

MARIZA PINHEIRO

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DA
ROPIVACAÍNA ASSOCIADA À SISTEMAS DE
LIBERAÇÃO SUSTENTADA**

BRAGANÇA PAULISTA

2012

MARIZA PINHEIRO

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DA
ROPIVACAÍNA ASSOCIADA À SISTEMAS DE
LIBERAÇÃO SUSTENTADA**

Orientadora: Dra. Giovana Tofoli

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação
Stricto Senso em Ciências da
Saúde da Universidade São
Francisco para obtenção de
título de Mestre em Ciências da
Saúde.

BRAGANÇA PAULISTA

2012

QV 40
P721a

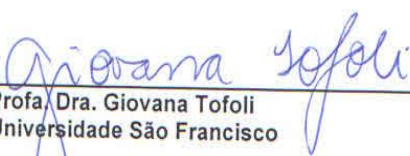
Pinheiro, Mariza.
Avaliação farmacocinética da Ropivacaína à sistemas de liberação sustentada / Mariza Pinheiro. -- Bragança Paulista, 2012.
54 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Giovana Tofoli.

1. Ropivacaína. 2. Lipossomos. 3. Ciclodextrinas.
4. Polímeros. 5. Farmacocinética. 6. Liberação sustentada.
I. Tofoli, Giovana. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.


PINHEIRO, MARIZA "AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DA ROPIVACAÍNA ASSOCIADA À SISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA", Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e sete de Fevereiro de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Giovana Tofoli
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Patricia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite
Universidade Estadual de Campinas

AGRADECIMENTOS

Em meio a tantos que participaram direta e indiretamente desse trabalho, gostaria de começar agradecendo a professora que me orienta; por sua dedicação, atenção e pelo carinho com que cuidou de tudo que envolvia esse estudo. Além de transmitir-me valores como ética, respeito e profissionalismo que levarei para toda vida.

A meus pais que sempre me apoiaram em todos esses anos acadêmicos e por me ensinarem que tudo começa e melhora através da educação.

A todos os amigos que me estimularam e me ajudaram nos momentos difíceis.

A FAPESP pelo suporte financeiro para esse estudo.

A Dra. Eneida de Paula e a Dra. Daniele Ribeiro de Araújo que forneceram as formulações utilizadas neste estudo.

Ao aluno de iniciação científica que trabalhou como meu auxiliar em toda parte de experimentação animal Diego Bueno

A todos os funcionários e colegas que colaboraram de alguma forma com meu trabalho.

E por fim, Aquele que me permitiu chegar até aqui me dando toda a proteção necessária para enfrentar cada momento. Deus, obrigada por tudo!

“Não é o mais forte da espécie que sobrevive, nem o mais inteligente. É aquele que melhor se adapta as mudanças”

Charles Darwin

RESUMO

A ropivacaína (RVC), um anestésico local (AL) de longa duração, tem sido amplamente utilizada na prática clínica devido ao seu perfil clínico farmacológico relativamente seguro. No entanto, devido à sua rápida transferência e redistribuição do local da injeção apresenta duração de ação relativamente curta. Assim, várias abordagens têm sido adotadas para aumentar os efeitos terapêuticos e diminuir a toxicidade deste AL como lipossomas, ciclodextrinas e polímeros. O uso desses carreadores têm se mostrado promissor no desenvolvimento de formulações anestésicas de liberação prolongada capazes de manter o fármaco por mais tempo e em maior concentração no sítio de ação. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a farmacocinética de novas formulações de RVC 0,5% associada á lipossomas, ciclodextrinas e polímeros, comparando-as com a RVC livre na mesma concentração. Foram utilizados 24 coelhos, divididos em quatro grupos (n=6), que receberam os seguintes tratamentos: RVC livre (RVC_{0,5%}), RVC encapsulada em lipossoma (RVC_{0,5%LUV}), RVC complexada em 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina (RVC_{0,5%CD}) e RVC associada a polímeros (RVC_{0,5%POL}). Os níveis plasmáticos de RVC obtidos após o bloqueio do nervo ciático (3mL), com estas formulações foram determinados com espectrometria de massas (CLAE-EM-EM), antes 0 (pré-dose), 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 e 540 minutos após a injeção. Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados com o programa WinNonlin (version 5.3). Os dados obtidos foram analisados pelos testes de ANOVA/Tukey-Kramer (p<0,05). De maneira geral, os níveis plasmáticos obtidos após a administração das diferentes formulações (RVC_{0,5%LUV}, RVC_{0,5%CD} e RVC_{0,5%POL}) não apresentaram diferença estatisticamente significativa daqueles obtidos após a injeção de RVC_{0,5%}. Porém a injeção de RVC_{0,5%POL} promoveu concentrações menores que aquelas obtidas após a injeção de RVC_{0,5%} nos tempos 15, 30 e 45 minutos (p<0,05). As formulações de RVC livre e RVC_{0,5%POL} apresentaram diferenças significativas em relação a concentração máxima observada (C_{max}), p<0,05. Área sob a curva do tempo 0 a 540 minutos (ASC₀₋₅₄₀), área sob a curva do tempo 0 a infinito (ASC_{0-∞}), tempo em que ocorre C_{max} (T_{max}), tempo de meia vida (t_{1/2}), volume de distribuição (V_d), clearance (Cl) e tempo de residência médio (MRT) não apresentaram diferenças significativas entre as quatro formulações testadas (p>0,05). Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que somente a associação de RVC com polímeros alterou a absorção deste anestésico.

PALAVRAS CHAVE: ropivacaína, lipossoma, ciclodextrina, polímero, liberação sustentada.

ABSTRACT:

Ropivacaine (RVC), a long acting local anesthetic (LA), has been widely used in clinic practice because of its pharmacological clinical behavior relatively safe. However, due to its quick redistribution and transference from the injection site has relatively short action duration. Thus, several approaches have been taken to increase the therapeutical effects and reduce the toxicity of the LA such as liposome, cyclodextrin and polymers. The use of these carriers have shown promising in the development of slow release anesthetic formulations able to mantain the drug for a longer period of time, and in a larger concentration in the action site. The aim of this study was to evaluate the pharmacokinetic of new LA formulation associated with liposome, cyclodextrin and polymers, comparing them to RVC 0,5% in the same concentration. 24 rabbits were divided, into four groups (n=6), which received the following treatments: RVC plain (RVC_{0,5%}), RVC liposome-encapsulated(RVC_{0,5%LUV}), RVC inclusion complex in 2-hydroxipropil-beta-cyclodextrin (RVC_{0,5%CD}) and loaded to polymers(RVC_{0,5%POL}). RVC plasmatic levels obtained after sciatic nerve (3ml), with these formulations were determined by mass spectrometry (HPLC-MS-MS), before 0 (predose), 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 and 540 minutes after the injection. Pharmacokinetics parameters were determined through WinNonlin program (version 5.3). The data obtained were analyzed by ANOVA/Tukey tests. In general, plasmatic levels obtained after the administration of different formulations (RVC_{0,5%LUV}, RVC_{0,5%HP-β-CD} e RVC_{0,5%POL}) did not show any statistically significant difference considering those obtained after RVC plain injection. But, the RVC_{0,5%POL} injection promoted lower concentrations than those obtained after the RVC injection in times 15, 30 e 45 minutes (p<0,05). RVC plain and RVC_{0,5%POL} showed significant differences in relation to the maximum observed concentration C_{max} (p<0,05). Area under the curve from time 0 to 540 minutes (AUC₀₋₅₄₀), area under the curve from time 0 to infinity (AUC_{0-∞}), in which time is C_{max} (T_{max}), half-life (t_{1/2}), volume of distribution (V_d), clearance (Cl) e mean residence time (MRT) did not show any differences among the four tested formulations (p>0,05). Based on these results, we conclude that only RVC loaded polymers modified the absorption of the anesthetic.

KEY WORDS: ropivacaine, liposome, cyclodextrin, polymer, sustained release.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

| | |
|---|--------------------------------------|
| 2 - [4 - (2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanosulfónico | HEPES |
| 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina | HP- β -CD |
| Alfa-ciclodextrina | α -CD |
| Alfa tocoferol | α -tocoferol |
| Anestésico Local | AL |
| Angström | Å |
| Área sob a curva | ASC |
| Área sob a curva do tempo 0 a infinito | ASC _{0-∞} |
| Área sob a curva do tempo 0 até 540 minutos | ASC _{0-t} |
| Beta ciclodextrina | β -CD |
| Bupivacaína | BVC |
| Ciclodextrina | CD |
| Clerance | Cl |
| Colégio Brasileiro de Experimentação Animal | COBEA |
| Concentração plasmática máxima | Cmax |
| Constante de associação | Ka |
| Cromatografia gasosa | GC |
| Cromatografia líquida com espectrometria de massas | CLAE-EM/EM |
| Cromatografia líquida de alta eficiência | CLAE |
| Eletroforese capilar | CE |
| Enzima ciclodextrina glicosiltransferase | CGTase |
| Gama ciclodextrina | γ -CD |
| Gás Nitrogênio | N ₂ |
| Grau Celsius | °C |
| Hidróxido de sódio | NaOH |
| Limite de Quantificação | LQ |
| Óxido de etileno | OE |
| Óxido de propileno | OP |
| Padrão interno | PI |
| Primeiro analisador | Q1 |
| Ropivacaína | RVC |

| | |
|--|----------------------------|
| Ropivacaína associada a polímeros | RVC _{0,5% POL} |
| Ropivacaína complexada em CD | RVC _{0,5% CD} |
| Ropivacaína complexada em HP-β-CD | RVC _{0,5% HPβ-CD} |
| Ropivacaína lipossomal | RVC _{0,5% LUV} |
| Ropivacaína livre | RVC _{0,5%} |
| Segundo analisador | Q2 |
| Tempo de meia vida de absorção | t _{1/2} alfa |
| Tempo de meia vida de eliminação | t _{1/2} beta |
| Tempo de meia-vida | t _{1/2} |
| Tempo médio de residência | MRT |
| Tempo para obtenção da concentração máxima | Tmax |
| Terceiro analisador | Q3 |
| Vêsculas lipossomais unilamelares | LUV |
| Volume de distribuição | Vd |

LISTA DE TABELAS e FIGURAS

| | página |
|--|---------------|
| Figura 1: Características estruturais dos lipossomas | 6 |
| Figura 2: Formação de complexos de inclusão entre fármacos e ciclodextrina, nas proporções de 1:1. | 9 |
| Figura 3: Copolímero em bloco (A) e micela com uma droga solubilizada (B) | 12 |
| Figura 4: (A) Espectro de massas na função MS e (B) Espectro de MS/MS para RVC. | 22 |
| Figura 5: (A) Espectro de massas na função MS e (B) Espectro de MS/MS para o PI | 23 |
| Figura 6: (A), (C), (E) Cromatograma referente ao branco do analito (plasma normal). (B), (D), (F) Branco do padrão interno (plasma normal); (G) branco do analito (plasma lipêmico); (H) branco do padrão interno (plasma lipêmico); (I) Branco do analito (plasma hemolisado); (J) branco do padrão interno (plasma lipêmico). | 25 |
| Tabela 1: Curva de Calibração (Linearidade) | 26 |
| Tabela 2: Análise inter-lotes e intra lotes dos controles de qualidade CA, CM e CB | 27 |
| Tabela 3: Resultados das análises intra-lote do controle de qualidade LQ. | 28 |
| Tabela 4: Resultados inter-lotes do controle de qualidade LQ | 28 |
| Tabela 5: Concentração (média \pm desvio padrão) de ropivacaína (ng/mL), após a injeção das diferentes formulações (RVC _{0,5%} , RVC _{0,5%LUV} , RVC _{0,5%CD} , RVC _{0,5%POL}). | 29 |
| Figura 7: Gráfico da concentração plasmática média versus o tempo após a injeção de RVC _{0,5% livre} , RVC _{0,5%LUV} , RVC _{0,5%CD} e RVC _{0,5%POL} . | 30 |
| Tabela 6: Parâmetros farmacocinéticos após a injeção de RVC _{0,5% livre} , RVC _{0,5%LUV} , RVC _{0,5%CD} e RVC _{0,5%POL} . | 31 |

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Anestésicos locais: ropivacaína | 2 |
| 1.2. Formulações anestésicas com sistemas de liberação sustentada | 5 |
| 1.2.1. Lipossomas | 5 |
| 1.2.2. Ciclodextrinas (CD) | 8 |
| 1.2.3. Polímeros | 11 |
| 1.3. Farmacocinética de novas formulações farmacêuticas | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 3.1 Materiais | 16 |
| 3.2. RVC livre: formulação | 16 |
| 3.3. RVC lipossomal: formulação | 16 |
| 3.4. RVC complexada em ciclodextrinas: formulação | 17 |
| 3.5. RVC com Polímero: formulação | 17 |
| 3.6. Modelo Animal | 18 |
| 3.7. Bloqueio do nervo ciático (injeção infiltrativa) e coleta das amostras | 18 |
| 3.8. Preparo e análise das amostras | 19 |
| 3.9. Validação da metodologia | 20 |
| 3.10. Análise estatística | 22 |
| 4. RESULTADOS | 23 |
| 4.1. Validação da Metodologia | 23 |
| 4.2. Determinação da concentração plasmática | 29 |
| 5. DISCUSSÃO | 34 |
| 6. CONCLUSÃO | 38 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| 8. ANEXO | 54 |

1. INTRODUÇÃO

O estudo da dor é, possivelmente, uma das maiores e mais importantes áreas da Medicina. Segundo a *Associação Internacional para o Estudo da Dor*, esse fenômeno é uma experiência sensitiva e emocional desagradável onde há percepção de um estímulo nocivo associado a uma lesão tecidual real ou potencial (Carpenter & Dickenson, 2002). Apesar de incômoda, a dor desempenha uma função biológica essencial. Porém, em algumas situações, o sofrimento doloroso perde sua função biológica e começa a representar uma conseqüência insuportável às desordens refratárias aos tratamentos (Stevens, 1992). Mesmo com os recentes avanços na pesquisa de novos agentes terapêuticos, a capacidade de instituir novos métodos de tratamento com o objetivo de produzir analgesia, isto é, aliviar ou eliminar a dor, ainda é um desafio atual para a ciência (Grillo et al., 2010).

Pode-se destacar ainda o procedimento cirúrgico que geralmente resulta em dor aguda pós-operatória, a qual, se não tiver o controle adequado, pode aumentar a morbidade pós-operatória e a incidência de dor crônica pós-cirúrgica. Desta forma, estratégias para o controle da dor continuam a ser desenvolvidas, já que nenhum método isolado se mostrou eficaz e livre de efeitos adversos associados (Almeida et al., 2011).

Existem alguns métodos que induzem analgesia, sendo o tratamento farmacológico o mais utilizado. Substâncias químicas podem alterar mecanismos periféricos ou centrais de detecção e elaboração da informação dolorosa, reduzindo a reação emocional à dor ou ainda interferindo no estado de consciência necessário à percepção dolorosa. Os medicamentos responsáveis por esses efeitos são denominados analgésicos, antiinflamatórios, analgésicos opióides (morfina e derivados), anestésicos gerais e locais (Sudo-Havashi & Bersani-Amado, 2001).

Os anestésicos locais (AL) apresentam grande aplicação clínica em Medicina e Odontologia e estão entre a classe de compostos farmacológicos usados para atenuar ou eliminar a dor, sendo utilizados em bloqueios regionais, na indução de analgesia operatória e/ou pós-operatória, no tratamento da dor aguda e crônica e, até para tratar arritmias ventriculares (Carpenter e Dickenson, 2002; Krenzischek et al., 2008). São amplamente utilizados devido a sua capacidade de bloquear a função sensorial, apesar de também promoverem bloqueio motor (Grillo et al., 2010). No entanto, as formas

comerciais disponíveis apresentam duração de ação relativamente curta, devido à sua rápida transferência e redistribuição do local da injeção; o que dificulta o seu uso clínico. Assim, várias abordagens como o desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada de AL (“drug delivery systems”) têm sido adotadas para aumentar os efeitos terapêuticos e diminuir a toxicidade de AL. (Chen et al., 2004; de Paula et al., 2010).

Lipossomas, ciclodextrinas e polímeros, entre outros, têm se mostrado promissores no desenvolvimento de formulações anestésicas de liberação prolongada capazes de manter o fármaco por mais tempo e em maior concentração no sítio de ação. As vantagens dessas formulações incluem aumento na duração do efeito e diminuição da toxicidade da droga (Gesztez & Mezei, 1988; Langerman et al., 1992; Boogaerts et al., 1993 a,b; Mowat et al., 1996; Bucalo et al., 1998; Davis & Brewster, 2004; Rose et al., 2005; Torchilin, 2005; Samad et al., 2007; De Paula et al., 2010). Estes sistemas atuam como reservatórios no sítio de injeção, o AL é lentamente liberado e prolonga a duração do bloqueio nervoso, previne altas concentrações plasmáticas, e dessa forma reduz o risco de toxicidade sistêmica (De Paula et al., 2010). Pacientes submetidos à cirurgias (no alívio da dor pós-operatória) e com dor crônica (que necessitam de administrações repetidas de AL, seja para bloqueio de nervos periféricos, centrais ou autonômicas) seriam os principais beneficiados pelo desenvolvimento dessas formulações, denominadas de liberação sustentada ou prolongada, que possibilitariam um aumento na duração da anestesia, diminuindo a frequência de administrações diárias e reduzindo a toxicidade sistêmica (Araujo et al., 2003; Oliveira et al., 2011).

