

Daniel Sebbe Mecatti

**AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DE
NANOPARTÍCULAS DE ALGINATO CONTENDO
LEVOBUPIVACAÍNA**

Bragança Paulista

2012

Daniel Sebbe Mecatti

**AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DE
NANOPARTÍCULAS DE ALGINATO CONTENDO
LEVOBUPIVACAÍNA**

Orientador: Profa. Dra. Silvana A. Calafatti

Coorientador: Profa. Dra. Giovana Tofoli

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade São Francisco, Campus de Bragança Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Bragança Paulista

2012

QV 40
M432a

Mecatti, Daniel Sebbe.

Avaliação da farmacocinética de nanopartículas de alginato contendo levobupivacaína / Daniel Sebbe

Mecatti. -- Bragança Paulista, 2012.

58 p.

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

Orientação de: Silvana Aparecida Calafatti.

1. Nanopartículas. 2. Levobupivacaína. 3. Alginatos.
4. Farmacocinética. I. Calafatti, Silvana Aparecia.
II. Título.



Diretoria Acadêmica de Pós Graduação
Programa de Pós-Graduação Stricto-Sensu
Mestrado em Ciências da Saúde

Credenciado pela CAPES
Portaria Ministerial nº 2.000
DOU 21/12/06 –Seção I – p.35-36

Ata de Arguição Final do Dissertação do Aluno

Daniel Sebbe Mecatti

Aos trinta e um dias do mês de Julho do ano de dois mil e doze, às nove horas, nas dependências da Universidade São Francisco, reuniu-se a Comissão da Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, para avaliação da dissertação intitulada "Avaliação da Farmacocinética de nanopartículas de Alginato contendo Levobupivacaína", apresentado pelo aluno, *Daniel Sebbe Mecatti* graduado em Medicina, pela Universidade do Vale do Sapucaí, que concluiu os créditos exigidos para a obtenção do Grau de "Mestre em Ciências da Saúde" segundo os registros constantes na Secretaria de Campus de Bragança Paulista. Os trabalhos foram instalados às nove horas, pela Professora Dra. Silvana Aparecida Calafatti, orientadora do Candidato e Presidente da Banca Examinadora, constituída pelos seguintes Professores: Professora Michelle Franz Montan Braga Leite, Doutora em Odontologia pela Universidade Estadual de Campinas; Professor Mario Angelo Claudino, Doutor em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas. A Banca Examinadora tendo decidido aceitar a dissertação, passou à Arguição Pública da candidata. Encerrados os trabalhos às 11:40 horas, os examinadores, consideraram o candidato APROVADO estando apto a receber o título de "Mestre em Ciências da Saúde". E, para constar, eu Professora Doutora Silvana Aparecida Calafatti lavrei a presente Ata, que assino juntamente com os demais membros da Banca Examinadora.

Bragança Paulista, 31 de Julho de 2012.

Profª Dra. Silvana Aparecida Calafatti
Universidade São Francisco

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

Prof. Dr. Mario Angelo Claudino
Universidade Estadual de Campinas

Obs.:

Campus Bragança Paulista
Campus Campinas - Unidade Cambuí
Campus Campinas - Unidade Swift
Campus Itatiba

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015

Dedicatória

Dedico esta dissertação ao meu falecido avô Dr. Benedicto Sebbe que foi quem me inspirou a estudar medicina, e realizar o sonho de ajudar pessoas de alguma forma, infelizmente faleceu pouco tempo após minha formatura, e hoje espero que com este trabalho possa estar dando início a mais uma evolução na anestesia ajudando a melhorar a qualidade dos fármacos que promovem o alívio da dor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o apoio de toda minha família nos momentos de dificuldade pelos quais passei durante o período de estudos, principalmente a minha esposa Giovana que com muita paciência soube me convencer a não desistir do meu sonho me levando até este momento, aos meus filhos Carolina e Vincenzo que apesar de pequenos serviram de inspiração e me deram forças para continuar, a minha colega de mestrado Sra. Juliana Papini que muito me auxiliou com os experimentos.

A FAPESP, que disponibilizou suporte financeiro para este trabalho (Proc. N 06/00121-9).

Ao Prof. Dra. Silvana Calafatti, pela orientação profissional e pessoal, pelos ensinamentos a mim dedicados durante a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Giovana Tofoli, obrigado pelas grandes oportunidades e por me receber em seu laboratório com atenção e dedicação.

À Universidade São Francisco (USF), por meio do reitor Hector Edmundo Huanay Escobar.

Ao Dr. Leonardo Fraceto da UNESP/Sorocaba pelo preparo e doação das amostras da formulação de Levobupivacaína encapsuladas em nanopartículas.

RESUMO

O presente estudo avaliou *in vivo*, as concentrações plasmáticas e o perfil farmacocinético das formulações de levobupivacína (LBVC_{0,5%}) livre, associada à epinefrina (LBVC_{0,5%EPI}) e encapsulada em nanopartículas poliméricas (LBVC_{NANO}), administradas por via intratecal em coelhos. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=6) e receberam 0,2 ml das seguintes formulações: LBVC_{0,5%}, LBVC_{NANO}, LBVC_{0,5%EPI}. As concentrações plasmáticas foram avaliadas nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 minutos após a injeção e os parâmetros farmacocinéticos foram calculados a partir dos dados obtidos com o software WinNonlin (version 5.3). A concentração plasmática medida após a injeção intratecal de LBVC_{0,5%} em coelhos foi maior que a obtida com a formulação de LBVC_{NANO} em todos os períodos analisados (p<0,05), com exceção dos tempos 300, 360 e 420 minutos. Com relação a comparação entre LBVC_{0,5%EPI} e LBVC_{NANO} as concentrações com a primeira foram maiores com significância (p<0,05) nos tempos 30, 45 e 60 min. As formulações LBVC_{0,5%EPI} e LBVC_{0,5%} não apresentaram diferenças significativas em relação à concentração plasmática (p>0,05). Em relação aos parâmetros farmacocinéticos avaliados, a concentração máxima (C_{máx}) obtida após a injeção intratecal com a formulação LBVC_{0,5%} foi maior do que a LBVC_{NANO} (p<0,05), enquanto, a LBVC_{0,5%EPI} manteve valores intermediários em relação às outras apresentações (p>0,05). Outro parâmetro avaliado foi a área sob a curva de 0 a 420 min (ASC₀₋₄₂₀), onde LBVC_{0,5%} apresentou maior valor que o obtido com LBVC_{NANO} (p<0,05), novamente LBVC_{0,5%EPI} apresentou valores intermediários (p>0,05). Em relação ao Volume de distribuição (Vd) o inverso ocorreu onde LBVC_{NANO} obteve valor maior que o obtido com LBVC_{0,5%} (p<0,05). Os outros parâmetros farmacocinéticos avaliados foram, tempo para obter a concentração máxima (T_{máx}), tempo de meia vida de eliminação (T_{1/2}), clearance (CL), tempo médio de permanência (MRT) e área sob a curva de 0 ao ∞ (ASC_{0-∞}) e não houve diferença significativa nos valores para as três formulações (p>0,05). Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que a encapsulação de LBVC em nanopartículas poliméricas promoveu menores concentrações plasmáticas, portanto, a encapsulação promove a liberação constante e prolongada do anestésico local estudado tornando seu uso promissor na prática médica, pois, provavelmente não haveria necessidade de múltiplas aplicações, além das baixas concentrações evitarem efeitos colaterais.

ABSTRACT

The present study evaluated, *in vivo*, plasma concentrations and pharmacokinetic profile of formulations of levobupivacaine (LBVC_{0,5%}) free, associated with epinefrine (LBVC_{0,5%epi}) and encapsulated with polymeric nanoparticles (LBVC_{NANO}), administered by intrathecal in rabbits. The animals were divided randomly in the LBVC_{0,5%epi}. Plasma concentrations were evaluated in times 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 and 420 minutes after injections; and the pharmacokinetic parameters were calculated from data obtained with software WinNolin (version 5.3). The plasma concentration measured after intrathecal injection of LBVC_{0,5%} in rabbits was bigger than that obtained with the formulation of LBVC_{NANO} in all analysed periods ($p < 0,05$), with the exception of time 300, 360 and 420 minutes. Regarding the comparison between LBVC_{0,5%epi} and LBVC_{NANO} with the first concentrations were higher with significance ($p < 0,05$) in 30, 45 and 60 minutes. The LBVC_{0,5%epi} and LBVC_{0,5%} formulations didn't show significant differences in relation to plasma concentration ($p > 0,05$). In relation to the pharmacokinetic parameters evaluated, the maximum concentration (C_{max}), obtained before intrathecal injection, the formulation LBVC_{0,5%} presents higher value than LBVC_{NANO} ($p < 0,05$) while LBVC_{0,5%epi} kept intermediate values in relation to the other formulations ($p > 0,05$). Another parameter evaluated was area under the curve from 0 to 420 (ASC₀₋₄₂₀) where LBVC_{0,5%} presents higher value than the obtained with LBVC_{NANO} ($p < 0,05$), again LBVC_{0,5%epi} presented intermediate values ($p > 0,05$). In relation to the volume of distribution (V_d) the inverse occurred where LBVC_{NANO} obtained values bigger than those obtained with LBVC_{0,5%} ($p < 0,05$). The other pharmacokinetic parameters evaluated were time to obtain maximum concentration (T_{max}), half time life of elimination ($t_{1/2}$), clearance (CL), average time of permanence (MRT) and area under the curve 0 to ∞ (ASC_{0- ∞) and there wasn't significant difference in values to the three formulations ($p > 0,05$). Before the results obtained we can conclude that encapsulation of LBVC in polymeric nanoparticle promoted smaller plasma concentration so the encapsulation promoted constant and prolonged release of the studied local anesthetic making its use promising in medical practice, therefore would probably not be necessary to use multiple applications apart from low concentrations to avoid side effects.}

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Canais de sódio em seus estados repouso, ativado e inativado	03
Figura 2. Canal de sódio em estado fechado após ligação do AL no receptor.	04
Figura 3. Condução do estímulo nervoso.	05
Figura 4. Estrutura química dos AL.	06
Figura 5. Anatomia óssea da coluna vertebral.	11
Figura 6. Elementos da conexão intervertebral.	12
Figura 7. Meninges e espaços raquidianos.	13
Figura 8. Gotejamento de LCR após punção intratecal, <i>adaptado de SAESP Tratado de Anestesiologia.(2006)</i>	14
Figura 9. Circulação do LCR.	15
Figura 10. Estrutura do alginato com seus monômeros ácido β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), com as possíveis ligações glicosídeas $\alpha(1-4)$ e $\beta(1-4)$.	20
Figura 11. Representação estrutural do polímero de quitosana.	21
Figura 12.(A) Espectro de massas na função EM e (B) Espectro de EM/EM para Bupivacaína.	32
Figura 13. (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 hemolisado).	35
Figura 14. Concentração plasmática média (\pm erro padrão) <i>versus</i> tempo após a injeção intratecal das três formulações de levobupivacaína, em coelhos.	40

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Tipos de fibras nervosas	05
Tabela 2. Curva de Calibração (Linearidade)	36
Tabela 3. Análise inter-lotes e intra lotes dos controles de qualidade CA, CM e CB	37
Tabela 4. Resultados das análises intra-lote do controle de qualidade LQ	38
Tabela 5. Resultados inter-lotes do controle de qualidade LQ	38
Tabela 6. Concentração (média \pm desvio padrão) de LBVC (ng/mL) medida no plasma de coelhos após a injeção intratecal das diferentes formulações (BCV, LBVC _{EPI} , LBVC _{NANO}).	39
Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos [média \pm desvio padrão] após a injeção intratecal das diferentes formulações (LBVC _{0,5%} , LBVC _{0,5%EPI} , LBVC _{NANO}) em coelhos.	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS:

AL	Anestésico local
ASC 0-480	Área sob a curva de 0 á 480 minutos
ASC 0-∞	Área sob a curva de 0 ao infinito
BVC	Bupivacaína
Cl	Clarence
C _{max}	Concentração máxima
CSVD	Canal de Sódio voltagem dependente
CA	Controle de qualidade alta
CB	Controle de qualidade baixa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM	Controle de qualidade média
EM	Espectrometria de Massas
ICH	International Conference on Harmonization
LBVC	Levobupivacaína
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LQ	Limite de quantificação
MRT	Tempo médio de Permanência
Nano	Nanopartículas poliméricas
PI	Padrão Interno
RVC	Ropivacaína
T _{1/2β}	Tempo de meia vida
T _{max}	Tempo máximo para obtenção da concentração máxima
V _d	Volume de distribuição

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	01
1.1. Anestésicos Locais	03
1.2. Bupivacaína e Levobupivacaína	08
1.3. Anestesia intratecal	10
1.3.1 Anatomia da coluna vertebral	11
1.3.2 Fisiologia do LCR	14
1.3.3 Farmacologia da anestesia intratecal	15
1.4. Formulações anestésicas com sistemas de liberação sustentada: sistemas nanoestruturados poliméricos	18
2. Objetivos	23
3. Materiais e Método	24
3.1. Material	24
3.2. Formulações de bupivacaína	24
3.3. Modelo animal	25
3.4 Preparo e análise das amostras	26
3.5. Validação da metodologia analítica	27
3.6. Parâmetros Farmacocinéticos	28
3.7. Análise Estatística	31
4. Resultados	32
4.1 Validação da Metodologia	32
4.2. Concentração Plasmática de bupivacaína em coelhos após a injeção intratecal	38
5. Discussão	42
6. Conclusão	46
7. Referências Bibliográficas	47
8. Anexo	58

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, neste sentido, a dor é um sintoma clinicamente importante para a detecção e avaliação de doenças, bem como, para induzir um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limitar os possíveis danos (Millan, 1999; Woolf, 2000; Almeida et al., 2004). Já está bem estabelecido que a dor é uma experiência complexa e que não envolve apenas a transdução de estímulo nocivo ambiental, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo. O fenômeno doloroso, portanto, possui dois componentes: um que discrimina o estímulo doloroso em relação ao tempo, espaço e intensidade, chamado de perceptivo-discriminativo (componente sensorial); e outro que atribui emoções à experiência dolorosa, sendo responsável pelas respostas comportamentais à dor. Este é caracterizado por comportamentos defensivos, como a retirada reflexa dos membros ou comportamento fuga/ luta, denominado de componente aversivo-cognitivo-motivacional (componente motivacional) (Melzack, 1975; Chapman et al., 1999; Julius et al., 2001; Almeida et al., 2004). A dor caracteriza-se por uma resposta orgânica protetora, sendo portanto importante, pois alerta o indivíduo para uma lesão iminente ou real dos tecidos, induzindo ao surgimento de respostas reflexas e comportamentais coordenadas com o intuito de manter o dano tecidual o mais controlado possível, exibindo os limites que não podem ser transgredidos (Woolf et al., 1999; Dias, 2007). A dor pode ser classificada como aguda quando é transitória, tendo duração de minutos à algumas semanas, sendo bem localizada e que quando a causa é removida cessa imediatamente (Teixeira et al., 2001). No entanto, quando a dor passa a se repetir ou sustentar-se por período prolongado, deixa de apresentar vantagens biológicas e passa a causar sofrimento, passa a ser classificada como dor crônica a qual é gerada por impulsos de pequena magnitude produzidos por atividade neural anormal (Melzack et al., 1999).

A dor crônica pode estar associada com a continuação da patologia ou persistir após a recuperação da doença ou lesão. Se a dor crônica for devido à doença orgânica, ela é

efetivamente curada ao se tratar a desordem de base, geralmente não é bem localizada e tende a ser maciça, dolorida, contínua ou recorrente e é dividida em nociceptiva, neuropática e psicogênica (Merskey et al., 1994; Smith et al., 1986; Fürst, 1999).

Porém, em algumas situações, o sofrimento doloroso perde sua função biológica e começa a representar uma consequência insuportável às desordens refratárias aos tratamentos (Steven, 1992) e, 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.

