

I WORKSHOP TEMÁTICO

NOVAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DE ANESTÉSICOS LOCAIS DE AÇÃO PROLONGADA: DO DESENVOLVIMENTO AO TESTE CLÍNICO ODONTOLÓGICO

LIVRO DE RESUMOS

06 e 07 de março/2009

**Local: Sala da Congregação do Instituto de
Biologia/Unicamp**

Comissão Organizadora

Dra. Eneida de Paula (IB/Unicamp)

Dr. Francisco Carlos Groppo (FOP/Unicamp)

Dr. Leonardo Fernandes Fraceto (Unesp/Sorocaba)

Dra. Maria Cristina Volpato (FOP/Unicamp)

Apoio Técnico

Maribel Correa da Silva

Programa do Evento

06/03/2009 – Sexta Feira

14:00-14:15h – ABERTURA

– Projetos em Andamento (I) – Do Preparo a caracterização de novas formulações de anestésicos locais

14:15-15:15h - AL em sistemas nanoparticulados - Dr. LEONARDO F. FRACETO

14:15 – Leonardo F. Fraceto – *Nanopartículas poliméricas para liberação de anestésicos locais* (projetos Carolina M. Moraes, Angélica P. Matos, Elisa Buffolo e Lívia Sottovia)

14:35 – Renato Grillo – *Preparo e caracterização de nanopartículas de alginato/quitosana, alginato/AOT para Bupivacaína*

14:55 – Nathalie F. S. Melo – *Nanocápsulas de poli-L-láctico contendo benzocaína*

15:15-16:15h - Anestésicos de uso dérmico - Dra DANIELE RIBEIRO DE ARAÚJO

15:15 – Daniele R. Araújo – *Liberação sustentada de anestésicos na pele* (+ projeto: Sheila Stocco)

15:45 - Patrícia M. W. Zago - *Eficácia anestésica da prilocaína lipossomal, em odontologia.*

16:00 – Patrícia M. W. Zago - *Eficácia anestésica da prilocaína lipossomal em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos.* (IC: Gisele R. Gayoso)

16:15 – 16:45h - CAFÉ

16:45-17:40h - AL em lipossomais, ciclodextrinas e calixarenos - Dra ENEIDA DE PAULA

16:45 – Eneida de Paula: *projetos iniciais: AL e lipid rafts (Bruna Casadei, Leonardo Souza), alterando a formulação lipossomal (Ana Laís Nascimento Vieira), calixarenos (Clóvis Vasconcellos Jr) e dibucaina em ciclodextrina (Vivi Tseng)*

17:00 – Camilla Scarelli: *Oxibuprocaína e proparacaína em lipossomas*

17:20 –Thais F. Souza: *Articaína em lipossomas*

17:40 - Roberta A.F. de Lima: *Complexo tetracaína-ciclodextrina para liberação sustentada*

18:00 - COQUETEL/HAPPY HOUR

07/03/2009 – Sábado

– **Projetos em Andamento (II) – Interação molecular Anestésico vs lipossomas**

8:00-9:00h - COLABORAÇÕES CIENTÍFICAS COM INSTITUTO DE QUÍMICA E FÍSICA/UNICAMP

8:30 – **Gabriela S. Lorite**– *Efeitos do anestésico dibucaína nas propriedades estruturais e elásticas em bicamadas lipídicas*

8:40 – **Luis Fernando Cabeça** – *Topologia de complexos formados entre AL/β-Ciclodextrina/Lipossomas aplicando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear*

9:00 – **Érica C.T. Prates**: *Dinâmica molecular da Articaína em membranas POPC*

– **Projetos em Andamento (III) – Dos testes *in vivo***

9:00-12:10h -Uso clinico das formulações anestésicas de liberação sustentada - Dr FRANCISCO CARLOS GROppo, Dra. MARIA C. VOLPATO E Dr. JOSÉ RANALI

9:20 – **Daniela B. Baroni**- *Efeito da lidocaína lipossomada sobre o ligamento periodontal (técnica intraligamentar) de incisivos de ratos. (IC: Pedro A. T. Leme).*

9:35 – **Daniela B. Baroni**- *Atividade anestésica da lidocaína encapsulada em lipossomas em odontologia.*

9:50-10:20h – CAFÉ

10:20 – **Luciana A. Berto** - *Estudo da eficácia da preparação anestésica local lipossomal de articaína em ratos.*

10:35 – **Luciana A. Berto** - *Eficácia anestésica da mepivacaína lipossomal com epinefrina. (IC: Mariana S. Meirelles)*

10:50 – **Luciana A. Berto** - *Eficácia anestésica da mepivacaína lipossomada sobre a pulpite induzida em ratos. (IC: Tiago M. Dias)*

11:05 – **Michelle Franz Montan** – *Avaliação da eficácia anestésica da ropivacaína lipossomada, como anestésico tópico nas mucosas vestibular e palatina.*

11:20 – **Michelle Franz Montan** – *Avaliação da eficácia anestésica e da concentração plasmática da ropivacaína lipossomada após infiltração na maxila .*

11:35 – **Giovana Radomille Tofoli**- *Eficácia anestésica e concentração plasmática de formulações de mepivacaína livre e encapsulada em lipossomas após anestesia infiltrativa em humanos (+ IC Tatiane Guerreiro)*

11:55 – **Cíntia M.S. Cereda**- *"Avaliação da neurotoxicidade local de formulações anestésicas locais complexadas em ciclodextrina" (+ projeto: Viviane A. Queiroz).*

Reunião dos Pesquisadores Principais

14:00 – 17:00h – Rumos e estratégias para a pesquisa temática no biênio 2010-2011

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA LIBERAÇÃO DE ANESTÉSICOS LOCAIS

Nathalie F.S. de Melo (1), Renato Grillo(1), Livia Sottovia(1), Carolina Moraes Moraes (2), Angélica P. de Matos (2), Elisa Bufolo(2), Eneida de Paula (2), Daniele R. de Araújo (3), André H. Rosa (1), Leonardo Fernandes Fraceto (1,2)

(1) Departamento de Engenharia Ambiental, Unesp/Sorocaba, Sorocaba, São Paulo, Brasil

(2) Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil

(3) Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC - UFABC, Santo André, SP, Brasil

Os anestésicos locais (AL) são moléculas anfifílicas utilizadas no controle da dor crônica ou aguda e que possuem toxicidade proporcional à potência. Os principais efeitos tóxicos dos AL são decorrentes de sua absorção sistêmica, após administração regional, e pode levar à neurotoxicidade e/ou cardiotoxicidade. As características desejáveis para uma molécula anestésica incluem, além de longa duração de ação e da seletividade para o bloqueio sensorial em relação ao bloqueio motor, a diminuição da toxicidade local e/ou sistêmica. Uma alternativa que atualmente tem se mostrado capaz de promover estes efeitos desejáveis é a liberação modificada desses fármacos, através do desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Um exemplo de sistema de liberação de fármacos amplamente utilizado atualmente são os sistemas nanoestruturados poliméricos. Os sistemas nanoestruturados poliméricos (SNP) agem como compartimentos transportadores de fármacos ou outras moléculas ativas e apresentam tamanho inferior a 1µm. Estes sistemas têm a capacidade de alterar as propriedades terapêuticas do fármaco a eles incorporados, levando à inúmeras vantagens, como o aumento da estabilidade do fármaco, liberação mais lenta e prolongada, diminuição da toxicidade, direcionamento a tecidos-alvo, entre outras. Neste trabalho, está sendo realizado o desenvolvimento de diferentes sistemas de liberação utilizando nanopartículas poliméricas para liberação modificada de diferentes anestésicos locais a fim de que estes sistemas possam melhorar as propriedades farmacológicas dos anestésicos locais, objetivando sua futura aplicação clínica. Agradecimentos: Fapesp, CNPq e Fundunesp.