1.1. Anestésicos locais: ropivacaína

Os AL são compostos químicos cuja atividade farmacológica primária envolve o bloqueio reversível da condução nervosa. Essa propriedade é uma consequência da inibição do processo de excitação-condução em nervos periféricos, após aplicação local e em concentrações adequadas. Uma das mais importantes propriedades de um AL de longa duração de ação é impedir a condução dos impulsos nervosos, que apesar de causar um prolongado bloqueio motor leva também a um bloqueio sensorial apropriado para anestesia em diferentes tipos de cirurgias (Kuthiala & Chaudhari, 2011).

Por serem moléculas anfifílicas, os AL têm grande afinidade pelas membranas celulares excitáveis, inativando os canais de sódio voltagem-dependentes e impedindo assim o influxo de íons necessários à despolarização da membrana (Araujo et al, 2008;

Braga et al., 2009). Os AL produzem seus efeitos por impedirem o rápido influxo de íons sódio para o interior do axônio, assim essa ação interrompe a formação e deflagração do potencial de ação (Kuthiala & Chaudhari, 2011). Acredita-se que a diminuição da permeabilidade da membrana aos íons sódio ocorra por dois mecanismos: alterações gerais na fluidez da membrana (levando a modificações conformacionais na proteína-canal de sódio voltagem-dependente) e/ou pela interação específica dos compostos AL com os canais de sódio (Ragsdale et al., 1996; Ragsdale & Avoli, 1998; Araujo et al., 2008; Braga et al., 2009).

O primeiro composto a ser utilizado como AL foi a cocaína obtida em 1860 por Niemann, ao isolar um alcalóide das folhas de *Erythroxylon coca* (folhas que já eram usadas por nativos da América do Sul desde o século XIX, as quais produziam entorpecimento dos lábios quando mascaradas) (Araujo et al., 2008; Reis Jr, 2008). Esta planta teve seus efeitos demonstrados por Köller em 1884, ao utilizá-la como anestésico oftálmico, e logo em seguida seus primeiros efeitos colaterais foram relatados (Melo et al., 2010). Apesar de ter sido empregada na clínica durante longo tempo, devido aos seus efeitos tóxicos como dependência física e psíquica, a cocaína foi substituída por outros compostos (Ruetsch et al., 2001; Araujo et al., 2008).

Dessa forma outros anestésicos foram sintetizados após investigações com mais de uma centena de amino-ésteres derivados do ácido paraminobenzóico, tais como: procaína (em 1904); benzocaína, piperocaína e tetracaína (até 1932); e a partir de 1943 com os AL modernos (amino-amidas), como lidocaína, prilocaína, etidocaína, bupivacaína, levobupivacaína e ropivacaína (dos Reis Jr, 2008). Os AL mais comumente usados na clínica médica são pertencentes à família das amino-amidas: bupivacaína, ropivacaína, lidocaína, mepivacaína e prilocaína (Koehler et al., 2005), que apesar de serem menos potentes que os amino-ésteres possuem menor grau de toxicidade sistêmica, além de serem biotransformados pelo fígado (via citocromo 450) o que os leva a apresentar uma meia-vida plasmática mais longa (Araujo et al., 2008).

Um AL exerce sua ação reversível em qualquer tecido excitável (Covino, 1986; Melo et al., 2010) e pode causar reações adversas pelo bloqueio não específico de canais iônicos das membranas nervosas, sendo o sistema nervoso central e o sistema cardiovascular os locais mais suscetíveis às suas ações. O sistema nervoso central é o local mais suscetível aos efeitos tóxicos destes fármacos e a toxicidade pode apresentar-se em dois estágios: em baixas concentrações os neurônios inibitórios são bloqueados resultando em convulsões generalizadas, e em altas concentrações ocorre depressão

generalizada (Groban, 2003; Mercado *et al.* 2011). Além disso, os AL são cardiotoxicos exercendo efeitos indiretos mediados centralmente e diretos no miocárdio, relacionados com a interação dos anestésicos com canais iônicos. Ações diretas causam efeitos cronotrópico, dromotrópico e inotrópico negativos (Graf, 2001; Cáceres *et al.*, 2008) enquanto a cardiotoxicidade indireta produz efeitos iniciais estimulantes, seguidos de depressão com o aumento da dose.

A ropivacaína (RVC) [(S)-propyl -2',6'- pipercolililidida], um AL de longa duração, descoberto recentemente, pertencente à classe das amino-amidas, tem sido amplamente utilizada na prática clínica devido ao seu perfil clínico farmacológico relativamente seguro. Apresenta propriedades farmacodinâmicas semelhantes às da bupivacaína, porém, ao contrário desta, que é uma mistura racêmica, a RVC é um enantiômero levógiro puro (S) (Graf *et al.*, 2002; Mathieu *et al.*, 2006) e possui uma toxicidade menor, se comparada à bupivacaína (BVC) (Martins *et al.*, 2005; Ratajczak-Enselme *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2009; Ranasinghe & Birnbach, 2010). Promove ainda bloqueio sensorial predominantemente em relação ao motor, por isso tem grande utilização na anestesia epidural e no alívio da dor pós-operatória (Leone *et al.*, 2008). Diversos estudos demonstraram que o bloqueio sensorial da RVC é semelhante ao da BVC, no entanto, o mesmo não ocorre com o bloqueio motor, devido à separação sensório-motora da RVC (Martins *et al.*, 2005).

A RVC e a BVC apresentam latência, potência e duração de ação similares. A eficácia clínica da RVC e BVC tem sido comparada sob as mais diversas formas de anestesia regional, tanto em animais de laboratório quanto em humanos (Knudsen *et al.*, 1997; Malinovsky *et al.*, 2000; Whiteside & Wildsmith, 2001). No entanto, o principal atributo deste novo AL é uma menor toxicidade no sistema nervoso central e cardiovascular (Reif *et al.*, 1998; Mio *et al.*, 2004; Zuo *et al.*, 2004; Kuthiala & Chaudhari, 2011), além de uma recuperação do bloqueio motor mais rápida (Knudsen *et al.*, 1997; Dony *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Kuthiala & Chaudhari, 2011). Estudos mostraram que a dose cumulativa de ropivacaína para produzir parada cardíaca em coelhos é de 108 ± 27 mg/kg, enquanto para a bupivacaína racêmica é de 39 ± 9 mg/kg. Além disso, após injeções intravasculares de ropivacaína em voluntários saudáveis não foram relatados acidentes vasculares cerebrais ou alterações duração dos intervalos PR, QRS, QT e da frequência cardíaca (Leone *et al.*, 2008).

A RVC é 10 vezes menos solúvel em lipídios e é eliminada através do fígado mais rapidamente que a bupivacaína, esta biotransformação ocorre pela ação de

diferentes isoenzimas do citocromo P-450 (Mathieu et al., 2006). O metabólito de maior ocorrência é o 3-hidroxi-ropivacaína, que representa 37% da dose administrada (Emanuelsson et al., 1997), outros metabólitos incluem 4-hidroxi-ropivacaína, e 2-hidroxi-metil-ropivacaína encontrados em análises de urina humana (Reif et al., 1998). Além disso, a RVC se liga extensamente a proteínas plasmáticas (cerca de 94%), principalmente a glicoproteína alfa 1 ácida. Assim, ocorre aumento da fração ligada quando há aumento de glicoproteína alfa 1 ácida, como no processo inflamatório (Mathieu et al., 2006).

1.2. Formulações anestésicas com sistemas de liberação sustentada:

1.2.1. Lipossomas:

Dentre os diversos veículos para liberação lenta de fármacos, os lipossomas têm gerado grande interesse devido a sua versatilidade (Felnerova et al., 2004, Kshirsagar et al., 2005). Estes veículos foram desenvolvidos há mais de 40 anos para liberação sustentada de drogas (Rose et al., 2005). Gregory Gregoriadis, logo após a publicação de um trabalho que caracterizou o sistema de vesículas fosfolipídicas realizado por Alec Banghan e colaboradores, propôs pela primeira vez sua utilização como sistema transportador de fármacos (Santos & Castanho, 2002). Desde então têm recebido atenção difundida como um sistema carreador para componentes terapeuticamente ativos, devido a suas características únicas tais como capacidade de incorporar drogas hidrofílicas e hidrofóbicas, boa biocompatibilidade, baixa toxicidade, falta de ativação do sistema imune, e entrega de marcadores de compostos bioativos para o sítio de ação (Mufamadi et al., 2011). Apesar de terem sido os primeiros nanossistemas utilizados na clínica e aprovados para administração intravenosa (Rossi-Bergmann, 2008) sendo comercializados desde a década de 80 para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e do câncer, problemas na área tecnológica e biológica ainda fazem com que as formulações lipossomais continuem a ser estudadas (Batista et al., 2007).

Os lipossomas (Figura 1) são formados pela interação de lipídios anfifílicos com uma fase aquosa (Banerjee, 2001), especialmente fosfolipídios (Sarpietro & Castelli, 2011), e consistem de esferas micro ou nanométricas de uma ou mais bicamadas de lipídios cujas caudas hidrofóbicas estão voltadas para o interior da bicamada e as cabeças polares para o exterior, em contato com a fase aquosa (Ranade, 1989; Torchilin,

2005); dessa forma, compostos farmacologicamente ativos podem ser incorporados tanto no compartimento aquoso interno (substâncias hidrossolúveis) quanto em suas membranas (substâncias lipofílicas) (Frézard et al., 2005). Além de serem biocompatíveis, biodegradáveis e não imunogênicos, sua versátil estrutura combinada com sua habilidade para encapsular diferentes compostos, tais como AL, representam uma grande vantagem para o seu uso (de Paula et al., 2010).

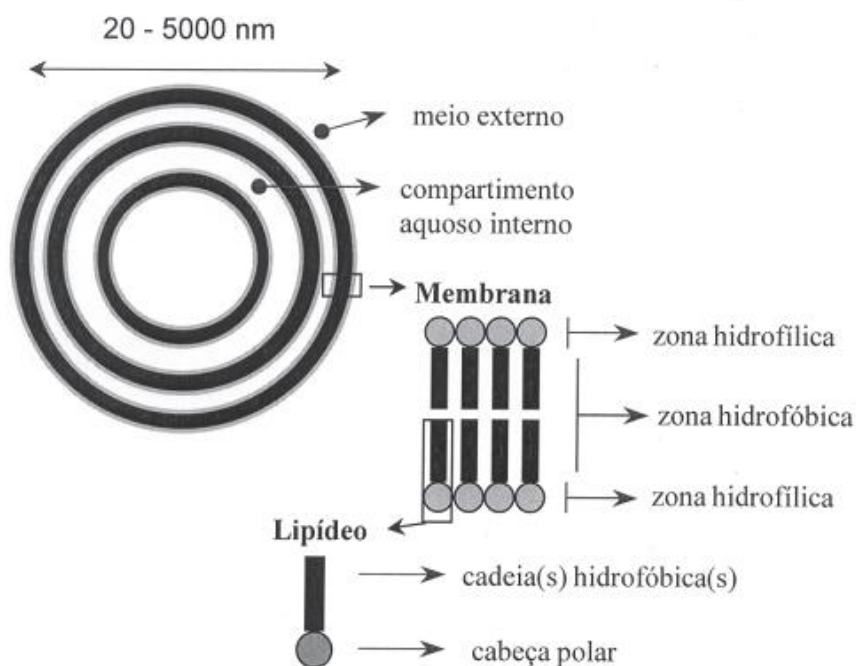


Figura 1: Características estruturais dos lipossomas (Adaptado de Frézard et al., 2005).

A encapsulação de fármacos nos lipossomas é orientada pela hidro ou lipofilicidade das mesmas, já que compostos hidrofílicos têm tendência a permanecer no compartimento aquoso e compostos hidrofóbicos inserem-se na bicamada lipídica (Sharata & Katz, 1996; Araújo et al., 2003; Batista et al., 2007). Drogas anfipáticas, como os AL, são encapsuladas dentro da bicamada lipídica e/ou do compartimento aquoso (Rose et al., 2005). Desta forma, os lipossomas são capazes de proteger os princípios ativos encapsulados da metabolização, prolongando sua presença no organismo e fazendo com que alcancem o seu sítio de ação em concentrações efetivas maiores (Araújo et al., 2003). Com essa maior biodisponibilidade do princípio ativo pode-se obter a potencialização de sua ação biológica e redução dos efeitos colaterais (Frézard et al., 2005).

Os lipídios constituintes da bicamada são materiais biocompatíveis de ocorrência natural, como fosfolipídios e colesterol (Ramana et al., 2010), assim estas vesículas lipídicas são semelhantes às membranas biológicas e são biodegradáveis além de apresentarem baixa toxicidade e imunogenicidade reduzida ou inexistente (Kuzma et al., 1997; Kshirsagar et al., 2005; Hung, 2006; Kelly et al., 2011). A similaridade dos monômeros constituintes dos lipossomas com o das membranas biológicas elimina o risco de antigenicidade ou de lesões histológicas (Malinovsky et al., 1997; Cereda et al., 2008; Tofoli et al., 2010) após sua administração. Lipossomas puros não têm atividade farmacológica inerente (Grant et al., 1994).

Depois da liberação da droga, os lipossomas são removidos do local da injeção por macrófagos e pelo sistema linfático, sendo rapidamente fagocitados ao entrar na circulação sistêmica (Mallipeddi & Rohan, 2010), sua captura é favorecida pelo processo de opsonização que ocorre assim que eles entram em contato com os componentes do sangue (Frézard et al., 2005). Lipossomas intravasculares são eliminados por uma combinação de processos que incluem a participação de monócitos circulantes, sistema reticular endotelial e proteínas de alta densidade (Mashimo et al., 1992; Gregoriadis & Florence, 1993).

A maior eficácia anestésica e menor toxicidade de preparações lipossomais de diversos anestésicos locais têm sido demonstradas em animais (Malinovsky et al., 1997; Grant et al., 2001; Boogaerts et al., 1993a,b; Mashimo et al., 1992; Yu et al., 2002; Araujo et al., 2004; Cereda et al., 2004; Cereda et al., 2006; Araujo et al., 2008).

O uso clínico do sistema lipossomal de liberação prolongada para anestesia local tem confirmado as vantagens terapêuticas com resultados promissores. Vários estudos demonstraram a efetividade destas preparações após a aplicação tópica (Foldvari, 1994; Singh & Vyas, 1996; Fischer et al., 1998; Friedman et al., 1999; Eichenfield et al., 2002; Taddio et al., 2005; Nestor, 2006; Franz-Montan et al., 2007). A efetividade clínica das preparações lipossomais com diversos sais anestésicos também já foi demonstrada em estudos com voluntários (Lafont et al., 1994; Boogaerts et al., 1994; Lafont et al., 1996; Grant et al., 2004; Franz-Montan et al., 2011; Tofoli et al., 2011).

A encapsulação de ropivacaína em lipossomas aumentou a intensidade e a duração do bloqueio do nervo infra-orbital e do nervo ciático em ratos, como demonstrado por Araujo et al (2008a), que comparou uma formulação de RVC lipossomal com uma solução de RVC livre e que encontrou uma menor citotoxicidade e melhora na duração

e intensidade dos efeitos analgésicos. Dessa forma, tal estudo sugere a RVC lipossomal como uma nova formulação potencial, já que a RVC é um agente AL seguro.

Em vários estudos a efetividade de RVC tem sido demonstrada em modelos animais, e há a hipótese de que a maioria das características da RVC podem ser melhoradas com a encapsulação da mesma em lipossomas (Franz-Montan et al., 2011). Em outro estudo Franz-Montan e colaboradores (2010) observaram o perfil farmacocinético de RVC 0,5% encapsulada em lipossomas e RVC 0,5% com epinefrina 1:200.000 após a anestesia intra-oral infiltrativa em voluntário saudáveis. Os autores não observaram diferenças significativas entre as duas formulações em todos os períodos avaliados. O perfil farmacocinético semelhante indicou que a formulação lipossomal com o AL pode ser uma alternativa mais segura pela ausência do vasoconstritor.

1.2.2. Ciclodextrinas (CD):

Descritas pela primeira vez em 1891 por Villiers, as ciclodextrinas continuam a ser consideradas como um modelo de excipientes de inexplorável potencial (Loftsson & Duchêne, 2007). São oligossacarídeos cíclicos de ligação α -1,4, produzidos pela degradação enzimática do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), uma enzima presente em alguns microrganismos, sendo o *Bacillus macerans* a fonte mais usada (Loftsson & Duchêne, 2007; Welliver & McDonough, 2007). As CDs possuem uma biodisponibilidade limitada e após a absorção são distribuídas entre vários tecidos como rins, bexiga urinária, fígado, glândula adrenal, etc. São também rapidamente eliminadas do corpo através da excreção urinária sem modificações (Stella & He, 2008).