Existem alguns métodos que induzem analgesia, sendo o tratamento farmacológico o mais utilizado. Os anestésicos locais (AL), objetos desse estudo, apresentam grande aplicação clínica em Medicina e Odontologia, 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). No entanto, as formas comerciais disponíveis apresentam duração de ação relativamente curta, devido à sua rápida transferência e redistribuição do local da injeção. 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. As nanopartículas, entre outros, têm se mostrado promissoras 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 (Davis & Brewster, 2004; Rose et al., 2005; Torchilin, 2005; Samad et al., 2007; De Paula et al., 2010).

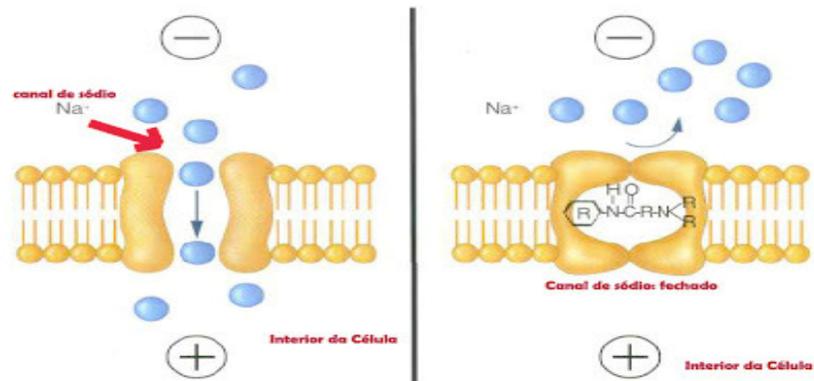


Figura 2. Canal de sódio em estado fechado após ligação do AL no receptor. (fonte internet acesso 17/07/2012, adaptado)

http://t3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSibvq_SpyiIcX34PHQKM7674usCIM4ip2SW6VZjXPwE8nVkJHou

Quanto a interação com a fase lipídica membranar, os AL quando em grandes quantidades, interrompem a condutância iônica por expandir-se na fase lipídica membranar, de modo a desorganiza-la e obstruir os CSVD. Essa teoria indica a relação entre a hidrofobicidade e potência anestésica (Butterworth e Strichartz, 1990; de Paula & Schreier, 1996). Por outro lado, a inserção preferencial de diferentes AL no interior da bicamada lipídica indica a formação de um sítio transiente, facilitando o acesso da molécula ao(s) sítio(s) de ligação nos CSVD (Fraceto et al., 2002, 2005, 2006; de Paula et al., 2008).

Para a compreensão do mecanismo, pelo qual os AL exercem seus efeitos farmacológicos, faz-se necessário o entendimento da condução nervosa, iniciada em função de um estímulo, que pode ser químico, físico ou elétrico (Carvalho, 1994). Esse estímulo resulta no aumento gradativo da permeabilidade da membrana aos íons de sódio permitindo seu influxo através da mesma e a saída de potássio, de modo a tornar o potencial de membrana negativo e desencadear o potencial de ação ao longo das fibras nervosas num processo dinâmico de despolarização e repolarização como mostra a **Figura 3** (McLure & Rubin, 2005).

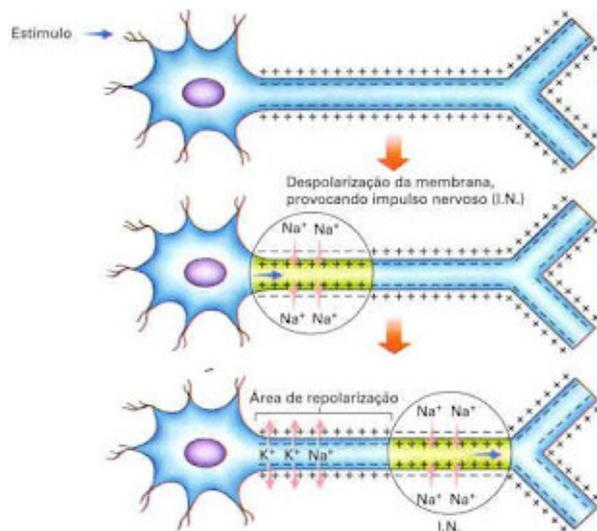


Figura 3. Condução do estímulo nervoso. (fonte internet acesso 17/07/2012)

http://1.bp.blogspot.com/_ZZMZFLa4PcY/TM11S4aUW6I/AAAAAAAAAFQ/EgiQMllcnzk/s1600/repolarizacao.jpg

Fibras nervosas mielinizadas e de maiores diâmetros (A: α - β - γ - δ) estão tipicamente envolvidas em funções sensoriais e motoras, em que a velocidade de transmissão nervosa é crítica. Em contraste, fibras não mielinizadas e de menores diâmetros (fibras C), apresentam menores velocidades de conduções e transmitem informações sensoriais como dor, temperatura e funções autonômicas (Barash et al., 2004). A **Tabela 1** apresenta a classificação das fibras nervosas de acordo com o tamanho, velocidade de condução e função (Barash et al., 2004).

Tabela 1: Tipos de fibras nervosas

Classificação	Diâmetro (μ)	Mielina	Condução (m/seg)	Função
A (Alfa e Beta)	6-22	+	30-120	Motor e Propicepção
A (Gama)	3-6	+	15-35	Tônus Muscular
A (Delta)	1-4	+	5-25	Dor, toque e temperatura
B	<3	+	3-15	Pré-ganglionar Simpática
C	0,3-1,3	-	0,7-1,3	Pós-ganglionar Simpática

Adaptado Barash et al. (2004).

Em geral, fibras menores são mais fáceis de bloquear do que as maiores, e as fibras não mielinizadas mais sensíveis do que as mielinizadas, além disso as fibras autônomas são mais suscetíveis do que as somáticas, portanto, a sequência do bloqueio é dor- temperatura- toque - sensação de pressão profunda e bloqueio motor (Barash et al., 2004).

A molécula dos AL, pode ser dividida em três partes: um grupamento amínico secundário ou terciário que confere às moléculas hidrossolubilidade. Outro, aromático que concede às moléculas propriedades lipofílicas que são essenciais para a sua penetração nas fibras nervosas e por último, unindo essas duas partes, uma cadeia intermediária que é importante em dois aspectos, primeiramente, fornece a separação espacial necessária entre as extremidades lipofílica e hidrofílica e também a ligação química entre os dois grupamentos, servindo como base para a classificação dos anestésicos locais em dois grupos: os ésteres (-COO) e as amidas (-NHCO-). A cadeia intermediária é de grande relevância, já que há grandes diferenças no grau de alergenicidade, na potência e no metabolismo, quando comparamos os dois grupos de fármacos, a **Figura 4** apresenta a estrutura química dos AL (Tortamano & Armonia, 2001).

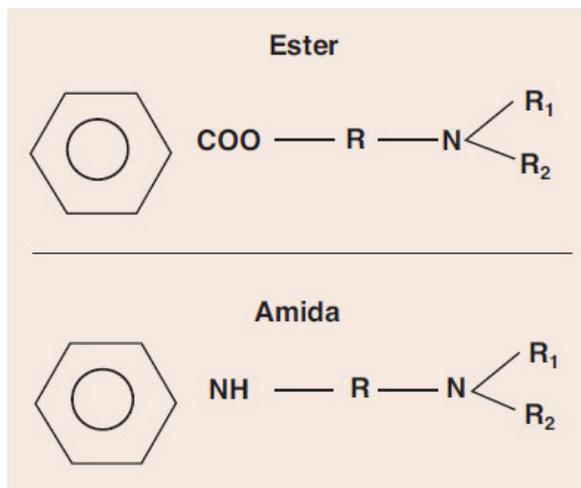


Figura 4. Estrutura química dos AL. (Adaptado Barash et al. 2004)

O AL mais comumente usados na clínica médica são pertencentes à família das amino-amidas: bupivacaína, ropivacaína, lidocaína, mepivacaína e prilocaína, sendo os do grupo ester (cocaína, benzocaína, tetracaína) os mais alergênicos dificultando sua utilização na prática anestésica (Koehler et al., 2005). Estes fármacos podem 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). 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) enquanto a cardiotoxicidade indireta produz efeitos iniciais estimulantes, seguidos de depressão com o aumento da dose. (Mercado et al., 2011).

A bupivacaína e a etidocaina são os AL mais propensos a provocarem arritmias letais, por apresentarem uma elevada potência anestésica (Mercado & Weinberg, 2011), relacionada diretamente a toxicidade (Knudsen et al., 1997). Esses efeitos são proporcionais a lipossolubilidade dos AL, uma vez, que a associação desses compostos com a região hidrofóbica das bicamadas lipídicas, resulta em sua maior distribuição para os locais de ação (Li et al., 2002).

Como as características desejáveis para um AL incluem longa duração de ação, seletividade para o bloqueio sensorial em relação ao motor e diminuição da toxicidade sistêmica (Kuzma et al., 1997; de Araújo et al., 2003), uma técnica frequentemente utilizada para limitar as concentrações sistêmicas do fármaco é a co-administração de um agente vasoconstritor, mais comumente a epinefrina. Em uma concentração de 5 mg / mL (1:200.000), a epinefrina reduz acentuadamente as concentrações máximas sistêmicas dos AL medidas após a infiltração subcutânea ou injeção do plexo cervical superficial (Rosenberg et al., 2004).

Outra alternativa que tem se mostrado capaz de promover estes efeitos desejáveis é a liberação modificada destes fármacos. Esta veiculação de anestésicos locais pode ser obtida pela formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (Dollo et al., 1996; Irie & Uekama, 1997; Loftsson & Masson, 2001; De Araújo et al., 2005, De Araújo et al., 2006), encapsulação com lipossomas (Simonetti & Andrade, 1996; De Araújo et al., 2004; Cereda et al., 2006; Grant et al., 2002; Rose et al., 2005), encapsulação em micropartículas (Le Guévello et al., 1993; Rose et al., 2005) e encapsulação em sistemas nanoestruturados poliméricos (Görner et al., 1999; Govender et al., 1999; Polakovic et al., 1999; You & Peng, 2005; Grillo et al., 2010).

1.2. Bupivacaína (BVC) e Levobupivacaína (LBVC):

A bupivacaína (BVC) é um AL da classe das amino-amidas, descoberta em 1963, que juntamente com dois outros AL desta classe, a lidocaína e a ropivacaína, têm sido os fármacos de escolha na terapia da dor aguda e crônica (Gupta, 1991; de Araújo et al., 2005). O uso da BVC na clínica se deve a sua potência e capacidade de produzir anestesia prolongada. Sua longa duração de ação, aliada a sua tendência em fornecer um bloqueio mais sensorial que motor, tornou-a de uso popular entre os anestesiológicos por promover analgesia prolongada durante o trabalho de parto ou no período pós-operatório (Mclure & Rubin, 2005). Porém, sua supremacia é questionada pelos relatos de cardiotoxicidade (Malamed, 2001) que estaria associada a sua lenta dissociação dos canais de sódio, durante a diástole ventricular, o chamado mecanismo de *fast in, slow out*, em contra partida a lidocaína não apresenta uma dissociação lenta mecanismo conhecido por *fast in, fast out*. (Clarkson & Hondeghem, 1985; Bergamaschi et al., 2005).

A BVC, por possuir estereocentro, apresenta dois isômeros, R(+) e S(-), sendo portanto, uma mistura racêmica que consiste de quantidades iguais de isômeros ópticos, levobupivacaína e dextrobupivacaína, também conhecidos como S(-) e R(+) enantiômeros. Com base em demonstrações de que a cardiotoxicidade observada com a bupivacaína racêmica mostra enantiosseletividade, ou seja, é mais pronunciada com o enantiômero R(+), uma das possíveis explicações seria que os canais de sódio, conhecidamente são dextrógiros, assim sendo, fármacos que apresentem quantidade aumentada de sua forma dextrógira apresentarão maior afinidade pelos canais, dificultando o desligamento do anestésico do mesmo (Groban et al., 2001). Os efeitos tóxicos associados ao uso da BVC levaram a pesquisa de novos AL (Casati et al., 2003), sendo a ropivacaína (um isômero com substituinte propila ao invés de butila, como na bupivacaína) lançada no mercado a partir dos anos 80, como uma alternativa, menos tóxica, que a BVC. Como a síntese da RVC é estereoseletiva, levando ao isômero levógiro, concluiu-se que a estereoseletividade estava relacionada à cardiotoxicidade destes AL e, a partir daí, desenvolveu-se a levobupivacaína, LBVC (S75 R25). (de Araújo et al., 2005; Torres, 2006).

Uma injeção intravascular inadvertida, de BVC, atingindo concentrações plasmáticas tóxicas, pode produzir efeitos sobre os sistemas nervoso central (SNC), principalmente convulsões, e sobre o sistema cardiovascular, podendo resultar em parada cardiorrespiratória e óbito (Bergamaschi et al., 2005). Um estudo, encontrou-se menor incidência de hipotensão arterial em gestantes anestesiadas para cesariana com LBVC do que com BVC (Foster & Markham, 2000; Bader et al., 1999). Outro estudo que comparou 7,5 mg de BVC com 7,5 mg de LBVC associadas a fentanil por administração intratecal para cirurgia transuretral e evidenciou que o bloqueio motor teve menores intensidade e duração com LBVC quando comparada com BVC e que o bloqueio sensorial e o intervalo para administração de analgesia suplementar foram maiores com LBVC do que com BVC (Erbay et al., 2010), onde conclui-se que apesar da potência entre BVC e LBVC ser semelhante a primeira apresenta maiores efeitos colaterais e LBVC apresentou uma analgesia mais duradoura.

Devemos entender, no entanto, que quando comparamos dois fármacos, neste caso BVC e LBVC, a “dose ótima” para uma anestesia intratecal ou bloqueio de nervos periféricos, deveria ser determinada, o que não é possível atualmente devido as inúmeras variáveis existentes, a dose deve sim ser determinada para cada paciente individualmente tornando difícil a comparação entre os fármacos em termos de potência e duração de anestesia (Deleon & Wong, 2011).

1.3. Anestesia intratecal

Em 1885, o neurologista James Leonard Corning, imaginando que os vasos intervertebrais se comunicassem diretamente com os nervos espinhais, injetou no espaço T11-T12 uma solução de cocaína a 3% e obteve uma anestesia de curta duração na sua segunda tentativa. A anestesia obtida por Corning provavelmente foi devido a introdução da agulha no espaço peridural, porque não houve gotejamento de líquido. Somente em 1894, Corning injetou cocaína deliberadamente no espaço subaracnóideo obtendo anestesia (Cangiani et al., 2006).

O início da administração de anestésicos locais no espaço subaracnoideo (injeção intratecal), deu-se 16 de agosto de 1898 onde cirurgião alemão Augustus Karl Bier injetou 3 ml de cocaína 0,5% no espaço subaracnóideo de um paciente de 34 anos, que foi submetido à exérese de um tuberculoma do joelho, obtendo anestesia durante 45 minutos. Oito dias após, Bier resolveu submeter-se à injeção subaracnóidea de cocaína feita pelo seu assistente Hidelbrandt. Apesar da grande perda de líquido a anestesia foi efetiva. O fato foi celebrado com comida e muito vinho, e a cefaléia que se instalou por nove dias foi atribuída inicialmente a ressaca e posteriormente a algum distúrbio circulatório, pois esta piorava em pé e desaparecia ao deitar-se. Em seguida, Hidelbrandt se submeteu ao mesmo procedimento realizado por Bier, e teve três dias de cefaleia. A cocaína utilizada por Bier era diluída em água e a técnica não era asséptica. Bier admitiu, então, que a ocorrência de cefaléia estava na dependência da perda líquido (Vale,1998).

Na realidade, a sistematização e o grande avanço da técnica devem-se ao cirurgião francês Tuffier que no V congresso Europeu de Cirurgia, em 1900, apresentou 63 procedimentos realizados sob anestesia subaracnóidea. Ele preconizou a utilização do bloqueio sob condições assépticas e estabeleceu que a linha imaginária traçada entre as duas cristas ilíacas permitia localizar o espaço L3-L4. Além disso, preconizou que injeção só deveria ser realizada após o gotejamento de líquido. A partir dos estudos de Tuffier a anestesia subaracnóidea começou a ser estudada e se mantém até hoje como uma técnica muito explorada por sua simplicidade, eficácia, baixa toxicidade e baixo custo. (Vale,1998).