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ALGINATO/QUITOSANA E ALGINATO/AOT PARA BUPIVACAÍNA

Renato Grillo (1), Nathalie F. S. de Melo (1,2), Livia Sottovia (1), Daniele R. de Araújo(3), André H. Rosa (1), Eneida de Paula (2) Leonardo F. Fraceto (1,2)

(1)Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Sorocaba, S/P

(2)Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas S/P

(3)Centro de Ciências humana e Natural, Universidade Federal do ABC, Santo André, S/P

Apesar dos recentes avanços básicos e clínicos a investigação de novos agentes terapêuticos para a administração da dor é ainda um desafio. A bupivacaína (BVC) é um potente anestésico local da classe dos amino-amidas que produz anestesia prolongada, por possuir estereocentro, apresenta dois isômeros, R(+) e S(-) [Goodman *et al.*, 1996 Novas bases terapêuticas, McGraw-Hill]. O uso da BVC foi associado a efeitos cardiotoxícos, que levaram a pesquisa de novos AL, sendo desenvolvido uma nova formulação contendo 25% do isômero R(+) BVC e 75% do isômero S(-) BVC (NOVABUPI®), melhorando o perfil anestésico em relação à mistura racêmica [De Araújo *et al.*, 2006 Rev. Bras. Anestesiologia. 56, 495-506]. Uma alternativa capaz de promover a melhora dos efeitos desejáveis dos AL é a liberação modificada dos fármacos. Nanopartículas de alginato, um polissacarídeo poliânion extraído de algas marrons, foi preparado com o intuito de melhorar a ação farmacológica deste AL (aumentar o tempo de anestesia) bem como reduzir sua toxicidade, local ou sistêmica. O preparo das nanopartículas foi realizado por dois métodos distintos. Nanopartículas de alginato/quitosana foram preparadas por gelificação iônica [Sarmiento *et al.*, 2006 Carbohydrate Polymers 66 1-7] e de Alginato/AOT por dupla emulsão [Chavanpatil *et al.*, 2007 J. Pharm. Scien. 96, 3379-3389]. A BVC foi quantificada por CLAE e a eficiência de encapsulação foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação [Schaffazick *et al.*, 2003 Quim. Nova 26, 726-737]. O tamanho e o potencial zeta das nanopartículas foram determinados utilizando um analisador de tamanho de partículas (Malvern Zetasizer) e ensaios de liberação *in vitro* foram realizados [Paavola *et al.*, 1995 Pharm. Res. 12, 1997-2002]. A quantia de BVC associada às nanopartículas de alginato/quitosana e alginato/AOT foi de 78% e 86%, respectivamente. As nanopartículas de alginato/quitosana apresentaram diâmetro médio de 500nm e valor de potencial zeta de -29,6mV, enquanto que as nanopartículas de alginato/AOT apresentaram diâmetro médio de 633nm e potencial zeta de -7,5mV. A cinética de liberação *in vitro* apresentou diferença na liberação da BVC livre quando comparada a BVC associada às nanopartículas. Este estudo inicial está sendo essencial para o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica de liberação controlada para a BVC, objetivando o tratamento da dor. Agradecimentos: Fapesp, CNPQ and Fundunesp

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI-L-LACTÍDEO CONTENDO BENZOCAÍNA

Nathalie F. S. de Melo (1,2), Renato Grillo (2), Livia Sottovia (2), Daniele R. de Araújo(3), André H. Rosa (2), Eneida de Paula (1) Leonardo F. Fraceto (1,2)

(1) Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Brasil

(2) Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Sorocaba, SP, Brasil

(3) Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC - UFABC, Santo André, SP, Brasil

Os anestésicos locais (AL) são fármacos capazes de bloquear a sensação dolorosa em virtude da sua ligação com canais de sódio voltagem-dependente das membranas neuronais impedindo o influxo dos íons sódio e a propagação do impulso nervoso. [Fraceto *et al.*, 2006 *Biophys. Chem.* 20, 29-39]. A benzocaína (BZC) é um anestésico local que apresenta baixa solubilidade em água, o que limita seu uso em aplicação tópica. Nanopartículas poliméricas de diferentes materiais biodegradáveis são utilizadas como sistemas carreadores de fármacos. O termo nanopartícula refere-se a nanoesferas (NE) e nanocápsulas (NC) que são nanocarreadores com estrutura matricial e vesicular, respectivamente. Trabalhos da literatura descrevem associação de anestésicos locais com micro e nanopartículas poliméricas. [Klose *et al.*, 2006 *Int. J. Pharm.*, 314, 198-206]. Porém para a benzocaína a associação com sistemas de micro e nanoestruturados poliméricos não foram até então avaliados. Neste trabalho, desenvolveu-se nanocápsulas utilizando o polímero biodegradável poli-D,L-lactídeo (PLA) veiculando o anestésico local benzocaína. Este estudo teve como objetivo caracterizar a associação entre a benzocaína e as nanocápsulas de PLA através de medidas de tamanho e potencial zeta, análise de pH da suspensão, quantificação da taxa de associação, ensaio de liberação *in vitro* e preparo de gel de Aristoflex® com a suspensão de NC-PLA com BZC. A BZC foi incorporada em nanocápsulas de poli-L-lactídeo (NC-PLA), preparadas pelo método de nanoprecipitação. A BZC foi quantificada por CLAE a partir de curva analítica validada, o potencial zeta e o tamanho das partículas foi determinado utilizando um analisador de tamanho de partículas (Malvern Zetasizer). A BZC livre foi determinada utilizando-se o método de ultrafiltração/centrifugação. O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado utilizando-se um modelo de dois compartimentos [Paavola *et al.*, 1995 *Pharm. Res.*, 12, 1997-2002]. O diâmetro das NC-PLA contendo BZC variou entre 90,7 nm e 133,1 nm. O potencial zeta das partículas variou entre -12,4 mV e -40,4 mV, indicando estabilidade das formulações. A suspensão de NC-PLA contendo BZC mostrou-se estável no período de 60 dias de armazenamento em temperatura ambiente devido a pequena variação pH e acompanhamento da dispersão de luz das formulações. A quantidade de BZC associada às NC-PLA variou entre 47% e 72%. O ensaio de liberação *in vitro* para NC-PLA com BZC e para o gel contendo NC-PLA com BZC demonstrou liberação sustentada durante 8 h indicando que a associação da BZC com as NC-PLA modifica o perfil de liberação deste fármaco. Este trabalho abre perspectivas para utilização futura de nanopartículas contendo o anestésico local benzocaína para tratamento da dor. Agradecimentos: Fapesp, CNPq and Fundunesp.

LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE ANESTÉSICOS LOCAIS NA PELE E MUCOSAS

Cristina Padula(1), Patrizia Santi(1), Sheila Stocco(2), Nathalie F.S. Melo(2), Giovana R. Tófoli(2), Cíntia M. S. Cereda(2), Rui B. Brito Jr. (3), Leonardo F. Fraceto(2,4), Eneida de Paula(2), Daniele R. de Araujo(2,5)