As três CD naturais são a alfa (α -CD), a beta (β -CD) e a gama (γ -CD) compostas de seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopiranoose, respectivamente (Kaur et al., 2004; Welliver & McDonough, 2007; Stella & He, 2008). Essas unidades apresentam em sua estrutura grupos hidroxil primários e secundários orientados para o exterior e, em consequência disso, as ciclodextrinas se apresentam com a superfície exterior hidrofílica (formada por grupos hidroxilas, sendo altamente polar) e uma cavidade central hidrofóbica (apolar) (Patel et al., 2008). Essa cavidade central torna a ciclodextrina capaz de formar complexos com muitas drogas e de alterar as

propriedades físico-químicas das mesmas (Loftsson & Masson, 2001; Davis & Brewster, 2004, Fernandes et al., 2007).

Os complexos com ciclodextrinas (Figura 2) podem ser usados para aumentar a solubilidade e a estabilidade, diminuir a volatilidade e alterar a biodisponibilidade de fármacos. Das ciclodextrinas naturais, a mais amplamente utilizada é a β -CD, pois apresenta sua cavidade interna com aproximadamente 6Å de diâmetro e pode acomodar os grupos aromáticos encontrados na maioria das drogas. Podem levar uma molécula hidrofóbica em solução, mantendo-a dissolvida e transportando-a à membrana celular lipofílica (Kaur et al., 2004; Grillo et al, 2008). O diâmetro da cavidade interna da α -CD é muito pequeno e a γ -CD tem um custo muito elevado, o que torna o seu uso desfavorável. Uma característica negativa das β -CD é a sua solubilidade aquosa limitada (Rajewsky & Stella, 1996; Davis & Brewster, 2004; Kaur et al., 2004; de Paula et al., 2010) em relação às demais.

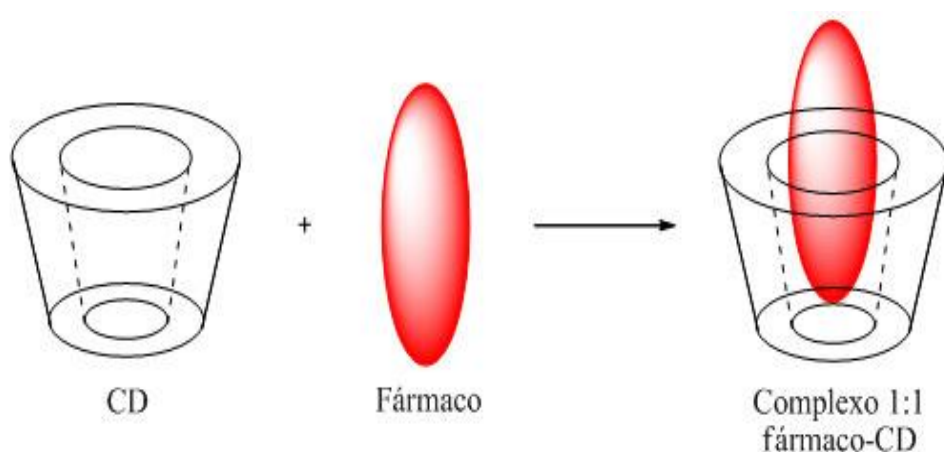


Figura 2: Formação de complexos de inclusão entre fármacos e ciclodextrina, nas proporções de 1:1. (Adaptado de Davis & Brewster, 2004)

Por possuir essa solubilidade aquosa limitada, fato que pode ser proveniente das ligações intramoleculares de hidrogênio entre os grupos hidroxil secundários, a β -CD apresenta uma interação desfavorável com moléculas de água (Kaur et al., 2004). Por essa razão, várias modificações têm sido feitas na estrutura química da β -CD, com o objetivo de melhorar essa propriedade. Um dos derivados utilizado é a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), comercialmente desenvolvida pela empresa farmacêutica Janssen (Stella & He, 2008), o qual apresenta maior solubilidade em água que a β -CD e

menor potencial tóxico (Irie & Uekama, 1997; Davis & Brewster, 2004; Brewster & Loftsson, 2007; de Paula et al., 2010), além da melhora na capacidade de complexação.

Os rins são os órgãos mais afetados pela CD, após a absorção sistêmica. Tanto a β -CD quanto a HP- β -CD formam um complexo com colesterol ou seus ésteres no sangue, porém apenas com a β -CD o complexo formado é insolúvel. Tal complexo, na urina, passa por filtração glomerular e é retomado pelas células tubulares renais, o que traz danos aos rins (Stella & He, 2008).

A complexação de anestésicos locais com ciclodextrinas tem demonstrado ser de grande interesse e valia, pois com a biodisponibilidade do anestésico aumentada no sítio de ação, há a diminuição da concentração plasmática e, conseqüente aumento da duração do efeito anestésico. Dollo et al. (1996 a, b) descreveram e caracterizaram a complexação de cinco anestésicos locais (bupivacaína, etidocaína, lidocaína, mepivacaína e prilocaína) em β -CD e seus derivados e obtiveram como resultado um aumento da solubilidade dos anestésicos quando complexados (destaque para a bupivacaína). Em 1998, esses mesmos autores completaram tais estudos com a demonstração da melhora do índice terapêutico em animais pela bupivacaína após complexação em ciclodextrinas (Dollo et al., 1998) e desde então outros estudos sugerem que AL complexados em CD tem sua segurança e eficácia como “drug delivery” aumentadas (Welliver & McDonough, 2007). Em alguns estudos a HP- β -CD tem-se mostrado bem tolerada em animais e humanos (Kaur et al., 2004), sendo a administração considerada não tóxica em baixas e moderadas doses (de Paula et al., 2010); além de não promover necrose celular mesmo após altas doses, como encontrado em estudos com a β -CD (Stella & He, 2008).

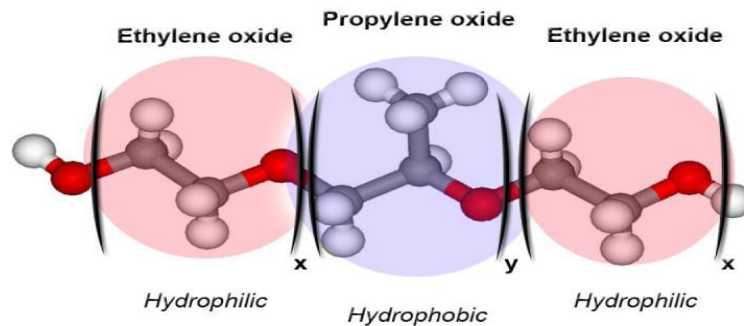
Nos últimos anos, a RVC complexada em HP- β -CD tem sido testada *in vivo*, resultando em aumento significativo na atividade anestésica. Araújo et al (2008b) observaram o aumento no tempo de anestesia da RVC complexada, quando comparada com a formulação livre, após o bloqueio do nervo ciático de ratos. Segundo os autores, as características do complexo RVC- HP- β -CD melhoram a biodisponibilidade da RVC no sítio de ação favorecendo o seu futuro uso clínico.

1.2.3. Polímeros:

Os polímeros fazem parte do nosso cotidiano e estão entre as classes de materiais mais versáteis, dentre suas aplicações estão as do setor farmacêutico (Villanova et al., 2010). O uso destas substâncias como sistemas de liberação sustentada têm promovido aumento da disponibilidade biológica do fármaco, redução da toxicidade, supressão das reações adversas e diminuição do número de doses diárias (Grillo et al., 2010; Villanova et al., 2010). Polímeros usados para liberação lenta de fármacos foram considerados como componentes biologicamente inertes que protegem as drogas da degradação, prolongam a exposição da droga nos tecidos-alvo e melhoram o transporte da droga para dentro da célula (Batrakova et al., 2008).

Dentre os polímeros utilizados para manutenção de formulações por tempo prolongado no local de ação podemos citar os Poloxâmeros (Figura 3). Estes são blocos de copolímeros constituindo de unidades alternantes hidrofílicas (óxido de etileno – OE) e hidrofóbicas (óxido de propileno – OP) (Mitchell et al., 2011). Os blocos são organizados numa estrutura de tri-blocos: OE-OP-OE (Batrakova et al., 2008; Obstein et al., 2010); o núcleo formado por OP é pobremente solúvel em água, já a casca formada por OE é altamente solúvel em solventes aquosos (Ricci et al., 2002). Este copolímero de caráter anfifílico pode apresentar hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade variáveis, e a incorporação de fármacos pode aumentar a estabilidade e solubilidade dos mesmos, além de melhorar a farmacocinética e biodistribuição (Batrakova et al., 2008).

A



B

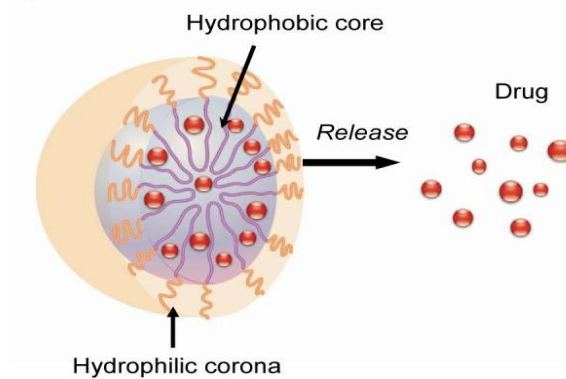


Figura 3: Copolímero em bloco (A) e micela com uma droga solubilizada (B)
(Adaptado de Batrakova et al., 2008)

Estes polímeros termorreversíveis têm sido amplamente utilizados devido a sua baixa toxicidade, boa compatibilidade com outros compostos químicos, e alta capacidade de solubilizar diferentes drogas (Derakhshandeh et al., 2010). A solução de polímero é um gel altamente viscoso a temperatura ambiente, mas torna-se líquida a temperatura refrigerada. A geleificação é termorreversível (Ricci et al., 2002), a formulação permanece no estado aquoso a baixa temperatura (4°C) durante a administração, mas muda para o estado gel no sítio de administração, quando a temperatura é elevada a 37°C (temperatura corporal), e dessa forma a liberação é retardada (Chen et al., 2004; Derakhshandeh et al., 2010). Ainda podemos citar como vantagem desse sistema o fato de os polímeros não necessitarem ser removidos do

corpo após o fornecimento da droga ter se esgotado e dos fármacos não precisarem ser solúveis em água (Xuan et al., 2010; Ranade 2004).

Poloxâmeros apresentaram melhora da biodisponibilidade e atividade de vários medicamentos como antibióticos e antifúngicos; assim como na melhora do efeito de quimioterápicos em modelos *in vivo* (Batrakova et al., 2008). Vários estudos têm demonstrado que a associação de AL com poloxâmeros têm prolongado a duração do bloqueio e diminuído sua toxicidade sistêmica (de Paula et al., 2010), os AL têm seu efeito anestésico aumentado devido ao comportamento temperatura-dependente de geleificação (Chen et al., 2004; Weinger et al., 2010).

A efetividade da associação de RVC com poloxamer foi demonstrada com o teste de *tail flick* em ratos, a técnica anestésica foi realizada por injeção infiltrativa na base da cauda. Os animais que receberam RVC associada a estes polímeros apresentaram maior duração de efeitos analgésicos quando comparados com a administração do anestésico livre ou complexados a ciclodextrinas (Papini et al., 2011).

1.4. Farmacocinética de novas formulações farmacêuticas:

A determinação de parâmetros farmacocinéticos é fundamental para a prática clínica (Adams et al., 1989) e fornece informações fundamentais durante o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas (Altun et al., 2004), como as preparações de liberação sustentada de AL. Além disso, durante o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas a ICH (International Conference on Harmonization) exige o cumprimento da etapa pré-clínica de determinação de farmacocinética antes dos testes em voluntários (fase clínica).

Embora existam vários métodos para quantificação de um anestésico local após a sua aplicação, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) é considerada a técnica de escolha para análise em fluídos biológicos (Cobb & Andersson, 2005). O sistema CLAE-EM/EM é uma das ferramentas analíticas mais utilizadas para determinação dos parâmetros farmacocinéticos de uma droga (Korfmacher, 2005). Além disso, esta técnica é utilizada durante o desenvolvimento de perfis farmacêuticos, o que inclui a medida de propriedades físico-químicas e do metabolismo de drogas (Kerns & Di, 2006).

O sistema CLAE-EM/EM inclui um cromatógrafo líquido, uma fonte de ionização e o espectrômetro de massas propriamente dito, controlados por um

computador (Korfmacher, 2005). Este sistema cromatográfico separa os componentes da mistura, possibilitando a determinação da concentração das substâncias analisadas. A espectrometria de massas é uma técnica que envolve a fragmentação de moléculas alvo, seguida da separação e da medida de massa dos fragmentos individuais (Ullman et al., 1998).

A espectrometria de massas é uma técnica versátil e sensível para determinar a composição elementar, estrutura e concentração de compostos inorgânicos e orgânicos (Ullman et al., 1998, Korfmacher, 2005). Além da combinação com o CLAE, o espectrômetro de massas pode ser combinado com cromatografia gasosa (GC), eletroforese capilar (CE) entre outros, o que aumenta ainda mais as aplicações desta técnica. O resultado final de todas as análises feitas por espectrômetros de massa, independentemente do tipo de ionização ou de características de desempenho dos sistemas, é o fornecimento de um espectro que fornece a relação massa-carga no eixo x versus o fluxo de íons detectados no eixo y (Gillette et al., 2005). Desta forma, a espectrometria de massas tem sido utilizada em diversas áreas como: proteoma, detecção de proteínas e peptídeos, de biomarcadores, de desordens metabólicas, de drogas ilícitas (testes “anti-doping”), toxicologia clínica, análise de alimentos, de hormônios e de pesticidas entre outras (Cappiello et al., 2005; Gillette et al., 2005; Pusch & Kostrzewa, 2005; Hortin, 2006; Klampfl, 2006).

A concentração plasmática de anestésicos locais encapsulados em lipossomas foi avaliada em diversos estudos com animais. Estes estudos demonstraram que a administração de anestésicos locais encapsulados em lipossomas permite maior duração de ação e menor absorção sistêmica da droga (Hou & Yu, 1997; Yu et al., 2002; Grant et al., 2003; Tofoli et al., 2010). No entanto, as formulações de RVC lipossomais, complexadas em CDs e associadas a polímeros não foram avaliadas em relação à sua farmacocinética após a aplicação parenteral em animais. Esta avaliação fornece informações fundamentais para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas e para o futuro uso clínico das mesmas.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a farmacocinética destas novas formulações, com perspectivas futuras para estudos clínicos, utilizando a RVC encapsulada em lipossomas, complexada em CD, associada a polímeros, e livre nas mesmas concentrações após o bloqueio do nervo ciático em coelhos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Realizar ensaio *in vivo*, em coelhos, para determinar as concentrações plasmáticas e o perfil farmacocinético da ropivacaína, na mesma concentração, encapsulada em lipossomas, complexada em CD, associada a polímeros e livre após o bloqueio do nervo ciático.
- Obter dados pré-clínicos sobre a farmacocinética destas novas formulações de ropivacaína com o objetivo de futuros testes clínicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 Materiais:

Para confecção das formulações com ropivacaína foi utilizado: sal de cloridrato de ropivacaína (doador pela Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda.), acetato de α -tocoferol, fosfatidilcolina de ovo e colesterol (Sigma Chem. Co.), hidroxipropil- β -ciclodextrina (Roquette Ind. Farmac.), poloxamer 407 e 188 (BASF) tampão HEPES 20mM com NaCl 0,9% (Q-biogene).

Para a indução de anestesia geral foram utilizados alfa-cloralose e uretano (Sigma Chem. Co.).

Para a determinação dos níveis plasmáticos de ropivacaína o equipamento utilizado foi um espectrômetro de massas triplo-quadrupolar em seqüência com fonte de ionização por eletrospray (Micromass Quattro LC®) acoplado ao cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC 20 AD. Todos os demais reagentes foram de grau analítico ou farmacopêico.

3.2. RVC livre: formulação

A solução de ropivacaína 0,5% em meio aquoso foi preparada com água destilada e esterilizada em autoclave (Cereda *et al.*, 2008). Todas as formulações com anestésico livre eram estéreis.

3.3. RVC lipossomal: formulação

A formulação de ropivacaína lipossomal foi preparada no Instituto de Biologia da UNICAMP, no laboratório de Biomembranas, em colaboração com a Profa. Dra. Eneida de Paula. As vesículas unilamelares foram preparadas pelo método de hidratação de filme seco retirando-se alíquotas de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol (na proporção molar de 4:3:0,07) de solução estoque em clorofórmio. A mistura foi então evaporada sob fluxo de N₂ seguido de vácuo por 2 h, à temperatura ambiente (Fraceto *et al.*, 2002). Após a secagem, foi adicionado o tampão HEPES 20mM, pH 7,4 com NaCl 150 mM, a dispersão

foi agitada por 5 minutos em vórtex e apresentou vesículas multilamelares concêntricas, separadas por cavidades aquosas.