O uso da via intratecal tem aumentado desde o final da década de 1980. Esta modalidade de administração de fármacos é utilizada principalmente para o tratamento de dores crônicas malignas e neuropáticas. Porém, além destes usos, esta via de administração pode ser usada em uma grande variedade de situações como cirurgias ortopédicas, abdominais, ginecológicas, cesarianas e para o alívio da dor do parto natural (Cohen & Dragovich, 2007; Smith et al., 2008).

Um dos fatores limitantes da utilização da via intratecal em anestesia é a curta duração do bloqueio sensitivo. Assim, diversos estudos vêm tentando prologar a duração da anestesia subaracnóidea, evitando assim múltiplas punções ou a utilização de técnicas contínuas com cateteres, o que aumenta o risco de infecções.

1.3.1. Anatomia da coluna vertebral:

A coluna vertebral é formada pelo empilhamento de 33 elementos ósseos, identificados como vértebras, das quais 7 são cervicais, 12 torácicas, 5 lombares, 5 sacrais e 4 coccígeas (**Figura 5**).

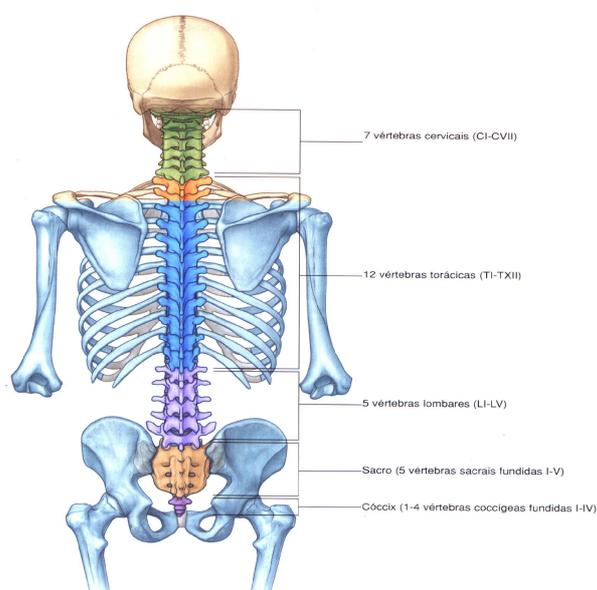


Figura 5. Anatomia óssea da coluna vertebral (fonte internet)

http://t3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTkuokhpMvdX2UWsbAI4Uw_mID-8Z5_cYEoehfjqA2ymNSbGOEq

As vértebras se unem por meio de cinco ligamentos superpostos: supra-espinhoso, interespinhoso, amarelo, longitudinal anterior e longitudinal posterior, este conjunto de ligamentos e ossos é denominado de canal osteoligamentar (**Figura 6**).

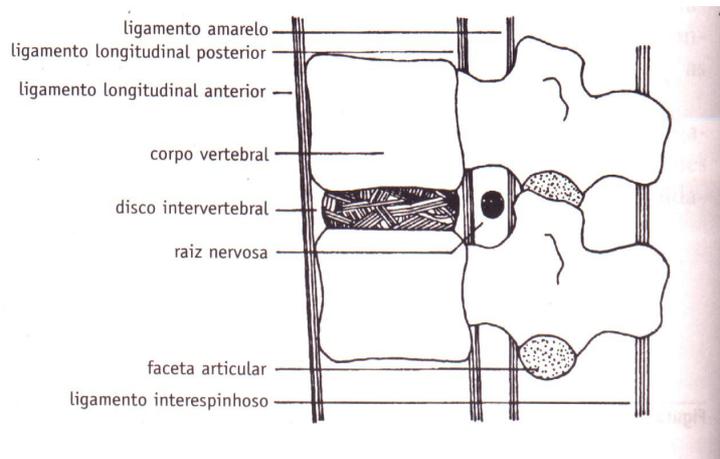


Figura 6. Elementos da conexão intervertebral. (Adaptado barash et al., 2004)

O conteúdo desse canal é composto pela medula que está envolvida por três envoltórios conjuntivos derivados de duas formações embriológicas, paquimeninge (dura mãe) e leptomeninge (aracnoide e pia mãe). A dura mãe, membrana mais externa e mais resistente é formada por fibras colágenas e poucas fibras elásticas, ambas, distribuídas em arranjo multidirecional, acelular em grande parte, exceto por uma camada que forma a borda entre ela e a aracnoide (Cangiani et al., 2006).

A aracnóide é uma membrana delicada, avascular, composta de uma superposição de células com fibras conjuntivas. Essa configuração permite a aracnóide funcionar como principal barreira meníngea aos materiais que penetram e saem do líquido cefalorraquidiano (LCR), não servindo somente como estrutura sacular desse líquido. O transporte ativo de compostos através da membrana aracnóide ocorre na região das bainhas dos ramos nervosos. Nessa área, o transporte de materiais do LCR ocorre de maneira unidirecional para o espaço peridural, podendo contribuir para o clearance dos agentes anestésicos espinhais (Cangiani et al., 2006).

A pia mãe, fina e vascularizada, recobre toda a superfície da medula, aderindo a ela intimamente, constituindo seu limite externo. Contém numerosos vasos que originam os ligamentos denteados que conectam a medula à dura mãe. Essa forte ligação permite a centralização da medula no seu canal, qualquer que seja a movimentação da coluna. Toda essa configuração de ossos, ligamentos e membranas formam os espaços raquidianos (**Figura 7**), são eles:

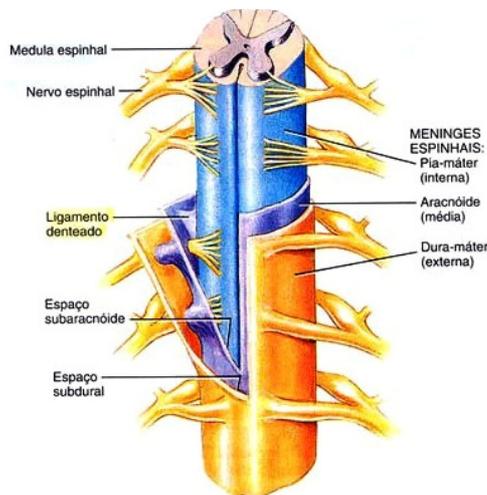


Figura 7. Meninges e espaços raquidianos (fonte internet)

<http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTdtJzSHs1l1XInQgHQx66it5xjSbheEZAQ9tp0aG349slhfGZ3w>

- Espaço peridural separa os componentes osteoligamentares da dura mater. É composto de gordura, um importante plexo venoso, artérias, linfáticos e expansões fibrosas, principalmente na porção anterior os quais participam da sustentação da dura mater.
- Espaço subdural, encontra-se entre a dura mater e a aracnóide, apesar de sua existência ser considerada virtual, uma porcentagem que varia de 0,82% a 10% das anestésias o anestésico é injetado neste espaço.
- Espaço subaracnóideo, compreendido entre pia mãe e a aracnóide, contém o LCR, sendo atravessado por varias expansões em rede. Abaixo de L2 , o espaço subaracnóideo contem as raízes nervosas em forma de cauda equina e o filamento terminal, permitindo a punção lombar sem risco para medula, neste espaço é realizada a anestesia intratecal ou raquianestesia, conforme e demonstra a **Figura 8** (Zarzur & Imbelloni, 2001; Cangiani et al., 2006).

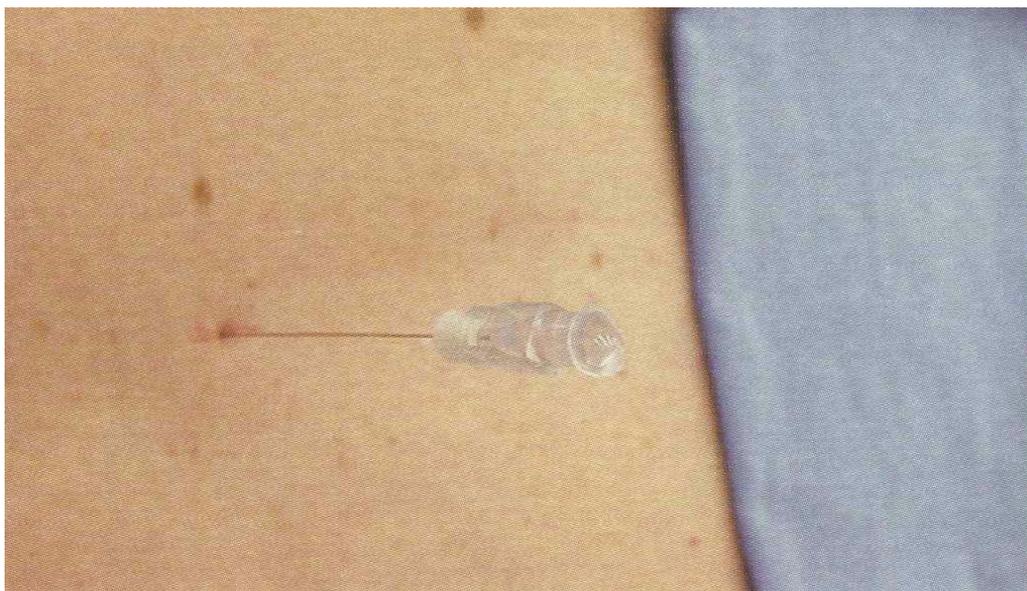


Figura 8. Gotejamento de LCR após punção intratecal, *adaptado de SAESP Tratado de Anestesiologia.(2006)*

1.3.2. Fisiologia do Líquido Cefalorraquidiano (LCR):

O LCR é um líquido aquoso e incolor que ocupa o espaço subaracnóide e as cavidades ventriculares e que tem por função principal a proteção mecânica do sistema nervoso central, apresenta um volume entre 90 e 150ml, secretado em sua maior parte pelo plexo coroide (80%) dos ventrículos encefálicos III, IV e laterais (Cangiani et al., 2006). Dos ventrículos laterais, passa através dos forames interventriculares (de Monroe) e junta-se no diencéfalo com o volume produzido no III ventrículo. Daí segue pelo aqueduto de Sylvius no mesencéfalo e IV ventrículo, onde se comunica com espaço subaracnóideo pelos forames de Magendie e de Luschka, como pode ser observado na **Figura 9**.

Cerca de 25% do volume estão contidos no sistema ventricular e o restante distribui-se no espaço subaracnóideo, sendo separado do tecido nervoso pela pia mater, o LCR é secretado continuamente em volume em torno de 500 ml dia (20ml/h), sua absorção é essencialmente venosa através de vilosidades e granulações aracnóideas, processo de extrema importância, pois, ele é quem realiza a filtração do LCR para o plasma, permitindo a passagem de pequenas moléculas, fármacos, microorganismos e proteínas, logo, o processo de absorção permite o

clearance de fármacos do LCR. Sua densidade varia de 1,003 a 1,010 à 37° C (Zarzur & Imbelloni et al., 2001; Cangiani et al., 2006).

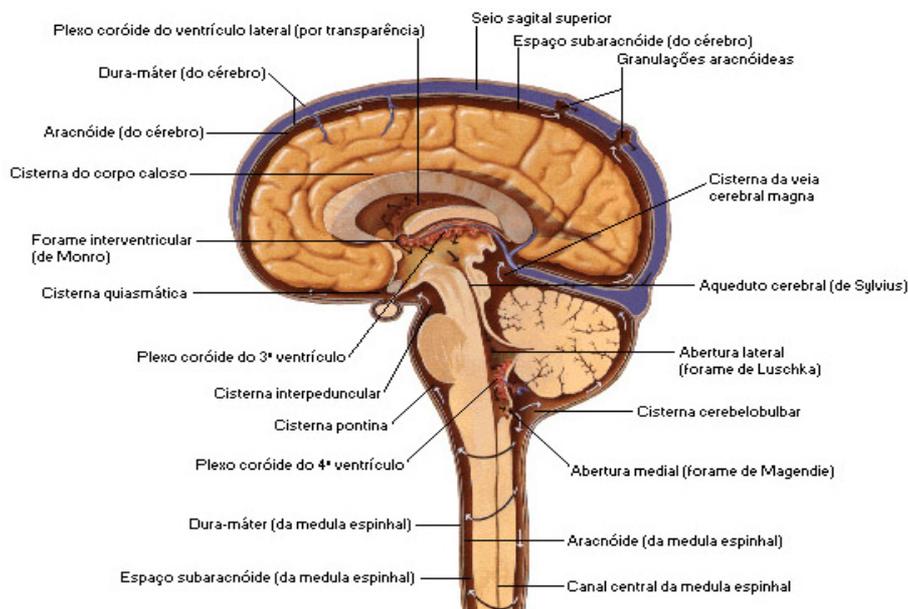


Figura 9. Circulação do LCR.(Adaptado SAESP 2006)

O anestésico local após sua administração, por via intratecal, é diluído pelo LCR, diminuindo sua concentração antes de atingir os sítios efetores no sistema nervoso central. Tal diluição ocorre principalmente nos primeiros 5 minutos após a injeção, sendo mais lenta a seguir. Dessa forma, variações individuais no volume do LCR na região lombossacra e a distribuição desse volume poderão afetar a anestesia subaracnóidea. Foram encontradas correlações clínicas entre o volume de LCR na região lombossacra e a anestesia intratecal com lidocaína hiperbárica, demonstrando que o volume do LCR nesta região foi responsável por 80% da variabilidade da extensão e da duração do bloqueio (Carpenter et al, 1998).

1.3.3. Farmacologia da anestesia intratecal:

Uma anestesia intratecal adequada requer bloqueio suficiente das sensações no sítio cirúrgico, com duração apropriada à execução do procedimento. A distribuição das soluções anestésicas no LCR, a partir de determinada dose de AL, depende de numerosos fatores

individuais e, por isso não pode ser previsível. Esses fatores estão relacionados com o LCR (volume e pressão), com a solução e tipo de anestésico injetado e com a técnica de injeção.

Apenas em condições patológicas, os fatores relacionados com o LCR podem influenciar na distribuição das soluções. A pressão liquórica média é em torno de 14 cm de H₂O e seus valores podem estar aumentados nessas situações patológicas. Quanto ao volume do LCR as variações podem influenciar o comportamento dos anestésicos injetados. Uma vez diminuído, a dispersão dos anestésicos atinge um nível superior na mesma dose utilizada. Diversas circunstâncias podem reduzir o volume de LCR no espaço subaracnóideo. Entre eles a gestação por dilatação do plexo venoso peridural; na hipertrofia idiopática da gordura peridural; e na compressão da veia cava, ascite e obesidade mórbida. O tipo do anestésico local utilizado é o principal fator que determina a duração da anestesia intratecal. O anestésico de duração mais curta é a procaína. A lidocaína e a mepivacaína são de duração intermediária, e a bupivacaína, tetracaína e a ropivacaína de longa duração (Bengtsson et al., 1983; Nogueira et al., 2010).

Quanto à solução injetada os fatores que alteram a dispersão no LCR e a duração do bloqueio nervoso estão relacionados com o volume, concentração, dose e baricidade, das mesmas. A dose é uma variação da combinação entre volume e concentração e parece ser o fator isolado mais importante na duração do bloqueio. Estudo realizado em 1999 utilizando 10 mg de bupivacaína mostrou semelhança na duração dos bloqueios utilizando tanto soluções hiperbáricas como isobáricas independente do volume e concentração utilizados (Malinovsky et al., 1999).

Quanto a baricidade das soluções elas se classificam em hipobáricas (menos densas que o LCR), isobáricas (mesma densidade do LCR) e hiperbáricas (densidade maior que o LCR). Esses valores alteram a dispersão do anestésico no LCR tendo, portanto, papel importante no nível (quantidade de dermatômos bloqueados) e duração da anestesia. Soluções hipo e hiperbáricas tendem a se dispersar (diluir) mais do que as isobáricas, que tendem a se concentrar no local próximo da injeção. Ao volume injetado de uma mesma solução hiperbárica, condiciona-se um aumento no nível do bloqueio. Independente do nível, o aumento da dose por elevação do volume do AL em mesma concentração, diminui a latência e aumenta a duração do bloqueio (Cangiani et al., 2006).