(1) Dip. Farmaceutico, Università degli Studi di Parma-UNIPR

(2) Dep. De Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP

(3) Fac. de Odontologia S. Leopoldo Mandic-SLMandic

(4) Fac. de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista-UNESP

(5) Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC - UFABC

Nas últimas décadas, várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de explorar e inserir as vias de administração tópica e transmucosa como alternativas às vias parenteral e oral. As principais motivações se devem aos fatos de que são vias não invasivas, com vascularização adequada, evitam a biotransformação de primeira passagem e possibilitam a utilização de formas farmacêuticas auto-administráveis, permitindo a adesão ao tratamento. Apesar da grande aplicação em Medicina e Odontologia, os anestésicos locais (AL) apresentam permeabilidade e duração de efeito insuficientes para a manutenção da analgesia por longos períodos [Sudhakar et al., 2006. J. Control. Rel. 114:15-40]. Como alternativas para contornar esses inconvenientes, surgem o desenvolvimento e o futuro uso terapêutico de sistemas inovadores como os bioadesivos (*Patch-non-Patch*[®]) e os géis poliméricos associados a cossolventes e promotores de absorção (*Carbopol*[®]-*Atpeg*[®]-*Span*[®]). Sendo assim, este trabalho visa apresentar os recentes avanços e perspectivas na cinética de permeação, bem como na modulação da liberação e na biocompatibilidade de AL (benzocaína, lidocaína, prilocaína e ropivacaína) a partir de bioadesivos e géis através da pele e mucosas. Os bioadesivos *Patch-non-Patch*[®] (álcool polivinílico 25%-56%w/w; Plastoid E35H-26%w/w; água-13%w/w, glicerina-4%w/w) foram preparados contendo benzocaína ou lidocaína (3, 5, 10 ou 20 % w/w) [Padula et al., 2003. J. Control. Rel. 88:277-285]. Posteriormente, os filmes foram caracterizados quanto ao conteúdo de fármaco, peso, espessura, tensão, deformação, morfologia e ensaios de permeação *in vitro*. Os valores de fluxo obtidos para os bioadesivos contendo benzocaína 3-5% (5,43±1,1 µg.cm⁻² e 11,94±3,5 µg.cm⁻²) foram significativamente diferentes em relação aos cremes comerciais (0,074±0,006 µg.cm⁻²; p<0,001) além de reduzirem o tempo necessário para início de permeação e potencializarem a duração da analgesia (p<0,001), apontando os filmes bioadesivos *Patch-non-Patch*[®] como novos sistemas terapêuticos transdérmicos efetivos para a liberação de AL [de Araujo et al., 2008a. 35 CRS Meeting; de Araujo et al., 2008b. AAPS Meeting]. Com relação à aplicabilidade desses bioadesivos para liberação de AL na pele e mucosas, pretende-se, em etapas posteriores, realizar estudos de biocompatibilidade sobre eritrócitos humanos, cultura de fibroblastos e técnicas histológicas (em andamento). Outra abordagem, refere-se ao desenvolvimento, aos estudos de permeação *ex vivo* e à avaliação da biocompatibilidade de formulações contendo géis poliméricos associados a cossolventes e promotores de absorção (*Carbopol940/980*[®]-*Atpeg400/600*[®]-*Span60*[®]). Os estudos de permeação serão realizados utilizando-se pele de suínos como barreira e, possivelmente, modelos de pele artificiais. Agradecimentos: CAPES, CNPq, FAPESP.

EFICÁCIA ANESTÉSICA DA PRILOCAÍNA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS,
EM ODONTOLOGIA.

Zago, P.M.W. (1); Baroni, D.B. (1); Volpato, M.C. (1); Groppo, F.C. (1), de Paula,
E.(2)

(1) Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp

(2) Instituto de Biologia - Unicamp

O objetivo deste estudo cruzado, duplo-cego e randomizado é avaliar a taxa de sucesso, latência e duração da anestesia pulpar e de tecidos moles das formulações: prilocaína 3% encapsulada em lipossomas, prilocaína 3% e prilocaína 3% com felipressina 0,03UI/mL (solução comercial). Quarenta voluntários saudáveis estão sendo submetidos à infiltração anestésica de 1,8mL das formulações, na região vestibular do canino superior direito. As formulações são aplicadas em 3 sessões, com um intervalo mínimo de uma semana e com ordem de aplicação aleatória. Ao final do procedimento o voluntário assinala a dor sentida durante a infiltração em uma escala analógica visual (EAV). A anestesia pulpar é verificada pela aplicação de estímulo elétrico (pulp tester), sendo a latência medida em intervalos de 2 minutos e a duração em intervalos de 10 minutos. A anestesia em tecidos moles (latência e duração) é avaliada através da resposta do voluntário à pressão na gengiva e verificação do completo retorno à normalidade do lábio superior. Concluídas as três sessões, o voluntário é questionado a respeito da preferência por uma das formulações. Até o momento foram concluídas 52 sessões de aplicação das 120 propostas. Os resultados serão submetidos à ANOVA e comparados através do teste de Friedman ou de Tukey ($\alpha=5\%$). Agradecimentos: Bolsa de Mestrado - CAPES – CNPq.

EFICÁCIA ANESTÉSICA DA PRILOCAÍNA LIPOSSOMAL EM BLOQUEIO DO NERVO ALVEOLAR INFERIOR EM RATOS.

Gayoso, G. R.(1); Zago, P.M.W. (1); Baroni, D.B.(1); Berto, L.A. (1); Groppo, F.C. (1); Volpato, M.C. (1), de Paula, E. (2)

(1) Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp

(2) Instituto de Biologia - Unicamp

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia anestésica (taxa de sucesso, latência e duração da anestesia pulpar) das formulações: prilocaína 3% lipossomal, prilocaína 3% e prilocaína 3% com felipressina 0,03UI/mL (solução comercial), em bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos. Sessenta ratos foram divididos de forma aleatória em 3 grupos (20 animais para cada formulação) e submetidos à anestesia geral (xilazina 10mg/Kg e ketamina 90mg/Kg, IM) para a fixação de 2 fios de cobre aos molares inferiores (um para cada lado da mandíbula). Os fios de cobre foram utilizados como condutores da eletricidade aplicada pelo pulp tester, para testar os parâmetros da anestesia. Após 3 horas desse procedimento, ao retornar da anestesia geral, os animais foram sedados com tiopental sódico (25mg/Kg, IP). Nesta situação os ratos apresentavam-se responsíveis a estímulos e foram submetidos ao bloqueio bilateral do nervo alveolar inferior com a injeção de 0,2 mL da formulação teste em um lado e o mesmo volume de soro fisiológico 0,9% no lado contralateral (controle). O tempo de latência foi verificado em intervalos de 2 minutos e o tempo de duração em intervalos de 5 minutos. Não houve diferenças significantes entre os grupos considerando o sucesso das anestésias (Qui-quadrado, $p > 0,05$) e o tempo de latência (Kruskal-Wallis, $p= 0,8526$). A prilocaína lipossomal apresentou maior duração anestésica quando comparada à prilocaína em solução (Kruskal-Wallis, $p=0,0123$), mas sem diferenças significativas (Kruskal-Wallis, $p=0,1091$) quando comparada com a formulação comercial. A solução de prilocaína lipossomal mostrou-se tão eficaz quanto à solução comercial para o bloqueio do nervo alveolar inferior em ratos. Agradecimentos: Bolsa Iniciação Científica - Fapesp.

ANESTÉSICOS EM SISTEMAS LIPOSSOMAIS, CICLODEXTRINAS E CALIXARENOS

Eneida de Paula (1)

(1) Instituto de Biologia / Unicamp

O laboratório de biomembranas tem uma longa tradição no estudo da interação molecular entre anestésicos locais (AL) e sistemas modelo de membranas usando uma variedade de técnicas espectroscópicas como Ressonância Magnética Nuclear e Eletrônica, fluorescência,..... Com as informações adquiridas sobre as propriedades físico-químicas de mais de uma dezena de AL de uso clínico e sua correlação com alterações estruturais e dinâmicas de bicamadas lipídicas, iniciamos uma linha de pesquisa direcionada a melhorar a biodisponibilidade desses fármacos através do preparo de sistemas de liberação sustentada (drug-delivery), usando como carreadores lipossomas, ciclodextrinas e, mais recentemente, biopolímeros e calixarenos.

Resultados do preparo e caracterização *in vitro* e *in vivo* de formulações lipossomais e complexos de AL em ciclodextrinas serão apresentados pelos 3 palestristas que me seguem. Dentre os projetos em fase inicial no laboratório de Biomembranas, destacamos projetos envolvendo modificação na composição da formulação lipossomal (Ana Laís Nascimento Vieira), preparo de complexo dibucaína:beta-ciclodextrina (Vivi Tseng), testes de toxicidade *in vitro* e preparo de complexo calixareno:tetracaína (Clóvis Vasconcellos Jr), preparo e caracterização de nanopartículas de PLGA contendo dibucaína (Elisa Bufolo), efeito de anestésicos locais em *Detergent-Resistant-Membranes* (Bruna R. Casadei, Leonardo L. Souza), testes com animais para avaliação do efeito anestésico (Viviane A. Queiroz) e determinação da farmacocinética (Tatiane Guerreiro) de formulações de AL de liberação sustentada.

As diferentes formulações de liberação sustentada objetivam aumentar a solubilidade aquosa ou em membranas dos AL, melhorar sua estabilidade química, diminuir ou retardar o clearance plasmático, aumentar o efeito anestésico, diminuir a dose efetiva, diminuir a toxicidade local e ao Sistema Cardio-vascular e Sistema Nervoso Central ou constituir uma alternativa ao uso da associação AL-vasoconstritor, em odontologia. Destas novas formulações, aquelas que se mostrarem mais promissoras depois de testadas em ensaios pré-clínicos poderão vir a se tornar novos produtos farmacêuticos a serem lançados no mercado, em parceria com indústrias farmacêuticas. Agradecimentos: FAPESP (# 06/00121-9), CAPES, CNPq e Faepex/UNICAMP.