As vesículas unilamelares (LUV) de 0,4 μ m foram preparadas por extrusão das vesículas multilamelares descritas acima. Assim, sob pressão de nitrogênio, à temperatura ambiente, a amostra de vesículas multilamelares foi passada por um disco de drenagem e uma membrana de policarbonato com poros de tamanho controlado (0,4 μ m), por 12 vezes. Os lipossomas foram deixados em repouso, por pelo menos 2h, para o intumescimento das vesículas. As formulações dos lipossomas tiveram concentração de vesículas unilamelares de 5 mM (Cereda et al., 2006, 2008)

Após a preparação das vesículas, o cloridrato de ropivacaína foi incorporado, sendo que a concentração total de anestésico foi 0,5% (16,08 mM) (Araujo et al., 2008a). As formulações foram preparadas em câmara de fluxo laminar (com materiais e soluções autoclavados a 1 atm e 121°C, por 20 min.) e esterilizadas em autoclave (Cereda et al., 2008). As formulações lipossomais utilizadas foram preparadas semanalmente.

3.4. RVC complexada em ciclodextrinas: formulação

A formulação de ropivacaína complexada em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (RVC_{0,5%CD}) também foi preparada no Instituto de Biologia da UNICAMP, no laboratório de Biomembranas, em colaboração com a Profa. Dra. Eneida de Paula.

Em solução, os complexos foram preparados pela adição de quantidades apropriadas de ropivacaína e de HP- β -CD (razão molar 1:1). A suspensão formada foi equilibrada por agitação, à temperatura ambiente, por um período de 24 horas, resultando, assim, em uma solução límpida do complexo ciclodextrina/anestésico local. Para a preparação de complexos sólidos, a solução foi liofilizada e guardada a -20°C para uso posterior (Dollo et al., 1998; Loftsson & Masson, 2001; Araujo et al., 2008b) com dissolução de em tampão HEPES (20mM pH 7,4 com NaCl 150mM).

3.5. RVC com Polímero: formulação

O sistema poloxamer-ropivacaína (RVC_{0,5%POL}) foi preparado na UFABC, em colaboração com a Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo. RVC_{0,5%POL} foi preparada por dispersão direta do fármaco (5 mg/mL) em solução de poloxamer 407 e 188 (Lutrol® F-

127, BASF) a 25% cada, mantida a 4°C, sob agitação (100 rpm) por pelo menos 6 horas (Schmolka e al., 1972).

3.6. Modelo Animal:

Foram utilizados coelhos albinos da raça Nova Zelândia, machos, com peso variando entre 2000 e 3000 g, submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada a $22 \pm 3^\circ\text{C}$ e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos 7 dias.

O protocolo experimental foi elaborado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade São Francisco (001.08.10- Anexo 1)

Para a realização dos testes pré-clínicos de farmacocinética foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais (n=6/grupo):

- Grupo I: Ropivacaína livre: RVC_{0,5%}
- Grupo II: Ropivacaína lipossomal RVC_{0,5%} LUV
- Grupo III: Ropivacaína complexada em 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina:

RVC_{0,5%} CD

- Grupo IV: Ropivacaína associada a polímeros: RVC_{0,5%} POL

3.7. Bloqueio do nervo ciático (injeção infiltrativa) e coleta das amostras:

Previamente à administração das formulações foi realizada a indução da anestesia geral com α -cloralose (50 mg/kg) e uretano (1mg/kg) e realizando suplementação com os mesmos em 25% da dose inicial quando necessário (Fonseca et al., 1996). Logo após a indução da anestesia geral, foi realizada a instalação de um cateter intravascular na orelha como via de acesso venoso.

A técnica do bloqueio do nervo ciático foi realizada de acordo com o método descrito por Leszczynska & Kau (1992). As formulações foram administradas por infiltração (3,0 mL) na pata posterior direita, na região próxima ao nervo ciático. Assim, a agulha foi inserida no espaço popliteal na face posterior do joelho, na área do nervo ciático. (Araújo et al., 2008 a,b).

Foram coletadas amostras de 5 mL de sangue nos seguintes tempos: 0 - antes da injeção anestésica (“baseline”), 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 e 540 minutos após a injeção. O tempo de coleta de cada amostra foi definido e ajustado de modo que obtivéssemos onze amostras entre o tempo Zero (antes da administração) e 4 vezes o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da RVC (aproximadamente 111 min) (Leone et al., 2008). Este esquema de progressão geométrica é comumente utilizado e fornece informações sobre a disposição da droga (Bourne, 1995).

O sangue foi colhido com a adaptação na cânula do cateter de um tubo a vácuo (Vacuette®, Greiner Bio-one), contendo um anticoagulante (Heparina sódica). Logo após a colheita, o cateter foi lavado com uma mistura (1:10) de heparina sódica (Liquemine®, Roche) e soro fisiológico, para evitar coagulação do sangue e obstrução da via de acesso. As amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga (eppendorf®) heparinizados e o plasma separado foi armazenado a -70°C até a análise. Logo após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia.

3.8. Preparo e análise das amostras:

O equipamento utilizado para a obtenção das concentrações plasmáticas de ropivacaína foi um espectrômetro de massas triplo-quadrupolar em seqüência com fonte de ionização por eletrospray (Micromass Quattro LC®) acoplado ao cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC 20 AD; auto-Injetor da marca Shimadzu (Sil 20 A); programa Micromass versão Masslynx 4.1; degaseificador Shimadzu (DGU 20A₃).

As amostras de plasma (50µL) obtidas foram misturadas com o padrão interno (PI) de mepivacaína (1 µg/mL) previamente à extração. As amostras misturadas com o PI foram agitadas por 1 minuto para garantir solubilização do PI no plasma. Em seguida foram adicionados 50 µL de NaOH (1M) e 1000 µL de hexano/acetato de etila (1:1) e a mistura foi agitada por 5 minutos. Em seguida foi centrifugada a 1400 rpm por 5 minutos a 4° C. Foram transferidos 800 µL da fase orgânica para um microtubo de 2 mL e em seguida a amostra foi seca em fluxo de nitrogênio. A amostra foi ressuspensa em 50 µL da fase móvel, agitada por 1 minuto e esta solução foi transferida para o insert (150µL) para posterior injeção no sistema CLAE-EM/EM.

Foram injetados 5 µL desta mistura no CLAE-EM/EM. Foi utilizada uma coluna Polaris C18 de 5µm (50x2 mm) e a fase móvel utilizada era composta de acetonitrila e

água (80:20 v/v) com adição de 0,1% de ácido fórmico. O tempo de corrida foi de 2,5 minutos, sendo o tempo de retenção da ropivacaína de 0,75 min e do PI.

A detecção foi feita pelo monitoramento de reações múltiplas (MRM), que consiste na separação no primeiro analisador (Q1) da molécula-alvo ionizada e fragmentação no segundo analisador (Q2), seguida da análise do fragmento específico no terceiro analisador (Q3). A amostra de ropivacaína foi monitorada MRM 275,3>125,9, e a mepivacaína em MRM 247,13>98,04.

O software WinNonlin (WinNonlin version 5.3, Pharsight Corporation, CA, USA) foi utilizado para calcular os parâmetros farmacocinéticos: concentração plasmática máxima (C_{max}), tempo para obtenção da concentração máxima (T_{max}), área sob a curva (ASC) do tempo 0 até 540 minutos e de 0 a infinito e tempo de meia vida (t_{1/2} beta), volume de distribuição (V_d) e clearance (CL).

3.9. Validação da metodologia:

A validação foi realizada de acordo com os preceitos da resolução 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para a condução e validação dos ensaios analíticos, foi utilizado o padrão analítico de ropivacaína e mepivacaína (Sigma Chem. Co).

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

Especificidade: capacidade do método de medir um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para confirmar a especificidade do método, foram analisadas amostras (n=5) de um pool de plasma dos animais, sendo três amostras normais, uma com o plasma lipêmico e outra hemolisada. Foram observadas a possível presença de interferentes e de supressão de íons no tempo de retenção do fármaco e do PI.

Linearidade: É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na

amostra, dentro de um intervalo especificado. A análise da linearidade foi feita com no mínimo 6 concentrações diferentes. Foram construídas 3 curvas de calibração que incluíram a análise da amostra branco, amostra Branco+PI e mais seis amostras com valores na faixa de 0,1 a 50 ng/mL em plasma de coelhos. O desvio deve ser menor ou igual a 20% em relação a concentração nominal para o Limite de Quantificação (LQ) e deve ser menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. O coeficiente de correlação linear deve ser no mínimo $r=0,98$.

Precisão: É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada como repetibilidade ou precisão intra-corrída e precisão intermediária ou inter-corrídas. A precisão intra-corrída é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo instrumentador e a mesma instrumentação. Esta análise foi feita com três concentrações alta (CA 1200 ng/mL), média (CM 600 ng/mL) e baixa (CB 6 ng/mL) em triplicatas, ou seja, 9 determinações. A precisão intermediária (ou inter-corrídas) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, ou instrumentador diferente e/ou equipamentos diferentes. Esta análise também foi feita com três concentrações alta, média e baixa em triplicatas, em dois dias diferentes, ou seja, 18 determinações. A precisão não deve apresentar valores de desvio superiores a 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%

Exatidão: É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. A exatidão do método foi determinada com o uso de 3 concentrações (CA, CB e CM) com cinco determinações por concentração. A exatidão foi determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrída) e em corridas diferentes (exatidão inter-corrídas) como a precisão. O desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

Limite de quantificação (LQ): É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. A resposta de pico para o LQ deve ser, no mínimo, 5 vezes maior que qualquer interferência na amostra branco no tempo de retenção do fármaco. O pico de resposta do fármaco no LQ foi identificável e reproduzível com

precisão de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão, através da análise de cinco amostras de padrões.

3.10. Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão (com n=6). Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (One-way ANOVA) com teste posterior de Tukey-Kramer, com nível de significância 5%. O software utilizado para apresentação e análise dos dados foi o Graph Pad Software Instat. Os diferentes tempos (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 e 540 minutos) foram observados separadamente considerando todas as substâncias testadas ($RVC_{0,5\%}$, $RVC_{0,5\%LUV}$, $RVC_{0,5\%CD}$, $RVC_{0,5\%POL}$) e as mesmas foram comparadas entre si.

4. RESULTADOS:

4.1. Validação da Metodologia:

Foi realizada a infusão direta de ropivacaína no solvente acetonitrila na concentração de 1 µg/mL no equipamento, com o objetivo de confirmação da massa nominal utilizando a função scan MS. Operando o espectrômetro de massas em modo positivo obteve-se o espectro de massa da ropivacaína, a **Figura 4** apresenta o espectro de EM (A) e EM/EM (B) para a ropivacaína. A **Figura 5** mostra o espectro de EM (A) e EM/EM (B) para a mepivacaína PI.

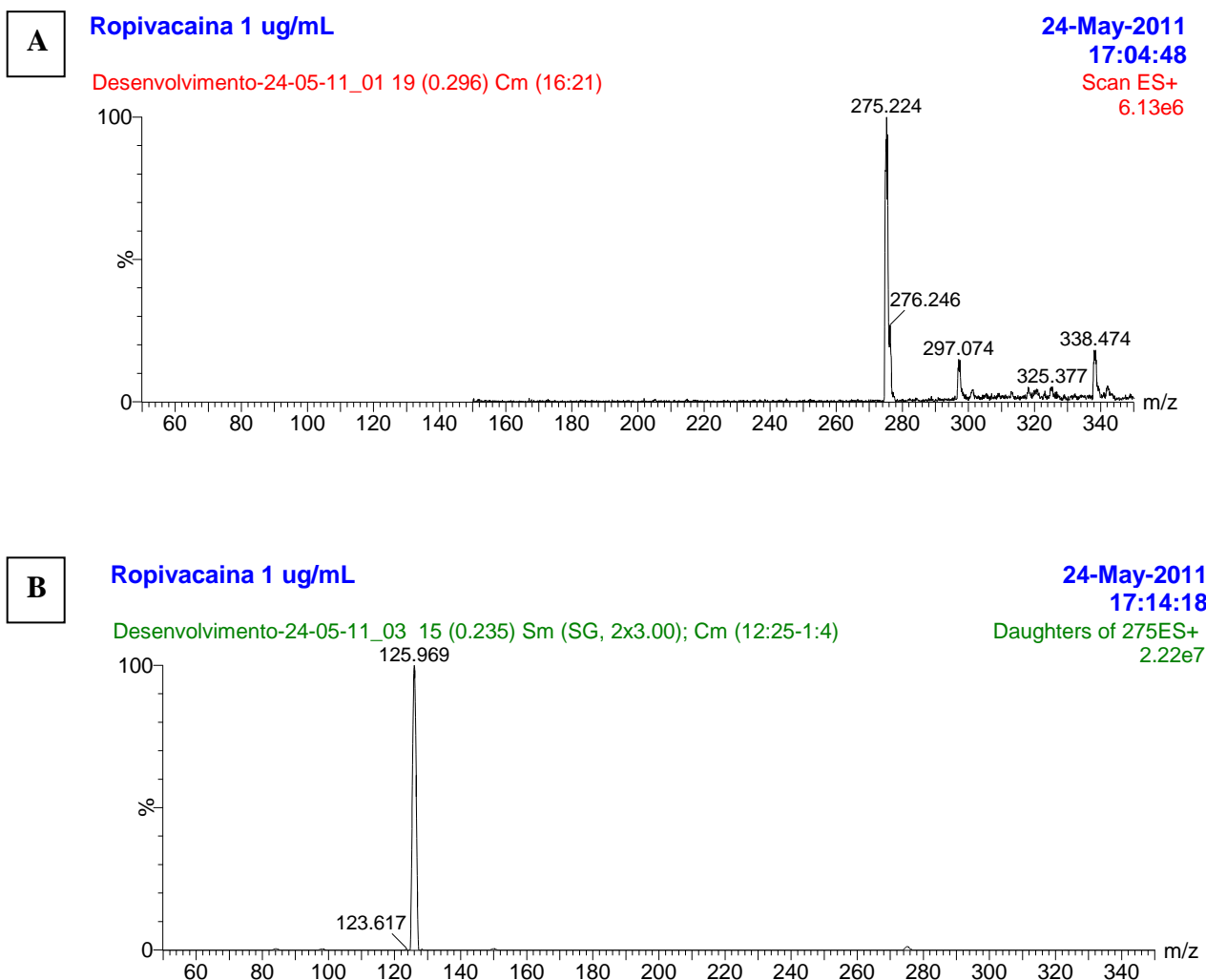


Figura 4: (A) Espectro de massas na função EM e (B) Espectro de EM/EM para RVC.

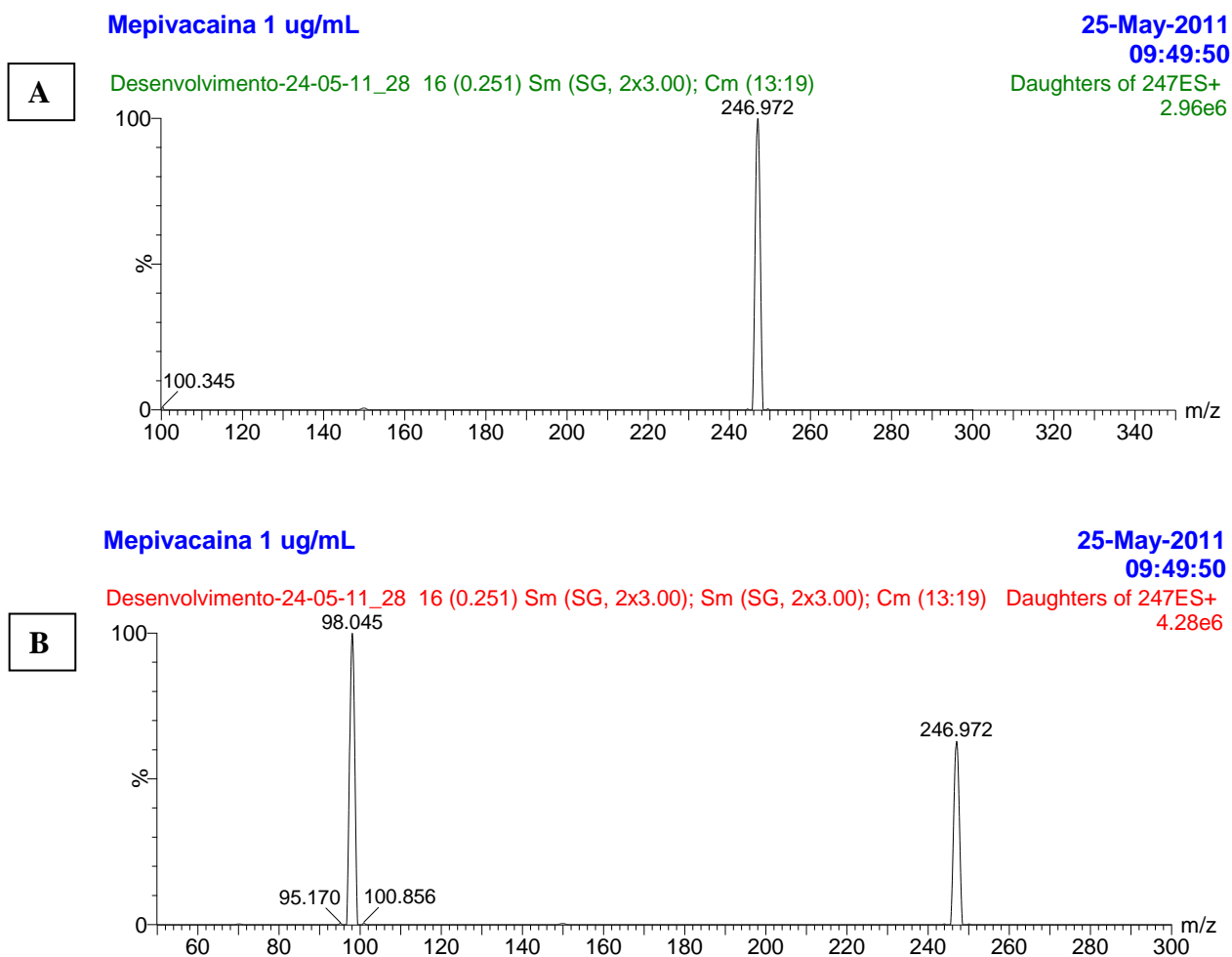


Figura 5: (A) Espectro de massas na função MS e (B) Espectro de MS/MS para o PI.