Para soluções isobáricas, o aumento do volume, mantida as concentrações, modifica pouco a duração e o nível médio dos bloqueios. No mesmo estudo, Malinovsky e colaboradores (1999), demonstraram ausência de efeitos do aumento do volume se acompanhado de diminuição

da concentração em soluções hiperbáricas. Por outro lado com soluções isobáricas um maior volume de anestésico acompanhado de diminuição da concentração levou a um nível maior de anestesia quando comparado com o uso de pequenos volumes e maiores concentrações. Com relação a técnica de injeção, o nível e duração são alterados pelo nível que é realizada a punção, com a posição do paciente, e com a velocidade de injeção e barbotagem (Vale & Simonetti et al., 2001).

A técnica anestésica pela via intratecal foi escolhida para este estudo de farmacocinética, pois trata-se de uma técnica de simples execução e com baixo custo, sendo muito utilizada na prática clínica. O uso de sistemas de liberação sustentada é capaz de promover um aumento na concentração de fármaco disponível no tecido alvo, prolongando sua duração de ação, assim, estes sistemas de liberação sustentada poderiam substituir injeções repetidas ou infusões contínuas aumentando o conforto dos pacientes, resolvendo assim, a maior limitação da anestesia intratecal, a curta duração do bloqueio sensitivo. Estudos prévios, em animais, demonstraram que a administração de ropivacaína encapsulada em microesferas, por via epidural, prolongou a duração de ação do AL, além de produzir níveis plasmáticos constantes e de longa duração (Ratajczak-Enselme et al., 2009).

1.4. Formulações anestésicas com sistemas de liberação sustentada: sistemas nanoestruturados poliméricos

As formas farmacêuticas de liberação modificada são sistemas nos quais parte da dose inicial do fármaco é liberada de imediatamente após a sua aplicação, buscando alcançar rapidamente a ação terapêutica desejada. Em seguida, a dose remanescente é liberada lentamente, visando a obtenção de uma concentração maior e por mais tempo do fármaco no tecido desejado (Collett & Moreton, 2005).

As formas farmacêuticas de liberação modificada podem ser classificadas em liberação retardada, repetida, sustentada e controlada (Freitas et al., 2006). Cada sistema de liberação objetiva eliminar as mudanças cíclicas na concentração de fármaco no plasma, observadas após a administração de um sistema de liberação convencional, nos de liberação retardada o fármaco não é liberado imediatamente após a administração, mas, sim um tempo depois, nos de liberação repetida uma dose individual é liberada regularmente logo após a administração, e uma segunda ou terceira doses são subsequentemente liberadas, em intervalos intermitentes. Geralmente contém dois tipos de doses, uma de liberação imediata e outra de liberação prolongada, nos de liberação sustentada existe uma liberação inicial de fármaco, suficiente para disponibilizar a dose terapêutica logo após a administração, a qual é seguida de uma liberação gradual do fármaco, por um período de tempo estendido, liberação controlada (LC) refere-se a formas farmacêuticas que liberam o fármaco em uma velocidade constante e fornecem concentrações plasmáticas que permanecem invariáveis com o tempo (ANSEL et al., 2000; LACHMAN et al., 2001; AULTON, 2005).

Os sistemas de liberação sustentada de fármacos alteram propriedades físicas ou químicas destes, facilitando sua passagem através de barreiras biológicas, modulando a velocidade com que estas substâncias atravessam essas barreiras e penetram na circulação até atingirem o tecido alvo. Além disso, podem direcionar o fármaco no organismo, evitando seu acúmulo em tecidos não específicos o que diminui efeitos tóxicos (Alonso, 2004; Durán et al., 2006).

Dentre as vantagens destes sistemas de liberação estão a manutenção da concentração do fármaco constante no tecido alvo por um maior período de tempo, aumento do tempo entre as doses com melhor o efeito terapêutico, menores efeitos colaterais por agir em local específico.

Partículas poliméricas biocompatíveis, como micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas, constituem, atualmente, promissores sistemas de liberação sustentada de fármacos. Além disso, podem apresentar pequeno tamanho e ser biodegradáveis, podendo ser injetáveis, evitando-se assim, inserções cirúrgicas inconvenientes para colocação/remoção de alguns sistemas (Jalil & Nixon, 1990).

Apesar das vantagens acima citadas, devem ser consideradas e ponderadas algumas desvantagens ou, melhor dizendo, limitações como: dificuldade ou impossibilidade de interromper rapidamente a ação farmacológica do medicamento em caso de intoxicação grave ou de intolerância, acúmulo do fármaco se a velocidade de eliminação for lenta, cinética de liberação dependente da integridade da forma farmacêutica e ainda o fato de seu custo ser geralmente mais elevado que o das formas farmacêuticas convencionais (Freire et al., 2006).

Em relação aos AL, os sistemas de liberação têm como objetivo promover uma liberação lenta e continuada, diminuindo a toxicidade sistêmica destes fármacos de ação regional (Simonetti & Andrade, 1996; Kuzma et al., 1997; De Araújo et al., 2003; De Paula et al., 2010). Existem diversos relatos na literatura de diferentes sistemas de liberação utilizados como carreadores para AL, dentre os quais destacam-se as preparações em ciclodextrinas, lipossomas e sistemas nanoestruturados poliméricos (Polakovic et al., 1999; Blanco et al. 2003, Govender et al., 1999; Gorner et al., 1999). Nanopartículas poliméricas constituem um dos sistemas liberação de fármacos mais importantes e podem ser preparados utilizando-se diferentes tipos de polímeros biodegradáveis naturais ou sintéticos, como o alginato e a quitosana.

Alginatos são polissacarídeos lineares solúveis em água extraídos de algas marrons, constituídos por monômeros de ácido β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G) (Martinsen et al., 1997). Cada tipo de monômero apresenta uma forma diferente de se ligar ao polímero, às ligações de G são estruturadas na forma vertical, enquanto as posições de M são encontradas na horizontal (George & Abraham, 2006), dando origem as diferentes ligações glicosídeas α (1-4) e β (1-4), como demonstrado na **Figura 10**.

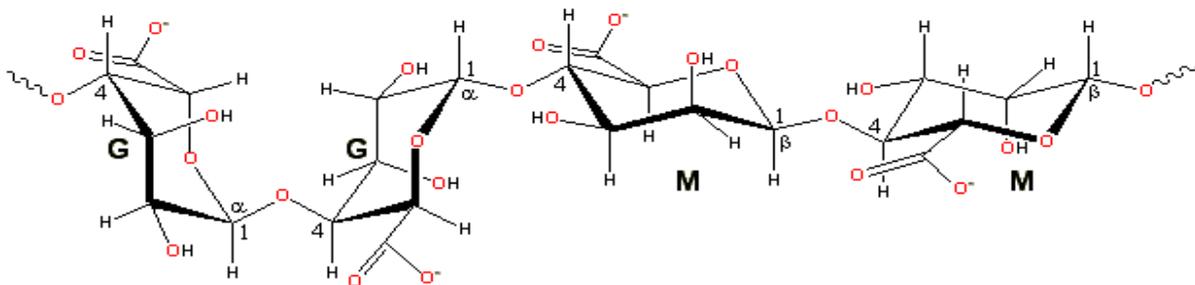


Figura 10. Estrutura do alginato com seus monômeros ácido β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), com as possíveis ligações glicosídeas α (1-4) e β (1-4). (adaptado Grillo et al., 2010).

Estes polímeros são poliânions e podem reagir com cátions divalentes, (levando à formação de um gel) ou com cátions polivalentes (formando ligações cruzadas) (Haug & Larsen, 1962). Assim, este sistema constitui em uma técnica de encapsulação simples formado de junções intercadeias, permitindo a entrada de drogas ou proteínas nesta estrutura de rede (Martinsen et al., 1997).

Comercialmente, os alginatos são extraídos de 3 espécies de algas, que incluem *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* (Smidsrod & Skjak, 1990) e são muito utilizados em comidas industrializadas como emulsificante e estabilizador e são inclusos no grupo de compostos saudáveis pelo FDA, sendo biodegradável e atóxico quando administrado oralmente (Espevik, 1993). Este polímero também está sendo utilizado para sistema de liberação de fármaco (Zahoor et al., 2007; Shimizu et al., 2003) e terapia gênica (You & Peng, 2005, Murtas et al., 2005, Douglas et al., 2005), facilitando a passagem através de barreiras biológicas, contribuindo na diminuição da toxicidade, aumentando a estabilidade e melhorando a biodisponibilidade (Alonso, 2004; Durán et al., 2006).

A quitosana pode ser obtida a partir da quitina por meio da desacetilação com álcalis (**Figura 11**), podendo também estar naturalmente presente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (Kafetzoulos et al., 1993). De acordo com o grau médio de acetilação, podem-se obter diversas quitosanas variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade (Singla et al., 2001).

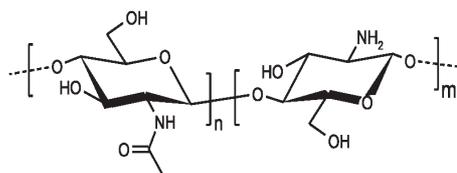


Figura 11. Representação estrutural do polímero de quitosana.(adaptado Grillo et al., 2010)

A quitosana é um polímero catiônico que está sendo usado na produção de micropartículas e nanopartículas, através da formação de uma geleificação ionotrópica com polímeros negativamente carregados. Complexos poliânions tem sido utilizados como sistema de liberação de drogas, proteínas, DNA e outros oligonucleotídeos (Agnihotri et al., 2004; Leong et al., 1998). Vários tipos de complexo quitosana-poliânion foram reportados na literatura, porém a combinação de quitosana e alginato de sódio foi considerada a mais interessante para sistemas carreadores (Mi et al., 2002). Uma vantagem adicional deste sistema são as características não tóxicas, permitindo a repetição da administração do agente terapêutico. Alguns trabalhos na literatura mostraram a encapsulação de fármacos, proteínas em nanopartículas e micropartículas de alginato-quitosana (Takka et al., 1999; Coppi et al., 2002; Gonzalez-Rodriguez et al., 2002).

O complexo interpolimérico entre alginato e quitosana ocorre em pH ácido, sendo que em pH neutro o complexo viscoso intumescce e o gel formado se desintegra lentamente liberando o fármaco. O grau de liberação é baseado no grau de reticulação entre os polímeros (Tønnesen & Karlsen, 2002).

A encapsulação de AL com nanopartículas poliméricas de alginato 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. Grillo et al. (2010) descreveram e caracterizaram a encapsulação de levobupivacaína em nanopartículas poliméricas de alginato/quitosana (LBVC_{ALG-QUIT}) e obtiveram como resultado a encapsulação de cerca de 76% de LBVC. Além disso, este sistema de nanopartículas apresentou estabilidade adequada por 30 dias em solução. O perfil de liberação da LBVC em solução e nas nanopartículas foi avaliado e os resultados demonstraram que a LBVC tem perfil de liberação modificado com a encapsulação. Testes *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o sistema LBVC_{ALG-QUIT} apresentou baixa citotoxicidade em fibroblastos 3T3 e promoveu aumento da intensidade e duração do bloqueio motor e sensorial após bloqueio do nervo ciático em camundongos.

Estudos pré-clínicos são fundamentais para fornecer informações sobre a farmacocinética e a possível toxicidade destas novas fórmulas farmacêuticas. O estudo de farmacocinética possibilita a observação da exposição sistêmica a um novo fármaco/formulação, e para isso utilizam o plasma para determinar parâmetros como ASC (área sob a curva), $C_{máx}$ (concentração máxima) e $T_{máx}$ (tempo para obtenção da concentração máxima).

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 formulações de LBVC em nanopartículas poliméricas de alginato/quitosana. No entanto, as formulações de LBVC_{NANO} ainda não foram avaliadas em relação à sua farmacocinética após a aplicação parenteral em animais. Além de fornecer importantes informações sobre a exposição sistêmica de fármacos, os estudos de farmacocinética também confirmam a efetividade destes sistemas nanocarreadores. Os sistemas de liberação sustentada/modificada (“drug delivery”) devem atuar como reservatórios de drogas no local da injeção. Assim, os AL devem ser liberados lentamente, o que além de aumentar a duração anestésica, previne a ocorrência de picos plasmáticos acentuados, e, portanto reduz o risco de toxicidade sistêmica. A curva de farmacocinética de formulações sustentadas geralmente apresenta perfil distinto das formas livres; é esperado menor extensão de absorção e menores níveis plasmáticos (Tofoli et al., 2010).

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, as concentrações plasmáticas e o perfil farmacocinético das formulações de LBVC livre, associada à epinefrina e encapsulada em nanopartículas poliméricas, administradas por via intratecal em coelhos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material:

Para confecção das formulações de levobupivacaína foram utilizados: cloridrato de levobupivacaína (S75–R25) (NovaBupi®) (cedido pela Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda.), alginato de sódio, PVA poli-(álcool vínlico) e quitosana foram obtidos da marca Sigma Chem. Co. As formulações comerciais NovaBupi® S75–R25 e NovaBupi® S75–R25 com epinefrina 1:200.000 também foram cedidas pela Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda.

O equipamento utilizado para a obtenção das concentrações plasmáticas de levobupivacaína foi um espectrômetro de massas triplo-quadrupolar em seqüência com fonte de ionização por eletrospray (Micromass Quattro LC®) acoplado com um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC 20 AD. Para a condução e validação dos ensaios analíticos, foi utilizado o padrão analítico de cloridrato de levobupivacaína (Sigma Chem. Co). Todos os demais reagentes foram de grau analítico ou farmacopêico.

3.2. Formulações de levobupivacaína

A preparação das nanopartículas de alginato foi realizada segundo o método descrito por Sarmiento et al. (2005). Primeiramente, uma solução de alginato de sódio (0,063% p/v) contendo 0,5% de LBVC foi preparada e 7,5mL de solução de cloreto de cálcio (18mM) foram adicionados lentamente durante 60 minutos sob agitação mecânica (1000 rpm). Posteriormente, 25 mL de solução de quitosana (0,07%) foi adicionados à primeira solução por um período de 90 minutos. Para o preparo da solução de quitosana (0,07%) foi utilizado ácido acético (1M) sob agitação durante um período de 12h devido à dificuldade na sua dissolução. As nanopartículas foram armazenadas em frasco âmbar após o preparo para posterior utilização.

Todas as formulações foram preparadas em câmara de fluxo laminar (com materiais e soluções autoclavados a 1 atm e 121°C, por 20 min) sendo, posteriormente, submetidas à filtração em membranas de 0,22 µm. As formulações foram preparadas pelo Dr. Leonardo Fraceto na UNESP/ Sorocaba.

3.3. Modelo animal

O protocolo experimental, nos animais deste experimento, foi elaborado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade São Francisco (Protocolo nº 001.09.10 - Anexo 1).

Para o estudo de farmacocinética foram utilizados 18 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.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para receber (n=6/grupo) por via intratecal um dos três tratamentos propostos:

- Grupo I: Levobupivacaína 0,5% encapsulada em nanopartículas: LBVC_{0,5% NANO}
- Grupo II: Levobupivacaína livre 0,5%: LBVC_{0,5%}
- Grupo III: Solução comercial de Levobupivacaína com epinefrina 1:200.000: LBVC_{0,5% EPI}

Previamente à administração das soluções, foi realizada a indução da anestesia geral com α -cloralose ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e uretano ($1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) por administração intramuscular e, quando necessário, foi realizada a suplementação com 25% da dose inicial (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.

Para injeção intratecal, foi utilizada uma agulha 27G conectada a uma seringa que foi inserida perpendicularmente no espaço entre as vértebras L5 e L6. O sítio de injeção selecionado está restrito à região onde a medula espinhal termina e a cauda equina começa, de forma a reduzir a possibilidade de dano espinhal e facilitar a acessibilidade intervertebral. As formulações foram injetadas em um volume máximo de 0,2 mL (Malinovsky et al., 2002).