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA LIPOSSOMAL PARA OXIBUPROCAÍNA

Scarelli, C. (1), de Paula, E. (1)

(1) Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas-SP, Brasil.

A oxibuprocaina (OBC) é um anestésico local usado em oftalmologia para diagnósticos e procedimentos cirúrgicos de curta duração. Como outros anestésicos da família dos amino-ésteres a OBC é bastante potente (dose clínica = 0,4%), mas possui clearance rápido pelas colinesterases plasmáticas [Covino & Vassalo, *Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico*, 1985]. Lipossomas são sistemas carreadores usados para liberação sustentada de fármacos, que têm sido empregados para aumentar o efeito anestésico e/ou reduzir a toxicidade dos mesmos [Araújo et al *Can. J. Anesth.*, 51:566, 2004]. Nesse estudo determinamos algumas propriedades físico-químicas da OBC como a absorção no ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 305\text{-}308\text{ nm}$) e a fluorescência intrínseca ($\lambda_{\text{em}} = 378\text{ nm}$) em diferentes pH, o pKa (7,6), a solubilidade aquosa (1,95M em pH 5,5) e a meia-vida da hidrólise alcalina 3,75 h) em pH 10,2.

Lipossomas multilamelares foram preparados a partir de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol (4:3:0,07 mol%) e o método de incorporação passiva foi utilizado para a encapsulação da OBC. Os valores do coeficiente de partição da OBC nestes lipossomas (P= 4,2, 9,0 e 116,4 em pH 5, 7,4 e 8,5, respectivamente), determinados por separação de fases, revelaram maior interação da forma neutra da OBC com lipossomas e sua relativa baixa hidrofobicidade, em comparação com outros anestésicos locais estudados [de Paula & Schreier, *S. Biochim. Biophys. Acta* 1240:25, 1995]. Experimentos de cinética de liberação (diálise de equilíbrio) da OBC, na presença e na ausência de lipossomas, foram feitos em pH 7,4 e revelaram liberação sustentada da OBC lipossomal. Testes em eritrócitos indicaram que a encapsulação em lipossomas facilita a ação da OBC em membranas biológicas, pois a concentração para causar hemólise isotônica foi de 1,09mM para OBC e de 0,8mM para OBC lipossomal, em Ht=0,15%. Em testes de citotoxicidade, o sistema lipossomal aumentou a sobrevivência de células fibroblásticas 3T3 expostas à ação da OBC ($\text{IC}_{50\%} = 20\text{ mM}$ com OBC lipossomal e 15mM com OBC livre). A formulação mostrou-se estável por 120 dias de armazenamento a 4°C, sem aumento significativo nos níveis de peróxidos (< 1,4 nM) ou no tamanho médio das partículas (368±83nm). Os resultados obtidos indicam que a formulação de OBC em lipossomas pode ser uma alternativa viável para aumentar a biodisponibilidade deste anestésico e sua ação anestésica. Agradecimentos: FAPESP (Proc. 06/00121-9).

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA PARA ARTICAÍNA

Souza, T. F.(1), de Paula, E.(1)

(1)Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas-SP, Brasil.

Nesse trabalho analisamos as características físico-químicas da Articaína (ATC), um anestésico local do tipo aminoamida e preparamos um sistema para liberação sustentada desse fármaco, em lipossomas, objetivando aumentar sua biodisponibilidade para melhora do efeito terapêutico do mesmo, seja pela diminuição da concentração clínica (4%), seja pela proteção à hidrólise plasmática.

Primeiramente determinamos características ópticas da ATC no UV/Vis como absorção ($\lambda_{\text{máx}}$ 272-273 nm) e fluorescência (λ_{em} 348-353nm), em três pHs (5,0, 7,4 e 10). O valor de pKa, determinado por titulação volumétrica foi de 7,7. Testes de cinética de degradação alcalina não detectaram hidrólise significativa até 5,5h após início do experimento, em pH=9,0, porém o $t_{1/2}$ hidrólise foi determinado em 1,55h, em pH=10. A solubilidade aquosa da forma neutra da ATC foi superior (120mM) a de outros anestésicos locais por nós estudados.

Lipossomas multilamelares preparados a base de fosfatidilcolina de ovo (EPC) foram preparados e a ATC foi incorporada aos mesmos de forma passiva. Tentativas de determinação do coeficiente de partição (P) por separação de fases e fluorescência [de Paula & Schreier, 1995, Biochim. Biophys. Acta 1240:25, 1995] revelaram valores de P muito pequenos ou não detectáveis, porém medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) demonstraram claramente ($\Delta C.S.$, ΔT_1) a interação de hidrogênios do anel tiofênico da ATC com metilenos da cabeça polar de lipossomas unilamelares de EPC, em pH alcalino. Além disso, ensaios com lipossomas gigantes mostraram que a ATC (10mM) interage com os componentes da membrana e é capaz de romper as vesículas, em pH 5,5.

Testes de liberação *in vitro* demonstraram que a incorporação da ATC em lipossomas retarda a liberação de droga em solução aquosa a pH 7,4, evidenciando a interação anestésico/membrana.

Na seqüência desta pesquisa pretendemos avaliar a estabilidade física e química da formulação em função do tempo de armazenamento, testar sua citotoxicidade em cultura de células fibroblásticas e realizar testes de avaliação do potencial antinociceptivo da nova formulação, em animais. Agradecimentos: FAPESP (Proc. 06/00121-9)

COMPLEXO TETRACAÍNA: HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA PARA LIBERAÇÃO SUSTENTADA

Roberta Aline Franco de Lima (1), Marcelo Bispo de Jesus (1), Eneida de Paula (1)

(1) Instituto de Biologia – UNICAMP

Os anestésicos locais são fármacos empregados para alívio da dor aguda ou crônica, bloqueando a condução do estímulo doloroso em membranas neuronais. A tetracaína (TTC) é um anestésico da classe dos amino-ésteres que vem sendo usado na prática clínica, principalmente em procedimentos oftalmológicos que requerem anestesia tópica, como intervenções da córnea [Rang et al., Farmacologia, 5^a. ed., 2004]. Apesar da elevada potência anestésica a aplicação da TTC é limitada pela baixa estabilidade química (hidrólise por esterases plasmáticas) e relativa toxicidade sistêmica [Miyoshi et al., Reg. Anesth. Pain Med. 23:176, 1998]. Como alternativa para melhorar o perfil farmacológico da TTC foi utilizada β -ciclodextrina (β -CD), uma vez que sistemas de liberação modificada de fármacos têm sido amplamente utilizados e se tornado cada vez mais viáveis economicamente [Murtaza et al., J. Pharm. Tox. Meth. 46: 131-136, 2002]. Estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram a formação de complexos na estequiometria 1:1, entre TTC e β -ciclodextrina [Fernandes et al, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 57: 395, 2007]. Neste trabalho preparamos e caracterizamos complexo formado entre TTC e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β CD) e mostramos resultados preliminares de testes de toxicidade e avaliação da atividade anestésica.

Medidas de titulação por fluorescência permitiram a determinação da estequiometria do complexo de inclusão como sendo 1:1 e da constante de ligação ($K_b = 4015 \text{ M}^{-1}$), indicando a ocorrência de interação estável para o complexo, em pH 7,4. A formação do complexo de inclusão TTC: HP- β CD resultou em diminuição da toxicidade induzida pela TTC em culturas de células de fibroblastos 3T3. Testes em animais (bloqueio do nervo infra-orbital, em ratos estão sendo feitos para avaliar o efeito antinociceptivo do complexo TTC: HP- β CD, em relação a tetracaína livre. Agradecimentos: FAPESP (Proc. 06/00121-9)

EFEITOS DO ANESTÉSICO DIBUCAÍNA NAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E ELÁSTICAS EM BICAMADAS LIPÍDICAS

Lorite G.S (1), Zaniquelli, M.E.D(1), de Paula E.(2), Cotta M.A(1).

