics. *Ther Drug Monit.* 1997;19(2):160-4.
- MALAMED SF. Morbidity, mortality and local anaesthesia. *Prim Dent Care.* 1999;6(1):11-5.
- MEECHAN J. How to avoid local anaesthetic toxicity. *Br Dent J.* 1998;184(7):334-5.
- MEECHAN JG, ROOD JP. Aspiration in dental local anaesthesia. *Br Dent J.* 1992;172(2):40.
- OERTEL R, EBERT U, RAHN R, KIRCH W. The effect of age on pharmacokinetics of the local anesthetic drug articaine. *Reg Anesth Pain Med.* 1999;24(6):524
- OERTEL R *et al.* A simple method for the determination of articaine and its metabolite articainic acid in dentistry: application to a comparison of articaine and lidocaine concentrations in alveolus blood. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1993;15(8):541-7
- RAMACCIATO JC, TÓFOLI GR, GROppo FC, VOLPATO MC, RANALI J. Os Avanços da Anestesia Local em Odontologia. *Rev APCD.* 2003; 57(6):455-9.
- RANALI J. Terapêutica Medicamentosa. In: *Opinion Makers.* 1.ed., São Paulo. VM Comunicações, 2002, p.60-75.
- SOARES PCO. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares pré, trans e pós anestesia local em pacientes normotensos. [dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2002.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII. The national formulary XVII, Rockville, 1995.
- VICKERS ER *et al.* Pharmacokinetics of EMLA cream 5% application to oral mucosa. *Anesth Prog.* 1997;44(1):32-7
- VLEETER AA. *et al.* High-performance liquid chromatographic assay of mepivacaine enantiomers in human plasma in the nanogram per milliliter range. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;12:369-372.