Foram coletadas amostras de 3 mL de sangue nos seguintes tempos: 0 - antes da injeção anestésica (“baseline”), 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 minutos. O tempo de coleta de cada amostra foi definido e ajustado para a obtenção de onze amostras entre o tempo Zero (antes da administração) e 4 vezes o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da LBVC (Ratajczak-Enselme et al., 2007). Este esquema de progressão geométrica é comumente utilizado e fornece informações sobre a disposição da droga (Bourne, 1995). Logo após a coleta, a cânula foi lavada

com uma mistura de anticoagulante (heparina sódica) 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 as coletas de sangue, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia.

3.4. Preparo e análise das amostras

As amostras de plasma foram descongeladas em temperatura ambiente e um volume de 50µL foi misturado com 50µL do padrão interno (PI) de ropivacaína (10µg/mL) previamente a extração. As amostras misturadas com o PI foram agitadas por 2 minutos para garantir solubilização do PI no plasma. Em seguida foram adicionados 1000 µL de hexano/acetato de etila (1:1) e a mistura foi agitada por 5 minutos, centrifugada a 14000 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 para posterior injeção no sistema CLAE-EM-EM.

Foram injetados 5 µL desta mistura no sistema cromatográfico. Foi utilizada uma coluna Polaris 5µ, C18 (50 x 2 mm) e a fase móvel utilizada era composta de acetonitrila e água (80:20 v/v) com adição de 0,1% de ácido fórmico (pH=3,0). O tempo de corrida foi de 2,5 minutos, sendo o tempo de retenção do bupivacaína e do PI 0,72 min.

A detecção foi feita pelo modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), a amostra de levobupivacaína foi monitorada em MRM 289,3>140,1, e o PI em MRM 275,3>125,9.

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) de 0 a 420 e de 0 a infinito, tempo de meia vida de eliminação (t_{1/2} beta), volume de distribuição (V_d), Clearance (CL) e tempo médio de permanência (MRT).

3.5. Validação da metodologia analítica:

A validação da metodologia teve como objetivo demonstrar que o método foi adequado para dosar levobupivacaína livre e em nanopartículas poliméricas. Durante estes processos, foram determinados parâmetros como: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação. Estes parâmetros foram determinados e avaliados de acordo com o que é preconizado na resolução 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para a condução e validação dos ensaios analíticos foi utilizado cloridrato de bupivacaína (Sigma Chem. Co).

Foi utilizado plasma de três coelhos coletado da veia marginal da orelha. Previamente à coleta de sangue, foi realizada a indução de anestesia geral dos animais com α -cloralose (50 mg.kg⁻¹) e uretano (1 g.kg⁻¹) por administração intramuscular. O sangue foi centrifugado para a separação do plasma que 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 brancas (n=5) do um pool de plasma de 3 animais, sendo uma amostra lipêmica e uma hemolisada. A presença de interferentes e de supressão de íons no tempo de retenção do fármaco e do PI, foram ser observadas.

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 0,3 a 120 ng/mL em plasma de coelhos. Aceita-se um desvio inferior ou igual a 20% em relação a concentração nominal para o Limite de Quantificação (LQ) e inferior ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. Para aceitação do método deve-se encontrar um coeficiente de correlação linear deve ser no mínimo de $r=0,98$.

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 em três níveis:

repetibilidade ou precisão intra-corrída (concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação) 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, média e baixa (controles de qualidade-CQ) em três replicatas, ou seja, 9 determinações. A precisão intermediária (ou inter-corrídas) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com instrumentador diferente e/ou equipamentos diferentes. Esta análise também foi feita com três concentrações alta, média e baixa (controles de qualidade-CQ) em três replicatas, 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 deve ser determinada com o uso de 3 concentrações (CQ baixo, médio e alto) com cinco determinações por concentração. A exatidão deve ser 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 deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal do padrão, através da análise de, no mínimo, cinco amostras de padrões.

3.6. Parâmetros Farmacocinéticos:

Concentração máxima (C_{máx}): Este parâmetro representa a maior concentração sanguínea alcançada pelo fármaco após administração oral, sendo, por isso, diretamente proporcional à absorção. Desta forma, depende diretamente da extensão e velocidade de absorção, porém, também da velocidade de eliminação, uma vez que esta inicia-se assim que o fármaco é

introduzido no organismo. Esta medida não deve ser avaliada por si só, pois pode conduzir a conclusões errôneas. (

Tempo para atingir a concentração máxima (T_{máx}): Este parâmetro tem íntima relação com a velocidade de absorção do fármaco e pode ser usado como simples medida desta. É alcançado quando a velocidade de entrada do fármaco na circulação é excedida pelas velocidades de eliminação e distribuição; absorção não pode, portanto, ser considerada completa neste estágio.

Área sob a curva de concentração plasmática vs. tempo (ASC_{0-T}): Representa a quantidade total de fármaco absorvido. Para fármacos administrados cronicamente, é um parâmetro mais crítico que a velocidade de absorção. É considerado o mais importante parâmetro na avaliação da biodisponibilidade, sendo expressado em quantidade/volume x tempo (m g/mL x h) e pode ser considerado representativo da quantidade total de fármaco absorvido após administração de uma só dose desta substância ativa.

Clearance ou Depuração: Clearance é um termo inglês usado universalmente para indicar a remoção completa de determinada substância de um volume específico de sangue na unidade de tempo. Depuração, é o termo em português que mais se aproxima do sentido do termo inglês. De modo mais simples, a depuração de um fármaco do organismo pode ser compreendida como a taxa de eliminação por todas as vias, normalizada para a concentração do fármaco (C) em um líquido biológico:

Depuração = Taxa de eliminação/C

Os princípios de depuração dos fármacos são semelhantes àqueles da fisiologia renal, onde, por exemplo a depuração da creatinina é definida como a taxa de eliminação da creatinina na urina em relação à sua concentração no plasma. É importante notar que a depuração não indica a quantidade do fármaco que está sendo removida, mas, em vez disso, o volume do líquido biológico, como o sangue ou o plasma, do qual fármaco teria sido totalmente removido. O clearance é expresso em volume por unidade de tempo (ml/min ou L/h). A depuração por vários órgãos de eliminação é aditiva. A eliminação de um fármaco pode ser o resultado de processos que ocorrem no rim, fígado e outros órgãos. A divisão da taxa de eliminação por cada órgão pela

concentração plasmática do fármaco, por exemplo, fornece as respectivas depurações em cada um destes órgãos; estas quando somadas representam a depuração sistêmica total.

$$Cl_{\text{Total}} = Cl_{\text{renal}} + Cl_{\text{hepático}} + Cl_{\text{outros}}^*$$

**Refere-se a vias de excreção como lágrimas, saliva suor e fezes*

Quando o fármaco é parcial ou totalmente excretado pelos rins sem sofrer alterações, o clearance renal pode ser calculado dividindo-se a velocidade de excreção urinária (mg/min) pela sua concentração sanguínea(mg/ml). O clearance de creatinina é um índice da função renal porque esta substância endógena sofre filtração glomerular completa e sua secreção e reabsorção tubulares são mínimas; desta forma pode também ser utilizado na avaliação do clearance renal de fármacos.

Tempo de meia vida ($T_{1/2}$): A meia-vida é um conceito cronológico e indica o tempo em que uma grandeza considerada reduz à metade de seu valor. Em farmacocinética ela representa o tempo gasto para que a concentração plasmática ou a quantidade original de um fármaco no organismo se reduza à metade. A cada intervalo de tempo correspondente a uma meia-vida, a concentração decresce em 50% do valor que tinha no início do período. Esse conceito é operacionalizado pela observação da concentração no plasma. Para a maioria dos fármacos, a meia vida é constante em uma larga faixa de concentrações. Já o termo vida-média exprime a duração média da concentração e não sua meia vida. O tempo de meia-vida ou $t_{1/2}$ é um importante parâmetro farmacocinético. A caracterização de um evento farmacocinético pelo valor da meia vida possibilita uma estimativa da rapidez com que o processo ocorre, originando dados importantes para a interpretação dos efeitos terapêuticos ou tóxicos dos fármacos, da duração do efeito farmacológico e do regime posológico adequado.

Volume de Distribuição (V_d): O volume de distribuição é simplesmente uma constante de proporcionalidade fictícia, um conceito matemático, utilizado para explicar as concentrações observadas dos medicamentos com base na quantidade de fármaco conhecida presente no organismo. Ele fornece uma estimativa da extensão do tecido extravascular que faz a captação dos medicamentos; descreve a relação entre a quantidade de fármaco em todo o organismo e a

quantidade existente no plasma. Domingues, criador deste conceito define-o como o volume no qual o fármaco deve dissolver-se para que sua concentração se iguale a do plasma. Nesta definição a concentração plasmática do fármaco é aquela observada após a absorção e distribuição e antes da eliminação. Quando V_d é pequeno, a captação pelos tecidos é limitada; já valores grandes para V_d , indicam uma ampla distribuição para os tecidos. Como muitos fármacos são relativamente lipofílicos, a captação tecidual é extensa, e grandes volumes de distribuição são comuns.

Tempo de permanência médio (MRT): É o tempo médio em que uma molécula do fármaco permanece dentro do organismo após a administração rápida de uma única dose EV. Como o “clearance”, este valor é independente da dose administrada. O tempo médio de permanência é calculado a partir da relação onde a AUMC é a área sob o primeiro momento da curva de concentração plasmática – tempo, e a AUC é a área sob a curva de concentração plasmática – tempo. Para um fármaco com características unicompartimentais, o tempo médio de permanência é igual ao recíproco da taxa de eliminação constante.

3.7. Análise Estatística:

Os dados obtidos foram expressos em média \pm erro padrão e as diferenças estatísticas determinadas por análise de variância (ANOVA) não paramétrica com teste posterior de Kruskal-Wallis. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. Os softwares utilizados foram GraphPad InStat e GraphPad Prism (Graph Pad Software Inc., versão 3.0, 1997 – 1998).

4. RESULTADOS:

4.1 Validação da Metodologia

Foi realizada a infusão direta, de bupivacaína no solvente acetonitrila na concentração de 10 µg/mL, no equipamento com o objetivo de confirmação da massa nominal utilizando a função scan EM. Operando o espectrômetro de massas em modo positivo obteve-se o espectro de massa da bupivacaína, a **Figura 12** mostra o espectro de EM (A) e EM/EM (B) para a bupivacaína.

Bupivacaina10 ug/mL

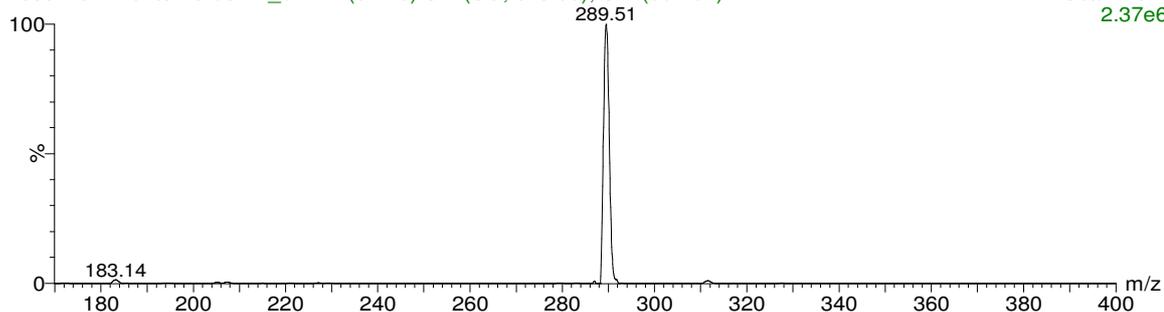
Desenvolvimento-15-08-11_01 74 (0.746) Sm (SG, 3x3.00); Cm (69:102)

15-Aug-2011

11:41:35

Scan ES+

2.37e6



Bupivacaina10 ug/mL

Desenvolvimento-15-08-11_02 79 (0.797) Cm (77:86)

15-Aug-2011

11:51:17

Daughters of 290ES+

1.87e6

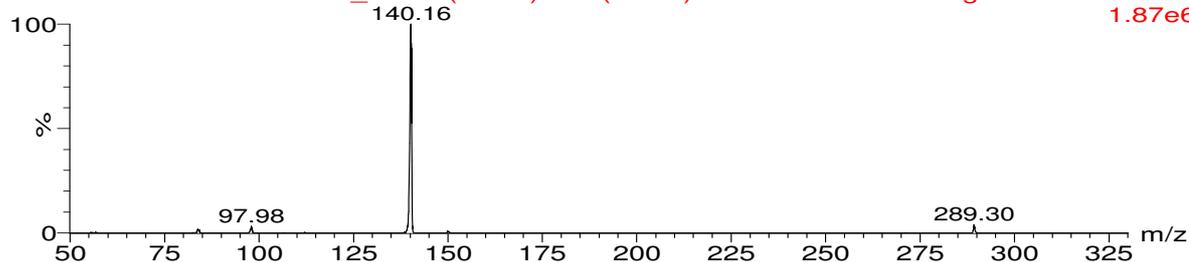


Figura 12: (A) Espectro de massas na função EM e (B) Espectro de EM/EM para Bupivacaína.

Especificidade: Para confirmar a especificidade do método, foram analisadas, amostras de plasma de coelhos separadamente, sendo três amostras normais, uma com o plasma lipêmico e a outra hemolisada. A **Figura 13** apresenta os resultados.

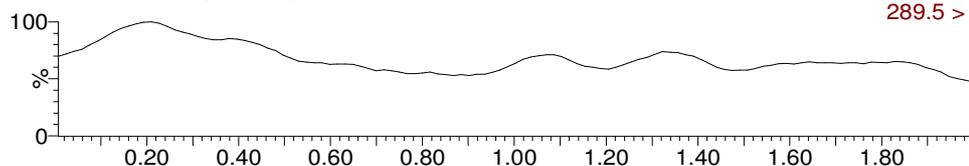
Pool 1

19-Aug-2011

11:28:46

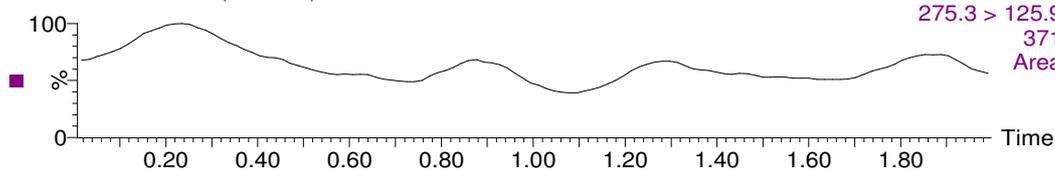
Seletividade-01 Sm (Mn, 2x3)

1: MRM of 1 Channel ES+
289.5 > 140.09
340
Area



Seletividade-01 Sm (Mn, 2x3)

2: MRM of 1 Channel ES+
275.3 > 125.9
371
Area



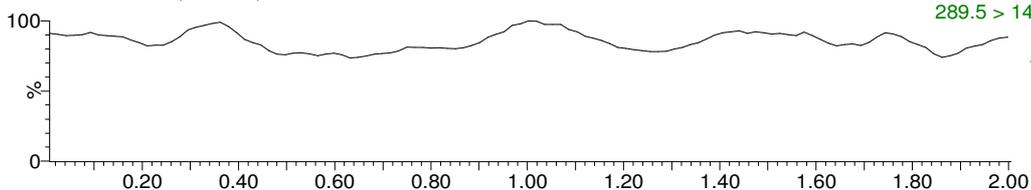
Pool 2

19-Aug-2011

11:31:25

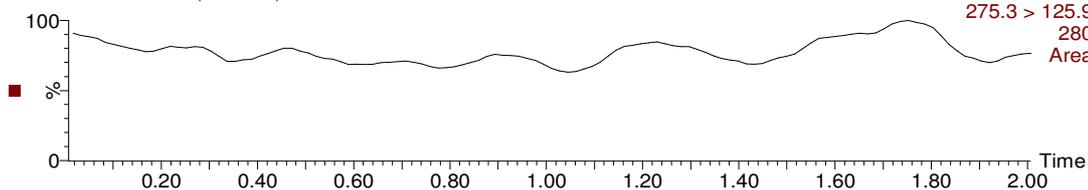
Seletividade-02 Sm (Mn, 2x3)