(1) Instituto de Física/Unicamp

(2) Instituto de Biologia/Unicamp

Bicamadas fosfolipídicas sustentadas têm sido usadas como modelos para investigar as propriedades de membranas biológicas e processos associados, tais como reconstituição molecular e catálise enzimática. Por outro lado, o efeito de anestésicos locais (LA) nas propriedades estruturais e dinâmicas de membranas lipídicas pode ser a chave para compreender o seu mecanismo de ação.

Neste trabalho, nós mostramos imagens de microscopia de força atômica (AFM), adquiridas em tempo real, para investigar o efeito de interação entre o anestésico local dibucaína (DBC) e domínios fosfolipídicos. As bicamadas fosfolipídicas foram obtidas a partir de fosfatidilcolina de ovo (EPC) e dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), através do método de fusão de vesículas sobre mica. Imagens de topografia e fase foram adquiridas por AFM, tanto para caracterização topográfica, como para observação da ação da DBC (adicionada gradualmente, durante a aquisição) sobre a bicamada. As medidas foram realizadas em modo não contato, em meio aquoso.

As imagens AFM mostram que as bicamadas de EPC se formam em domínios sobre a mica e não apresentam um formato típico nem distribuição uniforme. Por outro lado, bicamadas de DMPC se formam em domínios extensos, com multi camadas e de maneira mais homogênea que as bicamadas de EPC. Em ambos os casos os valores obtidos para a altura das camadas são compatíveis com a literatura. No caso de bicamadas de EPC, observamos a ação da DBC em função da concentração de DBC e ao longo do tempo. A sequência de imagens topográficas mostra o desaparecimento de arranjos lipídicos com o aumento da concentração de DBC. Também observamos que para concentrações elevadas (5mM) o efeito da DBC na membrana é muito drástico. Já para bicamadas de DMPC, observamos as alterações morfológicas para única concentração de DBC (5mM) ao longo do tempo. Neste caso, apesar da concentração elevada, o desaparecimento das bicamadas ocorreu lentamente em comparação com as bicamadas de EPC (2h30). Em ambos os casos, as imagens de fase mostram modificações na superfície da bicamada, indicando alterações nas propriedades elásticas da mesma na presença de DBC. Mudanças na tensão e elasticidade superficiais em monocamadas destes lipídios na presença de DBC pelo método de gota pendente corroboram esta hipótese.

TOPOLOGIA DE COMPLEXOS FORMADOS ENTRE α/β -
CICLODEXTRINA/LIPOSSOMAS APLICANDO TÉCNICAS DE RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR - RMN

Luís Fernando Cabeça (1), Eneida de Paula (2), Anita Jocelyne Marsaioli (1)

(1) Depart. de Química Orgânica, Instituto de Química, UNICAMP, SP, Brasil

(2) Depart. de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, SP, Brasil

Os lipossomas são vesículas constituídas de uma ou mais camadas de lipídios separados por compartimentos aquosos que são usados no campo farmacêutico como agentes carreadores e sistemas liberadores de drogas devido sua versatilidade e eficiência clínica [Mareuil, 2002 Antiviral Res., 54 175-188]. A liberação controlada de anestésicos locais (ALs) encapsuladas leva a uma melhor resposta farmacológica, menor toxicidade e com maior absorção do que os correspondentes ativos livres [Batista, 2007 J. Pharm. Sci., 43 167-179]. Para tanto, hoje existem várias formulações para encapsular fármacos em ciclodextrinas, em lipossomas e em ambos que permitem uma maior carga do princípio ativo [Cereda, 2006 J. Anaesth., 53 1092-1097; Torchilin, 2005 Nature Rev. Drug. Disc., 4 145-160].

Neste aspecto, o estudo das interações de princípios ativos com lipossomas e ciclodextrinas por RMN pode levar à melhor compreensão destas interações e eventual desenvolvimento de fármacos e princípios ativos mais eficientes, aumentando, dessa forma, a eficácia terapêutica e retendo sua estrutura e atividade por mais tempo [Fraceto, 2002 Biophys. Chem., 99 229-243]. O acesso preciso das interações moleculares estabelecidas entre fármacos/ β -CD e fármacos/ β -CD/lipossomas foram realizadas por técnicas de RMN como ROESY1D, DOSY e Diferença de Transferência de Saturação (STD) para o anestésico local prilocaína nos diferentes pH 10, 7 e 5,5.

A análise da formação do complexo (regime rápido) entre PLC [10mM] e β -ciclodextrina [10mM] foi comprovado primeiramente através de espectros de RMN ^1H , que registraram variações significativas no deslocamento químico dos hidrogênios aromáticos da PLC nos pH 10, 7,0 e 5,5 quando em contato com a β -CD. O complexo PLC/ β -CD também foi investigado por ROESY1D com incrementos de r_{Oe} intermoleculares no complexo PLC/ β -CD no hidrogênio 6 e hidrogênios aromáticos da PLC em todos os pH quando o hidrogênio 3 da β -CD foi irradiado.

O complexo PLC/ β -CD foi adicionado à lipossomas multilamelares (EPC, 5mM) de 400 nm, passando imediatamente a formar o complexo PLC/EPC. A confirmação do novo complexo foi obtida através de experimentos de STD nos três pHs (10, 7 e 5,5).

Todos os complexos foram avaliados através de experimentos de difusão RMN-DOSY, que fornece a constante de associação. Agradecimentos: IQ-UNICAMP, CNPq, FAPESP

DINÂMICA MOLECULAR DE ARTICAÍNA NEUTRA EM MEMBRANAS POPC

Érica Teixeira Prates (1), Mónica Pichkolz (2), Munir Salomão Skaf (1)

(1) Instituto de Química / UNICAMP, Campinas - SP, Brasil.

(2) Instituto de Biologia / UNICAMP, Campinas - SP, Brasil.

O anestésico local (AL) de nome usual articaína (ATC) é uma droga eficaz, de baixa toxicidade e de amplo uso odontológico e dermatológico. Trata-se de um AL pertencente à classe das amino-amidas. Peculiarmente, apresenta um anel tiofeno e um grupo éster ligado a ele, o qual contribui para o rápido metabolismo da droga, pois é hidrolisada enzimaticamente a ácido articaínico. Diferente de outros AL presentes na clínica, ainda há poucos trabalhos publicados a respeito da ATC em membranas biológicas sob uma perspectiva molecular. No presente trabalho foram empregados métodos teóricos (métodos quânticos e, essencialmente, Dinâmica Molecular, DM) para estudar a interação da ATC com bicamadas fosfolipídicas. Inicialmente, a molécula de ATC neutra foi cuidadosamente parametrizada de acordo com o modelo CHARMM27 [MacKerell et al., J. Phys. Chem B 102:3586, 1998] e, então, a partir de simulações da ATC em solução aquosa, foram detalhados aspectos estruturais e conformacionais de seus isômeros ópticos. Também foram feitas oito simulações de DM, de 10-20 ns, de uma única ATC neutra próxima a uma bicamada de 126 lipídios POPC (1-palmitoil-2-oleil-*sng*licerol- 3-fosfatidilcolina). Usando o ensemble Np_zAT , a área por lipídio foi fixada em diferentes valores em torno do valor médio encontrado experimentalmente. Em cada sistema simulado, as rodadas iniciaram-se com uma única ATC aleatoriamente posicionada na fase aquosa. Em quatro das simulações conduzidas, poucos nanossegundos foram suficientes para observar a ATC cruzar a interface em direção à membrana. Através de análises tradicionais, como perfil de densidade eletrônica e estatística de ligações de hidrogênio, verificou-se que, independente da área por lipídio, a ATC neutra posiciona-se, preferencialmente, próxima às cabeças polares lipídicas e, eventualmente, interage com os átomos de oxigênio das moléculas de POPC via ligações de hidrogênio. O mesmo não ocorre com outros AL já estudados como lidocaína [Högberg et al. Biophys. Chem. 125:416, 2007], prilocaína, [Pickholz et al, Intl J. Quantum Chem.108:2386, 2008], etidocaína e bupivacaína, os quais são majoritariamente situados no interior hidrofóbico da membrana. Foi verificada grande concordância entre nossos resultados e os obtidos experimentalmente, por Ressonância Magnética Nuclear [Song et al Eur. J. Pharm. Sci. 33:399, 2008; Fraceto et al, em andamento]. Agradecemos à FAPESP pelo suporte financeiro (# 07/02629-2).

EFEITO DA LIDOCAÍNA LIPOSSOMADA SOBRE O LIGAMENTO PERIODONTAL DE INCISIVOS DE RATOS.

Leme P.A.T (1), Baroni D.B. (1), Zago P.M.V. (1), Berto L.A. (1), Franz-Montan M. (1), Groppo F.C. (1), De Paula E. (2), Volpato, M.C. (1)

(1) Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

(2) Instituto de Biologia – UNICAMP.

A eficácia da lidocaína em preparação lipossomal foi demonstrada em bloqueio sensorial e motor em ratos (Cereda C. M. S. & colaboradores, 2006, Canadian Journal of Anesthesia, 53(11): 1074-7). Este estudo tem por objetivo avaliar as alterações causadas pela administração de preparação lipossomal de lidocaína 2% em anestesia intraligamentar em ratos, comparando com a administração de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000. Vinte e quatro ratos, divididos em 2 grupos (1 para cada solução em estudo) receberam 0,05ml injeção intraligamentar na face distal do incisivo superior direito. As injeções foram realizadas com dispositivo de injeção com velocidade controlada em 0,1ml/min (Morpheus). O incisivo superior esquerdo recebeu pela mesma técnica 0,05ml de solução de NaCl 0,9%. Nos tempos 6h e 24h após as injeções, 6 animais de cada grupo foram sacrificados e a maxila removida e fixada em formol 10%. Terminada esta etapa, as peças foram descalcificadas em EDTA 4% e diafanizadas com xilol. A etapa de confecção de lâminas ainda está em andamento. Estão sendo obtidos cortes no sentido transversal (mésio-distal) dos dentes, de 5µm de espessura. Após esta etapa, as lâminas serão coradas com picrossírius e tricrômico de Gomori e analisadas ao microscópio óptico para avaliação qualitativa de fibras colágenas e elásticas e com hematoxilina e eosina para avaliação do infiltrado inflamatório. A possível inflamação decorrente da administração será classificada em escores (0- tecido normal; 1- infiltrado inflamatório leve; 2- infiltrado inflamatório moderado; 3- infiltrado inflamatório intenso; 4- infiltrado inflamatório intenso com áreas de necrose tecidual). Os resultados serão avaliados pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5%. Agradecimentos: Bolsa Iniciação Científica FAPESP.

ATIVIDADE ANESTÉSICA DA LIDOCAÍNA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS NA ODONTOLOGIA.

Baroni D.B. (1), Zago P.M.V. (1), Groppo F.C. (1), De Paula E. (2) Volpato, M.C. (1)

(1) Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

(2) Instituto de Biologia – UNICAMP.

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia anestésica de lidocaína encapsulada em lipossomas em anestesia tópica sobre a mucosa palatina. O estudo é cruzado e duplo-cego, com ordem de aplicação aleatória dos anestésicos e com intervalo de uma semana entre as aplicações. Até o momento, foram selecionados 28 voluntários de um total de 40. Os seguintes anestésicos tópicos (100mg) estão sendo comparados: lidocaína 5% encapsulada em lipossomas, lidocaína 2,5% encapsulada em lipossomas, pomada de lidocaína 5% (Xylocaina® pomada - AstraZeneca), EMLA® (EMLA creme - AstraZeneca), gel placebo e gel placebo lipossomal. Em cada sessão são aplicados topicamente, de forma aleatória, dois anestésicos tópicos durante dois minutos, um na mucosa palatina da região do canino superior direito e outro na mucosa palatina da região do canino superior esquerdo, totalizando três sessões por voluntário. Previamente à aplicação dos géis, a mucosa é seca com uma gaze estéril. Logo após a aplicação, é introduzida uma agulha curta 30G no local, sendo injetado 1/6 de tubete de solução de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000. Em seguida é avaliada a percepção dolorosa à punção e à injeção em duas escalas analógicas visuais. Após a avaliação dos parâmetros de dor em mucosa palatina através das escalas analógicas visuais, é aplicado um questionário no qual os voluntários avaliam os anestésicos utilizados no estudo quanto ao conforto da injeção e sabor, e qual dos géis utilizados teriam preferência em reutilizar, caso necessitassem de anestesia em mucosa palatina. Até o presente momento, não é possível quantificar os resultados, já que é um estudo duplo-cego e a fase experimental ainda não chegou ao fim. Os resultados serão submetidos à ANOVA e comparados através do teste de Friedman ou de Tukey ($\alpha=5\%$). Agradecimentos: Bolsa Mestrado FAPESP (#2007/05850-1).

ESTUDO DA EFICÁCIA DA PREPARAÇÃO ANESTÉSICA LOCAL LIPOSSOMAL DE ARTICAÍNA EM RATOS

Luciana Aranha Berto (1), Eneida de Paula (2), Maria Cristina Volpato (1), Francisco Carlos Groppo (1)

(1) Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp

(2) Instituto de Biologia/ Unicamp

Este estudo tem como objetivo avaliar a eficácia anestésica de duas formulações lipossomais injetáveis de articaína (3% e 4%), comparando-as com uma solução comercial de articaína 4% com epinefrina 1:100.000, em dois modelos animais. Para a avaliação da eficácia anestésica estão sendo utilizadas a técnica do bloqueio do nervo infra-orbital (experimento 1) e a técnica do bloqueio do nervo alveolar inferior (experimento 2). Em ambos os experimentos estão sendo formados, aleatoriamente, 4 grupos de 8 animais (totalizando 64 ratos), que recebem a injeção de uma das seguintes soluções: Grupo 1: articaína 4% com epinefrina 1:100.000; Grupo 2: preparação anestésica local lipossomal de articaína a 4%; Grupo 3: preparação anestésica local lipossomal de articaína a 3%; e Grupo 4: solução de lipossomas 4mM sem anestésico local. Os lados contralaterais recebem NaCl 0,9% (controle). No experimento 1, já concluído, os animais receberam 0,1mL das soluções próximo ao forame infra-orbitário de um dos lados do rato, de forma aleatória. Foi avaliado o tempo de anestesia da região através do pinçamento vigoroso do lábio superior, a cada 5 minutos, até que fosse obtido o primeiro sinal de resposta aversiva do animal, indicando o final da anestesia. As médias de duração de anestesia em tecido mole para os grupos 1, 2 e 3 foram, em minutos, 145,6; 128,1 e 123,7, respectivamente. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os Grupos 1, 2 e 3 (ANOVA, $p=0,5873$). O Grupo 4 não teve o lábio anestesiado. No experimento 2, ainda não concluído, as soluções estão sendo depositadas próximo ao forame mandibular de um dos lados do rato, sendo avaliados os parâmetros sucesso da anestesia, tempo de latência e tempo de anestesia pulpar, por estímulo elétrico (“pulp tester”). Previamente às injeções, são fixados fios de cobre às superfícies oclusais dos molares inferiores do animal, em ambos os lados, após anestesia geral (ketamina e xilazina) Pelo contato do pulp tester com a extremidade livre do fio de cobre é que se dá o estímulo elétrico. A análise estatística dos dados será feita através do teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%. Agradecimentos: Bolsa de mestrado concedida pela Fapesp (#2007/05734-1).

EFICÁCIA ANESTÉSICA DA MEPIVACAÍNA LIPOSSOMAL COM EPINEFRINA EM RATOS

*Mariana Silveira Meirelles (1), Luciana Aranha Berto (1), Eneida de Paula (2), Maria
Cristina Volpato (1), Francisco Carlos Groppo (1)*

(1) Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp

(2) Instituto de Biologia/ Unicamp

Estudos prévios demonstraram a eficácia da solução lipossomal de mepivacaína 2%. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição da epinefrina 1:100.000 sobre a eficácia anestésica da solução de mepivacaína 2% lipossomal. Foi utilizada a técnica do bloqueio do nervo infra-orbital em ratos [Fink et al, 1975 *Anesthesiology* 42 731–6]. 30 animais foram divididos em 3 grupos e, previamente aos experimentos, foram levemente sedados com tiopental sódico (25mg/kg) via intraperitoneal. Após a sedação, os animais receberam em um dos lados da maxila, de forma aleatória, a injeção de 0,1mL de uma das seguintes soluções: Grupo 1: mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000; Grupo 2: mepivacaína 2% lipossomal com epinefrina 1:100.000 e Grupo 3: mepivacaína 2% lipossomal. A injeção foi feita no forame infra-orbital do rato e o lado oposto recebeu o mesmo volume de solução de NaCl 0,9%. A cada 5 minutos foi realizado o pinçamento vigoroso do lábio do animal para avaliação da duração da anestesia em tecido mole. As médias de duração da anestesia em tecido mole foram, em minutos, 109,5; 124,5 e 107,5, para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os 3 grupos estudados (ANOVA, $p= 0,587$). Concluímos que a adição de epinefrina à preparação lipossomal de mepivacaína 2% não alterou sua eficácia anestésica em tecidos moles de rato. Agradecimentos: Bolsa de Iniciação Científica concedida pela Fapesp.

EFICÁCIA ANESTÉSICA DA MEPIVACAÍNA LIPOSSOMAL SOBRE PULPITE INDUZIDA EM RATOS

Tiago Monteiro Dias (1), Luciana Aranha Berto (1), Eneida de Paula (2), Maria Cristina Volpato (1), Francisco Carlos Groppo (1)

(1) Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp

(2) Instituto de Biologia/ Unicamp

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia anestésica da mepivacaína 3% lipossomal no bloqueio do nervo alveolar inferior (NAI) de ratos com pulpíte induzida. Foram utilizados 45 ratos aleatoriamente divididos em 3 grupos. Os animais tiveram os primeiros molares inferiores direito e esquerdo submetidos à abertura coronária e à indução de pulpíte, após anestesia geral com ketamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Após 24 horas, os ratos tiveram um fio de cobre fixado à superfície oclusal dos molares inferiores de ambos os lados da mandíbula e receberam próximo ao forame mandibular de um dos lados, para bloqueio do NAI, a injeção de 0,2 mL de uma das seguintes soluções: Grupo 1: mepivacaína 3% lipossomal; Grupo 2: mepivacaína 3%; Grupo 3: mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000. O lado oposto recebeu o mesmo volume de NaCl a 0,9%. Foram avaliados os parâmetros sucesso da anestesia, latência e duração da anestesia pulpar, por estímulo elétrico (“pulp tester”). O índice de sucesso da anestesia foi de 26,7%, 53,3% e 46,7%, para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente. A média do tempo de latência foi, em minutos, 4,6; 5,6 e 6,2, e a média do tempo de anestesia pulpar foi, em minutos, 13,3; 9,4 e 14,2, para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados com relação aos parâmetros duração da anestesia pulpar (ANOVA, $p=0,54$) e latência (ANOVA, $p=0,50$). O sucesso de anestesia foi menor para o Grupo 1 que para os Grupos 2 e 3 e os dois últimos não diferiram entre si (teste do Qui-quadrado). Concluímos que a adição de lipossomas à solução de mepivacaína não trouxe benefícios em termos de eficácia anestésica e que a solução de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 obteve a mesma eficácia que a solução a 3% sem vasoconstritor, apesar de ter uma concentração menor do anestésico. O modelo utilizado foi satisfatório para mimetizar a dificuldade de anestesia encontrada em condições inflamatórias. Agradecimentos: Bolsa de Iniciação científica concedida pela Fapesp.

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANESTÉSICA DA ROPIVACAÍNA LIPOSSOMADA, COMO ANESTÉSICO TÓPICO NAS MUCOSAS VESTIBULAR E PALATINA.

Michelle Franz-Montan (1), Eneida de Paula (2), Francisco Carlos Groppo (1), André Luis Rotolo Silva (2), José Ranali (1), Maria Cristina Volpato (1)

(1) Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas

(2) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia anestésica de ropivacaína encapsulada em lipossomas em anestesia tópica em 2 estudos, cruzados, duplo-cegos e com ordem de aplicação aleatória, com intervalo de 1 semana entre as aplicações. **Estudo 1:** foram comparadas a eficácia da anestesia tópica e a influência na resposta pulpar (estímulo elétrico) da ropivacaína 2% encapsulada em lipossomas (RL2), Benzocaína 20% (Benzotop®, DFL - B20), gel placebo lipossomal (PL) e gel placebo (P) aplicados em mucosa vestibular dos incisivos laterais superiores, em 40 voluntários. Os anestésicos foram aplicados bilateralmente e mantidos na região durante 30 minutos. Após este período, as formulações tópicas foram removidas e foi simulada uma anestesia local nas regiões de aplicação para verificar a eficácia em reduzir dor à punção com uma agulha odontológica curta 30G. A quantificação da dor foi feita através de uma escala analógica visual (EAV). O tempo de duração de anestesia em gengiva foi verificado através de estímulo físico. RL2 foi tão eficaz quanto B20 em reduzir dor à punção e na duração de anestesia em tecidos moles ($p > 0,05$) e ambas foram superiores às formulações PL e P ($p < 0,05$). Nenhuma das formulações exerceu influência na resposta pulpar. **Estudo 2:** ropivacaína 2% encapsulada em lipossomas (RL2), ropivacaína 1% encapsulada em lipossomas (RL1), mistura eutética de lidocaína 2,5% e prilocaína 2,5% (EMLA® creme, AstraZeneca) e gel placebo lipossomal (PL) foram avaliados quanto à eficácia em reduzir dor à punção e à injeção de anestésico local, quando aplicados topicamente na região palatina do canino superior esquerdo durante 5 minutos. Decorrente o tempo de aplicação, foi feita a punção na região, seguida da injeção de uma solução de lidocaína a 2% com epinefrina 1:100.000. A quantificação de dor pelos voluntários foi feita através da EAV em cada momento distinto. O EMLA foi mais efetivo em diminuir a dor à punção ($p < 0,05$), porém nenhuma das formulações testadas foi eficaz em diminuir a dor decorrente da injeção ($p > 0,05$). Nenhuma das formulações lipossomais foi eficaz como anestésico tópico na mucosa palatina. **Conclusão geral:** a ropivacaína encapsulada em lipossomas na concentração de 2%, por apresentar eficácia semelhante à da benzocaína 20% em aplicação tópica na mucosa vestibular, pode ser numa opção a esse anestésico, no entanto a ropivacaína encapsulada em lipossomas a 1 e 2% em administração tópica palatina não apresentou eficácia anestésica comparável ou superior às preparações não-lipossomais, não havendo vantagem no seu uso. Agradecimentos: Bolsa Doutorado FAPESP (2006/53255-2).

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANESTÉSICA E DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA ROPIVACAÍNA LIPOSSOMADA APÓS INFILTRAÇÃO NA MAXILA.

Michelle Franz-Montan (1), Cristiane de Cássia Bergamaschi (1), Eneida de Paula (2), Francisco Carlos Groppo (1), José Ranali (1), Maria Cristina Volpato (1)

(1) Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas

(2) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficácia anestésica e a concentração plasmática da ropivacaína a 0,5% encapsulada em lipossomas após anestesia infiltrativa, em 2 estudos, cruzados, duplo-cegos e com ordem de aplicação aleatória, com intervalo de 1 semana entre as aplicações. **Estudo 1:** 40 voluntários receberam a injeção na região de fundo de sulco vestibular do canino superior direito de 1,8mL de ropivacaína 0,5% encapsulada em lipossomas (RLipo), ropivacaína 0,5% com epinefrina 1:200.000 (Repi), ropivacaína a 0,5% (R) e lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Lepi). Foram avaliadas latência e duração da anestesia pulpar por aplicação de estímulo elétrico e em tecidos moles por estímulo de pressão. Não houve diferença estatística entre os anestésicos com relação ao tempo de latência. Repi e Lepi apresentaram maior tempo de anestesia pulpar quando comparados à RLipo e R ($p < 0,05$). Repi promoveu anestesia mais prolongada em gengiva do que os outros anestésicos ($p < 0,05$). A formulação lipossomal de ropivacaína não foi eficaz em anestesia infiltrativa na maxila. **Estudo 2:** foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os níveis plasmáticos de ropivacaína, após infiltração de 1,8 mL, no fundo de sulco vestibular de canino superior direito, de ropivacaina 0,5 % associada à epinefrina 1:200.000 e ropivacaina 0,5% encapsulada em lipossomas em 14 voluntários. Amostras de sangue foram coletadas antes, e 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 240, 420, 600 e 1440 minutos após a realização das injeções com cada formulação de ropivacaína testada. Os parâmetros farmacocinéticos avaliados foram AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , CL , T_{max} e VD . Não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os parâmetros farmacocinéticos avaliados entre as duas formulações anestésicas. Além disso, não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre as concentrações plasmáticas da ropivacaína entre as duas formulações testadas em cada período avaliado. **Conclusão geral:** apesar da encapsulação da ropivacaína em vesículas lipossomais ter promovido uma redução na absorção da ropivacaína de maneira semelhante à epinefrina, essa formulação não apresentou eficácia anestésica comparável ou superior às preparações não-lipossomais, em técnica infiltrativa na maxila, não havendo vantagem no seu uso. Agradecimentos: Bolsa Doutorado FAPESP (2006/53255-2).