Especificidade ou Seletividade: Para confirmar a especificidade do método, foram analisadas amostras de plasma (branco) obtidas de três animais, sendo três amostras normais, uma com o plasma lipêmico e a outra hemolisada. Na **Figura 6** estão apresentadas as amostras de plasma branco testadas utilizando-se os procedimentos de extração e as condições cromatográficas propostas, para avaliar interferência no tempo de retenção da ropivacaína e do padrão interno. Não foram encontradas interferências no tempo de retenção do fármaco e padrão interno.

Pool: 01

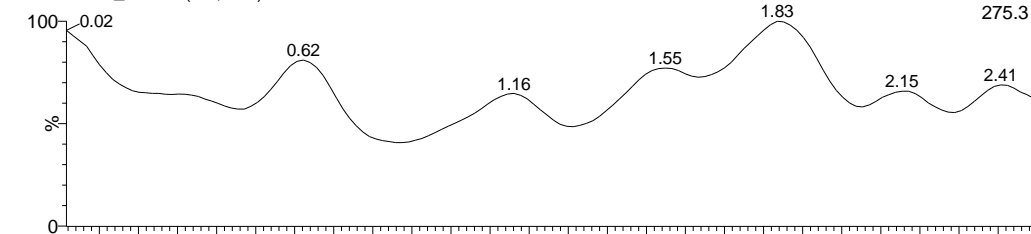
26-May-2011

14:42:52

A

Seletividade_01 Sm (Mn, 3x3)

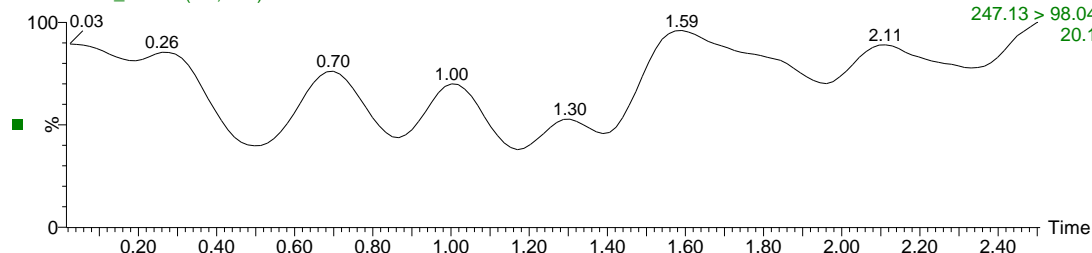
1: MRM of 1 Channel ES+
275.3 > 125.9
26.5



B

Seletividade_01 Sm (Mn, 3x3)

2: MRM of 1 Channel ES+
247.13 > 98.04
20.1



Pool: 02

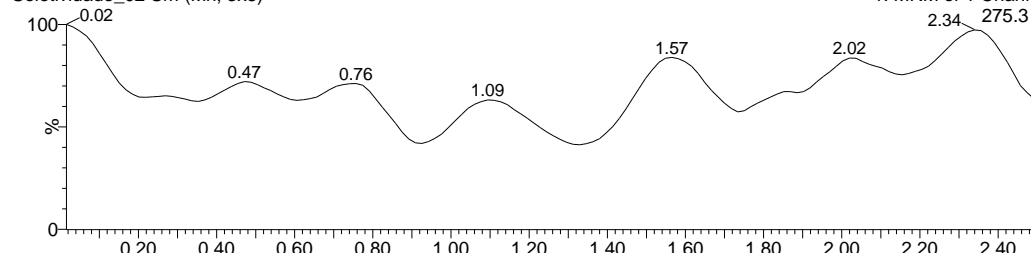
26-May-2011

14:46:09

C

Seletividade_02 Sm (Mn, 3x3)

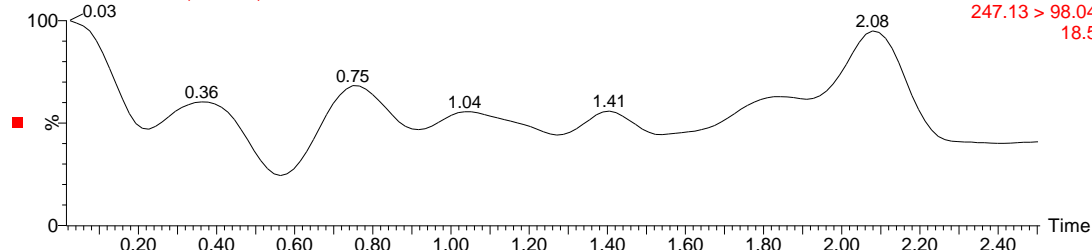
1: MRM of 1 Channel ES+
275.3 > 125.9
18.0



D

Seletividade_02 Sm (Mn, 3x3)

2: MRM of 1 Channel ES+
247.13 > 98.04
18.5



Pool: 03

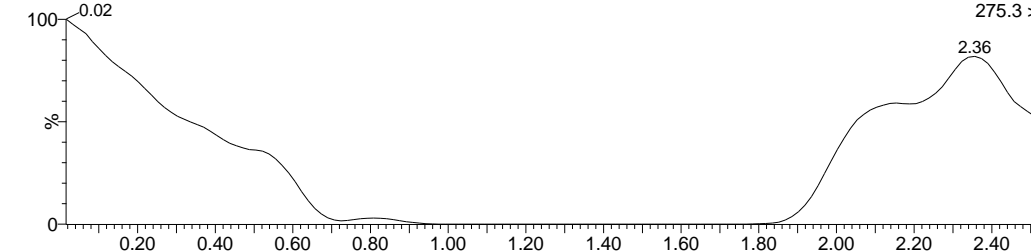
26-May-2011

14:49:27

E

Seletividade_03 Sm (Mn, 3x3)

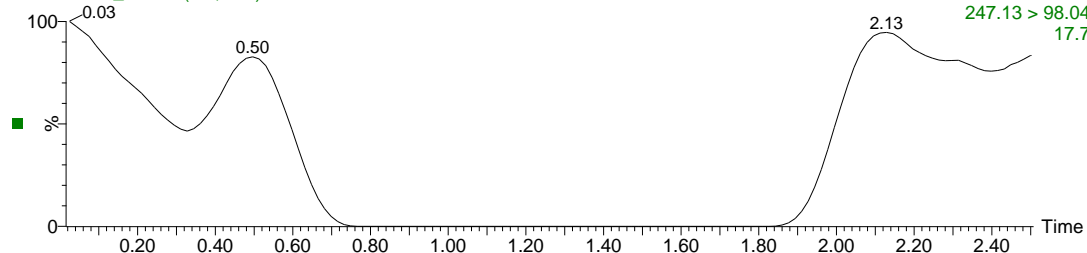
1: MRM of 1 Channel ES+
275.3 > 125.9
21.7



F

Seletividade_03 Sm (Mn, 3x3)

2: MRM of 1 Channel ES+
247.13 > 98.04
17.7



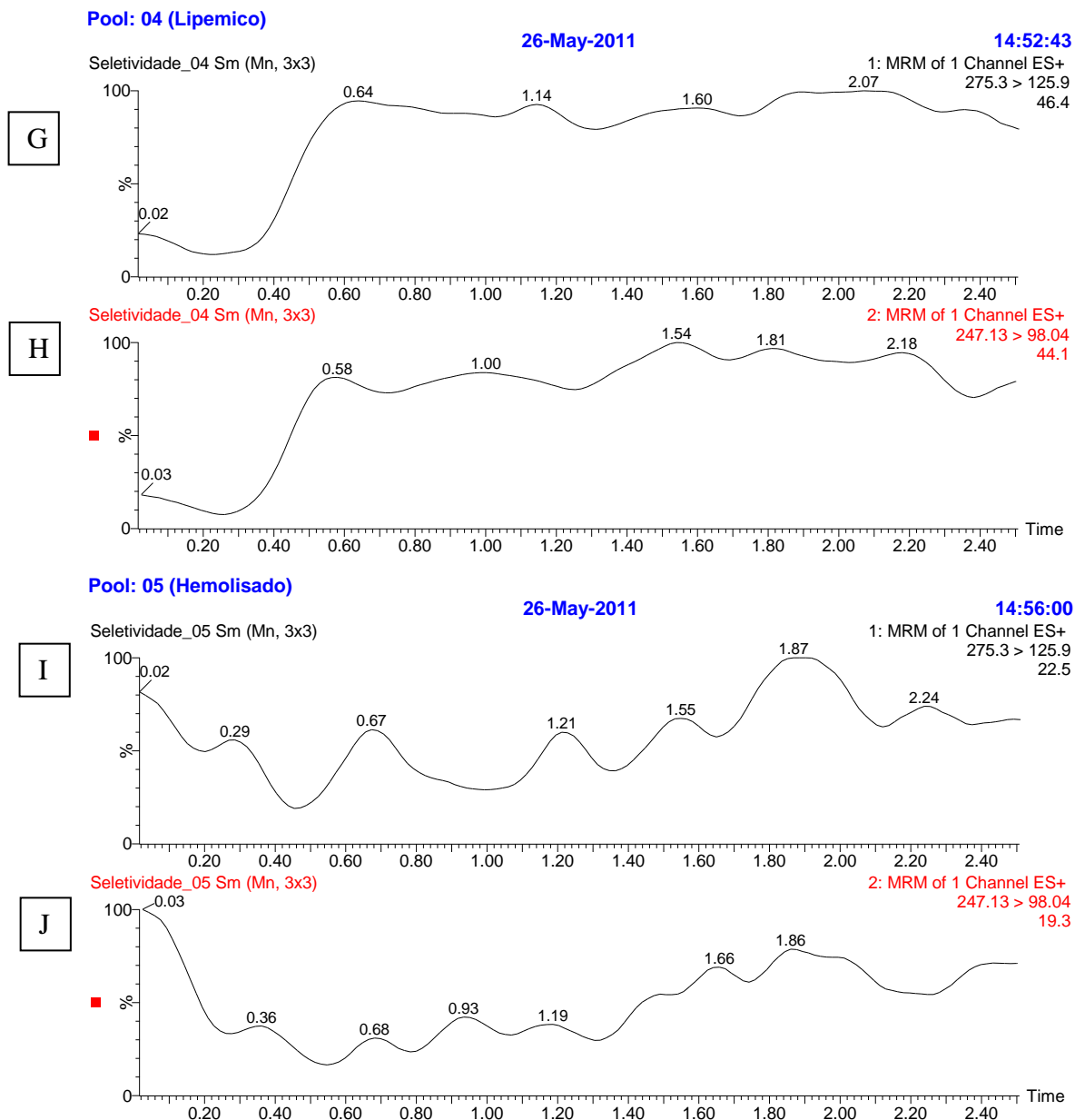


Figura 6: (A), (C), (E) Cromatograma referente ao branco do analito (plasma normal). (B), (D), (F) Branco do padrão interno (plasma normal); (G) branco do analito (plasma lipêmico); (H) branco do padrão interno (plasma lipêmico); (I) Branco do analito (plasma hemolisado); (J) branco do padrão interno (plasma lipêmico).

Linearidade: A curva de calibração da ropivacaína foi gerada através da análise de quantidades crescentes de fármaco. As concentrações foram definidas em testes preliminares, incluindo a primeira quantificação de amostras, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas. Para definir a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, foram geradas três curvas de calibração com seis padrões contendo o fármaco e padrão interno. Foi observada uma resposta adequada na

faixa de 2,00 a 1500,00 ng/mL. A curva de calibração apresentou excelente linearidade com coeficiente de correlação $r = 0.99$. Os desvios observados foram menores que 20% em relação a concentração nominal para o Limite de quantificação (LQ= 2 ng/mL) e menores que 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. A **Tabela 1** apresenta os valores de concentração obtidos com a curva calibração obtida nestes experimentos.

Tabela 1: Curva de Calibração (Linearidade)

| <i>Fármaco</i> | <i>Concentração nominal (ng/mL)</i> | <i>Concentração média experimental (ng/mL)</i> | <i>CV (%)</i> | <i>Exatidão (%)</i> |
|--------------------|-------------------------------------|--|---------------|---------------------|
| <i>Ropivacaína</i> | 2,00 | 2,01 | 0,13 | 100,65 |
| <i>Ropivacaína</i> | 25,00 | 23,03 | 1,96 | 92,15 |
| <i>Ropivacaína</i> | 250,00 | 237,03 | 2,84 | 94,81 |
| <i>Ropivacaína</i> | 750,00 | 769,90 | 1,62 | 102,65 |
| <i>Ropivacaína</i> | 1000,00 | 1025,64 | 0,89 | 102,56 |
| <i>Ropivacaína</i> | 1500,00 | 1607,52 | 0,83 | 107,16 |

Equação da curva de calibração 1: $y = 0,00431839x + 0,000105281$ ($r = 0,998011$)

Equação da curva de calibração 2: $y = 0,00434931x + 0,000239412$ ($r = 0,998574$)

Equação da curva de calibração 3: $y = 0,00438943x + 0,000591832$ ($r = 0,998317$)

Exatidão e Precisão: Precisão e exatidão do método foram calculados pelas variações intra e inter-lote de três concentrações distintas, alta (CA 1200 ng/mL), média (CM 600 ng/mL) e baixa (CB 6 ng/mL), utilizando-se várias determinações por concentração. A precisão e a exatidão foram determinadas em um mesmo lote (intra-lote) e em lotes diferentes (inter-lotes). A precisão intra-lotes apresentou valores na faixa de 0,75 a 3,79% e a inter-lotes de 1,19 a 2,28%. A exatidão apresentou valores de 91,60 a 108,96% (intra-lotes) e 92,71 a 106,60% (inter-lotes).

Tabela 2 - Análise inter-lotes e intra lotes dos controles de qualidade CA, CM e CB

| Réplicas | CB (lote 1) | CB (lote 2) | CB (lote 3) | CM (lote 1) | CM (lote 2) | CM (lote 3) | CA (lote 1) | CA (lote 2) | CA (lote 3) |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 5,50 | 5,83 | 5,46 | 571,82 | 613,76 | 594,54 | 1228,66 | 1299,12 | 1294,64 |
| 2 | 5,60 | 5,78 | 5,52 | 585,16 | 623,23 | 600,31 | 1247,37 | 1292,25 | 1257,41 |
| 3 | 5,63 | 5,66 | 5,48 | 582,99 | 607,67 | 597,74 | 1290,72 | 1312,35 | 1277,09 |
| 4 | 5,73 | 5,31 | 5,47 | 583,34 | 617,72 | 590,16 | 1237,07 | 1311,57 | 1254,64 |
| 5 | 5,60 | 5,75 | 5,51 | 590,66 | 593,55 | 548,34 | 1274,01 | 1319,09 | 1261,52 |
| 6 | 5,303 | 5,423 | 5,515 | 586,11 | 594,94 | 591,45 | 1253,78 | 1311,35 | 1304,13 |
| Média | 5,564 | 5,62 | 5,49 | 583,35 | 608,48 | 587,09 | 1255,27 | 1307,62 | 1274,90 |
| DP | 0,14 | 0,21 | 0,02 | 6,28 | 12,14 | 19,35 | 23,28 | 9,92 | 20,70 |
| CV | 2,66 | 3,79 | 0,45 | 1,07 | 1,99 | 3,29 | 1,85 | 0,75 | 1,62 |
| Exatidão | 92,73 | 93,81 | 91,60 | 97,22 | 101,41 | 97,84 | 104,60 | 108,96 | 106,24 |
| | | CB | | CM | | | CA | | |
| Média | | 5,56 | | 592,97 | | | 1279,27 | | |
| DP | | 0,06 | | 13,55 | | | 26,44 | | |
| CV (%) | | 1,19 | | 2,28 | | | 2,06 | | |
| Exatidão (%) | | 92,71 | | 98,82 | | | 106,60 | | |

* Valores Nominais: CB=6ng/mL; CM 600 ng/mL e CA=1200 ng/mL

Limite de quantificação (LQ): O LQ foi determinado como o menor valor mensurável de ropivacaína com um desvio padrão de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão, através da análise de, no mínimo, cinco amostras de padrões. O LQ determinado foi de 2,00 ng/mL. As **Tabelas 3 e 4** mostram os resultados da precisão e exatidão intra e inter-lote do LQ.