1: MRM of 1 Channel ES+
289.5 > 140.09
241
Area



Seletividade-02 Sm (Mn, 2x3)

2: MRM of 1 Channel ES+
275.3 > 125.9
280
Area



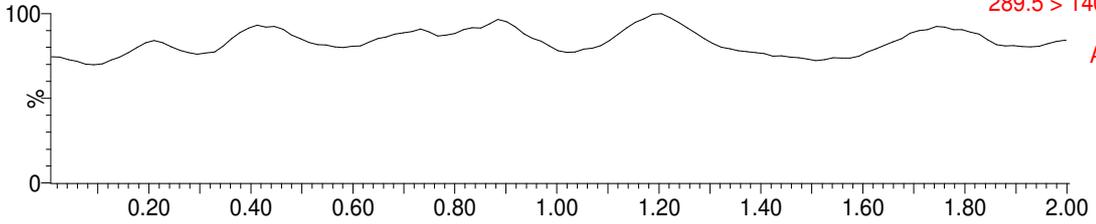
Pool 3

19-Aug-2011

11:34:03

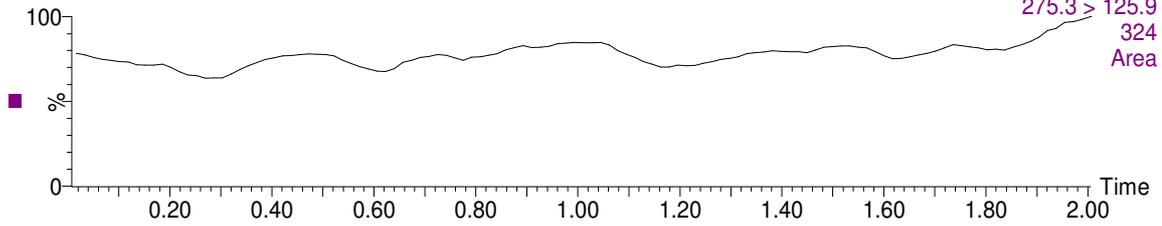
Seletividade-03 Sm (Mn, 2x3)

1: MRM of 1 Channel ES+
289.5 > 140.09
290
Area



Seletividade-03 Sm (Mn, 2x3)

2: MRM of 1 Channel ES+
275.3 > 125.9
324
Area



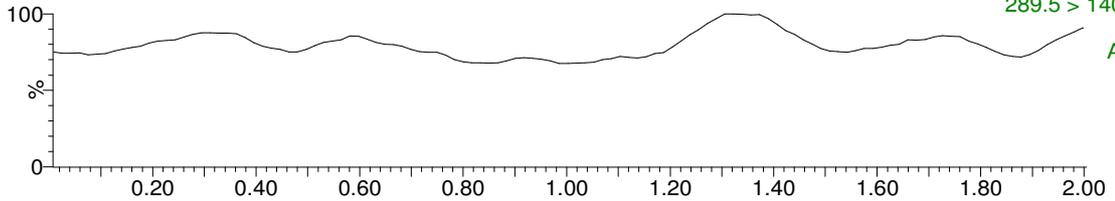
Pool 4 (Lipemico)

19-Aug-2011

11:36:43

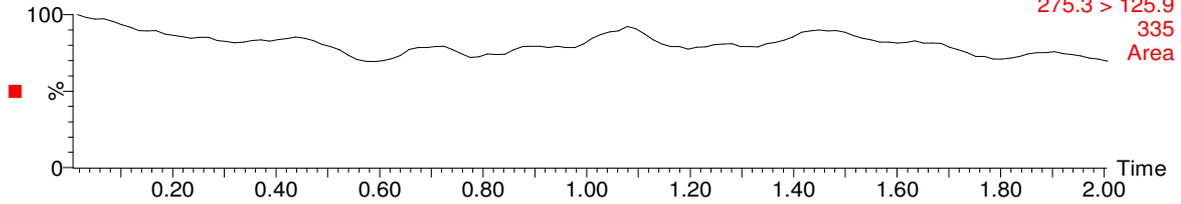
Seletividade-04 Sm (Mn, 2x3)

1: MRM of 1 Channel ES+
289.5 > 140.09
297
Area



Seletividade-04 Sm (Mn, 2x3)

2: MRM of 1 Channel ES+
275.3 > 125.9
335
Area



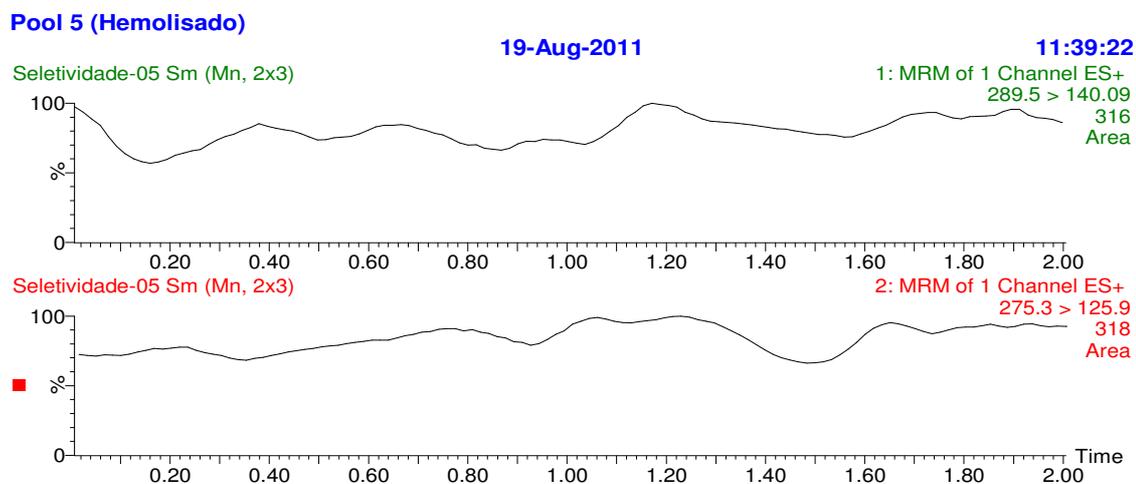


Figura 13. (A), (C), (E) Cromatograma referente ao branco do analito (plasma normal). (B), (D), (F) Branco do padrão interno (plasma normal); (G) branco do analito (plasma lipêmico); (H) branco do padrão interno (plasma lipêmico); (I) Branco do analito (plasma hemolisado); (J) branco do padrão interno (plasma hemolisado).

Linearidade: Para avaliar a linearidade gerou-se uma curva de calibração da bupivacaina 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 0,3 a 120 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=0,3 ng/mL) e menores que 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. A **Tabela 2** mostra os resultados médios de concentração obtidos para os padrões de calibração utilizados.

Tabela 2. Curva de Calibração (Linearidade)

<i>Fármaco</i>	<i>Concentração nominal (ng/mL)</i>	<i>Concentração média experimental (ng/mL)</i>	<i>Exatidão (%)</i>	<i>CV (%)</i>
<i>Bupivacaína</i>	0,300	0,300	100,000	0,333
<i>Bupivacaína</i>	2,963	2,979	99,311	3,108
<i>Bupivacaína</i>	9,847	9,856	98,557	0,255
<i>Bupivacaína</i>	30,043	29,962	99,873	0,572
<i>Bupivacaína</i>	60,884	60,888	101,481	0,852
<i>Bupivacaína</i>	121,181	120,802	100,668	1,165

Equação da curva de calibração 1: $y = 0,0240853x + 0,00320462$ ($r = 0,999925$)

Equação da curva de calibração 2: $y = 0,0243906x + 0,00171228$ ($r = 0,999768$)

Equação da curva de calibração 3: $y = 0,0247751x + 0,00130424$ ($r = 0,999881$)

Exatidão e Precisão: A precisão e exatidão do método foram calculados pelas variações intra e inter-lote de três concentrações distintas, alta (CA 90 ng/mL), média (CM 45 ng/mL) e baixa (CB 0,9 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 0,93 a 5,77% e a inter-lotes de 1,29 a 4,46%. A exatidão apresentou valores de 99,25 a 106% (intra-lotes) e 99,52 a 102,16% (inter-lotes). A **Tabela 3** mostra os valores de exatidão e precisão.

Tabela 3. 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	0,84	0,91	0,92	45,13	45,26	46,66	96,10	90,16	89,89
2	0,93	0,83	0,90	46,25	44,58	44,53	94,77	90,21	89,15
3	0,96	0,87	0,94	45,77	44,52	47,55	94,32	89,72	89,89
4	0,90	0,82	0,98	44,56	45,36	51,73	86,18	88,84	88,12

5	0,92	0,92	0,97	43,84	45,45	45,86	87,43	88,10	87,64
6	0,83	0,82	0,94	44,63	46,01	49,88	86,24	88,97	86,62
Média	0,90	0,86	0,94	45,03	45,20	47,70	90,84	89,33	88,55
DP	0,05	0,05	0,03	0,88	0,57	2,66	4,69	0,83	1,32
CV	5,77	5,29	3,14	1,95	1,25	5,58	5,16	0,93	1,49
Exatidão	99,50	95,74	104,63	100,06	100,43	106,00	100,93	99,26	98,39
				CB		CM		CA	
Média				0,90		45,97		89,57	
DP				0,04		1,49		1,16	
CV (%)				4,46		3,25		1,29	
Exatidão (%)				99,95		102,16		99,52	

* Valores Nominais: CB=0,9ng/mL; CM 45 ng/mL e CA=90 ng/mL

Limite de quantificação (LQ): O LQ foi determinado como o menor valor mensurável de LBVC 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 0,3 ng/mL. As **Tabelas 4 e 5** mostram os resultados da precisão e exatidão intra e inter-lote do LQ de bupivacaina.

Tabela 4. Resultados das análises intra-lote do controle de qualidade LQ– FASE I

	LQ (1)	LQ (2)	LQ (3)
Média	0,308	0,286	0,308
DP	0,036	0,046	0,016
CV (%)	11,614	15,933	5,214
Exatidão (%)	102,667	95,333	102,500

Concentração nominal: LQ= 0,3 ng/mL, DP= desvio padrão e CV= coeficiente de variação

Tabela 5. Resultados inter-lotes do controle de qualidade LQ

	LQ (1)	LQ (2)	LQ (3)
Média das Réplicas	0,308	0,286	0,308
Média		0,301	
DP		0,013	
CV (%)		4,180	
Exatidão (%)		100,167	

Concentração nominal: LQ=0,3 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 provou ser rápido (tempo de corrida analítica de 2,5 minutos) e adequado para dosagens de bupivacaína.

4.2 Concentração Plasmática de levobupivacaína em coelhos após a injeção intratecal

A **Tabela 6** apresenta a concentração média de LBVC (ng/mL) obtida após a injeção das formulações nos coelhos. A concentração plasmática medida após a injeção intratecal de LBVC_{0,5%} em coelhos foi maior que a obtida com a formulação de LBVC_{NANO} em todos os períodos analisados ($p < 0,05$), com exceção dos tempos 300, 360 e 420 minutos. Com relação a comparação entre LBVC_{0,5%EPI} e LBVC_{NANO} houve significância ($p < 0,05$) nos tempos 30, 45 e 60 min. As formulações LBVC_{0,5%EPI} e LBVC_{0,5%} não apresentaram diferenças significativas em relação à concentração plasmática ($p > 0,05$).

Tabela 6 : Concentração (média \pm erro padrão) de LBVC (ng/mL) medida no plasma de coelhos após a injeção intratecal das diferentes formulações (LBVC, LBVC_{EPI}, LBVC_{NANO}).

Tempo	LBVC_{0,5%}	LBVC_{0,5%EPI}	LBVC_{NANO}
0	0,00 \pm 0,00 a,c	0,00 \pm 0,00 b	0,00 \pm 0,00
15	85,27 \pm 69,88 a,c*	31,50 \pm 30,72 b	16,95 \pm 6,03
30	53,73 \pm 37,82 a,c**	29,05 \pm 23,79 b**	11,04 \pm 5,04
45	42,95 \pm 32,93 a,c**	23,96 \pm 23,73 b**	8,66 \pm 3,44
60	39,87 \pm 32,03 a,c**	19,37 \pm 21,41 b**	7,56 \pm 3,20
90	27,01 \pm 19,36 a,c*	14,89 \pm 16,16 b	5,35 \pm 2,33
120	19,42 \pm 11,64 a,c*	10,53 \pm 12,56 b	4,87 \pm 2,00
180	15,87 \pm 10,94 a,c*	7,62 \pm 6,26 b	4,22 \pm 2,19
240	12,84 \pm 8,25 c*	6,54 \pm 5,40 b	3,70 \pm 2,02
300	11,27 \pm 8,36 a,c	5,63 \pm 2,79 b	3,53 \pm 2,00
360	9,14 \pm 6,07 a,c	4,90 \pm 2,07 b	3,14 \pm 1,81
420	8,49 \pm 5,66 a,c	4,21 \pm 1,83 b	3,00 \pm 1,79

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

ANOVA/ Kruskal-Wallis

a LBVC_{0,5%} x LBVC_{0,5%EPI}

b LBVC_{0,5%EPI} x LBVC_{NANO}

c LBVC_{0,5%} x LBVC_{NANO}

A **Figura 14** demonstra a concentração plasmática média *versus* tempo, após a injeção das diferentes formulações (LBVC_{0,5%}, LBVC_{0,5%EPI}, LBVC_{NANO}) em coelhos.

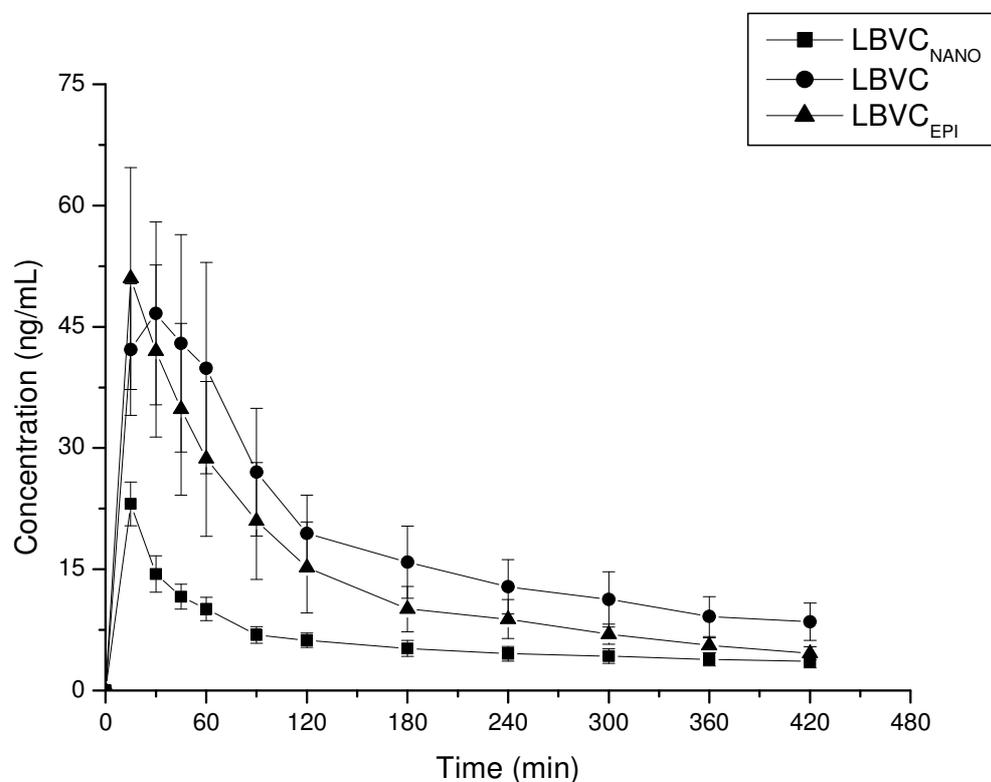


Figura 14. Concentração plasmática média (\pm erro padrão) *versus* tempo após a injeção intratecal das três formulações de levobupivacaína, em coelhos.