EFICÁCIA ANESTÉSICA E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE FORMULAÇÕES DE MEPIVACAÍNA LIVRE E ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS APÓS ANESTESIA INFILTRATIVA EM HUMANOS.

G. R. Tofoli (1), C.S. Cereda (1), D. R. de Araújo (1,2), M. Franz-Montan (3), F. C. Groppo(3), D. Quaglio(4), F.A. P. Barros (4), E. de Paula (1).

(1)Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Depto de Bioquímica;

(2)Universidade Federal do ABC;

(3) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia, Depto de Ciências Fisiológicas;

(4) CORE, Laboratory of Clinical Analysis.

Objetivos: 1) Avaliar os parâmetros de latência, anestesia pulpar e de tecidos moles, e 2) determinar os níveis plasmáticos obtidos, após a injeção de formulações comerciais e lipossomais de mepivacaína (MVC) na mucosa oral de voluntários. **Métodos:** Trinta voluntários receberam anestésias infiltrativas na região de canino superior direito em quatro sessões distintas, com as seguintes formulações: mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (MVC_{2%EPI}), mepivacaína 3% (MVC_{3%}), mepivacaína 2% e 3% lipossomal (MVC_{2%LUV} e MVC_{3%LUV}). O tempo de latência (TL) e de anestesia pulpar (AP) foram avaliados com aplicação de estímulos elétricos. O tempo de anestesia dos tecidos moles (TM) foi anotado em uma ficha pelos voluntários. Os níveis plasmáticos de mepivacaína foram determinados, com espectrometria de massas, após 0 (baseline), 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos das injeções anestésicas em 16 voluntários. Os dados obtidos foram analisados pelos testes de ANOVA, Tukey-Kramer e Friedman. **Resultados:** Não houve diferença em relação à TL entre as formulações ($p>0,05$). Os tempos de AP e TM obtidos com MVC_{2%EPI} apresentaram maior duração quando comparada às outras formulações ($p<0,05$). A injeção de MVC_{3%LUV} aumentou a duração de AP e de TM quando comparada às injeções de MVC_{2%LUV} e MVC_{3%} ($p<0,05$). A duração de AP e TM obtidas com MVC_{2%LUV} e MVC_{3%} foram similares ($p>0,05$). A concentração plasmática obtida após a injeção de MVC_{2% EPI} não apresentou diferença da obtida após a injeção de MVC_{2% LUV} em todos os tempos analisados ($p>0,05$), com exceção do tempo 120 minutos. As formulações de MVC a 3% apresentaram concentrações plasmáticas maiores que as formulações a 2% em todos os períodos analisados ($p<0,05$). As formulações de MVC livre e encapsulada a 2% não apresentaram diferenças em relação aos parâmetros farmacocinéticos C_{max}; ASC₀₋₃₆₀ e ASC_{0-∞} ($p<0,05$), porém apresentaram menores valores quando comparadas as formulações a 3% ($p>0,05$). T_{max} e t_{1/2} beta não apresentaram diferenças entre as formulações testadas ($p>0,05$). **Conclusão:** A encapsulação de MVC aumentou a duração da anestesia, pois a formulação lipossomal a 3% promoveu aumento nos tempos de AP e TM em relação a formulação comercial com a mesma concentração. Além disso, a formulação lipossomal a 2% promoveu duração de AP e TM similares a formulação comercial a 3%. A encapsulação de MVC a 2% foi eficiente para retardar a absorção do anestésico pois os níveis plasmáticos de MVC lipossomal a 2% foram semelhantes aqueles obtidos com a adição de vasoconstritor.

AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE LOCAL DE FORMULAÇÕES DE ANESTÉSICOS LOCAIS COMPLEXADOS COM CICLODEXTRINA

Cíntia M. S. Cereda (1), Giovana R. Tófoli (1), Daniele R. de Araujo (1,3), Sarah Arana (2) e Eneida de Paula (1)

(1) Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP.

(2) Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

(3) Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC.

Bupivacaína (BVC) e Ropivacaína (RVC) são anestésicos locais (AL) amplamente utilizados em procedimentos cirúrgicos. Novas formulações com AL que utilizam diferentes tipos de carreadores como as ciclodextrinas, têm apresentado resultados promissores, pois mantêm o fármaco por mais tempo no local de ação. Em estudos anteriores, a inclusão de BVC e RVC em hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) aumentou o efeito anestésico comparados aos fármacos em solução [Araujo et al., 2005. Rev. Bras. Anestesiol. 55:316; Araujo et al., 2008. Eur. J. Pharm. Sci. 33:60]. Entretanto, para o desenvolvimento e aplicação futura de novas formulações farmacêuticas como os complexos de inclusão entre BVC ou RVC e HP- β -CD (BVC_{HP- β -CD} e RVC_{HP- β -CD}), a avaliação da toxicidade local torna-se extremamente importante. Então, este estudo tem como objetivo a avaliação histopatológica do nervo ciático de ratos após injeção intraneural de BVC_{HP- β -CD} e RVC_{HP- β -CD}. Os complexos foram obtidos pela mistura equimolar dos AL e HP- β -CD na concentração final de 0,5%. O nervo ciático de ratos (Wistar, n=6/grupo) foi exposto, sem dano à camada de tecido conjuntivo (Iohom et al., 2005, Br. J. Anaesth. 94(4):529), sendo uma agulha 30G introduzida paralelamente à direção das fibras nervosas. Na porção central do nervo, depositou-se 0,1mL das soluções testadas (BVC, BVC_{HP- β -CD}, RVC, RVC_{HP- β -CD}, HP- β -CD, NaCl 0,9% χ ομο χ οντρολε νεγατιβο ε λιδοχαινα - Λ Δ X15% χ ομο χ οντρολε ποσιτιβο). Απ' σ 48 ηορασ, ο νερωο φοι ρετιραδο ε ασ αμοστρασ φιξιαδασ πορ ιμερσ \circ ο εμ γλυταραλδεϋδο-2,5% (24η) χ ομ π' σ-φιξα| \circ ο εμ τετρ' ξιδο δε' σμ ιο-1%. Απ' σ δεσιδρατα| \circ ο, ασ αμοστρασ φοραμ εμβεβιδασ εμ ρεσινα, χ ορτεσ τρ ανσπερσαισ σεμφινοσ (1 μ m) foram obtidos e corados com azul de toluidina-1%. A análise histopatológica da neurotoxicidade foi feita por microscopia de luz com uso de um escore de 0 a 4. Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas na comparação entre as formulações testadas, HP- β -CD e controle negativo (p>0,05). Entretanto, nos animais do grupo controle positivo, observou-se alterações morfológicas severas, com diferenças significantes em comparação com os outros grupos (p<0,001). Os escores médios (mínimo-máximo) foram: 0,60(0,33-0,83); 0,66(0,40-0,83); 0,70(0,25-0,80); 0,33(0,20-0,80); 0,50 (0,33-0,80); 0,50 (0,40-0,60) e 2,65 (2,0-3,25) para BVC, BVC_{HP- β -CD}, HP- β -CD, NaCl-0.9%, RVC, RVC_{HP- β -CD} e LDC, respectivamente. Em conclusão, este estudo mostrou que os complexos de inclusão de BVC e RVC em HP- β -CD não induziram alterações morfológicas significantes em nervo ciático de ratos em concentrações clínicas. Agradecimentos: FAPESP (proc. 06/00121-9 e 07/55189-0).