Tabela 3: Resultados das análises intra-lote do controle de qualidade LQ.

| | LQ (1) | LQ (2) | LQ (3) |
|-------------|---------|---------|--------|
| Média | 2,026 | 2,067 | 1,935 |
| DP | 0,037 | 0,060 | 0,051 |
| CV (%) | 1,829 | 2,887 | 2,630 |
| Exatidão(%) | 101,275 | 103,367 | 96,750 |

Concentração nominal: LQ= 2,00 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação

Tabela 4: Resultados inter-lotes do controle de qualidade LQ

| | LQ (1) | LQ (2) | LQ (3) |
|-------------------------------|---------|--------|--------|
| Média das Réplicas Inter-lote | 2,026 | 2,067 | 1,935 |
| Média | 2,009 | | |
| DP | 0,068 | | |
| CV (%) | 3,366 | | |
| Exatidão (%) | 100,464 | | |

Concentração nominal: LQ=2,00 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação média das réplicas inter-lotes de LQ (1), LQ (2) e LQ (3).

Os resultados obtidos na validação do método estão de acordo com os preceitos da resolução 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e indicam que o método é altamente específico e seletivo na faixa analítica avaliada. Além disso, o método descrito demonstrou ser rápido (tempo de corrida analítica de 2.5 minutos) e adequado para dosagens de ropivacaína.

4.2. Determinação da concentração plasmática:

O tamanho da amostra em cada um dos quatro grupos (seis animais) permitiu à ANOVA um poder de 98% para detectar uma diferença de 5% nas médias, considerando os resultados obtidos em todos os tempos analisados.

As concentrações plasmáticas obtidas após a injeção de RVC_{0,5% LUV} e RVC_{0,5% CD} não apresentaram diferença significativa da obtida após a injeção de RVC_{0,5% livre} em todos os tempos analisados ($p>0,05$). A injeção de RVC_{0,5% POL} promoveu

concentrações menores que as obtidas após a injeção de RVC_{0,5% livre} até os 45 minutos ($p < 0,05$), após este período também não houve diferença significativa entre estas formulações ($p > 0,05$).

A **Tabela 5** apresenta as concentrações de RVC (ng/ml) obtidas após a injeção das formulações nos 24 animais testados. A **Figura 7** apresenta o gráfico de concentração plasmática média *versus* o tempo após a injeção das formulações testadas.

Tabela 5: Concentração (média \pm desvio padrão) de ropivacaína (ng/mL), após a injeção das diferentes formulações (RVC_{0,5%}, RVC_{0,5%LUV}, RVC_{0,5%CD}, RVC_{0,5%POL}).

| Tempo | RVC_{0,5%} | RVC_{0,5%LUV} | RVC_{0,5%CD} | RVC_{0,5%POL} |
|--------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 0 | 0,00 \pm 0,00 a,b,c | 0,00 \pm 0,00 d,e | 0,00 \pm 0,00 f | 0,00 \pm 0,00 |
| 15 | 764,640 \pm 297,821 a,b,c* | 589,847 \pm 192,762 d,e | 638,925 \pm 113,993 f | 306,669 \pm 235,503 |
| 30 | 758,860 \pm 362,291 a,b,c* | 528,023 \pm 167,140 d,e | 542,898 \pm 143,744 f | 286,262 \pm 156,462 |
| 45 | 601,209 \pm 274,097 a,b,c* | 459,807 \pm 134,157 d,e | 475,044 \pm 102,916 f | 245,769 \pm 98,192 |
| 60 | 504,883 \pm 246,270 a,b,c | 433,976 \pm 123,095 d,e | 450,461 \pm 100,854 f | 254,292 \pm 91,242 |
| 90 | 386,778 \pm 190,927 a,b,c | 428,671 \pm 106,562 d,e | 413,920 \pm 133,066 f | 272,298 \pm 64,335 |
| 120 | 308,943 \pm 158,428 a,b,c | 375,490 \pm 88,408 d,e | 367,004 \pm 116,386 f | 274,225 \pm 61,203 |
| 180 | 220,374 \pm 94,233 a,b,c | 293,423 \pm 87,234 d,e | 320,780 \pm 144,497 f | 255,196 \pm 66,995 |
| 240 | 172,602 \pm 73,862 a,b,c | 221,255 \pm 58,657 d,e | 262,403 \pm 137,217 f | 190,187 \pm 42,554 |
| 300 | 133,087 \pm 45,910 a,b,c | 166,662 \pm 40,108 d,e | 220,368 \pm 127,307 f | 169,514 \pm 32,195 |
| 360 | 114,506 \pm 37,154 a,b,c | 121,888 \pm 45,060 d,e | 194,737 \pm 125,674 f | 138,810 \pm 27,011 |
| 420 | 104,552 \pm 43,166 a,b,c | 88,801 \pm 36,372 d,e | 181,055 \pm 126,140 f | 109,462 \pm 23,327 |
| 480 | 92,473 \pm 48,484 a,b,c | 66,083 \pm 31,832 d,e | 157,795 \pm 117,363 f | 83,034 \pm 24,070 |
| 540 | 86,617 \pm 52,134 a,b,c | 57,370 \pm 33,662 d,e | 151,425 \pm 115,830 f | 50,253 \pm 29,435 |

Nota: Análise Estatística: p<0,001 [***], p<0,01[**], p<0,05[*], p>0,05 [não significativo].

| ANOVA/Tukey Kramer | |
|--|---|
| a RVC _{0,5%} x RVC _{0,5%LUV} | d RVC _{0,5%LUV} x RVC _{0,5%CD} |
| b RVC _{0,5%} x RVC _{0,5%CD} | e RVC _{0,5%LUV} x RVC _{0,5%POL} |
| c RVC _{0,5%} x RVC _{0,5%POL} | f RVC _{0,5%CD} x RVC _{0,5%POL} |

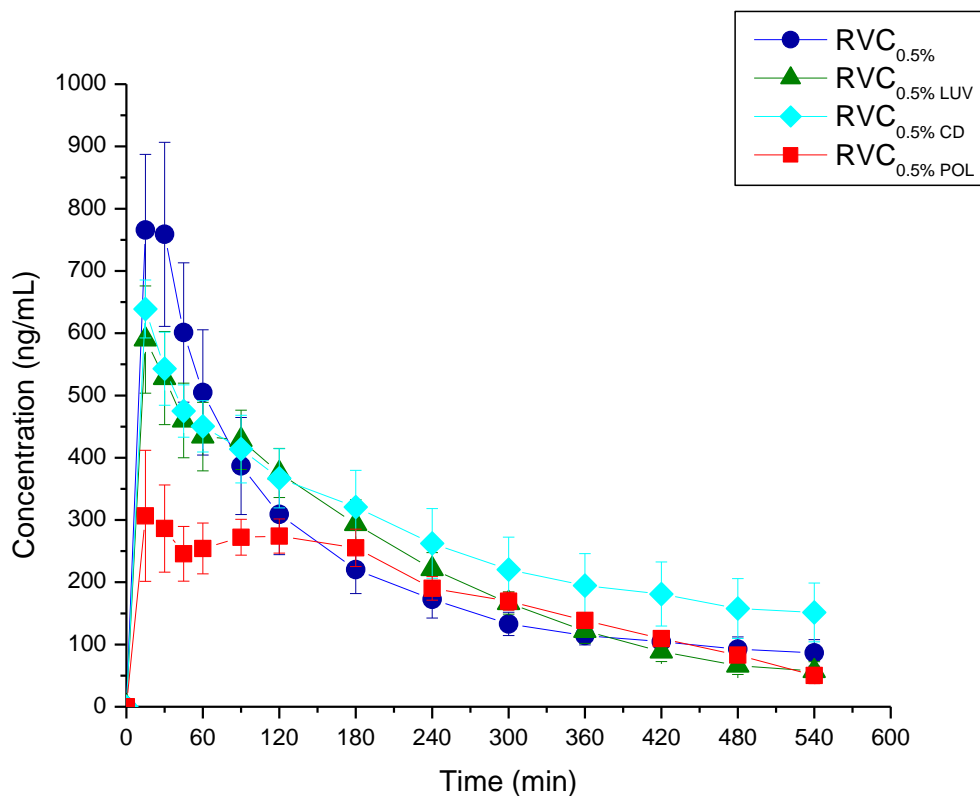


Figura 7: curva da concentração plasmática média *versus* tempo após a injeção de RVC_{0,5%} livre, RVC_{0,5%LUV}, RVC_{0,5%CD} e RVC_{0,5%POL}.

A **Tabela 6** representa os valores dos parâmetros farmacocinéticos (C_{max}, T_{max}, ASC_{0-t}, ASC_{0-∞}, t_{1/2}, V_d, Cl, MRT) obtidos com os valores de concentração plasmática obtidos em cada grupo.

Com relação ao perfil farmacocinético observou-se que houve diferença entre as formulações de RVC_{0,5% LIVRE} e RVC_{0,5% POL} na concentração plasmática máxima (C_{max}). O C_{max} foi aproximadamente duas vezes menor para a formulação de RVC_{0,5%POL} (p<0,05) quando comparado com a RVC_{0,5%}.

Tabela 6: Parâmetros farmacocinéticos após a injeção de RVC_{0,5%} livre, RVC_{0,5%LUV}, RVC_{0,5%CD} e RVC_{0,5%POL}.

| Parâmetros Farmacocinéticos | RVC _{0,5%} | RVC _{0,5%LUV} | RVC _{0,5%CD} | RVC _{0,5%POL} |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| T _{1/2} (h) | 4,06 ± 2,05 a, b, c | 2,95 ± 1,30 c, e, f | 7,53 ± 6,18 a, d, e | 2,89 ± 2,21 b, d, e |
| T _{máx} (h) | 0,33 ± 0,13 a, b, c | 0,54 ± 0,48 c, e, f | 0,29 ± 0,10 a, d, e | 1,42 ± 1,31 b, d, e |
| C _{máx} (ng/L) | 869,54 ± 355,53 a,b*,c | 606,36 ± 198,58 c, e, f | 692,92 ± 96,65 a, d, e | 423,58 ± 178,48 b, d, e |
| ASC _{0-t} (ng.h/L) | 2022,46 ± 754,67 a, b, c | 2039,91 ± 484,81 c, e, f | 2410,87 ± 992,36 a, d, e | 1618,18 ± 305,81 b, d, e |
| ASC _{0-inf} (ng.h/L) | 2568,87 ± 853,00 a, b, c | 2334,16 ± 636,34 c, e, f | 4698,06 ± 3281,27 a, d, e | 1903,44 ± 410,30 b, d, e |
| V _d (L) | 36,02 ± 17,90 a, b, c | 27,77 ± 8,86 c, e, f | 33,68 ± 9,97 a, d, e | 31,07 ± 19,95 b, d, e |
| Cl (L/h) | 6,25 ± 1,53 a, b, c | 6,83 ± 1,82 c, e, f | 5,17 ± 3,51 a, d, e | 8,28 ± 2,27 b, d, e |
| MRT (h) | 2,85 ± 0,59 a, b, c | 2,93 ± 0,41 c, e, f | 3,18 ± 0,62 a, d, e | 3,53 ± 0,36 b, d, e |

Nota: Análise Estatística: p<0,001 [***], p< 0,01[**], p<0,05[*], p>0,05 [não significativo].

| ANOVA/Tukey Kramer | |
|--|---|
| a RVC _{0,5%} x RVC _{0,5%CD} | d RVC _{0,5%CD} x RVC _{0,5%POL} |
| b RVC _{0,5%} x RVC _{0,5%POL} | e RVC _{0,5%CD} x RVC _{0,5%LUV} |
| c RVC _{0,5%} x RVC _{0,5%LUV} | f RVC _{0,5%LUV} x RVC _{0,5%POL} |

5. DISCUSSÃO

Em um sistema de liberação sustentada (“drug delivery”) com AL, alguns aspectos devem ser considerados para que ocorra sucesso da formulação. Como por exemplo, o fármaco deve ser encapsulado em quantidades suficientes para manter a concentração terapêutica da droga; a difusão do AL da solução injetada para o fluido extracelular e sua captação pelo tecido nervoso deve ser lenta, e o “clearance” do fármaco e do carreador devem ser lentos para permitir um efeito prolongado (Araujo et al., 2008a).

Formulações de “drug delivery”, como as que foram analisadas nesse estudo, são confeccionadas para a liberação lenta do AL, assim devem apresentar efeito prolongado e menores concentrações plasmáticas e incidência de efeitos tóxicos sistêmicos. As formulações utilizadas neste trabalho já tiveram sua efetividade comprovada e promoveram aumento na duração do efeito analgésico após a aplicação em animais (Araujo et al., 2008a; Araujo et al., 2008b; Papini et al., 2011). Assim, o presente estudo determinou concentrações plasmáticas e o perfil farmacocinético das diferentes formulações de RVC (RVC_{0.5%}, RVC_{0.5%LUV}, RVC_{0.5%CD} e RVC_{0.5%POL}) após o bloqueio do nervo ciático em coelhos.

A toxicidade sistêmica produzida por AL pode ser causada por injeção intravascular acidental, dose máxima maior que a recomendada ou após a rápida absorção da injeção em um sítio altamente vascularizado. Outros trabalhos já avaliaram a toxicidade sistêmica, assim como a melhora no perfil farmacológico de vários AL combinados com lipossomas, ciclodextrinas e polímeros (Kaur et al., 2004; Araujo et al., 2008a; Grillo et al., 2010; de Paula et al., 2010), porém não existem relatos na literatura sobre o perfil farmacocinético de RVC livre comparada com os sistemas de liberação sustentada utilizados neste estudo.

Para a determinação de tais parâmetros foi realizada a análise de concentrações plasmáticas de RVC obtidas após o bloqueio do nervo ciático em coelhos. O bloqueio de nervos com AL é uma técnica indicada para tratamento de dor aguda e analgesia intra e pós-operatória. Formulações de AL em sistemas de liberação prolongada, como as ciclodextrinas, os polímeros e os lipossomas, são úteis para prolongar a duração da analgesia e diminuir a toxicidade sistêmica neste tipo de bloqueio. Além disso, estas formulações são capazes de diminuir o bloqueio motor e esta característica tem enorme relevância clínica (Araújo et al., 2004). Assim o bloqueio do nervo ciático foi escolhido

como via de administração neste estudo para determinar a farmacocinética destas formulações visando o futuro uso clínico das mesmas.

Para obtenção de parâmetros farmacocinéticos confiáveis foram utilizados animais com idade e peso similares e aclimatados ao local de experimentação. Além disso, o experimento foi conduzido de maneira randomizada e sempre no mesmo horário para evitar à influência dos ritmos circadianos na liberação de catecolaminas endógenas (Pollman, 1982; Lemmer & Wiemers, 1989). A metodologia utilizada para dosar a RVC em plasma foi desenvolvida e validada ao longo do presente estudo e se mostrou sensível e seletiva possibilitando o estabelecimento de um pequeno limite de quantificação do fármaco com um pequeno tempo de corrida e um simples método de preparo das amostras.

Geralmente as formulações com lipossomas e ciclodextrinas apresentam concentrações plasmáticas menores e mais constantes quando comparadas com formulações livres, sugerindo que a encapsulação em lipossomas e a complexação em ciclodextrinas promove atraso da transferência do local de aplicação para a circulação sanguínea. No entanto, no presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações plasmáticas e nem nos parâmetros farmacocinéticos obtidas com $RVC_{0.5\%}$, $RVC_{0.5\%LUV}$ e $RVC_{0.5\%CD}$. Assim, o uso destes sistemas de drug delivery após o bloqueio do nervo ciático em coelhos, não promoveram um atraso na transferência do AL do local da injeção para a circulação sanguínea e não alteraram o perfil farmacocinético da RVC.

A formulação $RVC_{0.5\%POL}$ apresentou pico plasmático menos evidenciado e concentrações mais constantes por um maior período de tempo quando comparada com a $RVC_{0.5\%}$. Além disso, esta formulação apresentou menor C_{max} que o obtido com a injeção de $RVC_{0.5\%}$. Estas características determinam que o sistema $RVC_{0.5\%POL}$ apresentou perfil cinético típico de formulações de liberação sustentada. A formulação $RVC_{0.5\%POL}$ utilizou a associação de dois polímeros (poloxamer 407 e 188) à 25%; essa mistura foi selecionada devido a sua propriedade de geleificação termorreversível e o seu perfil de dissolução revela que a formulação se torna um gel à temperatura corpórea. Assim, após a injeção a formulação se torna um gel e demora mais tempo para se solubilizar no meio que a solução aquosa de RVC, por este motivo a aplicação deste gel funcionou como um sistema para liberação modificada de AL. Essa mistura também é conhecida por ter baixa toxicidade, níveis relativamente baixos de irritação da pele,

excelente solubilidade em água, alta capacidade de solubilização, boas características de liberação da droga e compatibilidade com outros compostos (Xuan et al., 2010).

Outros estudos avaliaram a farmacocinética de RVC com diferentes tipos de sistema de liberação prolongada (Ratajczak-Enselme et al., 2008; Franz-Montan et al., 2010; Shen et al. 2011). Ratajczak-Enselme e colaboradores (2008) avaliaram a farmacocinética epidural, intratecal e no plasma de RVC associada a micro-esferas poliméricas, após a administração epidural em um modelo de ovelhas. Embora o sistema polimérico de “drug-delivery” não seja o mesmo, o autor também obteve menores valores de C_{max} com a utilização de RVC associada a micro-esferas poliméricas, o que indica liberação controlada do anestésico.

Shen e colaboradores (2011) aplicaram em ratos, por via subcutânea, lipossomas multivesiculares de RVC. Os autores analisaram os parâmetros farmacocinéticos e encontraram menor valor de C_{max} e maior valor de ASC da formulação lipossomal comparada com a RVC livre. O presente estudo não encontrou diferenças entre os parâmetros farmacocinéticos obtidos com a injeção de RVC_{0,5%LUV} e RVC_{0,5%}. Estas diferenças podem ser explicadas pelo tipo de lipossoma e pela rota de administração utilizados. Shen e colaboradores utilizaram lipossomas multilamelares ao contrário do presente estudo que utilizou lipossomas unilamelares. Além disso, os lipossomas utilizados em nosso estudo apresentavam eficiência de encapsulação de cerca 24%, assim 76% de RVC estão livres nesta formulação.

Franz-Montan e colaboradores (2010) em seu estudo randomizado, duplo-cego e cruzado avaliaram farmacocinética da RVC_{0,5%} lipossomal e RVC_{0,5%} com epinefrina em 14 voluntários sadios. Os autores não observaram diferença entre as formulações com relação ao C_{max} , T_{max} , ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$. Os autores concluíram que a encapsulação de RVC em lipossomas promoveu atraso na absorção, assim como a adição de vasoconstritores. O presente estudo não utilizou a formulação com epinefrina e ao contrário do estudo de Franz-Montan e colaboradores (2010) a aplicação de RVC_{0,5%LUV} no bloqueio do ciático em coelhos não promoveu alteração no perfil farmacocinético do AL.

Não existem relatos na literatura de estudos que avaliaram a cinética de formulações de RVC complexadas com ciclodextrinas. O complexo de inclusão de RVC-HP- β -CD utilizado neste estudo apresenta valor de K_a (constante de associação) de aproximadamente $9,46 M^{-1}$ (Araujo, et al., 2008b). A velocidade de liberação dos fármacos das ciclodextrinas é determinada pela constante de ligação (K_a), e esta

liberação costuma ser rápida para quase todos os fármacos. Para a maior parte dos fármacos ocorre diluição e completa dissociação do fármaco da ciclodextrina, somente com valores de K_a maiores que $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ outros mecanismos podem estar envolvidos na liberação do fármaco. Este baixo valor de K_a poderia explicar a ausência de alterações farmacocinéticas após a aplicação de $\text{RVC}_{0.5\% \text{CD}}$. Além disso, para o complexo utilizado neste estudo apenas uma molécula de HP- β -CD a cada doze forma um complexo com a RVC. Esse baixo valor de complexação entre $\text{RVC}:\text{HP-}\beta\text{-CD}$ pode ser uma hipótese para a não alteração dos parâmetros farmacocinéticos

Apesar da ausência de alterações na farmacocinética e nas concentrações plasmáticas da $\text{RVC}_{0.5\% \text{LUV}}$ e $\text{RVC}_{0.5\% \text{CD}}$ em relação à RVC livre, é importante ressaltar que estas formulações foram avaliadas em modelos animais e apresentaram maior duração de ação e menor toxicidade (Araujo et al., 2008a; Araujo et al., 2008b). Assim, estas formulações podem ser úteis para a prática clínica devido as modificações farmacodinâmicas observadas em estudos prévios. A formulação de $\text{RVC}_{0.5\% \text{POL}}$ promoveu atraso na absorção do anestésico local e esta propriedade associada ao seu aumento de efetividade demonstrado previamente (Papini et al., 2011) torna o futuro uso clínico desta formulação favorável.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que, as formulações de RVC encapsuladas em lipossomas assim como as complexadas em ciclodextrinas não foram capazes de alterar o perfil farmacocinético deste fármaco. No entanto, a RVC_{0,5%POL} foi capaz de produzir uma liberação sustentada e melhorar o perfil farmacocinético da droga quando comparada com RVC_{0,5%}.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adams, H. A.; Biscopig J.; Ludolf K.; Börgmann A.; Bachmann-M, B.; Hempelmann, G. The quantitative analysis of amide local anesthetics using high pressure liquid chromatography and ultraviolet detection (HPLC/UV). *Reg Anaesth.*, 12(3): 53-57, 1989.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC No. 899, de 29/05/2003. D.O.U. Diário Oficial da União, de 02/06/2003.

Almeida, M. C. S.; Locks, G. F.; Gomes, H. P.; Brunharo, G. M.; Kauling, A. N. C. Analgesia pós-operatória: comparação entre infusão contínua de anestésico local e opioide via cateter peridural e infusão contínua de anestésico local via cateter na ferida operatória. *Rev. Bras. Anesthesiol*, 61:3, 2011.

Altun, Z.; Abdel-Rehim, M.; Blomberg, L. G. New trends in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent, and MEPS-LC-MS-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 813(1-2):129-35, 2004.

Araujo, D. R.; Cereda C. M.; Brunetto G. B.; Vomero, V. U.; Pierucci, A.; Neto, H. S.; de Oliveira, A. L.; Fraceto, L. F.; Braga, A. F.; de Paula, E. Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. *J Pharm Pharmacol*, 60(11):1449-57, 2008 a.

Araujo, D. R.; Cereda, C. M. S.; Brunetto G. B.; Pinto L. M. A.; Santana M. H. A.; de Paula E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. *Can. J. Anesth*, 51:566-572, 2004.

Araujo, D. R.; de Paula, E.; Fraceto, L. F. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. *Quim. Nova*, 31(7):1775-1783, 2008.

Araujo, D. R.; Pinto, L. M. A.; Braga, A. F. A.; de Paula, E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: Aplicações Terapêuticas. *Rev. Bras. Anesthesiol*, 53(5): 653-661, 2003.

Araujo, D. R.; Tsuneda, S.S.; Cereda, C. M. S.; et al. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. *Eur J Pharm Sci*, 33:60-71, 2008 b.

Banerjee, R. Liposomes: applications in medicine. *J Biomater Appl.*, 16(1):3-21, 2001.

Batista, C. M.; Carvalho, C. M. B.; Magalhães, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 43(2): 167-179, 2007.

Batrakova, E. V.; Kabanov, A. V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release*, 130(2):98-106, 2008.

Boogaerts, J. G.; Lafont, N. D.; Declercq, A. G.; Luo, H. C.; Gravet, E. T.; Bianchi, J. A.; Legros, F. J. Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. *J Clin Anesth.*, 6(4):315-20, 1994.

Boogaerts, J. G.; Lafont, N. D.; Luo, H.; Legros, F. J. Plasma concentration of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome associated and pain solutions to rabbits. *Can J. Anesth*, 40:1201-1204, 1993 b.

Boogaerts, J.; Declercq, A.; Lafont, N.; Benameur, H.; Akodad, E. M.; Dupont, J. C.; Legros, F. J. Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison of plain solutions. *Anesth Analg*, 76: 553-555, 1993a.

Bourne, D. W. A. Mathematical modeling of pharmacokinetic data. Technomic Publishing Inc, Lancaster, PA, USA, 1995.

Braga, A. F. A.; Carvalho, V. H.; Braga, F. S. S.; Rodrigues-Simioni, L.; Loyola, Y. C. S.; Potério, G. B. Influência de anestésicos locais sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio. Ação da lidocaína e da mistura enantiomérica em excesso de 50% de bupivacaína na junção neuromuscular. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 59 (6): 0034-7094, 2009 .

Brewster, M. E.; Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev.*, 59(7): 645-666, 2007.

Bucalo, B. D.; Mirikitani, E. J.; Moy, R. L. Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine and EMLA using 30-minute application time. *Dermatol Surg*, 24: 537-541, 1998.

Cáceres, M. T. F.; Ludovice, A. C. P. P.; Brito, F. S.; Darrieux, F. C.; Neves, R. S.; Scanavacca, M. I.; Sosa, E. A.; Hachul, D. T. Efeito de anestésicos locais com e sem vasoconstritor em pacientes com arritmias ventriculares. *Arq Bras Cardiol.*, 91(3): 142-147, 2008

Cappiello, A.; Famiglioni, G.; Palma, P.; Siviero, A. Liquid chromatography-electron ionization mass spectrometry: fields of application and evaluation of the performance of a Direct-EI interface. *Mass Spectrom Rev.*, 24(6):978-89, 2005.

Carpenter, K. J.; Dickenson, A. H. Molecular aspects of pain research. *The Pharmacogenomics*, J. 2: 87-95, 2002.

Cereda, C. M. S., Araújo, D. R.; Brunetto, G. B. & de Paula, E. "Liposomal prilocaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation" *J. Pharm. Pharmac. Sci.*, 7:235-257, 2004.

Cereda, C. M. S.; Araújo, D. R.; Brunetto, G. B.; de Paula, E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesis duration. *Can. J. Anesthesiol.*, 53 (11):1092-1097, 2006.

Cereda, C. M. S.; Tofoli, G. R.; Brito, R. B. Jr.; de Jesus, M. B.; Fraceto, L. F.; Araújo, D. R.; de Paula, E. Stability and local toxicity evaluation of a liposomal prilocaine formulation. *Journal of Liposome Research*, 18:329–339, 2008.

- Cereda, C. M. S.; Tofoli, G. R.; Maturana, L. G.; Oliveira, A. R. L.; Araujo, D. R.; Arana, S.; de Paula, E. Local neurotoxicity evaluation of ropivacaine-hydroxypopyl-beta-cyclodextrin inclusion complex in rat sciatic nerve. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 2008.
- Chen, P. C.; Kohane, D. S.; Park, Y. J.; Bartlett, R. H.; Langer, R.; Yang, V. C. Injectable microparticle-gel system for prolonged and localized lidocaine release. II. In vivo anesthetic effects. *J Biomed Mater Res A.*, 70(3):459-66, 2004.
- Cobb, Z.; Andersson, L. I. Determination of ropivacaine in human plasma using highly selective molecular imprint-based solid phase extraction and fast LC-MS analysis. *Anal Bioanal Chem.*, 383(4):645-50, 2005.
- Covino, B. G. Pharmacology of local anaesthetic agents. *Br. J. Anaesth*, 58: 701-716, 1986.
- Davis, M. E.; Brewster, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews*, 3: 1023-1035, 2004.
- De Paula, E.; Cereda, C. M. S.; Tofoli, G. R.; Franz-Montan, M.; Fraceto, L. F.; Araujo, D. R. Drug Delivery Systems for Local Anesthetics. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation.*, 4 (1): 23-34, 2010.
- Derakhshandeh, K.; Fashi, M.; Seifoleslami, S. Thermosensitive Pluronic hydrogel: prolonged injectable formulation for drug abuse. *Drug Desing, Development and Therapy*, 4: 255-262, 2010.
- Dollo, G.; Le Corre, P.; Chevanne, F.; Le Verge, R. Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. I. Physicochemical characterization. *Int. J. Pharm*, 131: 219-228, 1996 a.
- Dollo, G.; Le Corre, P.; Chevanne, F.; Le Verge, R. Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. II. Evaluation of affinity constants and in vitro transfer rate constants. *Int. J. Pharm*, 136: 65-174, 1996 b.
- Dollo, G.; Thompson, D. O.; Le Corre, P.; Chevanne, F.; Le Verge, R.. Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- β -CD complex

following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. *Int. J. Pharm.*, 164, 11-19, 1998.

Dony, P.; Dewinde, V.; Vanderick, B.; Cuignet, O.; Gautier, P.; Legrand, E.; Lavand'homme, P.; De Kock, M. The comparative toxicity of ropivacaine and bupivacaine at equipotent doses in rats. *Anesth. Analg.*, 91: 1489-1492, 2000.

Eichenfield, L. F.; Funk, A.; Fallon-Friedlander, S.; Cunningham, B. B. A clinical study to evaluate the efficacy of ELA-Max (4% liposomal lidocaine) as compared with eutectic mixture of local anesthetics cream for pain reduction of venipuncture in children. *Pediatrics.*, 109(6):1093-9, 2002.

Emanuelsson, B. M.; Person, J.; Sadin, S.; Alm, C.; Gustafsson, L. L. Intraindividual and interindividual variability in the disposition of the local anesthetic ropivacaine in healthy subjects. *Ther. Drug Monit.*, 19: 126-131, 1997.

Felnerova, D.; Viret, J. F.; Glück, R.; Moser, C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol.*, 15:518-29, 2004.

Fernandes, V. C.; Denadai, A. M. L.; Millán, R. D. S.; Alves, R. J.; Cunha Júnior, A. S. Caracterização físico-química de complexos de insulina:dimetil- β -ciclodextrina e insulina:hidroxipropil- β -ciclodextrina e avaliação da influência do tipo de complexo na produção de microesferas biodegradáveis. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 43(4):543-553, 2007.

Fisher, R.; Hung, O.; Mezei, M.; Stewart, R. Topical anaesthesia of intact skin: liposome-encapsulated tetracaine vs EMLA. *Br J Anaesth.*, 81(6): 972-3, 1998.

Foldvari, M. In vitro cutaneous and percutaneous delivery and in vivo efficacy of tetracaine from liposomal and conventional vehicles. *Pharm Res.*, 11(11):1593-98, 1994.

Fonseca, N. M.; Goldenberg, S.; Gomes, P. O.; de Paula, E.; Lima, C. A. Anestesia em coelhos. *Acta Cir Bras.*, 11 (2): 82-104, 1996.

Fraceto, L. F.; Pinto, L. M. A.; Franzoni, L.; Braga, A. A.; Spisni, A.; Schreier, S.; de Paula, E. Spectroscopic evidences for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys Chem.*, 6:229-43, 2002.

Franz-Montan, M.; Bergamaschi, C. C.; de Paula, E.; Groppo, F.C.; Ranali, J.; Fraceto, L. F.; Volpato, M. C. Pharmacokinetic Profile of Liposome-Encapsulated Ropivacaine after Maxillary Infiltration Anaesthesia. *J. Braz Chem. Soc.* 10:1945-195, 2010.

Franz-Montan, M.; de Paula, E.; Groppo, F. C.; Ranali, J.; Volpato, M. C. Efficacy of liposome-encapsulated 0.5% ropivacaine in maxillary dental anaesthesia. *Br J Oral.*, 2011. (in press)

Franz-Montan, M.; Silva, A. L.; Cogo, K.; Bergamaschi, C.; Volpato, M. C.; Ranali, J.; de Paula, E.; Groppo, F. C. Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. *Anesth Analg.*, 104(6):1528-31, 2007.

Frezard, F.; Schettini, D. A.; Rocha, O. G. F.; Demichelli, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quím. Nova*, 28(3): 511-518, 2005.

Friedman, P. M. Comparative study of the efficacy of four topical anesthetics. *Dermatol Surg.*, 25(12): 950-4, 1999.

Frömring, K-H. & Szejtli J. *Topics in Inclusion Science - Cyclodextrins in Pharmacy*, Hungria: Kluwer Academic Publishers 1994.

Gesztes, A.; Mezei, M. Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated teracaine. *Anesth Analg*, 67:1079-1081, 1988.

Gillette, M. A.; Mani, D. R.; Carr, S. A. Place of pattern in proteomic biomarker discovery. *J Proteome Res.*, 4(4): 1143-54, 2005.

Graf, B. M. The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine. *Curr Top Med Chem.*, 1(3):207-14, 2001.

Graf, B. M.; Abraham, I.; Eberbach, N.; Kunst, G.; Stowe, D. F.; Martin, E. Differences in Cardiotoxicity of Bupivacaine and Ropivacaine are the result Physicochemical and Stereoselective Properties. *Anesthesiology.*, 96(6):1427-1434, 2002.

- Grant, G. J.; Bansinath, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med.*, 26: 61-63, 2001.
- Grant, G. J.; Barenholz, Y.; Bolotin, E. M.; Bansinath, M.; Turndorf, H.; Piskoun, B.; Davidson, E. M. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiology.*, 101(1):133-7, 2004.
- Grant, G. J.; Piskoun, B.; Bansinath, M. Analgesic duration and kinetics of liposomal bupivacaine after subcutaneous injection in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 30(12):966-8, 2003.
- Grant, G. J.; Vermeulen, K.; Langerman, L.; Zakowski, M.; Turndorf, H. Prolonged analgesia with liposomal bupivacaine in a mouse model. *Reg Anesth.*, 19(4):264-9, 1994
- Gregoriadis, G.; Florence, A. T. Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs.*, 45:15-28, 1993.
- Grillo, R.; Melo N. F. S.; Fraceto, L. F.; Brito, C. L.; Gustavo H. G. Trossini, G. H. G; Menezes, C. M. S.; Ferreira, E. I.; Carolina Moraes Moraes, C. M. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil- β -ciclodextrina. *Quim. Nova*, 31(2): 290-295, 2008.
- Grillo, R.; Melo, N. F. S.; Araujo, D. R.; de Paula, E.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. *Journal of Drug Targeting*, 18(9): 688-99, 2010.
- Groban, L. Central nervous system and cardiac effects from long-acting amide local anesthetic toxicity in the intact animal model. *Reg Anesth Pain Med.*, 28(1):3-11, 2003.
- Hortin, G. L. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem.*, 52(7):1223-37, 2006.
- Hou, S. M.; Yu, H. Y. Comparison of systemic absorption of aqueous and liposomal lidocaine following intra-articular injection in rabbits. *J Formos Med Assoc.*, 96(2):141-3, 1997.
- Hung, O. Drug transformation: Advances in drug delivery systems. *Can J Anaesth.*, 53(11):1074-7, 2006.

- Irie, T.; Uekama, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.*, 86: 147-162, 1997.
- Kaur, I. P.; Chhabra, S.; Aggarwal, D. Role of Cyclodextrins in Ophthalmics. *Current Drug Delivery*, 1: 351-360, 2004.
- Kelly, C.; Jefferies, C.; Cryan, S. Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages. *J Drug Deliv.*, 727241, 2011.
- Kerns, E. H.; Di, L. Utility of mass spectrometry for pharmaceutical profiling applications. *Curr Drug Metab.*, 7(5):457-66, 2006.
- Klampfl, C. W. Recent advances in the application of capillary electrophoresis with mass spectrometric detection. *Electrophoresis.*, 27(1):3-34, 2006.
- Knudsen, J.; Suurküla, M. B.; Bolmberg, S.; Sjövall, J.; Edvardsson, N. Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. *Br. J. Anaesth.*, 78: 507-514, 1997.
- Koehler, A.; Oertel, R.; Kirch, W. Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacaine, prilocaine and ropivacaine in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 1088(1-2):126-30, 2005.
- Korfmacher, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today.*, 10(20):1357-67, 2005.
- Krenzischek, D. A.; Dunwoody, C. J.; Polomano, R. C.; Rathmell, J. P. Pharmacotherapy for acute pain: implications for practice. *J. Perianesth Nurs.*, 23:28-42, 2008.
- Kshirsagar, N. A.; Pandya, S. K.; Kirodian, B. G.; Sanath, S. Liposomal drug delivery system from laboratory to clinic. *J Postgrad Med*, 51:5-15, 2005.
- Kuthiala, G.; Chaudhary, G. Ropivacaine: A review of its pharmacology and clinical use. *Indian J Anaesth*, 55(2): 104-110, 2011.

Kuzma, P. J.; Kline, M. D.; Calkins, M. D.; Staats, P. S. Progress in the development of ultra- long-acting local anesthetics. *Reg Anesth.*, 22: 543-551, 1997.

Lafont, N. D.; Legros, M. D. Use of liposome associated bupivacaine for the management of a chronic pain syndrome. *Anesth Analg*, 79: 818 ,1994.

Lafont, N. D.; Legros, M. D. Use of liposome associated bupivacaine in a cancer pain syndrome. *Anaesthesia*, 51: 578-579, 1996.

Langerman, L.; Grant, G. J.; Zakowski, M.; Golomb, E.; Ramanathan, S.; Turndorf, H. Prolongation of epidural anesthesia using a lipid carrier with procaine, lidocaine and tetracaine. *Anesth Analg*, 75: 900-905, 1992.

Lemmer, B. and Wiemers, R. Circadian changes in stimulus threshold and in the effect of a local anaesthetic drug in human teeth: studies with an electronic pulp tester. *Chronobiol Int.*, 6(2):157-62, 1989.

Leone, S.; Di Cianni, S.; Casati, A.; Fanelli, G. Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. *Acta Biomed.*, 79:92-105, 2008.

Leszczynska, K.; Kau, S. T. A sciatic blockade method to differentiate drug-induced local anesthesia from neuromuscular blockade in mice. *J. Pharmacol. Meth.*, 27: 85-93, 1992.

Loftsson, T.; Duchêne, D.; Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm*, 329:1-11, 2007.

Loftsson, T.; Masson, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.*, 225: 15-30, 2001.

Malinovsky, J. M.; Benhamou, D.; Alafandy, M.; Mussini, J. M.; Coussaert, C.; Couarraze, G.; Pinaud, M.; Legros, F. J. Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. *Anesth Analg*, 85:1331-1336, 1997.

Malinovsky, J. M.; Charles, F.; Kick, O.; Lepage, J-Y.; Malinge, M.; Cozian, A.; Bouchot, O.; Pinaud, M. Intrathecal anesthesia: ropivacaine versus bupivacaine. *Anesth. Analg*, 91: 1457-1460, 2000.

Mallipeddi, R.; Rohan, L. C.; Progress in antiretroviral drug delivery using nanotechnology. *Int J Nanomedicine*, 5: 533-547, 2010.

Martins, C. A. S.; Aragão, P. W.; Freire, S. M. F.; Martins, M. M. R. S.; Borges, M. O. R.; Borges, A. C. R. Efeito da ropivacaína na recaptação neuronal de noradrenalina em músculo liso. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 55: 5: 532-537, 2005.

Mashimo, T.; Uchida, I.; Pak, M.; Shibata, A.; Nishimura, S.; Inagaki, Y.; Yoshiya, I. Prolongation of canine epidural anesthesia by liposome encapsulation of lidocaine. *Anesth Analg*, 74:827-34, 1992.

Mathieu, O.; Hillaire-Buys, D.; Dadure, C.; Barnay, F.; Mathieu-Daudé, J. C.; Bressolle, F. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of free and total concentrations of ropivacaine in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 831(1-2):91-8, 2006.

Melo, M. S.; Silva, W. A.; Moraes, A. C.; Udelsmann, A. Comparação das alterações hemodinâmicas na intoxicação aguda com bupivacaína e ropivacaína por via venosa em suínos. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 59 (5), 2009.

Melo, N. F. S.; Grillo, R.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína. *Quím. Nova*, 33(1): 65-69, 2010.

Mercado, P.; Weinberg, G.L. Local anesthetic systemic toxicity: prevention and treatment. *Anesthesiol Clin*, 29:233-42, 2011.

Mio, Y.; Fukuda, N.; Kusakari, Y.; Amaki, Y.; Tanifuji, Y.; Kurihara, S. Comparative effects of bupivacaine and ropivacaine on intracellular calcium transients and tension in ferret ventricular muscle. *Anesthesiology*, 101(4): 888-894, 2004.

Mitchell, S. J.; Huizer-Pajkos, A.; Cogger, V. C.; McLachlan, A. J.; Le Couteur, D. G.; Hilmer, S. N. Poloxamer 407 increases the recovery of paracetamol in the isolated perfused rat liver. *J. Pharm. Sci.*; 100(1): 334-340, 2011.

Mowat, J. J.; Mok, M. J.; MacLeod, B. A.; Madden, T. D. Liposomal bupivacaine. Extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient. *Anesthesiol*, 85: 635-643, 1996.

Mufamadi, M. S.; Pillay, V.; Choonara, Y. E. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *J Drug Deliv.*, 2011:939851, 2011.

Nestor, M. S. Safety of occluded 4% liposomal lidocaine cream. *J Drugs Dermatol*, 5(7):618-20, 2006.

Obstein, K. L.; Martins, F. M.; Fernández-Esparrach, G.; Thompson, C. C. Endoscopic ultrasound-guided celiac plexus neurolysis using a reverse phase polymer. *World J Gastroenterol.*, 16(6): 728–731, 2010.

Oliveira, R. M.; Tanaka, P.P.; Tenorio, S. B. Avaliação do uso de microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% após bloqueio do nervo ciático de ratos. *Rev Bras Anestesiol*, 61(6): 736-747, 2011.

Papini, J. Z. B.; Queiroz, V. A.; Cereda, C. M. S.; De Paula, E.; Akkari, A. C. S.; Araujo, D. R.; Tofoli, G. R. Evaluation of anesthetic activity of inclusion complex ropivacaine-2-hydroxypropyl β -cyclodextrin in thermoreversible poloxamer based-gels. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011, Rio de Janeiro.

Patel, A. R.; Vavia, P. R. Preparation and evaluation of taste masked famotidine formulation using drug/beta-cyclodextrin/polymer ternary complexation approach. *AAPS PharmSciTech.*; 9(2):544-50, 2008.

Pollman, L. Circadian rhythm differences in the duration of the effect of a local anesthetic. *Dtsch Zahnarztl Z.*, 37(4):388-90, 1982.

Pusch, W.; Kostrzewa, M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in screening and diagnostic research. *Curr Pharm Des*, 11(20):2577-91, 2005.

Ragsdale, D. S.; Avoli, M. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Res. Rev*, 26: 16-28, 1998.

- Ragsdale, D. S.; McPhee, J. C.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci*, 93: 9270-9275, 1996.
- Rajewski, R. A.; Stella, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo Drug delivery. *J. Pharm. Sci*, 85: 1142-1169, 1996.
- Ramana, L. N.; Sethuraman, S.; Ranga, U.; Krishnan, U. M. Development of a liposomal nanodelivery system for nevirapine. *J Biomed Sci.*, 17:57, 2010.
- Ranade, V. V. Drug delivery systems. Role of polymers in drug delivery, 2nd. ed. New York: CRC Press; 2004. p, 2-52.
- Ranade, V. V. Drug delivery systems.1. Site specific drug delivery using liposomes as carriers. *J Clin Pharmacol*, 29: 685-694, 1989.
- Ranasinghe, J. S.; Birnbach, D. Progress in analgesia for labor: focus on neuraxial blocks. *Int J Womens Health*, 1: 31-43, 2010.
- Ratajczak-Enselme, M.; Estebe, J. P.; Dollo, G.; Chevanne, F.; Bec, D.; Malinovsky, J. M.; Ecoffey, C.; Le Corre, P. Epidural, intrathecal and plasma pharmacokinetic study of epidural ropivacaine in PLGA-microspheres in sheep model. *Eur J Pharm Biopharm*, 72(1):54-61, 2009.
- Reif, S.; Le Corre, P.; Dollo, G.; Chevanne, F.; Le Verge, R. High-performance liquid chromatographic determination of ropivacaine, 3-hydroxy-ropivacaine, 4-hydroxy-ropivacaine and 2',6'-pipecoloxylidide in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci*, 20; 719: 239-44, 1998.
- Reis Jr, A. Anestesia regional intravenosa primeiro centenário (1908-2008): Início, desenvolvimento e estado atual. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 58 (3): 299-322, 2008.
- Ricci Junior, E.; Bentley, M. V. L. B.; Marchetti, J. M. HPLC assay of lidocaine in in vitro dissolution test of the Poloxamer 407 gels. *Rev Bras Cienc Farm*, 38(1),2002.
- Rose, J. S.; Neal, J. M.; Kopacz, D. J. Extended-duration analgesia: update on microspheres and liposomes. *Reg Anesth Pain Med*, 30(3):275-85, 2005.

Rossi-Bergmann, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. Artigos e Ensaio, 2008.

Ruetsch, Y. A.; Boni, T.; Borgeat, A. From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetics drugs. *Curr. Top. Med. Chem*, 3: 175-182, 2001.

Samad, A.; Sultana, Y.; Aqil, M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv.*, 4: 297-305, 2007.

Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B.. Lipossomas: a bala mágica acertou?. *Quím. Nova*, 25(6): 1181-1185, 2002.

Sarpietro, M. G.; Castelli, F. Transfer kinetics from colloidal drug carriers and liposomes to biomembrane models: DSC studies. *J. Pharm. Bioallied Sci*, 3(1): 77-78, 2011.

Schmolka, I. Artificial skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J. Biomed. Mater. Res.*, 6: 571-582, 1972.

Sharata, H. H.; Katz, K. H. Liposomes. *Int J Dermatol*, 35: 761-769, 1996.

Shen Y, Ji Y, Xu S, Chen da Q, Tu J. Multivesicular liposome formulations for the sustained delivery of ropivacaine hydrochloride: preparation, characterization, and pharmacokinetics. *Drug Deliv.*, 18(5):361-6 2011.

Singh, R.; Vyas, S. P. Topical liposomal system for localized and controlled drug delivery. *J Dermatol Sci*, 13(2):107-11, 1996.

Stella, V. J.; He, Q. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol*, 36:30-42, 2008.

Stevens, C.W. Alternatives to the use of mammals for pain research. *Life Sci*, 50: 901-912, 1992.

Strichartz, G. R.; Ritchie, J. M. Local Anesthetics. In: Strichartz, G. R. (Ed.). *Handbook of Experim Pharmacol* Springer-Verlag, Berlin, 1987.

Sudo-Havashi, L. S.; Bersani-Amado, C. A. Analgésicos e antipiréticos. In: Oga, S., Tedesco, J. *Farmacologia Aplicada*, 2001.

Taddio, A.; Soin, H. K.; Schuh, S.; Koren, G.; Scolnik, D. Liposomal lidocaine to improve procedural success rates and reduce procedural pain among children: a randomized controlled trial. *CMAJ*, 172(13):1691-5, 2005.

Tofoli, G. R.; Cereda, C. M.; de Araujo, D. R.; de Paula, E.; Brito, R. B. Jr.; Pedrazzoli, J. Jr.; Meurer, E.; Barros, F. A.; Groppo, F. C.; Volpato, M. C.; Ranali, J. Pharmacokinetic and local toxicity studies of liposome-encapsulated and plain mepivacaine solutions in rats. *Drug Deliv*, 17(2): 68-76, 2010

Tofoli, G. R.; Cereda, C. M.; Groppo, F. C.; Volpato, M. C.; Franz-Montan, M.; Ranali, J.; de Araújo, D. R.; de Paula, E. Efficacy of liposome-encapsulated mepivacaine for infiltrative anesthesia in volunteers. *J Liposome Res.*, 21(1):88-94, 2011.

Torchilin, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev. Drug-Discovery*, 4: 145-160, 2005.

Ullman, M. D.; Bowers, L. D.; Burtis, C. A. Cromatografia. In: Burtis CA, Ashwood ER Tietz Fundamentos de química clínica. 4 ed. Rio de Janeiro-RJ; Editora Guanabara Koogan, 1998. cap.8, p.103-120.

Villanova, J. C. O.; Orefice, R. L.; Cunha, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Ciência e Tecnologia*, 20(1): 51-64, 2010.

Wang, R. D.; Dangler, L. A.; Greengrass, R. A. Update on ropivacaine. *Expert Opin. Pharmacother.* 2: 2051-2063, 2001.

Weiniger, C. F.; Golovanevski, M.; Sokolsky-Papkov, M.; Domb, A. *Expert Opin. Drug Deliv*, 7(6):737-752, 2010.

Welliver, M.; McDonough, J. P.; Anesthetic Related Advances with Cyclodextrins. *The Scientific World*, 7: 364-371, 2007.

Whiteside, J. B.; Wildsmith, J. A. Developments in local anesthesia drugs. *Br. J. Anaesth*, 87: 27-35, 2001.

Xuan, J.; Balakrishnan, P.; Oh, D. H.; Yeo, W. H.; Park, S. M.; Yong, C. S.; Choi, H. Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam. *Int. J. Pharm*, 395: 317-323, 2010.

Yu, H. Y.; Li, S. D.; Sun, P. Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. *J Pharm Pharmacol*, 54(9):1221-1227, 2002.

Zuo, M.; Duan, G. L.; Ge, Z. G. Simultaneous determination of ropivacaine and antipyrine by high performance liquid chromatography and its application to the in vitro transplacental study. *Biomed Chromatogr*, 18(9):752-5, 2004.

8. ANEXOS: Anexo 1

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



UNIVERSIDADE
SÃO FRANCISCO

Bragança Paulista, 19 de Agosto de 2010.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Farmacocinética de formulações anestésicas locais em sistemas nanocarreadores de liberação sustentada.

Curso: Ciências da Saúde

Autor(es): Prof(a). Dr (a). Giovana Radomille Tofoli; Prof. Silvana Ap. Calafati Carandina; Daniel Sebbe Mecatti