O C_{max} da formulação $LBVC_{0,5\%}$ apresentou valor de aproximadamente 3,5 vezes maior do que a $LBVC_{NANO}$ ($p < 0,05$), enquanto, a $LBVC_{0,5\%EPI}$ manteve valor intermediário em relação as outras apresentações ($p > 0,05$). O mesmo aconteceu com a ASC_{0-420} , onde $LBVC_{0,5\%}$ apresentou maior valor que o obtido com $LBVC_{NANO}$ ($p < 0,05$), novamente $LBVC_{0,5\%EPI}$ apresentou valores intermediários ($p > 0,05$). Em relação ao V_d o inverso ocorreu onde $LBVC_{NANO}$ obteve valores aproximadamente 2,5 vezes maiores que os obtidos com $LBVC_{0,5\%}$ ($p < 0,05$). Os outros parâmetros farmacocinéticos (T_{max} , $t_{1/2\beta}$, CL , MRT e $ASC_{0-\infty}$) não apresentaram diferença significativa. A **Tabela 7** apresenta os parâmetros farmacocinéticos obtidos após a injeção intratecal das formulações de LBVC.

Tabela 7: Parâmetros farmacocinéticos [média ± erro padrão] após a injeção intratecal das diferentes formulações (LBVC_{0,5%}, LBVC_{0,5%EPI}, LBVC_{NANO}) em coelhos.

Parâmetro (Média ± DP):	LBVC_{0,5%},	LBVC_{0,5%EPI}	LBVC_{NANO}
Cmax (ng/mL)	85,27 ± 69,88 a, c*	51,75 ± 33,38 b	23,08 ± 6,61
Tmax (min)	0,25 a, c	0,29 ± 0,10 b	0,25
ASC ₀₋₄₂₀ (ng-min/mL)	141,91 ± 95,37 a, c*	98,32 ± 63,27 b	43,79 ± 17,73
ASC _{0-∞∞} (ng-min/mL)	205,17 ± 121,57 a, c	143,61 ± 63,41 b	84,59 ± 49,16
t ½ beta (min)	5,36 ± 2,51 a, c	6,16 ± 4,11 b	6,93 ± 2,28
Vd	54,86 ± 47,34 a, c**	72,31 ± 41,20 b	133,81 ± 36,13
CL	6,56 ± 3,74 a, c	9,18 ± 6,74 b	16,27 ± 11,77
MRT	2,36 ± 0,39 a, c	2,22 ± 0,38 b	2,54 ± 0,29

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

ANOVA/ Kruskal-Wallis

a LBVC_{0,5%} x LBVC_{0,5%EPI}

b LBVC_{0,5%EPI} x LBVC_{NANO}

c LBVC_{0,5%} x LBVC_{NANO}

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada de anestésicos locais, como a suspensão de nanopartículas utilizada neste estudo, tem como objetivo melhorar as propriedades terapêuticas destes fármacos. A efetividade dos AL depende das concentrações destes agentes no local de administração, por outro lado, efeitos adversos dependem da obtenção de altas concentrações plasmáticas. Assim, o uso destes sistemas promove lenta liberação dos AL e maior concentração no local de ação, o que aumenta a duração anestésica e previne a ocorrência de picos plasmáticos, e, portanto reduz o risco de toxicidade sistêmica (Tofoli et al., 2010; Tofoli et al., 2012).

A formulação utilizada neste estudo apresentou características de liberação sustentada em estudos *in vitro* (Grillo et al., 2010). O perfil de liberação da LBVC nas nanopartículas de alginato e quitosana foi avaliada com ensaios de liberação utilizando um sistema de dois compartimentos para observar o perfil de liberação do fármaco livre e deste quanto associado às nanopartículas. Nesse sistema, foi utilizada uma membrana de celulose (Spectrapore, com poro para exclusão molecular de 1000 Da) que separa a amostra do compartimento acceptor, contendo o solvente. O tamanho dos poros dessa membrana permite que passe através dela para o compartimento acceptor, somente fármaco livre das nanopartículas. A liberação total de LBVC (100%) em solução ocorreu após 350 min de ensaio, enquanto que a liberação total da BVC quando associada nas nanopartículas de alginato/quitosana se deu após um período de tempo maior. Os mesmos autores determinaram a eficiência de associação da LBVC nas nanopartículas e esta foi de aproximadamente 75%, apresentando uma boa associação.

Estas características observadas *in vitro* determinam um perfil modificado da liberação de LBVC, o presente estudo, *in vivo*, confirmou a propriedade de liberação sustentada desta formulação. A formulação com nanopartícula apresentou concentrações plasmáticas menores e mais constantes quando comparada com a formulação livre sem adição de vasoconstritor, sugerindo que a encapsulação em nanopartículas promoveu um atraso da transferência do local de aplicação para a circulação sanguínea até 240 minutos após a injeção.

A formulação de $LBVC_{0,5\%epi}$ apresentou valores de concentrações plasmáticas intermediárias quando comparados com os obtidos com as outras duas formulações. A adição de

epinefrina não alterou as concentrações plasmáticas obtidas quando comparada com a formulação livre (LBVC_{0,5%}) em todos os períodos avaliados, resultado similar ao relatado na literatura.

Boico e colaboradores (1992) avaliaram três tratamentos distintos (bupivacaína 22,5mg, bupivacaina 22,5mg+epinefrina 0,3mg ou bupivacaina 22,5mg+clonidina 0,15mg) administrados por via intratecal em 29 pacientes (ASA II-III) e não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de bupivacaína. Assim, a adição de epinefrina não altera a absorção do AL aplicado por via intratecal.

No entanto, quando LBVC_{0,5%epi} foi comparada com a formulação LBVC_{NANO} a primeira apresentou maiores concentrações nos tempos 30, 45 e 60 min ($p < 0,05$). As menores concentrações plasmáticas obtidas com LBVC_{NANO} demonstram que a mesma permanece em maior concentração no tecido alvo (medula espinal). Assim, a formulação de LBVC_{NANO} utilizada no presente estudo promoveu níveis plasmáticos menores e uniformes, o que diminui as flutuações dos níveis de AL relacionadas à ocorrência de efeitos adversos. Além disso, a maior permanência do anestésico no local de ação deve promover uma anestesia de melhor qualidade e maior duração. Assim, estes sistemas de liberação sustentada poderiam substituir injeções repetidas ou infusões contínuas aumentando o conforto do tratamento dos pacientes.

No presente estudo a anestesia intratecal foi realizada entre as vértebras L5 e L6, restringindo-se a medula espinal de coelhos albinos. Um fator que pode alterar a latência, duração, dispersão dos AL no LCR e absorção sistêmica dos mesmos é a baricidade das formulações utilizadas (Malinovsky et al, 1999). No presente estudo foram utilizadas diferentes formulações de anestésicos locais (LBVC_{0,5%}, LBVC_{0,5%epi}, LBVC_{NANO}), porém todas as formulações apresentaram baricidade semelhantes sendo isobáricas em relação ao LCR (baricidade de 1,0013). Assim, não houve alteração em relação à dispersão e a absorção do anestésico devido a esse fator. Portanto, as diferenças obtidas nas concentrações plasmáticas com a formulação de LBVC_{NANO} ocorreram devido à encapsulação do Al nas nanopartículas poliméricas.

Outros estudos avaliaram a farmacocinética de AL com diferentes tipos de sistema de liberação sustentada e outras vias de administração. Um estudo realizado em 2006, por Karashima e colaboradores avaliou as concentrações de LBVC e LBVC complexada a ciclodextrina (LBVC_{ciclo}) no plasma de coelhos após administração epidural nos tempos de 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 360, e 420 minutos após a administração. Os resultados apresentaram

concentrações maiores no plasma do grupo LBVC apenas nos tempos de 5, 10 e 15 min. Não ocorreram diferenças significativas nos parâmetros de ASC_{0-480} e $t_{1/2}$, portanto a complexação de ciclodextrina com LBVC não alterou sua absorção do espaço epidural, assim como a sua eliminação no sangue. Ao contrário dos resultados de Karashima et al. (2006), no presente estudo foram observadas alterações nas concentrações de LBVC no plasma após a sua encapsulação em nanopartículas poliméricas. Estas diferenças podem ser explicadas pelo uso de via de administração e de sistema de liberação de fármacos distintos.

Em outro estudo, Ratajczak-Enselme et al., em 2009, avaliaram a farmacocinética da ropivacaína associada a microesferas de ácido poliglicólico administrada por via epidural. Após a injeção, foram medidas as concentrações intratecal e plasmática. Um total de 15 ovelhas foram avaliadas da seguinte maneira: 3 ovelhas receberam infusão contínua de ropivacaína 10ml/h, durante 6 horas, com aumento da concentração a cada 2 horas (2, 5, 10 mg/ml); 6 ovelhas receberam um bolus de 15ml contendo 500mg de ropivacaína complexadas a microesferas; 3 receberam bolus de 15ml contendo 30mg de ropivacaína livre seguida de infusão contínua 10ml/h na concentração 2mg/ml durante 6 horas; e outras 3 receberam 15ml contendo 50mg de ropivacaína em bolus com aplicações de 2/2h até completarem três doses. Foi avaliada a concentração plasmática, intratecal e epidural após a administração das formulações. Os resultados demonstraram que ropivacaína associadas a microesferas apresentou menor absorção sistêmica comparada com as ropivacaína livre independente da maneira que foi administrada, além disso, o sistema de microesferas permitiu uma melhor passagem de ropivacaína do espaço epidural para o intratecal promovendo uma melhor biodisponibilidade do que a ropivacaína livre. No presente estudo foi realizado com injeção intratecal direta e os resultados de absorção sistêmica quando usado um sistema de liberação modificada foi significativamente diferente quando comparado com a formulação livre.

Em relação ao perfil farmacocinético podemos observar que houve diferença entre as formulações de LBVC na concentração plasmática máxima (C_{max}). O C_{max} foi menor para a formulação de LBVC_{NANO} ($p < 0,05$) quando comparado com o LBVC_{0,5%}. Além disso, a formulação com LBVC_{NANO} não apresentou pico plasmático tão evidenciado como a formulação LBVC.

O C_{max} obtido com LBVC_{0,5%} foi maior que o obtido com a formulação encapsulada, porém o tempo para atingir a concentração plasmática máxima (T_{max}) não apresentou diferenças

significativas entre as duas formulações ($p>0,05$). Assim, clinicamente é provável que a anestesia com as duas formulações apresentem regressão iniciada ao mesmo tempo, no entanto, a qualidade e duração da anestesia com $LBVC_{NANO}$ poderá ser melhor, pois esta permaneceu em maior concentração no sítio de ação.

O fármaco livre ($LBVC_{0,5\%}$), o fármaco encapsulado ($LBVC_{NANO}$) e o fármaco associado a epinefrina ($LBVC_{0,5\%epi}$) apresentaram o tempo de meia vida semelhantes (em torno de 45 min) e a área sob a curva (ASC) de 0 a infinito não apresentou diferenças significativa ($p>0,05$) entre as formulações administradas o que significa que a adição de epinefrina ou encapsular o fármaco altera apenas a sua liberação e não o seu metabolismo.

A formulação de $LBVC_{0,5\%}$ promoveu maior valor de ASC de 0 a 420 em comparação com a formulação $LBVC_{NANO}$ ($p<0,05$). Este resultado pode ser explicado pelas grandes diferenças nas concentrações plasmáticas, principalmente no início da curva. Portanto, a $LBVC_{0,5\%}$ apresenta maior disponibilidade plasmática do que a $LBVC_{NANO}$ o que demonstra maior clearance liquorico e provavelmente menor duração de efeito da formulação livre.

O V_d de um fármaco é influenciado pela quantidade total de água corporal, perfusão tecidual, ligação as proteínas plasmáticas, solubilidade lipídica, gradientes de pH e fenômenos de transporte ativo. No presente estudo o V_d das formulações $LBVC_{NANO}$ e $LBVC_{0,5\%}$ apresentaram diferenças significativas ($p<0,01$). Um elevado volume de distribuição reflete uma elevada ligação tecidual, e conseqüentemente só uma pequena fração do fármaco se encontra no compartimento vascular disponível para sofrer clearance. No presente trabalho a formulação testada de $LBVC_{NANO}$ apresentou um V_d (133,81 vs 54,86) maior quando comparada com a formulação $LBVC_{0,5\%}$ significando que a mesma possui alta afinidade com o tecido onde foi injetada, sugerindo um possível aumento na duração do efeito anestésico.

Assim a formulação de $LBVC_{NANO}$ administrada em coelhos neste estudo apresentou características de lenta liberação, e, por isso pode ser designada como um “sistema de drug-delivery”. A segurança destes carreadores associada à lenta liberação da levobupivacaína favorecem o futuro uso clínico desta nova formulação.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a quantidade de LBVC no plasma de coelhos após a administração intratecal da mesma dose do fármaco livre, encapsulado em nanopartículas e com epinefrina, e observou menores concentrações plasmáticas com a formulação do fármaco encapsulado demonstrando a ocorrência de liberação sustentada/prolongada do fármaco encapsulado em nanopartículas através do perfil farmacocinético, quando comparado com as outras duas formulações. Assim, encapsulação entre a levobupivacaína e as nanopartículas promove a liberação constante e prolongada do mesmo, corroborando com o resultado apresentado na literatura, esta propriedade associada ao aumento da efetividade demonstrado previamente; e a segurança devido ao baixo risco de intoxicação torna o futuro uso clínico desta formulação favorável.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams HA, 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.* 1989; 12(3): 53-57.

Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Rel.* 2004; 100: 5–28.

Almeida, T.F.; Roizenblatt, S.; Tufik, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, v.1000, n.1-2, p.40-56, Mar. 2004.

Alonso MJ. Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomed. Pharmacother.*, 2004; 58: 168-172.

Altun Z, Abdel-Rehim M, Blomberg LG. 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-CLAE -EM-EM. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;813(1-2):129-35.

Bader AM, Tsen LC, Camann WR - Clinical effects and maternal and fetal plasma concentrations of 0.5% epidural levobupivacaine versus bupivacaine for cesarean delivery. *An- esthesiology*, 1999;90:1596-1601.

Bergamaschi F, Balle VR, Gomes ME, Machado SB, Mendes FF. Levobupivacaine Versus Bupivacaine in Epidural Anesthesia for Cesarean Section. *Comparative Study Rev Bras Anesthesiol.* 2005 Dec;55(6):606-13

Blanco MD, Bernardo MV, Sastre RL, Olmo R, Muniz E, Teijón JM. Preparation of bupivacaine-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres by spray drying: drug release studies and biocompatibility. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2003; 55: 229-236.

Bourne DWA. Mathematical modeling of pharmacokinetic data. Technomic Publishing Inc, Lancaster, PA, USA, 1995.

Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP. *Advances in chitin and chitosan*, Elsevier Applied Science: London, 1992.

Cammermeyer J. The importance of avoiding “dark” neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathol.* 1961; 1: 245-270.

Cammermeyer J. The post-mortem origin and mechanism of neuronal hyperchromatosis and nuclear pyknosis. *Exp. Neurol.* 1960; 2: 379-405.

Cangiani, LM.; Lutti, MN.; Cangiani, LH.; Esteves, LO. Anestesia Subaracnoídea, em SAESP- Tratado de anestesiologia, sexta edição, São Paulo, 2006; p1163-1192.

Carpenter KJ, Dickenson AH. Molecular aspects of pain research. *Pharmacogenomics J.* 2002; 2(2):87-95.

Casati A, Santorsola R, Aldegheri G, Ravasi F, Fanelli G, Berti M, Franchini G, Torri G. Intraoperative Epidural Anesthesia and Postoperative Analgesia with Levobupivacaine for Major Orthopedic Surgery: A Double-Blind, Randomized Comparison of Racemic Bupivacaine and Ropivacaine. *J. Clin. Anesth.*, 2003; 15:126 –131.

Cereda CMS, Araújo DR, Brunetto GB, de Paula E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesis duration. *Can.J.Anesthesiol.* 2006; 53 (11):1092-1097.

Cereda CMS, Tofoli GR, Brito-Junior RB, de Jesus MB, Fraceto LF, Araújo DR, de Paula E. Stability and local toxicity evaluation of a liposomal prilocaine formulation. *Journal of Liposome Research*, 2008; 18:329–339.

Chapman, C.R.; Gavrin, J. Suffering: the contributions of persistent pain. *The Lancet*, v.353, n.9171, p.2233-2237, Jun. 1999.

Clarkson CW, Hondeghem LM. Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: Fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. *Anesthesiol.*, 1985; 62: 396-405.

Cobb Z, Andersson LI. Determination of ropivacaine in human plasma using highly selective molecular imprint-based solid phase extraction and fast LC-MS analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2005; 383(4): 645-50.

Cohen SP, Dragovich A. Intrathecal analgesia. *Med Clin North Am.* 2007;91:251-70.

- Coppi G, Iannuccelli V, Leo E, Bernabei MT, Cameroni R. Protein immobilization in crosslinked alginate microparticles. *J. Microencapsul.* 2002; 19: 37–44.
- Covino BG. Pharmacology of local anaesthetic agents. *Br. J. Anaesth.* 1986; 58: 701-716.
- Cox B, Durieux ME, Marcus MAE. Toxicity of local anesthetics. *Best Prac. Res. Clin. Anesthesiol.*, 2003; 17: 111-136.
- Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(12):1023-35.
- De Araújo DR, Braga AFA, Moraes CM, Fraceto LF, de Paula E. Mistura com Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) de Bupivacaína Complexada com Ciclodextrinas e Anestesia por Via Subaracnoidea em Ratos. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2006; 56: 495-506.
- De Araujo DR, Cereda CMS, Brunetto GB, Pinto LMA, Santana MHA, de Paula E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. *Can. J. Anesth.*, 2004; 51:566-572.
- de Araújo DR, Fraceto LF, Braga AFA, De Paula E. Sistemas de liberação controlada com bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25): efeitos da complexação com ciclodextrinas no bloqueio do nervo ciático em camundongos. *Rev Bras Anesthesiol*, 2005; 55 (3): 316-328.
- De Araújo DR, Pinto LMA, Braga AFA, de Paula E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: Aplicações Terapêuticas. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2003; 53(5): 653-661.
- De Paula E, Cereda CMS, Tofoli GR, Franz-Montan M, Fraceto LF, Araujo DR. Drug Delivery Systems for Local Anesthetics. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation.* 2010;4(1):23-34.
- Deleon AM, Wong CA. Levobupivacaine versus bupivacaine: is there as winner?
- Dias, S. A versão biológica da dor. *Com Ciência*, n.87, 2007. Reportagem. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/comciencia/?section=8&edicao=24&id=274&tipo=0>>, Acesso em: 19 jan. 2008.

- 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.* 1996; 131: 219-228.
- Douglas KL, Piccirillo CA, Tabrizian M. Effects of alginate on the vector properties of chitosan-based nanoparticles. *J Control Release.* 2005; 115: 354-361.
- Durán N, Mattoso LHC, Morais PC. *Nanotecnologia*, São Paulo: Artliber, 2006.
- Eduardo, Z. Anatomia da coluna vertebral para a raquianestesia, em Imbelloni, LE. *Tratado de anestesia raquidiana*, Rio de Janeiro, 2001; p12-20.
- Erbay RH, Ermumcu O, Hanci V, Atalay H. A comparison of spinal anesthesia with low dose hyperbaric levobupivacaine and hyperbaric bupivacaine for transurethral surgery: A randomised controlled trial. *Minerva Anesthesiol* 2010;76:992-1001.
- Espevik T, Otterlei M, SKJAK-BRÆK G, Ryan L, Wright Sd, Sundan A. The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers, *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 255–261.
- Fonseca NM, Goldenberg S, Gomes PO, de Paula Lima CA. Anestesia em coelhos. *Acta Cir Bras.*, 11 (2): 82-104, 1996.
- Foster RH, Markham A - Levobupivacaine: a review of its pharmacology and use as a local anaesthetic. *Drugs*, 2000;59: 551-579.
- Freire, A. C.; Podczek, F.; Sousa, J.; Veiga, F. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I - O cólon como local de liberação de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 3, p. 2006a.
- Freire, A. C.; Podczek, F.; Sousa, J.; Veiga, F. Liberação específica de fármacos no cólon por via oral. II – Tipos de sistemas utilizados. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*
- Freitas, O. Sistemas de liberação modificada de fármacos. In: congresso de ciências farmacêuticas de cascavel, 02., 2006, Cascavel. *Anais...* Cascavel, 2006.
- Fürst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin*, v.48, n.2, p.129-141, Jan. 1999.

- George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan- a review. *Journal of Controlled Release*. 2006; 114:1-14.
- Gonzales-Rodriguez ML, Holgado MA, Sanchez-Lafuente C, Rabasco AM, Fini A. Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *Int J Pharm*. 2002; 232: 225–234.
- Gorner T, Gref R, Michenot D, Sommer F, Tran Mn, Dellacherie E. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix. *J. Controlled Release*. 1999; 57: 259-268.
- Govender T, Stolnik S, Garnett Mc, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control. Release*. 1999: 57: 171–185.
- Graf BM. The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine. *Curr Top Med Chem*. 2001; 1(3):207-14.
- Grant GJ, Piskoun B, Bansinath M. Analgesic duration and kinetics of liposomal bupivacaine after subcutaneous injection in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003; 30(12):966-8.
- Grant SA. The Holy Grail: long-acting local anaesthetics and liposomes. *Best Pract. Res. Clin. Anaesth.*, 2002; 16: 345-352.
- Grillo R, Melo NFS, de Araújo DR, de Paula E, Rosa AH, Fraceto LF. Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. *Journal of Drug Targeting*, 2010 *in press*.
- Groban L. Central nervous system and cardiac effects from long-acting amide local anesthetic toxicity in the intact animal model. *Reg Anesth Pain Med*. 2003; 28(1):3-11.
- Gupta, S. P. (1991) Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. *Chem. Rev*. 91, 1109-1119.
- Haug A, Larsen B. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates. *Acta Chem. Scand*. 1962; 16: 1908–1918.
- Hou SM, Yu HY. Comparison of systemic absorption of aqueous and liposomal lidocaine following intra-articular injection in rabbits. *J Formos Med Assoc*. 1997;96(2):141-3.

Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86: 147-162.

Jalil, R; Nixon, JR. Biodegradable poly(lactide acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *Journal of Microencapsulation*, v 7, p.297-325 , 1990.

Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v.413, n.6852, p.203-210, Sep. 2001.

Kafetzoulos D, Martinov A, Bouriotis V. *Chitin Enzymology*, ed., European Chitin Soc: Ancona, p. 147, 1993.

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.* 2005; 1088(1-2):126-30.

Korfmacher WA. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today.* 2005; 10(20):1357-67.

Krenzischek DA, Dunwoody CJ, Polomano RC, Rathmell JP. Pharmacotherapy for acute pain: implications for practice. *Pain Manag Nurs.* 2008; 9(1 Suppl):S22-32.

Kubota N, Kikuchi Y, Mizuhara Y, Ishihara T, Takita Y. Solid-Phase Modification of Chitosan Hydrogel. Membranes and Permeability Properties. *J Appl. Polym. Sci.* 1993; 50: 1665.

Kuzma PJ, Kline MD, Calkins MD, Staats PS. Progress in the development of ultra- long-acting local anesthetics. *Reg Anesth*, 1997; 22: 543-551.

Le Guévello P, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. High-performance liquid chromatographic determination of bupivacaine in plasma samples for biopharmaceutical studies and application to seven other local anaesthetics. *J. Chromatography*, 1993; 622: 284-290.

Leong KW, Mao HQ, Truong L, Roy K, Walsh SM, August JT. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J. Control. Rel.* 1998; 53:183–193.

- Liu, SS.; Hodgson, PS. Anestésicos Locais, em Barash, PG.; Cullen, BF.; Stoelting, RK., Anestesia Clínica, quarta edição, São Paulo, 2004, p449- 469.
- Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.* 2001; 225: 15-30.
- Malamed SF. Manual de anestesia local.4 ed, Guanabara Koogan, 2001.
- Malinovsky JM, Charles F, Baudrimont M, Péréon Y, Le Corre P, Pinaud M, Benhamou D. Intrathecal Ropivacaine in Rabbits: Pharmacodynamic and Neurotoxicologic Study. *Anesthesiology* 97:429–35, 2002
- Malinovsky JM, Pinaud M. Neurotoxicité des agents administrés par voie intrathécale. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 1996; 15: 647-658.
- Malinovsky JM, Renaud G, Le Corre P, Charles F, Lepage JY, Malinge M, Cozian A, Bouchot O, Pinaud M. Intrathecal bupivacaine in humans: influence of volume and baricity of solutions. *Anesthesiology*. 1999 Nov;91(5):1260-6.
- Martinsen AA, Skajak-Break G, Smidsrod O. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydr. Polym.* 1997; 15: 171-193.
- McLure HA, Rubin AP. Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol.* 2005; 71(3):59-74.
- Melzack, R. The McGill pain questionnaire: major properties and scoring methods. *Pain*, v.1, n.3, p.277- 99, Sep. 1975.
- Mercado P, Weinberg GL. Local anesthetic systemic toxicity: prevention and treatment. *Anesthesiol Clin.* 2011 Jun;29(2):233-42. doi: 10.1016/j.anclin.2011.04.007. Review.
- Mestre C, Pélissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharm. Toxic. Meth.* 1994; 32: 197-200.
- Mi FL, Sung HW, Shyu SS. Drug release from chitosan– alginate complex beads reinforced by a naturally occurring crosslinking agent. *Carbohydr. Polym.* 2002; 48: 61–72.

Millan, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, v.57, n.1, p.1-164, Jan. 1999.

Minerva Anesthesiol. 2010 Dec;76(12):979-81. Epub 2010 Nov 24.

Murtas S, Capuani G, Dentini M, Manetti C, Masci G, Massimi M. Alginate beads as immobilization matrix for hepatocytes perfused in a bioreactor: a physico-chemical characterization. *J Biomater. Sci. Polym.* 2005; 16: 829–46.

Muzzarelli RAA, Muzzarelli C. *Chitosan in pharmacy and chemistry*, Atec: Grottammare, 2002.

Muzzarelli RAA. *Chitosan per or: from dietary supplement to drug carrier*, Atec: Grottammare, 2000.

Nogueira CS, Lima LC, Paris VC, Neiva PM, Otani ET, Couceiro Rde O, Burim F, Ferreira JA Jr, Cadecaro P. A comparative study between bupivacaine (S75-R25) and ropivacaine in spinal anesthesia for labor analgesia. *Rev Bras Anesthesiol.* 2010 Sep-Oct;60(5):484-94.

Oliveira AG, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quím. Nova*, 2004; 27: 131-138.

Phaechamud T, Koizumi T, Ritthidej GC. Chitosan citrate as film former: compatibility with water-soluble anionic dyes and drug dissolution from coated tablet. *Int. J. Pharm.* 2000; 198: 97-111.

Polakovic M, Gorner T, Gref R, Dellacherie E. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres II. Modelling of drug release. *J. Control. Release.* 1999; 60: 169-177.

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

Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9270-9275.

Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo Drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 1995; 85: 1142-1169.

- Ratajczak-Enselme M, Estebe JP, Dollo G, Chevanne F, Bec D, Malinovsky JM, Ecoffey C, Le Corre P. Epidural, intrathecal and plasma pharmacokinetic study of epidural ropivacaine in PLGA-microspheres in sheep model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 72(1):54-61
- Ratajczak-Enselme M, Estebe JP, Rose FX, Wodey E, Malinovsky JM, Chevanne F, Dollo G, Ecoffey C, Le Corre P. Effect of epinephrine on epidural, intrathecal, and plasma pharmacokinetics of ropivacaine and bupivacaine in sheep. *British Journal of Anaesthesia* 2007; 99 (6): 881–90.
- Rose JS, Neal JM, Kopacz DJ. Extended-duration analgesia: update on microspheres and liposomes. *Reg Anesth Pain Med.* 2005; 30(3):275-85.
- Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv* 2007; 4: 297-305.
- Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Neufeld R, Ferreira D. Insulin-loaded alginate/chitosan nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation. *Revista Portuguesa Farmácia.* 2005; LII(2): 139–140.
- Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials.* 2003; 24: 2309-2316 .
- Simonetti MPB, Andrade MP. Anestésicos locais e opióides encapsulados em lipossoma: um avanço farmacotécnico em progresso. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v. 46, p. 35-42, 1996.
- Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001; 53: 1047.
- Smidsrod O, Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Tibtech.* 1990; 8: 71–78.
- Smith HS, Deer TR, Staats PS, Singh V, Sehgal N, Corder H. Intrathecal Drug Delivery. *Pain Physician* 2008; 11:S89-S104.
- Stevens CW. Alternatives to the use of mammals for pain research. *Life Sci.* 1992; 50: 901-912.

Takka S, Acarturk F. Calcium alginate microparticles for oral administration. II. Effect of formulation factors on drug release and drug entrapment efficiency, *J. Microencapsul.* 1999; 16: 275–290.

Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Progress in Neurobiol.* 1998; 56: 341-358.

Tofoli GR, Cereda CM, de Araujo DR, de Paula E, Brito RB Jr, Pedrazzoli J Jr, Meurer E, Barros FA, Groppo FC, Volpato MC, Ranali J. Pharmacokinetic and local toxicity studies of liposome-encapsulated and plain mepivacaine solutions in rats. *Drug Deliv.* 2010;17(2):68-76.

Tønnesen, H. H.; Karlsen, J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 28, p. 621-630, 2002.

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

Torres MLA. Toxicidade dos anestésicos locais: o debate continua! *Rev. Bras. Anesthesiol*, 2006; 56: 339-342.

Tortamano, N.; Armonia, P. L. Anestésicos locais. In: Tortamano, N.; Armonia, P.L. *Guia terapêutico odontológico*. 14. ed. São Paulo: Santos. 2001. Cap. 4, p. 30-41.

USDHHS, 1987. Guidelines on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. Washington, DC: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.

v. 42, n. 3, p. 2006b.

Vale, NB. Centenário da raquianestesia cirurgica. *Rev Bras Anesthesiol*, 1998; 48:5-7-520.

Vale, NB.; Simonetti, MPB. Farmacologia dos anestésicos locais, em Imbelloni, LE. *Tratado de anestesia raquidiana*, Rio de Janeiro, 2001; p22-35.

Wee S, Gombotz WR. Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv Rev.* 199; 31(3):267-285.

Woolf, C.J. Pain. *Neurobiological Disease*, v.7, n.5, p.504-510, Oct. 2000.

You J, Peng C. Calcium-alginate nanoparticles formed by reverse microemulsion as gene carriers. *Macromol. Symp.* 2005; 219: 147-153.

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

Zahoor A, Sharma S, Khuller GK. Chemotherapeutic evaluation of alginate nanoparticle-encapsulated azole antifungal and antitubercular drugs against murine tuberculosis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2007; 3: 239–243.

7. ANEXO 1



UNIVERSIDADE
SÃO FRANCISCO

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Bragança Paulista, 29 de Outubro de 2010.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Avaliação Farmacocinética e estudos de toxicidade de nanopartículas de alginato contendo bupivacaina.

ÁREA DE CONHECIMENTO: Odontologia

Autor(es): Prof(a). Dr (a). Giovana Radomille Tofoli; Juliana Zampoli Boava Papini.

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 001.09.10

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em expressamente no dia 29/10/2010 a pendência do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: Aprovado

Carlos Augusto Real Martinez
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco