

ROHNELT MACHADO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE MICROESFERAS DE
BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE 50%: ESTUDO
IN VIVO APÓS BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Bernardo Tenório

Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Tanaka

Coordenador do Programa: Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos

CURITIBA

2010

Oliveira, Rohnelt Machado de

Análise da liberação controlada de microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%: estudo in vivo após bloqueio do nervo ciático de ratos / Rohnelt Machado de Oliveira. – Curitiba, 2010.

85 f: il

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Bernardo Tenório.

Tese – (Doutorado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1.Dor pós-operatória. 2.Liberação controlada de anestésicos locais. 3.Microesferas. 4.Bupivacaina. 5.Ratos Wistar. I.Título.

NLM: WO 300



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS: MESTRADO E DOUTORADO


Ata do julgamento da 131ª Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno ROHNELT MACHADO DE OLIVEIRA sob o **Título:** ANÁLISE DA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE MICROESFERAS DE BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉTRICO DE 50%: ESTUDO EM VIVO APÓS BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS, na **Linha de Pesquisa:** Métodos de Detecção Precoce e Avaliação de Fatores Prognósticos em Afecções Cirúrgicas, **Área de Concentração:** Clínica Cirúrgica, tendo como orientador Prof.Dr. Sérgio Bernardo Tenório.

Às sete horas e trinta minutos do dia cinco de fevereiro de dois mil e dez, no Auditório do 7º andar do prédio central sala 702 do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores David Ferez, Paulo Afonso Nunes Nassif, Jorge Rufino Ribas Timi, Roberto Gomes de Carvalho e Elizabeth Milla Tambara sendo esta última Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora.

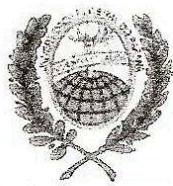

David Ferez


Jorge Rufino Ribas Timi


Elizabeth Milla Tambara


Paulo Afonso Nunes Nassif


Roberto Gomes de Carvalho



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DEFESA DE DOUTORADO**

Aluno ROHNELT MACHADO DE OLIVEIRA

Título da Tese: ANÁLISE DA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE MICROESFERAS
DE BUPIVACAINA EM EXCESSO ENANTIOMÉTRICO DE 50%: ESTUDO EM
VIVO APÓS BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS

CONCEITOS EMITIDOS:

Prof. Dr. David Ferez	conceito emitido	A	equivalência	10,0
Prof. Dr. Paulo Afonso Nunes Nassif	conceito emitido	A	equivalência	10,0
Prof. Dr. Jorge Rufino Ribas Timi	conceito emitido	A	equivalência	10,0
Prof. Dr. Roberto Gomes de Carvalho	conceito emitido	A	equivalência	10,0
Profa. Dra. Elizabeth Milla Tambara	conceito emitido	A	equivalência	10,0

Conceito Final de Avaliação:

Conceito: A Equivalência: 10,0

Curitiba, 05 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. David Ferez

Prof. Dr. Paulo Afonso Nunes Nassif

Prof. Dr. Jorge Rufino Ribas Timi

Prof. Dr. Roberto Gomes de Carvalho

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Rene e Dalva que foram
as sementes da minha educação.

À minha esposa, Eliane com carinho.

As minhas filhas Thays e Amanda que
iluminam o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Tanaka, pela idéia original, orientação, amizade e o apoio de sempre.

Ao Prof. Dr. Sérgio Bernardo Tenório, pela inestimável ajuda na conclusão deste trabalho.

Aos colegas Anestesiologistas do Hospital Nossa Senhora das Graças, pela colaboração e especial agradecimento.

Aos residentes em anestesiologia, Drs. Rodrigo Caíres e Tiago Alencar pela colaboração durante a fase de coleta de dados.

À Dra. Maria Fernanda Torres pelo excelente trabalho logístico durante o manuseio dos animais, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

Ao Sr. Eduardo Tozatto do Centro de Estudos em Equivalência Farmacêutica e Bioequivalência da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto (USP), pela avaliação das concentrações sanguíneas dos animais.

À Sra. Lourdes Pierri pela correção ortográfica.

RESUMO

ANÁLISE DA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE MICROESFERAS DE BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE 50%: ESTUDO IN VIVO APÓS BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO DE RATOS

Justificativa e Objetivos: Benefícios terapêuticos da utilização de anestésicos locais no controle da dor pós-operatória, através de carreadores de liberação controlada. Foi realizada análise da eficácia anestésica *in vivo* de microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (S75-R25). **Método:** Ratos masculinos (Wistar) foram divididos em quatro grupos de acordo com o fármaco injetado no nervo ciático: Grupo A (Microesfera); Grupo B (Microesfera de bupivacaína S50-R50); Grupo C (Microesfera de Bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%); Grupo D (Bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%). A anestesia inalatória sob máscara foi realizada previamente ao bloqueio do nervo ciático (halotano a 2% e O₂ a 100%). A proximidade da ponta da agulha (Stimuplex), no nervo ciático durante o bloqueio foi confirmada por uma contração muscular visível da pata com intensidade de estímulo de 0,2 miliampéres. O bloqueio sensorial foi medido pelo tempo exigido para cada rato retirar a pata de uma placa quente a 56° C, sendo considerado positivo (> 4s). A duração do bloqueio motor foi definida como o tempo após a injeção do medicamento em estudo até a recuperação do escore 2 de critério estabelecido, (dorsiflexão e garras parcialmente flexionadas e aduzidas). O estudo farmacocinético da liberação do anestésico local foi realizado através do sangue dos ratos, obtido por punção cardíaca antes do sacrifício dos animais para o estudo histológico. **Resultados:** Nos grupos B, C e D, a resposta ao teste sensitivo foi significativamente mais frequente do que no grupo A (p < 0,001). Entre os grupos B, C e D, não se observaram diferenças estatisticamente significativas de resposta positiva ao teste sensitivo (p > 0,05). Nos grupos B, C e D, a resposta ao teste motor também foi significativamente mais freqüente do que no grupo A (p = 0,02). Nos grupos B e D, observou-se tendência de maior positividade ao teste motor que no grupo C (p = 0,10). **Conclusões:** A liberação controlada de microesfera de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%, apresentou resultado semelhante em relação à analgesia quando comparado às outras formulações anestésicas com menor bloqueio motor.

Palavras-chave: Dor pós-operatória. Liberação controlada de anestésicos locais. Anestesia local. Microesferas. Bupivacaína. Ratos Wistar.

ABSTRACT

ANALYSIS OF CONTROLLED RELEASE MICROSPHERES BUPIVACAINE ENANTIOMERIC EXCESS 50%: STUDY IN VIVO AFTER BLOCK SCIATIC NERVE IN RATS

Background and objectives: Therapeutic effects from local anesthetics on the control of pos-operative pain using control release carriers. The objective was the analysis of anesthetic efficacy in vivo of 50% enantiomeric excess bupivacaine (S75-R25) loaded-microspheres. **Method:** Wistar male rats were divided in four groups according to the drug used in the sciatic nerve block: Group A (Microspheres); Group B (Bupivacaine S50-R50); Group C (50% enantiomeric excess bupivacaine loaded-microspheres); Group D (50% enantiomeric excess bupivacaine). Mask induction with halothane 2% in oxygen was done before sciatic block. The correct needle position for the block was certified by paw contraction at 0,2 mA stimulus. Sensitive block was considered positive if the rat would stand for at least 4 seconds 56 ° C heats under their paw. Motor block was defined as the time between injection and recovery score 2. Plasmatic concentrations of study drugs were made after their animal death. **Results:** In groups B, C e D positive sensitive block was significant higher then group A ($p < 0,001$). Between groups B, C e D there were no statistic significant differences to the sensitive block ($p > 0,05$). In groups B, C e D positive motor block was significant higher then group A ($p = 0,02$). There were a tendency in groups B e D for higher motor block then group C ($p = 0,10$). **Conclusions:** The controlled release of 50% enantiomeric excess bupivacaine was similar to the anesthetic formulations with less motor block.

Key-words: Pain, postoperative. Controlled release of local anesthetics. Anesthesia, local. Microspheres. Bupivacaine. Rats, Wistar.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - GRUPOS ESTUDADOS.....	34
FIGURA 2 - ANESTESIA GERAL INALATÓRIA NOS RATOS.....	35
FIGURA 3 - ANESTESIA GERAL INALATÓRIA NOS RATOS.....	35
FIGURA 4 - ANESTESIA GERAL INALATÓRIA NOS RATOS.....	36
FIGURA 5 - BLOQUEIO CIÁTICO.....	37
FIGURA 6 - BLOQUEIO CIÁTICO.....	37
FIGURA 7 - BLOQUEIO SENSORIAL.....	39
FIGURA 8 - BLOQUEIO SENSORIAL.....	39
FIGURA 9 - BLOQUEIO MOTOR.....	40
FIGURA 10 - ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO ANESTÉSICO LOCAL.....	41
FIGURA 11 - ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO ANESTÉSICO LOCAL.....	41
FIGURA 12 - ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO ANESTÉSICO LOCAL.....	42
TABELA 1 - RESUMO DOS TESTES SENSITIVO, MOTOR E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO ANESTÉSICO LOCAL.....	44
GRÁFICO 1 - RESPOSTA DO TESTE SENSITIVO NO GRUPO A.....	45
GRÁFICO 2 - RESPOSTA DO TESTE SENSITIVO NO GRUPO B.....	46
GRÁFICO 3 - RESPOSTA DO TESTE MOTOR NO GRUPO B.....	47
GRÁFICO 4 - RESPOSTA DO TESTE SENSITIVO NO GRUPO C.....	48
GRÁFICO 5 - RESPOSTA DO TESTE MOTOR NO GRUPO C	49
GRÁFICO 6 - RESPOSTA DO TESTE SENSITIVO NO GRUPO D.....	50
GRÁFICO 7 - RESPOSTA DO TESTE MOTOR NO GRUPO D.....	51
GRÁFICO 8 - VARIAÇÃO SENSITIVA ENTRE OS GRUPOS.....	52
FIGURA 13 - RESPOSTA HISTOLÓGICA.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AINES -	Antiinflamatórios não esteróides
AL -	Anestésico Local
AMPA -	Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
Å -	Angreston
APEC-	Asia- Pacífico Cooperação Econômica
BS -	Bloqueio Sensitivo
BM -	Bloqueio Motor
COBEA -	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
D(+)-	Isômeros destrorrotatórios
GABA b -	Ácido γ - aminobutírico
5HT ₂ -	5-hidroxitriptamina ₂
5HT _{1b} -	5-hidroxitriptamina _{1b}
IGM -	Imunoglobulina M
IGG -	Imunoglobulina G
K -	Kappa
L(-) -	Isômeros levorrotatórios
LUV -	Vesículas unilamelares
LDL -	Lipoproteína de baixa densidade
MET -	Microscopia eletrônica
MLV -	Vesículas multi
NMDA -	N-metil-D-aspartato
Mm -	micrometro
Nm -	Nanômetros
Nano -	Anão
UP -	Universidade Positivo
PGE ₂ -	Prostaglandinas ₂
pKa -	pH onde o fármaco é 50% ionizado e 50% não ionizado.
PEO -	Copolímeros-bloco / poli(óxido de etileno)
PPO -	Copolímeros-bloco PLGA - ácido poliláctico-co-glicólico
PLA -	Ácido poliláctico
PLGA -	Ácido poliláctico-co-glicólico

R25 -	Destro
R(±) -	Racêmica
RG 503H -	Polímero
RR -	Reflexo da retirada
S75 -	Sinistro
SiO ₂ -	Dióxido de silício
SBED -	Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 O FENÔMENO DA DOR.....	13
2.2 O PAPEL DO ANESTÉSICO LOCAL NO TRATAMENTO DA DOR.....	14
2.3 EVOLUÇÕES DOS ANESTÉSICOS LOCAIS.....	16
2.3.1 Lipossomas.....	19
2.3.2 Ciclodextrinas.....	20
2.3.3 Microesferas.....	20
2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	21
2.4.1 Nanociência.....	22
2.4.2 Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas.....	23
2.4.3 Polímeros biodegradáveis.....	28
2.4.3.1 Polímeros naturais.....	29
2.4.3.2 Polímeros naturais modificados.....	29
2.4.3.3 Polímeros sintéticos.....	29
2.5 BENEFÍCIOS TERAPÊUTICOS.....	30
2.6 A ESCOLHA DA FORMA DE ENTREGA CONTROLADA DO ANESTÉSICO LOCAL.....	31
3 MATERIAL E MÉTODO	32
3.1 PREPARAÇÕES DAS MICROESFERAS DE BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE 50% (S75-R25).....	32
3.2 AVALIAÇÕES DA EFICÁCIA ANESTÉSICA.....	32
3.2.1 Testes do bloqueio nervoso/ sensitivo e motor.....	37
3.3 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO ANESTÉSICO LOCAL.....	41
3.4. ESTUDO HISTOLÓGICO DO NERVO CIÁTICO.....	42
3.5 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	42
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4 RESULTADOS	43
4.1 AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO SENSITIVO.....	43
4.2 AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO MOTOR.....	44

4.3 AVALIAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DAS DROGAS....	52
4.4 RESPOSTAS HISTOLÓGICAS.....	53
4.5 COMPLICAÇÕES.....	54
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS.....	70

1 INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais são medicamentos utilizados para bloquear a condução nervosa e prover anestesia e analgesia (BORGEAT; EKATODRAMIS; SCHENKER, 2003). O principal fator determinante da duração do bloqueio nervoso é o tempo de permanência do anestésico local (AL) junto ao nervo. Um anestésico com elevada meia vida de eliminação seria capaz de prover bloqueio nervoso por tempo maior, porém estes anestésicos mostraram-se mais tóxicos que os demais e hoje não estão disponíveis para uso clínico (SCURLOCK; CURTIS, 1981; LIPFERT; SEITZ; AMDT, 1987). A infusão contínua do (AL) pode causar bloqueio nervoso por tempo ilimitado, porém com o risco de complicações decorrentes da toxicidade sistêmica pela sua absorção sanguínea. A adição de medicamentos que retardem a absorção do (AL), como a adrenalina, ou potencializem seu efeito, como os opióides, não trazem benefícios evidentes e adicionam riscos (MULROY; LARKIN; BATRA, 2001; IFELD. *et al.*, 2003; NEAL. *et al.*, 2002). A partir da década de 1990, foram desenvolvidos métodos para a administração contínua de medicamentos encapsulados em microesferas que possibilitam a sua liberação de modo lento e contínuo no local onde foi depositado (LEGROS; LUO; BOURGEOIS, 1990). Estas microesferas, utilizadas inicialmente para administrar quimioterápicos, são feitas de material biodegradável nos meios biológicos através da ação de fatores físicos, químicos, temperatura e ação enzimática (BLANCO; BERNARDO; GOMES, 1999; ARAÚJO; PINTO; BRAGA, 2003; ARAÚJO; FRACETO; BRAGA, 2005). O encapsulamento do (AL) pode aumentar a duração do bloqueio nervoso conforme estudos experimentais anteriores (MASTERS. *et al.*, 1993). Não há, no entanto, avaliação clínica ou laboratorial da bupivacaína em excesso enantiomérico S75-R25 acondicionada em microesferas.

1.1 OBJETIVO

O presente estudo objetiva analisar a duração do bloqueio motor e sensitivo da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) veiculadas em microesferas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A dor é um fenômeno caracterizado segundo a SBED, por uma experiência sensitiva e emocional desagradável, em que há percepção de um estímulo nocivo associado à lesão tecidual real ou potencial. A dor desempenha uma função biológica essencial, como resposta do organismo a um determinado trauma.

2.1 O FENÔMENO DA DOR

O estímulo doloroso (nocicepção) é gerado nas terminações livres. Estas terminações livres são ramificações periféricas das fibras amielínicas - as fibras C e das fibras mielinizadas de pequeno diâmetro - as fibras A δ , que conduzem o estímulo doloroso desde o local onde houve a agressão tecidual até o corno dorsal da medula espinhal. No corno dorsal da medula, o primeiro neurônio faz sinapse com diferentes tipos de neurônio de 2ª ordem, entre os quais: os neurônios motores no corno ventral, gerando como resposta espasmo muscular; os neurônios do corno intermédio lateral resultando em ativação do sistema nervoso simpático; neurônios dos tratos ascendentes como o trato espinotalâmico conduzindo o estímulo aos centros nervosos superiores. No trajeto até o cérebro, as fibras dos tratos ascendentes fazem sinapse com neurônios do sistema reticular, do sistema límbico, do hipotálamo e do córtex cerebral (CAMPBELL. *et al.*, 1989; CERVERO; TATTERSALL, 1986).

Existem 3 classes de nociceptores: os mecanociceptores, sensíveis a estímulos mecânicos; os termociceptores, sensíveis a estímulos térmicos; e os nociceptores polimodais, que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Quando um estímulo intenso provoca lesão tecidual, há desencadeamento de um processo inflamatório seguido de reparação. As células lesadas liberam enzimas de seu interior que, no ambiente extracelular, ciclizam ácidos graxos de cadeia longa e agem sobre os cininogênios, formando as cininas, principalmente a bradicinina uma substância algógena e vasoativa (CARVALHO; LEMONICA, 1998). A partir da membrana celular, pela ação da fosfolipase A, há liberação de ácido araquidônico que, por ação da cicloxigenase e da lipoxigenase, origina, respectivamente, prostaciclina, prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos e

lipoxinas. A biossíntese de prostaglandinas, principalmente PGE_2 , promove diminuição do limiar de excitabilidade dos nociceptores, fazendo com que estímulos menos intensos sejam capazes de ativá-los (BESSON, 1999; GOZZANI, 2000).

Em resumo, se um estímulo nociceptivo é capaz de ocasionar uma sensação dolorosa, a lesão tecidual que ele poderá provocar será responsável por uma série de eventos estreitamente ligados aos processos inflamatórios, que serão eles próprios a origem da ativação e da sensibilização dos nociceptores, (YAKSH; HAMMOND, 1982).

Na substância periaquedutal cinzenta está localizada a maior parte dos neurônios do sistema descendente inibitório, grupo de fibras neuronais que tem a função de atenuar a dor agindo no corno dorsal da medula espinhal pela liberação de neurotransmissores que ocupam receptores tanto nas fibras aferentes como nas eferentes (LE BARS; VILLANUEVA, 1988).

A identificação de neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos no processo doloroso no corno dorsal da medula espinhal, de localização pré e pós-sináptica na terminação central do aferente primário nociceptivo faz prever a importância e complexidade da área, (MAXWELL; RETHELY, 1987). São observados em posições pré-sinápticas receptores opióides: δ , κ , GABA.b, α_2 adrenérgicos, neurocinina 1 e $5HT_2$. Nas posições pós-sinápticas encontram-se receptores GABA.a,b, AMPA, NMDA, δ , α_2 adrenérgicos, $5HT_{1b}$, adenosina.

A existência de um sistema inibitório da dor explica a sensação de dor variar entre indivíduos da mesma espécie ou até entre mesmos indivíduos em situações diferentes. Os neurônios inibitórios são ativados por um grupo de substâncias endógenas denominadas de endorfinas que são produzidas em resposta a uma série de estímulos diferentes entre os quais está o estresse (WOOLF, 1989; CESSSELIN, 1986).

2.2 O PAPEL DO ANESTÉSICO LOCAL NO TRATAMENTO DA DOR

Os anestésicos locais, tanto por sua ação periférica quanto aplicados sobre o neuroeixo, constituem importante componente no manejo multimodal da dor aguda e de algumas condições crônicas. Além de proporcionar excelente analgesia ao repouso e ao movimento, seu uso está associado a um menor consumo de

opióides e a redução de seus efeitos colaterais correlacionados (BORGEAT; EKATODRAMIS; SCHENKER, 2003).

Os anestésicos locais são substâncias capazes de bloquear, de forma totalmente reversível, a geração e a propagação do potencial de ação em tecidos eletricamente excitáveis. Os anestésicos locais bloqueiam a condução nervosa, tanto sensorial quanto motora. Seu mecanismo de ação caracteriza-se pela propriedade de bloquear a corrente de sódio do potencial de ação nas membranas. São empregados basicamente nos procedimentos de bloqueio e infiltração para o tratamento da dor aguda e crônica (BARASH; CULLEN; STOELTING, 2001).

Uma grande descoberta foi síntese da lidocaína, um AL amino-amida (LOFGREN, 1948). A bupivacaína, uma amida de ação mais prolongada, foi sintetizada nos anos cinquenta, (EKENSTAM; EGNER; PETTERSSON, 1957). No final da década de 1970, iniciaram-se estudos sobre a utilização de opióides com a finalidade de melhorar a qualidade e duração da anestesia. Na década seguinte, os estudos concentraram-se mais na preocupação com a cardiotoxicidade da bupivacaína racêmica e na busca de alternativas para sua prevenção. Já na década de 1990 e neste século, identificou-se o menor potencial cardiotoxíco dos enantiômeros levógiros dos AL amídicos.

A bupivacaína racêmica é o (AL) pertencente à classe das amino-aminas, mais utilizado em procedimentos cirúrgicos, principalmente para anestésias regionais prolongadas. Os efeitos adversos (toxicidade para os sistemas nervoso central e cardiovascular) associados ao uso de bupivacaína racêmica levaram à pesquisa de novos agentes com perfil de bloqueio semelhante, mas com menor cardiotoxicidade (MATHER; CHANG, 2001). Surgiram então a ropivacaína e a bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%, sintetizados sob a forma enantiomérica S(-), demonstrando que, além de modificações moleculares, a estereosseletividade é fator importante para diminuir a cardiotoxicidade da bupivacaína.

Ropivacaína e bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% são, aproximadamente, equipotentes à bupivacaína racêmica para anestesia epidural e de plexos, enquanto têm 30% a 40% menos efeitos sistêmicos. Aparentemente a menor toxicidade é devido à reduzida afinidade pelo tecido cerebral e miocárdico com as preparações isoméricas.

A bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% é uma droga preparada com 100% de componente levógiro. Na prática, apresenta uma grande dissociação entre bloqueio motor e sensitivo, semelhante ao que se obtém com a ropivacaína, o que representa, para algumas situações clínicas, um inconveniente. Atualmente estudos estão sendo realizados no sentido de incrementar o bloqueio motor da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%, para as situações clínicas indicadas, com o acréscimo de dextrobupivacaína, compondo uma mistura com excesso enantiomérico na relação de 75% de componente levógiro e 25% de componente dextrógiro.

2.3 EVOLUÇÃO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Os anestésicos locais variam em seus efeitos clínicos e essas diferenças dependem de sua estrutura química. Reconhecem-se, na fórmula geral dos anestésicos locais, três partes fundamentais: 1. Radical aromático: é a porção lipossolúvel da droga, responsável por sua penetração no nervo. Entre os exemplos de radicais aromáticos estão o ácido benzóico (cocaína e benzocaína), o ácido para-aminobenzóico (procaína e cloro-procaína) ou a xilidina (lidocaína e bupivacaína). O ácido para-aminobenzóico, sendo uma molécula pequena, pode funcionar como hapteno e determinar reações alérgicas. 2. Cadeia intermediária: é o esqueleto da molécula do anestésico. Variações da cadeia intermediária levam à alteração tanto da potência como da toxicidade dos anestésicos locais. 3. Grupo amina: é a porção ionizável da molécula, que vai sofrer a influência do pH do meio e, portanto, é a única que pode ser manipulada pelo anestesiológico. É ela que determina a velocidade de ação do anestésico local.

De acordo com a natureza química da ligação entre o anel aromático e o grupo amina, os anestésicos locais são divididos em dois grandes grupos: ésteres e amidas. Os ésteres são biotransformados rapidamente no plasma pela colinesterase plasmática, enquanto que as amidas dependem de biotransformação pelos microsomas hepáticos.

As características clínicas dos anestésicos locais estão diretamente ligadas às suas propriedades físico-químicas que, por sua vez, dependem de sua fórmula estrutural. Hoje se reconhece a importância da estereoisomeria na ação dos

anestésicos locais (AKERMAN; HELLBERG; TROSSVIK, 1988). A maioria dos anestésicos locais de uso clínico é comercializada em sua forma racêmica, ou seja, tanto o isômero levógiro quanto o dextrógiro são utilizados. Muitas das ações indesejáveis desse grupo de drogas podem ser atribuídas a sua forma dextrógira. A ropivacaína é o primeiro anestésico local utilizado exclusivamente na forma levógira, sendo que a esse fato se atribui sua menor toxicidade.

As propriedades físico-químicas dos anestésicos locais explicam suas características clínicas, quais sejam: sua velocidade de ação, potência, duração e toxicidade. A ropivacaína (ROSEMBERG; KYTTA; ALILA, 1986), o mais recente dos anestésicos locais, tem perfil intermediário entre os agentes mais comumente utilizados em nosso meio, a lidocaína e a bupivacaína; assim sendo, espera-se que sua potência e sua toxicidade sejam também intermediárias entre os agentes.

Alguns anestésicos locais podem determinar um bloqueio diferencial das fibras sensitivas e motoras. O exemplo clássico é a bupivacaína. Principalmente nas concentrações de 0,125 e 0,25%, o bloqueio sensitivo efetivo pode ser conseguido com mínimo bloqueio motor. No caso da ropivacaína, espera-se que essa diferença seja ainda mais evidente. Quando comparada com a bupivacaína, a ropivacaína determina bloqueio semelhante das fibras tipo C, porém muito menor das fibras tipo A (BADER. *et al.*,1989).

Os efeitos adversos provocados pela bupivacaína (toxicidade para o sistema nervoso central) levaram aos pesquisadores a se aprofundar no estudo das propriedades físico-químicas do AL no sentido de diminuir estes efeitos. A bupivacaína apresenta o maior índice de lipossolubilidade, ou seja, a lipossolubilidade facilita a penetração dos anestésicos locais nas membranas biológicas, estando relacionada com sua potência (COVINO, 1986).

A ligação protéica tem relação com a duração da anestesia, sendo maior com a bupivacaína. A maior afinidade aos aminoácidos levógiros do canal de sódio está diretamente relacionada com o mecanismo de ação (CARPENTER; MACKEY, 1996). Os anestésicos locais são bases fracas pouco solúveis e instáveis. Para torná-los mais solúveis e estáveis são apresentados comercialmente na forma de sais ácidos (cloridratos) com maior estabilidade em solução (pH de 5 a 6). O grau de dissociação influencia a distribuição e o início de ação do anestésico, visto que a

velocidade de bloqueio guarda uma relação inversa com o grau de ionização (VALE 1994).

A grande maioria dos anestésicos locais amino-amidas empregados clinicamente são compostos quirais. Apresentam um carbono assimétrico adjacente ao grupo amina e assim existem sob a forma de isômeros que são a imagem especular um do outro. Distinguem-se os isômeros (D) destrorrotatórios e os isômeros (L) levorrotatórios. Como regra, o isômero L tem maior atividade vasoconstritora, maior duração de ação e menor toxicidade sistêmica potencial que a forma D da mesma droga. Inicialmente as formulações com um único isômero tinham um custo muito elevado de produção, por isso os anestésicos locais foram comercializados como misturas racêmicas. Atualmente a comercialização de formulações de um só isômero é possível graças a novas técnicas de extração seletiva (SANTOS; FINSTER, 1999).

A presença do carbono assimétrico na bupivacaína e na ropivacaína justifica a propriedade de apresentar estereoisômeros L(-) e D(+), bem como a forma racêmica R(±). A lidocaína não apresenta quiralismo por não ter carbono assimétrico. Como os amino-ácidos do canal de sódio do nervo e do miocárdio são todos levógiros, a ligação e o desligamento do estereoisômero levógiro puro – ropivacaína – do canal do sódio ocorrem de modo mais fácil e mais rápido. Ao contrário, a forma racêmica (soma das formas L(-) 50% e D(+) 50% da bupivacaína apresenta uma ligação mais estável no canal de sódio, o que explica o efeito mais duradouro e sua maior cardiotoxicidade (SIMONETTI; CARVALHO, 1997; SIMONETTI; BATISTA; FERREIRA, 1998).

Embora existam diferenças quanto aos perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos enantiômeros, propriedades físico-químicas como a solubilidade aquosa ou em lipídios e o pKa são preservadas (WHITESIDE; WILDSMITH, 2001) constituindo-se em fatores que podem limitar o benefício terapêutico de drogas administradas na forma tradicional. Outros fatores limitantes são ausência de uma modalidade contínua de administração, como analgesia controlada pelo paciente ou via cateter. Tentativas em prolongar o bloqueio por meio do uso de adjuvantes ou pelo aumento da concentração ou volume do anestésico local apresentam limitado benefício (NEAL. *et al.*, 2002).

Com a alteração de propriedades físicas e químicas na molécula dos anestésicos locais, síntese direcionada por estudos de correlação estrutura-função, alguns desses objetivos têm sido atingidos. Uma alternativa utilizada é o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada contendo AL em carreadores, que possibilitam a manipulação de algumas propriedades físico-químicas além de melhorarem os efeitos terapêuticos, favorecendo sua utilização clínica. Entre estes sistemas de liberação prolongada encontramos implantes (BLANCO; BERNARDO; GOMES, 1999), lipossomas (ARAÚJO; PINTO; BRAGA, 2003), complexação de drogas com ciclodextrinas (ARAÚJO; FRACETO; BRAGA, 2005), ou micropartículas (LE CORRE; LÊ GUEVELLO; GAJAN, 1994).

2.3.1 Lipossomas

Os lipossomas são esferas microscópicas de tamanhos variados, com uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por compartimentos aquosos, onde as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior e as cabeças polares para o exterior da bicamada, mantendo contato com a fase aquosa (RANADE; 1989).

A natureza da interação entre os lipídios, a composição dos mesmos e o método de preparação determinam o padrão, o tamanho e o número de bicamas formadas. Os lipossomas, quanto ao número de bicamas, são classificados em vesículas multi (MLV) ou unilamelares (LUV); influenciam diretamente na absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e no perfil de toxicidade das drogas encapsuladas (LIENTENBERG; BARENHOLZ, 1988). O tamanho do lipossoma afeta a biodistribuição; pois, após a administração subcutânea, lipossomas menores que 120 nm atravessam rapidamente os capilares, enquanto lipossomas maiores, com cerca de 200 nm ou mais, tendem a permanecer no local de injeção (GRANT; BANSINATH, 2001; GRANT; BARENHOLZ; PISKOUN, 2001). De maneira geral, pode-se dizer que o uso de drogas encapsulados em lipossomas tem como vantagem a liberação lenta da droga, prolongando a duração do efeito e a redução da toxicidade para o sistema cardiovascular e nervoso central (GRANT. *et al.*, 1992).

2.3.2 Ciclodextrinas

A hidrólise enzimática do amido usualmente resulta na formação de glicose, maltose e em uma longa classe de dextrinas lineares e ramificadas. No entanto, alguns microorganismos e plantas, que produzem enzimas denominadas ciclo-dextrina glicosiltransferases, são capazes de degradar o amido em produtos cíclicos chamados ciclodextrinas (LOFTSSON; MASSON, 2001).

A habilidade das ciclodextrinas de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e da polaridade com a droga. Além disso, as forças que dirigem a complexação têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água na cavidade das ciclodextrinas, às interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (BIBBY; DAVIES; TUCKER, 2000), visto que a cavidade interna tem diâmetros de 5 a 8Å (MATIOLI, 2000), sendo grande o bastante para acomodar um hexanel aromático.

As β -ciclodextrinas são as dextrinas cíclicas, mais largamente utilizadas, para a complexação com várias classes de drogas, como: agentes antitumorais, antidiabéticos e antiinflamatórios (DALMORA; DALMORA; OLIVEIRA, 2001), que podem ser administrados por diversas vias como subaracnóidea, venosa, muscular, peridural, oral, nasal e dérmica.

Além da estabilização, a modificação da farmacocinética e das propriedades biofarmacêuticas das drogas são os efeitos mais significantes da complexação com ciclodextrinas, cujos efeitos são observados especialmente na solubilidade e na liberação da droga complexada. Como consequência disso, a administração de fármacos complexados com β -ciclodextrina altera a intensidade e a duração de seus efeitos através da baixa absorção sistêmica das drogas (FROMMING; SZEJTLI, 1994). Essa propriedade das ciclodextrinas torna bastante promissora seu uso para a complexação com anestésicos locais.

2.3.3 Microesferas

As microesferas biodegradadas têm se apresentado como uma atrativa alternativa para implante. Elas são geralmente formuladas por método de evaporação em solvente (BINDSCHAEDLER. *et al.*, 1988). As microesferas tornam-se interessantes

por sua propriedade em proporcionar uma taxa de liberação prolongada e menor captação para a circulação sistêmica, evitando altas concentrações plasmáticas. Seu menor tamanho permite a injeção local por meio de agulha. As microesferas podem proporcionar uma liberação prolongada do fármaco permitindo uma maior duração de ação.

2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, que envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da ciência. O sistema de liberação controlado de drogas vem revolucionando a indústria farmacêutica (produção de medicamentos), como também a indústria química (derivados de petróleo, agroindústria, indústria civil na produção de tintas) principalmente. A terapêutica moderna está baseada em um modelo racional de liberação controlada e alta especificidade de compostos de drogas. Os novos métodos para a administração de drogas baseiam-se no encapsulamento (forma de veículo) das drogas em vários modelos como nanocápsulas, microcápsulas, microesfera poliméricas ou protéicas, que por sua vez, liberam a droga, já no interior do organismo, em pequenas e controláveis doses diárias, de acordo com a forma que foi projetada, durante dias, semanas ou meses, passando por vários fatores (eliminação de primeira passagem, ligações a proteínas, ligações a outros tecidos, etc.), que podem interferir com a biodisponibilidade e chegam à circulação sistêmica inalterada, pronta para interagir com seus sítios de ação.

O princípio básico desse sistema é que estes compostos são biodegradáveis quando em contato com os sistemas biológicos e através da ação de fatores físico, químicos como: pH, temperatura, ação enzimática, vão sendo distribuídos (liberados) lentamente.

Em relação à indústria farmacêutica, o interesse crescente em sistemas de liberação controlada de drogas confirma-se pelo fato de que oferecem inúmeras vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos, tais como: a) maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco a partir da degradação da matriz; b) diminuição significativa

da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; c) natureza e composição dos veículos variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura); d) administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses); e) direcionamento a alvos específicos sem imobilização significativa das espécies bioativas; f) tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas.

Nas formas de administração convencionais (aerossol, injeção, pílulas), a concentração da droga na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Uma vez que cada droga possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Tal fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica.

2.4.1 Nanociência

Os termos nanociência e nanotecnologia reúnem muitas ideias e procedimentos conhecidos, os quais já eram uma preocupação de muitos cientistas, como pode ser verificado na área de colóides e superfícies. A proposta é de inovação tecnológica que auxilie e acompanhe todos os avanços científicos importantes hoje, utilizando ferramentas novas, anteriormente não disponíveis, que nos permitem ver as estruturas nanométricas e até movimentar átomos; por exemplo, as microscopias de força atômica (mostra detalhes topográficos em superfícies) e de tunelamento (que permite movimentar átomos e observar densidade eletrônica), com vários modos diferentes de obtenção de imagem (INOUE. *et al.*, 1989; GATTI; RIVASI, 2002; HARUYAMA, 2003).

Nano é um prefixo grego que significa "anão". Um nanômetro é igual a 1 milionésimo de milímetro ou 1 bilionésimo de metro. Para termos ideia sobre qual escala de comprimento estamos falando, um fio de cabelo possui o diâmetro de 100.000 nm. Átomos são cerca de 1/10.000 do tamanho de uma bactéria e bactérias são 1/10.000 do tamanho dos mosquitos (DURAN; HEAKETH, 2003).

De acordo aos documentos recentes da "American , European e o APEC Center for Technology Foresight", o impacto da nanociência e nanotecnologia

beneficiou todas as áreas científicas e tecnológicas conhecidas hoje, incluindo materiais e fabricações na nanoeletrônica, dispositivos de informação tecnológica, saúde, biotecnologia e agricultura, segurança nacional, educação e a competitividade nacional. O termo nanopartículas aplicado à liberação controlada de fármacos é amplo e refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, nanoesferas e nanocápsulas principalmente. Denominam-se esferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homoganeamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica ou serosa (DE AZEVEDO, 2003). Desta forma, obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Nanocápsulas, ao contrário, constituem sistemas reservatórios, onde é possível identificar-se um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo.

2.4.2 Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas

O desenvolvimento de formulações que permitam a liberação controlada de fármacos em sítios específicos, visando a diminuição de efeitos tóxicos e/ou aumento do índice terapêutico, tem recebido grande atenção nos últimos anos. A finalidade última dos sistemas de liberação controlada de fármacos, como já analisado, do ponto de vista do tratamento clínico, o controle de concentração terapêutica é importante, e foi, ao lado do direcionamento do fármaco a alvos específicos, um dos principais objetivos de todas estas pesquisas (FARREL; HEAKETH, 2003; KAWASHIMA, 2001).

Para se ter ideia do grau fundamental que uma liberação sustentada possui, imagine uma situação bastante comum da administração de analgésicos em pacientes com câncer terminal; nos casos em que a concentração da droga estiver abaixo da concentração terapêutica, o que é inerente a sistemas convencionais, o paciente experimentará dor (SCHAFFAZICK. *et al.*, 2002; YANO. *et al.*, 2002). Por outro lado, os picos de concentração são prejudiciais em outro sentido; conferem uma dose que atinge níveis tóxicos no plasma. Portanto, em primeira instância, sistemas nanoparticulados são muito úteis na manutenção da dose terapêutica em níveis seguros, na diminuição dos picos e valores plasmáticos, além de conferir

proteção e economia de fármaco (LIMA; RODRIGUES, 1999; KREUTER, 2001; LOCKMAN, 2002). Neste contexto, como bem frisado na introdução, sistemas de liberação controlada representam um desenvolvimento relativamente novo e, quanto às suas necessidades, têm o objetivo de prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos. A preparação de nanopartículas passa a ser crucial e se concentra em dois pontos: modificações (aprimoramentos) que criem novas rotas ou melhorem outros métodos e funcionalização química das partículas. No primeiro caso, um método de preparação interessante foi patenteado no Brasil. Trata-se da aplicação da técnica de “Spray Drying” (JAIN; THOMAS; PANCHAGNULA, 2002), envolvendo a adição de partículas de SiO₂ antes da secagem, na preparação de nanocápsulas ou nanoesferas para encapsulação de antiinflamatórios não hormonais (AINES). Com isto se consegue maior estabilidade da dispersão, melhor distribuição do tamanho das partículas, e uma viabilidade industrial para a produção das nanopartículas, evitando-se o processo de liofilização.

Modernamente, têm sido obtidas nanoesferas a partir de micelas poliméricas, utilizando-se de hidrogéis de polivinilpirrolidona com isopropilacrilamida, pois foi verificado que seu tempo na circulação sanguínea era mais longo. Um hidrogel é uma rede de polímeros hidrofílicos que são reticulados e que tem a propriedade de intumescer em ambientes abundantes em água (GAUR. *et al.*, 2000). A preparação destas nanoesferas é possível dentro de núcleos aquosos de gotas de micelas inversas e permite uma modulação precisa da distribuição de tamanho das partículas, preparadas com diâmetro menor que 100 nm. Uma vez que, a reação de polimerização e subsequente encapsulação ocorre em núcleos aquosos, é possível encapsular moléculas hidrofílicas. A superfície destas partículas já é hidrofóbica, com maior tempo na circulação sanguínea.

No segundo caso, as pesquisas em funcionalização química de superfície de nanopartículas muitas possibilidades estão sendo testadas. A adsorção de polímeros na superfície das nanopartículas é um fenômeno importante, pois pode alterar sua hidrofobicidade, facilitando sua redispersão em água, o que é importante para efeitos de utilização em injeções além de alterar o direcionamento a alvos específicos do organismo.

Os novos sistemas carregadores coloidais para liberação controlada e dirigida de fármacos procuram mudar a distribuição da substância ativa, aumentando

a permanência na circulação sistêmica para que se alcance maior eficácia terapêutica com doses menores e baixa toxicidade. Logo, o potencial terapêutico destes dispositivos biodegradáveis encapsulando o ingrediente ativo depende do tempo de circulação na corrente sanguínea e, principalmente, do destino in vivo do carregador, que deve ser direcionado a alvos específicos (frequentemente designados por “drug targets”) (OKTAR, 2003; PARIS; PESSEY, 2003). Isto pode ser feito pela utilização de copolímeros-bloco (KWON, 2002) como, por exemplo, PEO e PLA, em que a porção hidrofóbica (PLA) forma a matriz polimérica (nanopartícula) enquanto que a porção hidrofílica forma a cobertura. A presença destes polímeros sobre a superfície da partícula decresce a adsorção de opsoninas e subsequente fagocitose, ou seja, o carregador não é reconhecido pelo sistema de defesa do organismo. Uma aplicação destes sistemas é a utilização de nanopartículas sólidas que encapsulem drogas antitumorais para serem direcionadas mais facilmente ao alvo.

Trabalhos importantes têm sido realizados com nanoesferas na liberação de fármacos para o cérebro. A difusão passiva de substâncias através das células endoteliais do cérebro é dependente da massa molar e da lipofilicidade dos compostos. Entretanto, um grande número de espécies ativas que possuem lipofilicidade favorável e que normalmente deveriam ser capazes de transpor estas células, não o conseguem (GATTI; RIVASI, 2002). Isto ocorre devido à existência de uma eficiente “bomba de efluxo”, incluindo transportadores aniônicos orgânicos, como P-glicoproteínas, às vezes referidas como proteína de resistência multi-droga. Estes sistemas são conhecidos como barreiras hematoencefálicas, os quais representam um grande obstáculo para várias drogas, incluindo antibióticos, antioncoplásicos, e uma variedade de drogas atuantes no SNC. Uma das possibilidades de vencer esta barreira é a utilização de nanoesferas para o transporte, por exemplo, de neuropeptídeos, para o tratamento de tumores cerebrais. Para isto, as nanopartículas devem ser injetadas por via intravenosa e devem ser cobertas por uma camada de polisorbato para que possam mimetizar lipoproteínas de baixa densidade e, podendo assim interagir com receptores de LDL e difundir pelas células endoteliais do cérebro. Logo, pode-se deduzir que as propriedades de superfície das partículas são fatores chave que determinam a permanência na circulação sistêmica e, aumentam a biodisponibilidade do

ingrediente ativo. Entretanto, com a metodologia de se modificar a superfície de nanopartículas, não se conseguiu ainda evitar totalmente a ação, ainda que menor, do sistema reticuloendotelial, uma importante barreira fisiológica (GOMES; DE MELO, 2002).

Após a administração intravenosa de nanoesferas, assim como de outros carregadores coloidais, as proteínas do plasma conhecidas como opsoninas (imunoglobulinas IGM e IGG, relacionadas à resposta imune inata do organismo), são rapidamente adsorvidas na superfície das partículas. Esta adsorção de opsoninas leva ao rápido reconhecimento pelas células do sistema reticuloendotelial de macrófagos, principalmente no baço e células de Kupffer, no fígado e consequente fagocitose das partículas, especialmente no fígado (60-90%), baço (2-20%), medula óssea (0,1-1%) e quantidades variadas nos pulmões (SHERSTOV. *et al.*, 1996). Em função da existência destas barreiras, as recentemente investigações, feitas no sentido de reduzir a captura das partículas coloidais pelo sistema reticuloendotelial, representam uma proposta futura de poder aumentar a concentração destes veículos no sangue e conseqüentemente no alvo desejado (KREUTER. *et al.*, 2002; DAVDA; LABHASETWAR, 2002).

O termo nanopartículas é genérico, sendo usado de acordo com o tamanho da partícula a que se está referindo. Partículas com tamanho menor que 1 μm são consideradas nanopartículas, enquanto que as partículas maiores são denominadas micropartículas. Existe uma certa controvérsia com relação ao tamanho limite para as micropartículas, uma vez que erroneamente alguns autores consideram partículas maiores que 1 μm como nanopartículas.

Na grande maioria dos trabalhos, os sistemas que se mostraram particularmente interessantes foram o das nanopartículas de polímeros biodegradáveis, que é um sistema, cujo direcionamento do fármaco a sítios-alvo específicos do organismo é claramente identificável, e, também, bastante estável, não sendo reconhecido por macrófagos do sistema reticuloendotelial de defesa. Trata-se, portanto, do melhor sistema ora disponível para se investigar o comportamento de carregadores coloidais em organismos vivos, estritamente ligados à liberação controlada de fármacos (MIDDLETON; TRIPTON, 2002).

O método mecânico mais utilizado é o “Spray Drying” (secagem em spray), em que o fármaco, em solução ou dispersão, é nebulizado, juntamente com o

material revestidor solubilizado ou fundido. Isto é feito em uma câmara de evaporação, causando a rápida solidificação das gotículas originando as partículas (FARREL; HEAKETH, 2003).

Os sistemas de liberação controlada do tipo polimérico, conhecidos há algum tempo, são classificados de acordo com vários mecanismos (PEPPES, 1987). Os sistemas controlados por difusão são os mais comuns e dois tipos são descritos. O primeiro inclui membranas, cápsulas, nanocápsulas, lipossomas e fibras ocas; o segundo tipo é um sólido monolítico no qual o agente ativo é disperso ou dissolvido em um polímero inerte e a difusão do fármaco é a etapa limitante; a taxa de liberação é dependente da escolha do polímero.

Os sistemas controlados quimicamente fazem uso da bioerosão de polímeros, resultando na absorção dos resíduos pelo organismo. Bioerosão polimérica pode ser definida como a conversão do material insolúvel em água em um material solúvel. A droga, também, pode estar ligada covalentemente ao polímero e ser liberada por cisão da ligação por ação da água ou de enzimas. Nos sistemas controlados por solvente, o agente ativo está dissolvido ou disperso na matriz polimérica e não se difunde através da matriz. Para que ocorra a difusão, o polímero deve se intumescer, por exemplo, com água, abaixando a temperatura de transição vítrea e tornando o material mais plástico. Deste modo, o fármaco contido na matriz pode se difundir para o meio externo.

O conceito de “microcápsula” surgiu da idealização do modelo celular, cuja membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce, ao mesmo tempo, outras funções como controlar a entrada e saída de material na célula. De modo semelhante, a microcápsula consiste, em geral, em uma camada de polímero que atua como um filme protetor; isola a substância ativa (gotículas líquidas ou partículas sólidas) e evita os efeitos de sua exposição inadequada. Essa “membrana” desfaz-se sob estímulo específico, liberando a substância no local ou momento ideais. O material ativo também pode estar incluso em uma matriz sólida de polímero; formando, nesse caso, uma “microesfera” (SHAHIDI; HAN, 1993).

As microcápsulas são usadas, principalmente, para aumentar a estabilidade de uma droga ou para modificar ou retardar sua liberação em locais específicos de ação. Substâncias antiinflamatórias, por exemplo, podem ter seu tempo de atuação no plasma sanguíneo aumentado pela microencapsulação,

prolongando seu efeito no organismo. A diferença básica entre esses métodos está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, sendo que a combinação entre o material e o agente pode ser de natureza física, química ou físico-química (GAUR. *et al.*, 2000). Entre os métodos físicos, alguns mais conhecidos são spray drying (secagem de gotículas), spray cooling (solidificação de gotículas por resfriamento) e extrusão (modelamento de microesferas por meios mecânicos). Entre os métodos químicos, destacam inclusão molecular (encapsulação de certas moléculas por outras) e polimerização interfacial (reação de polimerização no limite entre duas soluções; uma delas contendo o material ativo em suspensão). Os métodos físico-químicos mais estudados são a coacervação ou separação de fases (separação do polímero encapsulante de um meio líquido e sua precipitação na superfície do material ativo disperso no mesmo meio) e envolvimento lipossômico (encapsulação por membranas lipídicas) (PARK, 2002).

A escolha do agente encapsulante depende do método utilizado para formar as microcápsulas, do tipo de aplicação do produto (aditivos para alimentos, fármacos, fragrâncias, pesticidas etc.) e da forma como ele agir. A substância encapsulada pode ser liberada por estímulos mecânicos (rompimento das microcápsulas através de pressão) ou outros (variação da temperatura ou do pH no meio onde as microcápsulas ou microesferas estão). Em uma loção cosmética para o corpo, por exemplo, as microcápsulas que contêm a fragrância são rompidas, liberando-a, pela pressão dos dedos durante a aplicação na pele (ruptura mecânica). Em um medicamento oral, para que a mucosa do estômago seja protegida do contato com o princípio ativo e este seja liberado apenas no local exato de sua absorção, no intestino, pode-se usar um agente encapsulante que só se dissolva em meio alcalino (como o intestinal) (PORTE; COUARRAZE, 1994).

2.4.3 Polímeros biodegradáveis

A aplicação de materiais poliméricos tem sido evidenciada em diversos campos como engenharia de tecidos, implante de dispositivos médicos, órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia, reparo ósseo e outros.

Sistemas poliméricos de liberação de drogas são largamente utilizados e não só permitem uma liberação lenta e gradual do ingrediente ativo como, também, podem possibilitar o direcionamento a alvos específicos do organismo, como sítios de inflamação ou tumor (SOMA. *et al.*, 1999). Polímeros biologicamente degradáveis incluem, portanto.

2.4.3.1 Polímeros naturais

Sempre biodegradáveis, o colágeno, a celulose e a quitosana são muito utilizados como matrizes em liberação de fármacos. Um exemplo é a aplicação de quitosana enxertada com poli (ácido acrílico), formando um copolímero, na confecção de nanoesferas para se estudar a liberação controlada em função do tempo, utilizando-se de eosina, um corante solúvel em água, como marcador (NASCIMENTO. *et al.*, 2001; BRANNON-PEPPAS, 1997).

2.4.3.2 Polímeros naturais modificados

Um problema encontrado em polímeros naturais é que eles, frequentemente, levam muito tempo para degradar. Isto pode ser resolvido ao se adicionar grupos polares às cadeias que, por serem mais lábeis, podem diminuir o tempo de degradação. Tais modificações podem resultar em reticulação de gelatina utilizando-se formaldeído, a reticulação de quitosana utilizando-se glutaraldeído, levar celulose a acetato de celulose. Modificações enzimáticas também são utilizadas como a modificação de quitosana por tirosinase.

2.4.3.3 Polímeros sintéticos

Os polímeros sintéticos são, também, largamente utilizados; por exemplo, poli(etileno), poli(álcool vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(etilenoglicol), poliésteres. Os poliésteres são mais utilizados pelo químico e têm no poli(glicolide) o polímero alifático linear mais simples. O monômero glicolide é sintetizado a partir da dimerização do ácido glicólico e a polimerização por abertura de anel leva a materiais de alta massa molar, com aproximadamente 1-3% do

monômero residual. Na prática, copolímeros de glicolide com l-lactide e dl-lactide são os mais utilizados, com vantagens em sistemas de liberação controlada. Uma delas é o menor tempo de degradação, que se explica devido à amortização provocada pela quebra da regularidade entre as cadeias na presença do monômero em copolímeros de l-lactide com 25—70% em glicolide. Uma estrutura típica de um polímero biodegradável é a do poli(ácido láctico). São também preparados copolímeros-bloco compostos de PEO-PPO-PEO (Pluronic, um copolímero-bloco relativamente hidrofílico) e poli(alfaaprolactona) (hidrofóbico) obtido a partir da abertura de anel de alfa-caprolactona na presença de PEO-PPO-PEO e catalisador octoato estanhoso (HA; LEE; KIM, 2000).

2.5 BENEFÍCIOS TERAPÊUTICOS

O benefício terapêutico das várias drogas administradas por meio do desenvolvimento de sistemas de liberação controlada é possível através da manipulação de algumas propriedades, favorecendo sua utilização clínica. As pesquisas com formulações de anestésicos locais de liberação controlada têm demonstrado resultados promissores.

Estudos em pacientes, no tratamento da dor pós-cirúrgica e crônica oncológica, demonstraram a aplicabilidade e eficácia da encapsulação de bupivacaína 0,5% em lipossomas por administração peridural e infiltração no plexo braquial. Foi observada uma maior duração da analgesia, quando comparada àquela obtida após administração do anestésico local livre, além da potencialização do bloqueio nervoso diferencial. Resultados que podem ser atribuídos à manutenção de altos níveis da droga no local de injeção (BOOGAERTS; LAFONT; DECLERQ, 1994; LAFONT; LEGROS; BOOGAERTS, 1996).

Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento dessas formulações, estudos ainda são necessários para a determinação da razão de liberação e estabilidade dos anestésicos nas diversas preparações, bem como para o controle de alguns efeitos como indução de bloqueio simpático. Por isso, modificações nos métodos de preparação e/ou variações na composição têm sido utilizadas com o objetivo de aumentar a eficiência dos anestésicos locais (FLETCHER; LE CORRE; GUILBAUD, 1987; GRANT; BANSINATH, 2001).

2.6 A ESCOLHA DA FORMA DE ENTREGA CONTROLADA DO ANESTÉSICO LOCAL

Entre as formas de entrega controlada de drogas, as microesferas de bupivacaína mostraram-se interessantes por causa de suas habilidades de prover uma sustentabilidade aumentada da droga, quando comparada com as outras formas de transporte. Além de proporcionar uma taxa de liberação prolongada, tem tamanho menor, o que facilita a sua injeção (BENOIT, 1996). No presente estudo, utilizou-se microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% *in vivo*, cujo objetivo era encontrar, uma liberação prolongada do fármaco, permitindo uma maior duração de ação e menor captação para a circulação sistêmica, evitando altas concentrações plasmáticas.

Outra preocupação dos estudiosos no assunto é o processo de preparação das microesferas. Com adição no processo do “*spray-drying*”, existe alguma vantagem quando comparado ao usual método de microencapsulação (emulsificação) (PAVANETTO. *et al.*, 1994). A escolha do polímero é fator importante uma vez que o mesmo deve ser biocompatível e com capacidade de armazenar boa quantidade do medicamento a ser utilizado. O co-polímero de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) foi escolhido por possuir uma capacidade de cada gramo poder conter até 0,8g de bupivacaína, e ser biodegradável (CURLEY; CASTILLO; HOTZ, 1996). Diferentemente o polímero de ácido poliláctico (PLA) que pode conter somente 22% de anestésico local, fato que em escala industrial pode tornar sua produção inviável (LE CORRE; LÊ GUEVELLO; GAJAN, 1994).

A relação ideal entre o AL e o polímero gira entre 55% a 75%, porque uma concentração acima deste valor não está associada a um bloqueio mais prolongado (CURLEY; CASTILLO; HOTZ, 1996).

Microesferas contendo AL por meio da emulsificação da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% com o polímero (PLGA), com a eliminação do solvente por meio do método “*spray-dried*” e liofilização do mesmo foi testado *in vitro* com resultados semelhantes aos encontrados com a bupivacaína racêmica. Estudos com bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%, anestésico local de formulação mais recente ainda, necessitam de avaliações em microesferas.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 PREPARAÇÕES DAS MICROESFERAS DE BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE 50% (S75-R25)

A bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% foi encapsulada como base obtida pela precipitação em meio alcalino (hidróxido de amônia) proveniente de uma solução aquosa saturada de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%. A pureza da base resultante da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% foi verificada por cromatografia líquida de alto desempenho por comparação com cloridrato de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (LE GUEVELLO; LE CORRE; CHEVANNE, 1993). As microesferas da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% foram preparadas com a base da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% dissolvida e polímero (RG 503H, Boehringer Ingelheim). A relação de peso dos polímeros da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% utilizada foi de 60-40 (peso %). A solução foi processada pelo método de “*spray-dried*” com uma mini Büchi B-191 “*spray-dried*” laboratorial usando bico de 0,7 mm. Os parâmetros do processo foram assim definidos: temperatura de entrada (50°C); temperatura de saída (43°C); aspirador (100%); bomba (2.5ml/min) e fluxo do spray (600 nl/h). As microesferas foram armazenadas sob vácuo a temperatura de 4°C até caracterização.

3.2 AVALIAÇÕES DA EFICÁCIA ANESTÉSICA

Este estudo experimental segue as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Constituíram a amostra deste estudo 32 ratos masculinos da linhagem Wistar, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Positivo (UP), com peso entre 200 e 350 gramas, habituados a um ciclo natural claro/escuro de 12 horas, água e alimentação à vontade, alojados em 4 grupos de 8 animais por gaiola e aclimatados ao local de experimentação a uma

temperatura de 24°C por pelo menos 8 dias antes da exposição ao estudo experimental.

Os ratos da classe Wistar foram utilizados por apresentarem as seguintes vantagens: são espécies bem conhecidas pela ciência, com grande quantidade de informações disponíveis; são de fácil manutenção e observação em cativeiro; possuem ciclos vitais curtos (maturidade sexual, prenhez, lactação, puberdade, etc.); permitem que se trabalhe com uma quantidade grande de animais; apresentam uniformidade genética, isto é, são animais isogênicos. Foram utilizados apenas ratos Wistar machos por apresentarem menores alterações hormonais que as fêmeas.

Todo o processo de criação desses animais consistiu em minimizar, ao extremo, as possíveis variáveis que poderiam interferir em uma dada resposta biológica ao experimento. Mudanças da temperatura ambiental levam a respostas adaptativas, com alterações comportamentais, fisiológicas e metabólicas. Portanto, para evitar situações de estresse térmico, que levariam à invalidação do experimento científico, os animais no biotério foram mantidos a uma temperatura entre 21° +- 23°C; temperatura adequada para camundongos e ratos segundo a literatura. A umidade relativa do ar foi mantida em torno de 55% +- 15%, pois a sudoração destes animais é insignificante e fazem taquipnéia como mecanismo de adaptação frente ao calor. O excesso de umidade interfere na dissipação de calor pelos animais, que constantemente, perdem calor e umidade, eliminando CO₂, além de outros produtos resultantes de reações metabólicas. Especial atenção foi dada à amônia, decorrente da degradação dos excretos nitrogenados que pode afetar o sistema respiratório. Elevações excessivas do nível de amônia foram evitadas, pois estão relacionadas com o aumento exagerado da umidade. O uso de exaustores e condicionadores de ar foi indispensável.

Foi importante promover períodos alternados e regulares de luz e escuridão (por exemplo, de 12 horas), para sincronização do ciclo circadiano (dia/noite). A intensidade luminosa e o foto período (duração do dia) influenciam o metabolismo e o ciclo estral dos animais, alterando suas respostas biológicas. Os roedores são animais de hábitos noturnos, além do que, cuidados especiais devem ser tomados em relação aos animais albinos, por serem mais sensíveis à luz. O isolamento total do biotério em relação à luz natural permitiu o controle da

intensidade luminosa e do foto período. Foram utilizadas luzes fluorescentes brancas em virtude de menor emissão de calor.

O ruído, fonte de estresse dos animais, foi controlado, pois é um fator de grande influência sobre o bem estar, principalmente, considerando-se que os ouvidos dos roedores possuem a capacidade de escutar frequências mais altas (ultrassons), inaudíveis por ouvidos humanos (STEPHAN; ZUCKER, 1972).

Os ensaios de eficácia anestésica foram realizados pela técnica do bloqueio do nervo ciático em ratos. Os ratos foram divididos em 4 grupos de oito animais de acordo com a droga injetada no nervo ciático, figura 1.

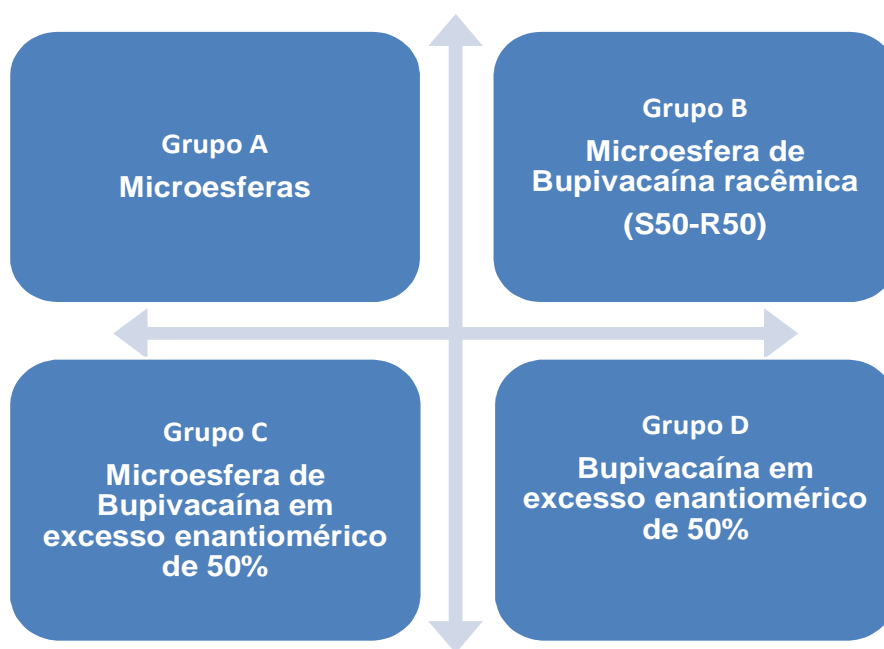


FIGURA1- GRUPOS ESTUDADOS

O animal era colocado em uma cúpula de vidro, sobre uma atmosfera de oxigênio e flutano inicialmente, adormecido, a anestesia geral inalatória sob máscara era continuada, até a realização do bloqueio do nervo ciático. Foi utilizado

o agente anestésico flutano, com concentração inspirada de 2% a 4%, com oxigênio a 100%, figuras 2, 3, 4.



FIGURA 2 – ANESTESIA GERAL INALATÓRIA- cúpula de vidro



FIGURA 3 - ANESTESIA GERAL INALATÓRIA- máscara



FIGURA 4 - ANESTESIA GERAL INALATÓRIA- sistema de ventilação

Os ratos eram posicionados em decúbito lateral imediatamente após a indução anestésica e executado o bloqueio do nervo ciático na pata posterior percutaneamente. Teve-se como referência o sulco localizado pela palpação entre a cabeça do grande trocanter do fêmur e a tuberosidade isquiática. O nervo era identificado pela introdução no sulco de uma agulha 24 de teflon (Stimuplex, B. Braun, Melsungen, Germany) unida a um estimulador de nervo (DigiStim II, NeuroTechnology, Houston, Tex.). A proximidade da ponta da agulha no nervo ciático durante o bloqueio era confirmada por uma contração muscular visível da pata com uma intensidade de estímulo de 0,2 miliampères. Enquanto o anestesiolegista mantinha a agulha firme na posição identificada, um assistente injetava a droga. Todos os animais retornavam às suas gaiolas para se recuperar da anestesia geral depois do bloqueio do ciático concluído. Nos grupos B, C e D, a falha técnica foi definida como “nenhum bloqueio sensorial ou motor mensurado após a injeção”; os animais eram eliminados. O volume da injeção foi de 0.5 ml em seringa de insulina, de uma solução de 3.175% de cloridrato do anestésico local. As microesferas liofilizadas foram diluídas em água destilada e misturadas na velocidade máxima por 2 minutos antes da injeção. Tanto na realização do bloqueio ciático como na avaliação do bloqueio sensitivo e motor, o investigador não conhecia qual era o tipo de anestésico aplicado; houve a manipulação prévia das drogas por outro investigador, figuras 5 e 6.



FIGURA 5 – BLOQUEIO CIÁTICO



FIGURA 6 – BLOQUEIO CIÁTICO

3.2.1 Testes do bloqueio nervoso/ sensitivo e motor

Os testes nociceptivos do bloqueio do nervo foram avaliados observando a retirada do membro em resposta à estimulação nociva, (reflexo da retirada). O reflexo da retirada (RR), chamado, também, de reflexo da flexão, foi um dos reflexos

usados por Sherrington para ilustrar muitos dos princípios da ação reflexa. O RR do membro envolve a contração dos músculos flexores do quadril, joelho e tornozelo. É um reflexo polissináptico que é induzido pela estimulação nociva do membro, e sua latência, amplitude, e duração está na dependência da intensidade do estímulo. Foi induzido o (RR) pela estimulação nociva aguda da pele (térmica) em uma taxa de intensidade e de repetição que não resultasse em hiperalgesia.

BLOQUEIO SENSORIAL

O bloqueio sensorial foi medido pelo tempo requerido para cada rato retirar sua pata de uma placa a 56° C de temperatura, equipada com um diodo que emite com precisão +- 0.1 graus. Além da exatidão do diodo, foi utilizado um termômetro. A primeira medida foi realizada uma hora após a anestesia geral inalatória. Não anestesiados, os ratos intactos retiram sua pata da placa dentro de 1 a 3 segundos e foram envolvidos em um pano, delicadamente acima de seu quadril, com a finalidade de conter as extremidades superiores e obstruir a visão. Foram posicionados para estar com uma pata posterior sobre a placa quente e a outra contralateral colocada em um bloco de madeira em temperatura normal. As patas posteriores foram expostas ordenadamente, primeiro a esquerda, então a direita) a placa quente. Alternando os lados, a pata contralateral serve como controle no estudo para detectar efeitos analgésicos sistêmicos potenciais ou a analgesia de estresse induzida. A latência para retirar cada pata da placa quente foi gravada alternando as patas e permitindo ao menos 15 segundos de recuperação entre cada medida. Com o tempo registrado, não havendo a retirada da pata do animal da placa quente após 12 segundos, a experimentação era terminada, evitando-se ferimentos ou hiperalgesia (LEE *et al.*, 1994). Acima de 4 segundos era considerado como teste positivo, figuras 7 e 8.



FIGURA 7 – BLOQUEIO SENSORIAL- chapa quente



FIGURA 8 - BLOQUEIO SENSORIAL- chapa quente

BLOQUEIO MOTOR

Propriocepção: resposta ao posicionamento: quando o rato está em sua posição normal de descanso, os dedos das patas estão flexionados sobre o dorso. Sua habilidade em reposicionar a pata traseira e os dedos foi avaliada, figura 9. Os ratos foram colocados em posição prona, com suas patas traseiras esticadas para trás e com o dorso em contato com a superfície firme. A resposta foi avaliada de acordo com o critério de Thalhammer *et al.*(1995):

1 – A pata traseira retorna a sua posição original com as garras abertas. (dorsiflexão ou abdução e extensão das garras);

2 – A pata traseira retorna a posição original, no entanto as garras estão fechadas. (dorsiflexão e garras parcialmente flexionadas e aduzidas);

3 –A pata traseira não retorna totalmente a posição original. (inabilidade em abrir e extender as garras);

4 – A pata traseira permanece e as garras estão fechadas (denota bloqueio motor total).



FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO MOTOR- superfície plana

3.3 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO ANESTÉSICO LOCAL

O estudo da liberação do anestésico local na forma de microesferas, utilizado neste trabalho, foi realizado através do sangue dos ratos, obtido por punção cardíaca antes da eutanásia dos animais para o estudo histológico. As amostras de sangue foram colocadas em tubos com heparina, associado ao ácido tetra-acético, centrifugado para separar o plasma, e armazenado congelado até a análise da concentração plasmática da droga, figuras 10, 11 e 12.



FIGURA 10 – ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO ANESTÉSICO LOCAL- sangue dos animais



FIGURA11 - ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO ANESTÉSICO LOCAL- centrifugação

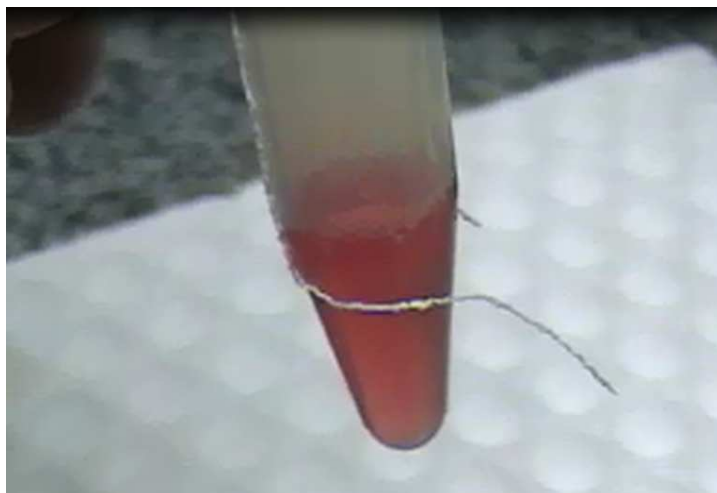


FIGURA 12 - ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO ANESTÉSICO LOCAL- separação do plasma

3.4 ESTUDO HISTOLÓGICO DO NERVO CIÁTICO

Um animal de cada grupo foi sacrificado no 2º, 4º, 6º, 8º dia após aplicação do anestésico local. Os dois nervos ciáticos dos ratos foram expostos cirurgicamente após serem submetidos à anestesia inalatória. Utilizou-se fluotano como anestésico. Após a retirada da peça cirúrgica, o rato foi eutanaziado com uma injeção intraperitoneal de tiopental sódico (70mg/kg). Os nervos foram preparados de acordo com o procedimento recomendado para a avaliação da neurotoxicidade do tecido (SANDERSON, 1994).

3.5 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Geladeira Electrolux®

Centrífuga Quimis®

Balança Digimed KN5000®

Chapa quente Prodicil®

Equipamento de anestesia Brasmed®

Agulha 24 de teflon (Stimuplex, B. Braun, Melsungen, Germany)

Estimulador de nervo (DigiStim II, NeuroTechnology, Houston, Tex.).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Trata-se de um estudo experimental, prospectivo e longitudinal da avaliação da eficácia anestésica de microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%. Todos os dados foram obtidos, prospectivamente, pelo pesquisador na avaliação dos animais, registrados no instrumento de coleta de dados elaborado pelo autor e apresentado no anexo. Os dados foram digitados em planilha eletrônica (Microsoft Excel®), conferidos e exportados para o programa Statistica®. O modelo de Anova de Kruskal-Wallis foi aplicado para avaliar a diferença das medidas de natureza contínua de distribuição assimétrica (teste sensitivo) nos diferentes grupos. Para todos foram utilizados os testes bicaudais, cujas diferenças poderiam estar distribuídas para ambos os lados da curva, com nível de significância mínimo de 5%. O tamanho da amostra foi estimado considerando um erro de tipo I de 5% (alfa) e erro do tipo II de 10%, com um poder de teste estimado mínimo de 90%.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO SENSITIVO

A avaliação do bloqueio sensorial demonstrou que após a infiltração do AL no nervo ciático de ratos, ocorreu um aumento do limiar de dor dos animais com todas as formulações anestésicas estudadas (Grupos B C D); estatisticamente diferente do grupo (A) controle ($p < 0,001$).

Contudo, comparações entre os grupos B C D, demonstraram perfis de bloqueio sensoriais semelhantes ($p > 0,05$). A injeção de AL, na forma de microesferas em concentrações diferentes, não induziu aumento na duração da analgesia e na intensidade do efeito quando comparada ao AL livre. (Tabela 1)

4.2 AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO MOTOR

A injeção do AL livre ou na forma de microesfera alterou a função motora após o bloqueio do nervo ciático; percebeu-se a perda reversível dos reflexos motores nos animais utilizados. Comparações entre estas formulações de AL evidenciaram uma menor intensidade do bloqueio motor no grupo (C) de microesfera de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%). (Tabela 1)

TABELA 1 – RESUMO DOS TESTES: SENSITIVO, MOTOR E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Grupo	Dia ¹	Teste Sensitivo ²	Teste Motor ²	Concentração Plasmática ³
A	2 ^o	1	1	ND
	4 ^o	1	1	ND
	6 ^o	1	1	ND
	8 ^o	1	1	ND
B	2 ^o	8	1	79ng/ml
	4 ^o	1	1	ND
	6 ^o	2	1	ND
	8 ^o	1	1	ND
C	2 ^o	5	1	ND ng/ml
	4 ^o	2	1	255,70 ng/ml
	6 ^o	1	1	136,60 ng/ml
	8 ^o	1	1	81,6 ng/ml
D	2 ^o	1	1	ND
	4 ^o	1	1	ND
	6 ^o	1	1	ND
	8 ^o	1	1	ND

¹ dia da eutanásia do animal

² testes medidos em segundos

³ ND = Não detectado (concentrações inferiores de 50 ng/ml de plasma)

Do gráfico 1, extrai-se que, em todas as observações, o teste sensitivo foi negativo no grupo A. Fica evidente que, na grande maioria dos animais deste grupo, o teste durou 1 segundo. Nas tabelas 2, 3, 10 e 14 no anexo, são apresentados todos os tempos observados no experimento do grupo A. Com relação ao resultado do teste motor, todas as observações foram classificadas como grau 1, ou seja, resultado negativo.

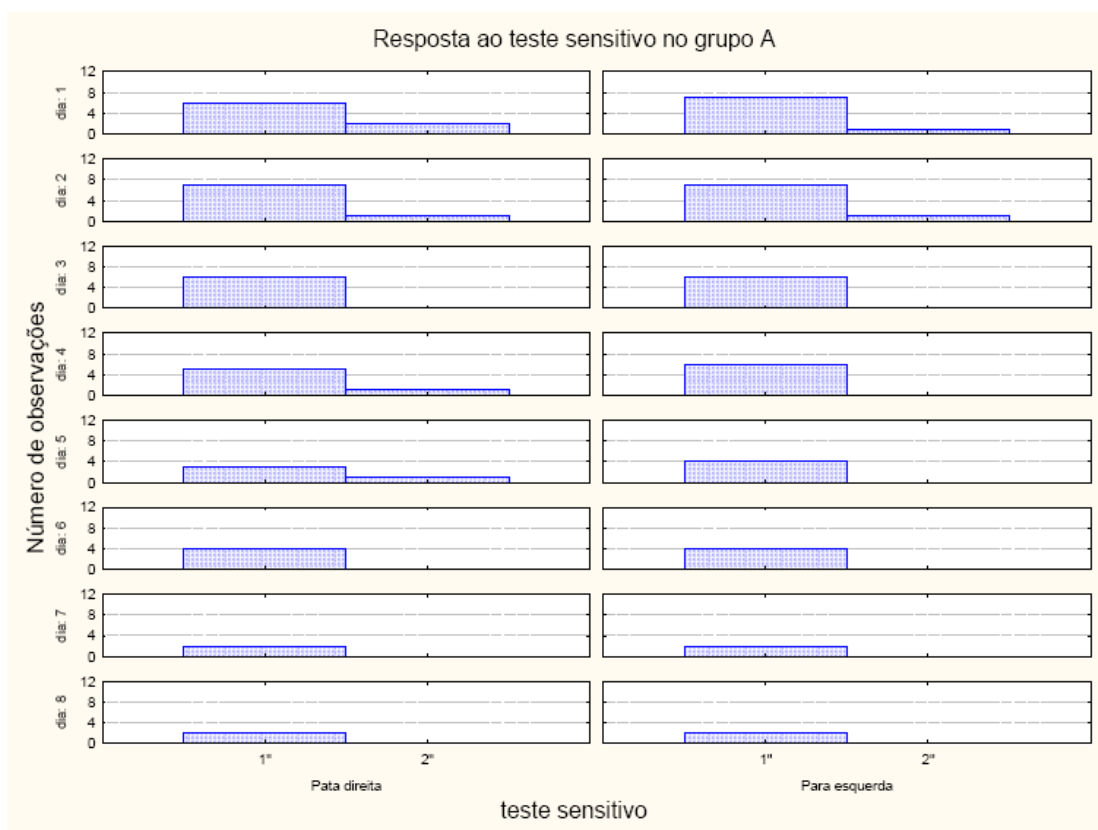


GRÁFICO 1 - RESPOSTA DO TESTE SENSITIVO NO GRUPO A

No gráfico 2, observa-se os tipos de resposta ao teste sensitivo no grupo B. Neste grupo, já se começa a notar que, em alguns animais, o teste sensitivo com valores superiores a 4 segundos. Em 50% das observações, o teste sensitivo foi positivo nos dois primeiros dias.

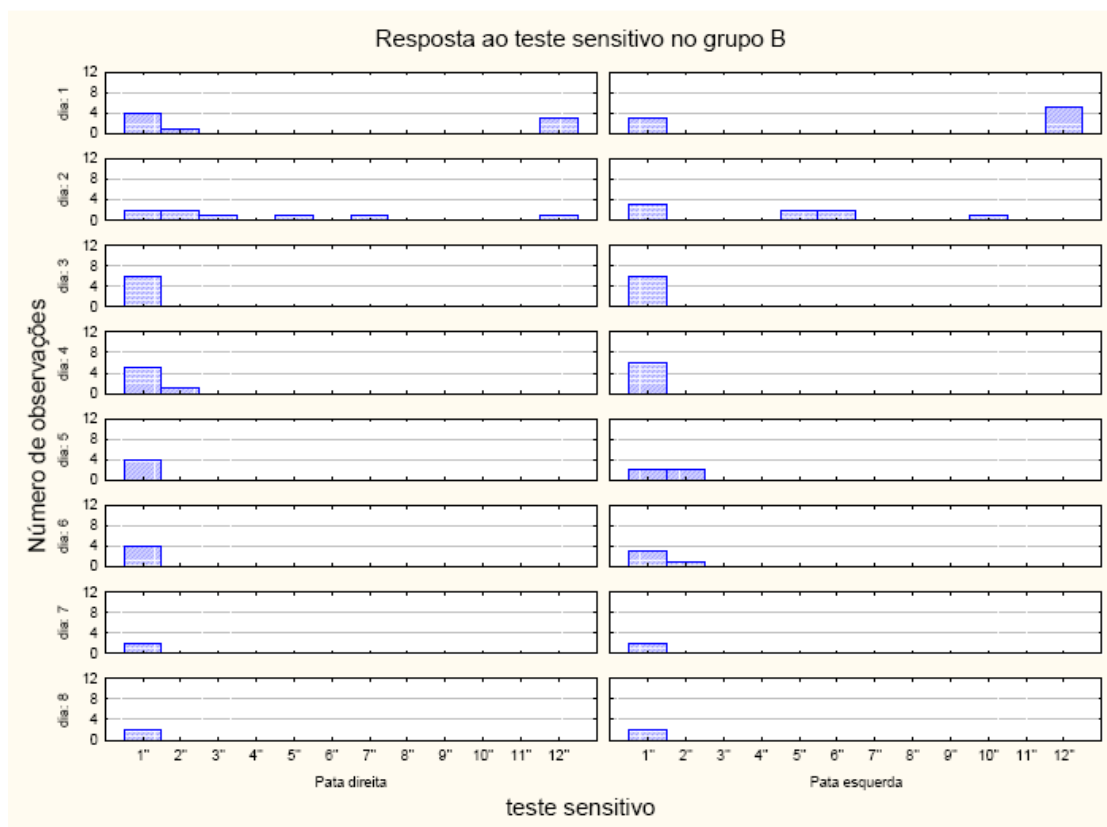


GRÁFICO 2 - RESPOSTA DO TESTE SENSITIVO NO GRUPO B

Do gráfico 3 depreendem-se os resultados do teste motor, em que 37,50% dos casos foram positivos no primeiro dia. Todas as respostas do grupo B são demonstradas nas tabelas 4, 5, 11 e 15 no anexo.

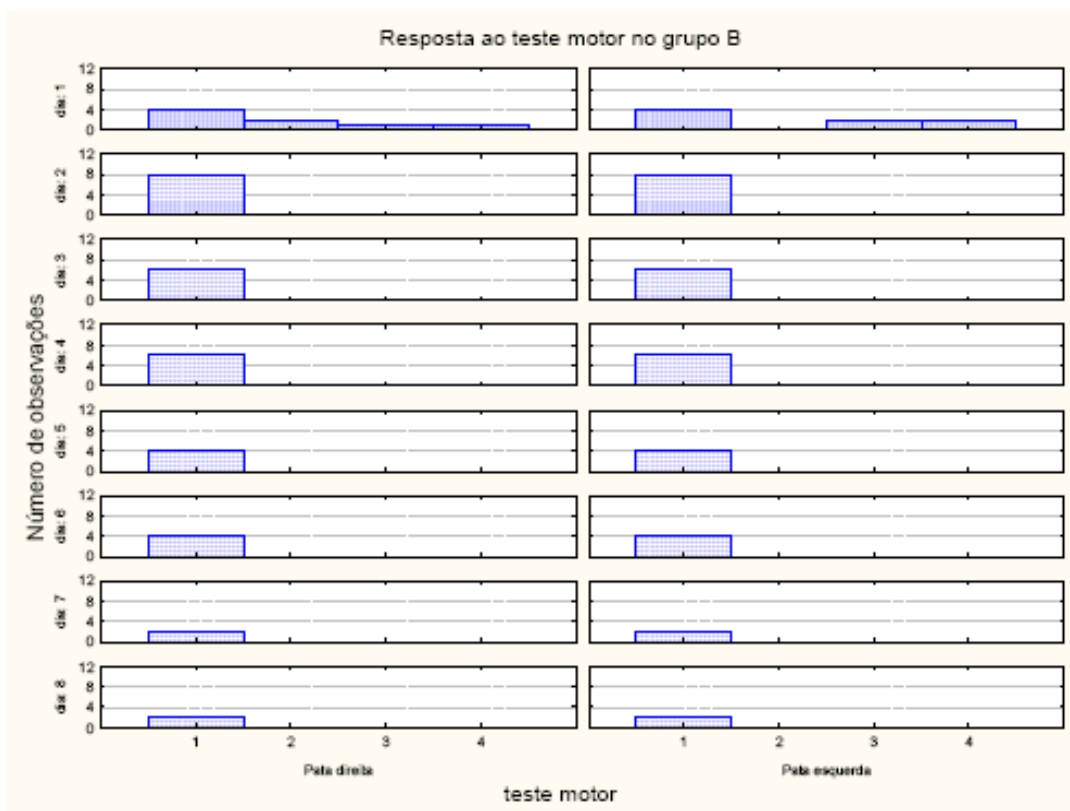


GRÁFICO 3 - RESPOSTA DO TESTE MOTOR NO GRUPO B

No gráfico 4, observam-se os tipos de resposta ao teste sensitivo no grupo C, que foi positivo em cerca de 50% das observações nos dois primeiros dias.

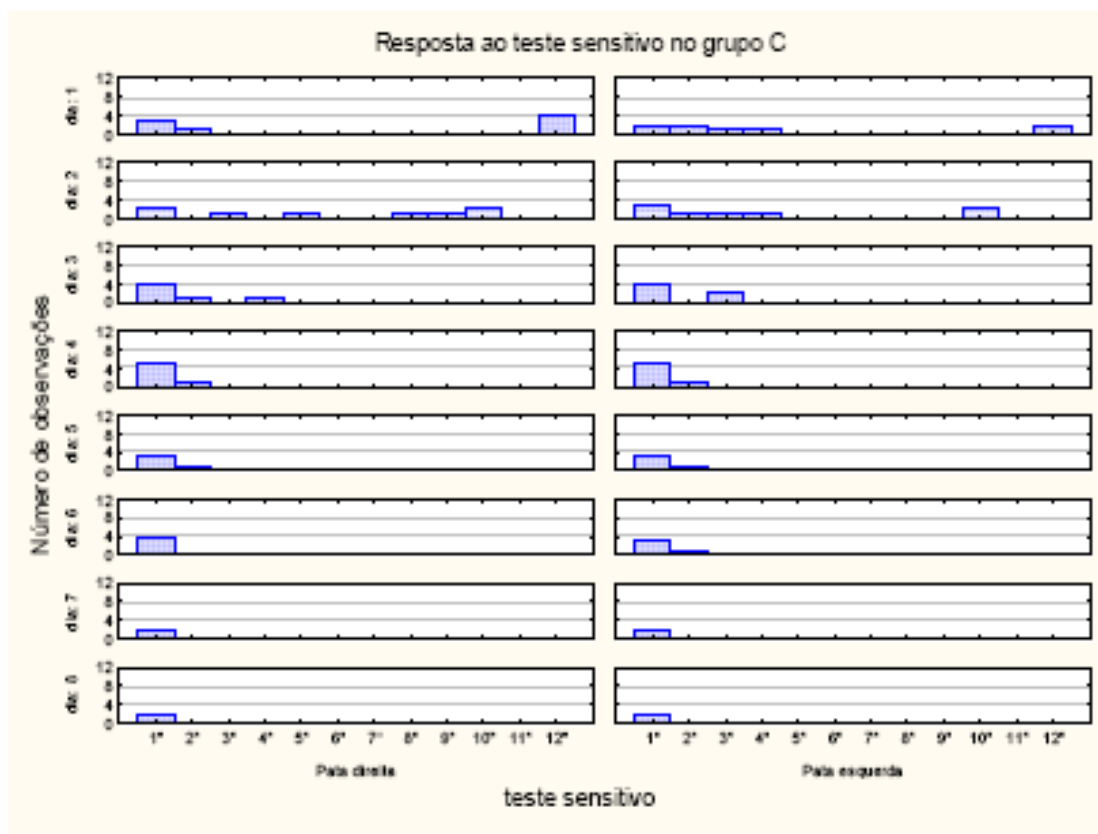


GRÁFICO 4 - RESPOSTA DO TESTE SENSITIVO NO GRUPO C

Do gráfico 5, depreende-se que 10% dos casos foi positivo ao teste motor no primeiro dia. Todos os resultados do teste sensitivo e motor são demonstrados nas tabelas 6, 7, 12 e 16 no anexo.

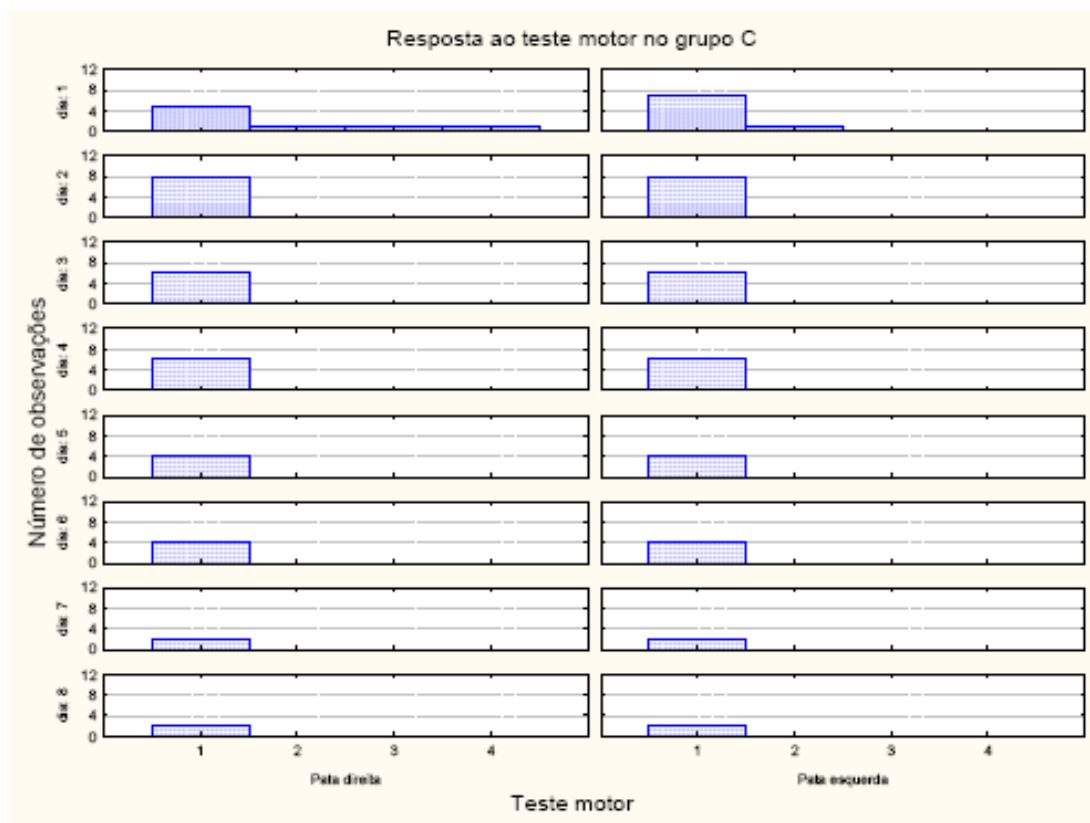


GRÁFICO 5 - RESPOSTA DO TESTE MOTOR NO GRUPO C

No gráfico 6, verifica-se as respostas ao teste sensitivo no grupo D, que foi positivo em cerca de 40% a 60% das observações nos dois primeiros dias.

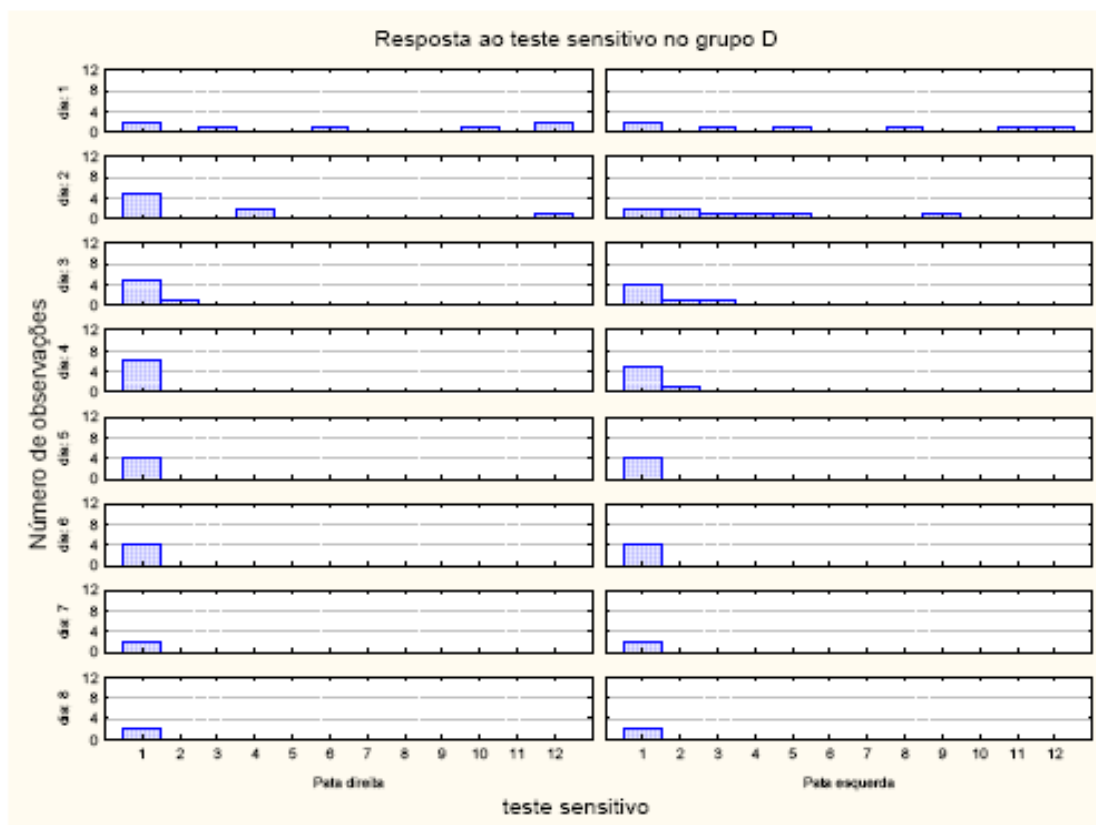


GRÁFICO 6 - RESPOSTA DO TESTE SENSITIVO NO GRUPO D

Extrai-se do gráfico 7, que ocorreu cerca de 40% de positividade ao teste motor no primeiro dia. Nas tabelas 8, 9, 13 e 17 no anexo apresentam os resultados descritivos.

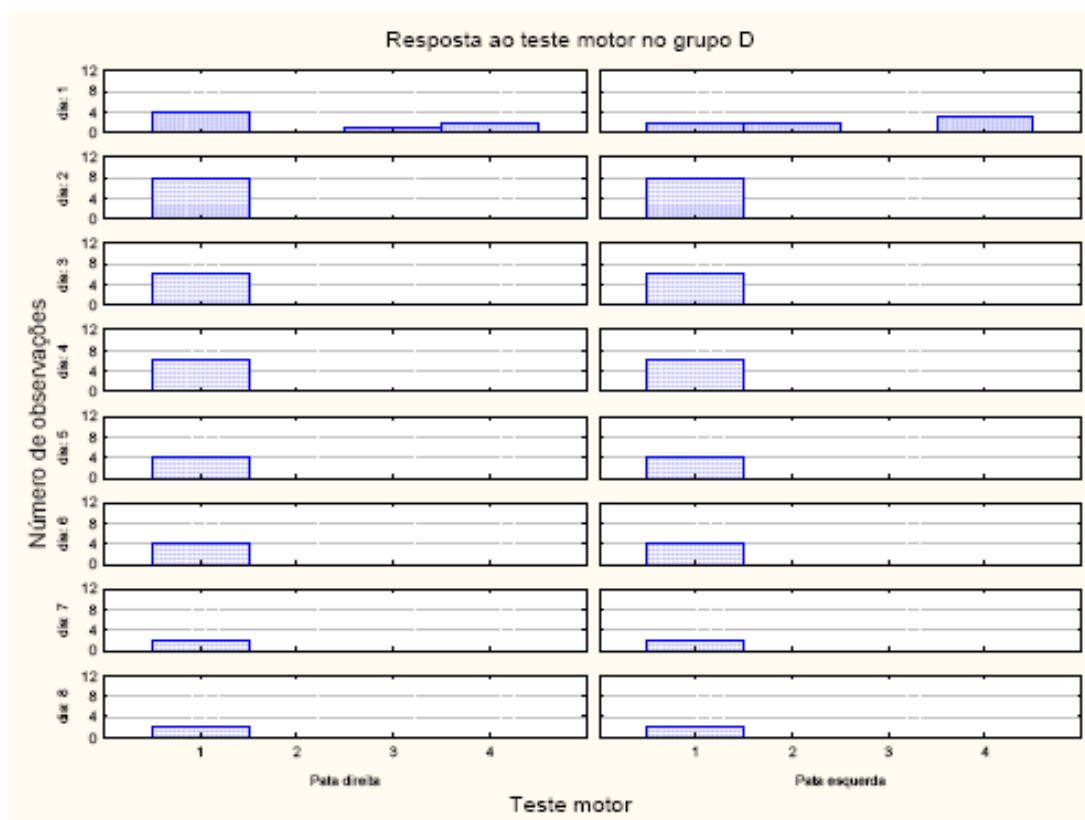


GRÁFICO 7 - RESPOSTA DO TESTE MOTOR NO GRUPO D

No gráfico 8, percebe-se a variação da resposta ao teste sensitivo entre os grupos, cujas tabelas 18 e 19 no anexo demonstram um estudo comparado das respostas sensitivas e motoras entre os grupos.

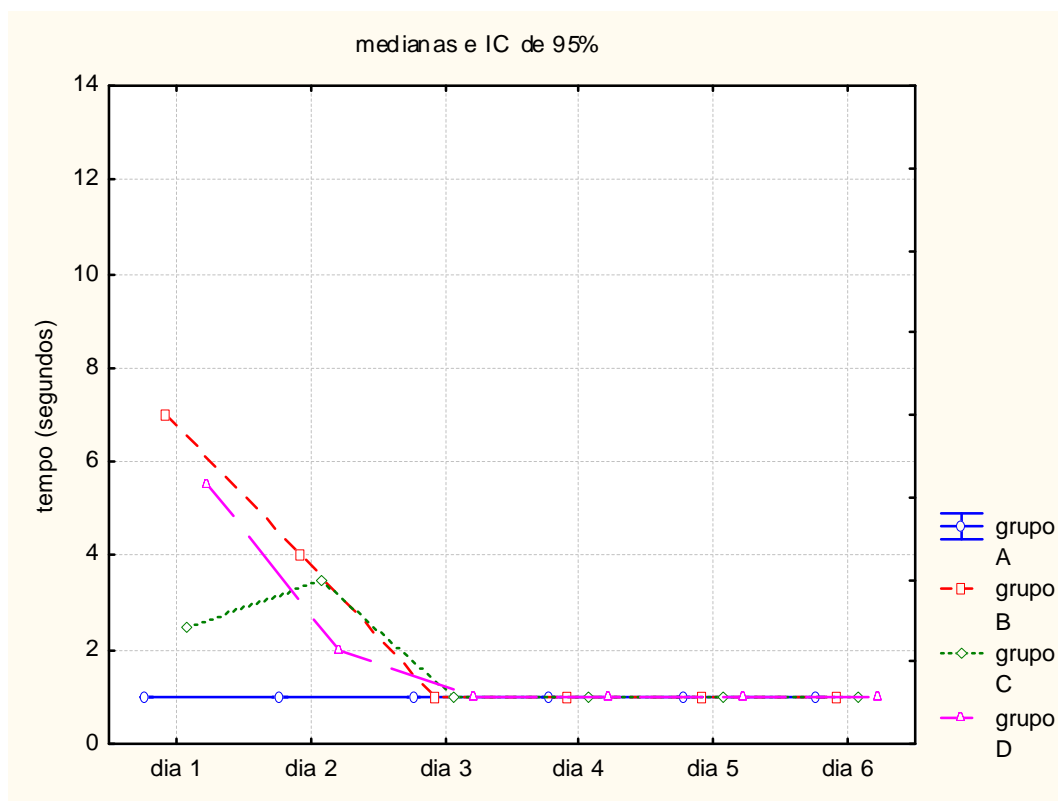


GRÁFICO 8 - VARIAÇÃO SENSITIVA ENTRE OS GRUPOS

4.3 AVALIAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DAS DROGAS

A microesfera de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% grupo (C), foi detectada no plasma dos animais até o 8º dia (81,6 ng/ml), enquanto que a microesfera de bupivacaína S50-R50 grupo (B) detectou-se uma concentração plasmática inferior (79 ng/ml) somente até o 2º dia após a injeção. Embora a concentração plasmática de bupivacaína no grupo (C) tenha sido superior à concentração de bupivacaína no grupo (B), as diferenças registradas no teste sensitivo (5 segundos para o grupo C e 8 segundos para o grupo B) no 2º dia, não foram proporcionais à concentração plasmática da droga. Em contrapartida, a não detecção da presença de bupivacaína no plasma no grupo (B) interferiu diretamente

sobre o bloqueio nervoso e foi comprovado pelo aumento da sensibilidade do animal sobre a placa quente. (Tabela 1)

Nas tabelas 20, 21, 22 e 23, em anexo, encontramos a descrição geral de todas as dosagens sanguíneas.

4.4 RESPOSTAS HISTOLÓGICAS

Os resultados da análise histopatológica em MET sugerem que não houve diferenças significativas entre os grupos (A), (B), (C) e (D). As amostras apresentaram aspectos normais com relação ao contorno das bainhas de mielina, tamanho das células de Schwann, organização das suas lamelas e volume dos axônios envolvidos por elas. (figura 13)

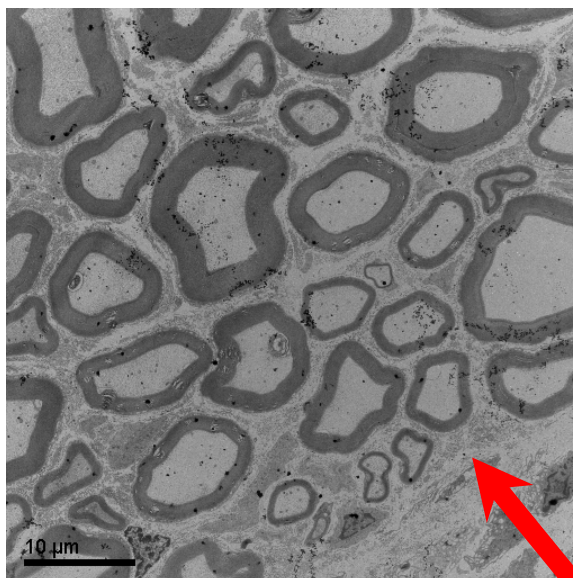


FIGURA 13 - RESPOSTA HISTOLÓGICA

Observa-se a presença de bainhas de mielina normais. Aumento de 2500x

4.5 COMPLICAÇÕES

No grupo A (Microesfera) em um animal foi observado agressividade e outro lesão ocular; no grupo B (Microesfera de Bupivacaína racêmica S50-R50) em um animal foi observado bolhas (queimaduras); no grupo C (Microesfera de Bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%) houve um caso de hematúria e no grupo D (Bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%) um caso de agitação exacerbada do animal.

5 DISCUSSÃO

O anestésico local na sua forma tradicional demonstra seus benefícios terapêuticos no tratamento da dor pós-operatória há bastante tempo, porém seus efeitos, algumas vezes, são limitados pelas propriedades físico-químicas, (solubilidade) e toxicológicas. Um anestésico ideal deve ter longa duração de ação, diminuição da toxicidade local e/ou sistêmica e aumento da seletividade para o bloqueio sensorial em relação ao bloqueio motor (COVINO, 1986).

A diminuição da toxicidade associada à bupivacaína racêmica resultou na pesquisa de um novo agente anestésico, a bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%. Droga sintetizada sob a forma enantiomérica, que demonstra a importância da estereosseletividade na diminuição da toxicidade. A bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% é o isômero levógiro da bupivacaína. Quimicamente é um anestésico local do tipo amino-amida, e sua produção foi feita porque se observou experimentalmente que o isômero dextro (R) tinha maior potencial para ocasionar fenômenos de neurotoxicidade, como as convulsões e os fenômenos de cardiotoxicidade: taquicardia, bloqueios atrioventriculares, alargamento do QRS e fibrilação atrial. Anestésicos locais bloqueiam os canais de sódio periféricos rápidos, voltagem-dependentes dos axônios; tais drogas têm uma alta afinidade pelo sistema nervoso central e sistema cardiovascular. A toxicidade do sistema nervoso central segue um processo de dois estágios; quando em baixas concentrações, promove o bloqueio de neurônios inibitórios, que resulta em convulsões generalizadas. Em altas concentrações, ocorre uma depressão global do sistema nervoso central. A cardiotoxicidade, pode ser mediada indiretamente pelo cérebro e diretamente no miocárdio. De forma semelhante ao sistema nervoso central, a cardiotoxicidade indireta ocorre inicialmente como ação estimulatória decorrente de concentrações mais baixas, seguida de um componente depressivo em concentrações maiores. As ações diretas no miocárdio incluem inotropismo, cronotropismo e dromotropismo negativos. Estudos eletrofisiológicos em animais demonstraram que o bloqueio dos canais de sódio é estereosseletivo; o isômero (R) é mais potente e rápido que o isômero (S). Isto explica os grandes índices de cardiotoxicidade associados ao isômero (R) devido à maior contribuição do bloqueio na fase de platô do potencial de ação da fibra miocárdica (WHITESIDE; WILDSMITH, 2001).

Associada a estas alterações, as pesquisas promoveram melhora dos efeitos terapêuticos dos anestésicos locais, utilizando-se de carreadores de liberação controlada (PINTO *et al.*, 2006). Esses carreadores têm a vantagem de contornar propriedades físico-químicas limitantes (como a solubilidade aquosa ou em membranas) das drogas encapsuladas, melhorando assim a farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controle da absorção e distribuição tecidual) e os efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica das mesmas). Pesquisas em humanos demonstraram bons resultados no tratamento da dor pós-operatória com a encapsulação de bupivacaína 0,5% em **lipossomas** (ARAÚJO; PINTO; BRAGA, 2003). Os resultados obtidos com os lipossomas são devidos à capacidade de veicular o anestésico local em órgãos-alvo, disponibilizando apenas uma fração (liberação controlada) para o sítio de ação. Em **ciclodextrinas** (ARAÚJO; FRACETO; BRAGA, 2005), a intensidade e a duração do efeito dos anestésicos locais são obtidas através da baixa absorção sistêmica do complexo. Através desses estudos, conclui-se que há uma maior duração da analgesia, quando comparada àquela obtida após administração do anestésico local na sua forma livre, com aumento da seletividade entre o bloqueio sensorial e o motor, resultados atribuídos à manutenção de altos níveis da droga no local de injeção.

Novos estudos com anestésicos locais, utilizando-se de microesferas, como carreador para liberação programada, têm demonstrado uma alternativa atrativa aos lipossomas e ciclodextrinas (LE CORRE. *et al.*, 1995).

Em contraste com os anestésicos locais utilizados na forma de liberação controlada, todos os anestésicos locais na forma livre, exigem altas doses clínicas. As taxas de infusão de bupivacaína em bloqueios contínuos ou em nervos periféricos para controle da dor aguda ou crônica em humanos adultos é de 5 a 30 mg/h (DENSON; RAJ, 1983). Para se obter uma adequada dose de bupivacaína na forma de liberação controlada foi necessário o desenvolvimento de microesferas, formulação esta que permite alta porcentagem de droga à disposição (LEWIS, 1990).

Este trabalho experimental original analisou o perfil da liberação controlada da mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25) sob a forma de microesferas, aproveitando-se das qualidades de um anestésico local de menor toxicidade,

associado a um carreador, que poderiam proporcionar uma liberação prolongada do fármaco, e permitir maior duração de ação, menor captação para a circulação sistêmica, evitando altas concentrações plasmáticas.

Microesferas contendo anestésico local por meio da emulsificação da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% com o polímero (PLGA), a eliminação do solvente por meio do método “spray-dryed” e liofilização foi utilizado neste estudo, por possuir o polímero (PLGA) uma capacidade de cada gramo poder conter até 0,8g de bupivacaína e ser biodegradável (CURLEY; CASTILHO; HOTZ, 1996). Diferentemente o polímero de ácido poliláctico (PLA) armazena menor quantidade do medicamento, apenas 22% de anestésico (LE CORRE. *et al.*, 2002). O co-polímero de ácido poliláctico-co-glicólico tem sido amplamente utilizado devido a sua taxa de degradação e propriedades mecânicas poderem ser precisamente controladas pela variação na relação ácido láctico/ ácido glicólico e pela alteração no peso molecular dos polímeros. Os polímeros de PLGA são degradados em monômeros ácidos (ex: ácido láctico e glicólico), que são, conseqüentemente, eliminados do organismo na forma de dióxido de carbono e água (ITO. *et al.*, 2005; WAKIYAMA; JUNI; NAKANO, 1981).

Em relação à técnica anestésica, a utilização da anestesia inalatória com fluotano sob máscara antes do bloqueio do nervo ciático dos ratos, baseada em pesquisas anteriores, minimizou a atividade aversiva com a repetição dos procedimentos e realização de injeções mais precisas. Este estudo também confirma que a breve utilização de fluotano não tem efeito sobre a mensuração e duração do bloqueio após os ratos despertarem da anestesia (HU; HU; BERDE, 1997).

A escolha do nervo ciático para o bloqueio nervoso foi utilizada por ser um modelo experimental que fornece os meios para a avaliação do tempo de instalação e duração do bloqueio motor (SIMONETTI; VALINETTI; FERREIRA, 1997), (FELDMAN; COVINO, 1988), a quantificação do bloqueio sensitivo com anestésicos locais (GRANT. *et al.*, 1992), e, também, permite detectar a neurotoxicidade potencial de anestésicos locais (SIMONETTI; CARVALHO, 1997). O nervo ciático, portanto se constitui no ponto de partida para o estudo de anestésicos locais em animal intacto, compondo com as investigações *in vitro* os requisitos da fase pré-clínica de novos compostos antes das fases de investigação no homem.

A avaliação da eficácia anestésica sensorial foi baseada na observação do comportamento dos animais de experimentação ao estímulo térmico nociceptivo, caracterizado pela troca rápida do apoio dos pés (“sapateado”), lambar, morder ou levantar uma das patas quando colocados sobre uma superfície aquecida a mais de 50° C (placa quente) mostrou-se um modelo muito sensível aos nossos objetivos, (MASTERS. *et al.*, 1993). É importante enfatizar que, embora a inervação sensitiva da pata seja mediada pelo nervo ciático, às flexões do quadril e do joelho, necessários para remover a pata da placa quente, são mediados pelo nervo femoral, não foi bloqueado. Consequentemente este teste foi específico para avaliar o bloqueio sensitivo. Sob essas condições a pata foi estimulada de uma forma mais restrita, diferentemente de outros métodos de ensaio, como a imersão em água quente, em que uma área maior é estimulada, possibilitando outras contribuições sensitivas, com probabilidade a interpretações errôneas. A temperatura de 56° C, apesar de alta, foi utilizada porque representa um estímulo forte e distingue mais claramente o bloqueio sensorial de efeitos analgésicos mais suaves. Convém salientar que o modelo utilizado neste teste sensitivo é originado de teste para anestesia, não contemplando analgesia; no entanto, não se conhece nenhum teste para analgesia em animal no segundo dia de experimento na literatura.

A avaliação do bloqueio motor foi baseada na posição normal dos ratos em descanso, cujos dedos das patas estão flexionados sobre o dorso, observando-se anormalidades na forma de andar, habilidade em reposicionar a pata traseira e os dedos, após o bloqueio nervoso. O tempo após a injeção do medicamento em estudo até a recuperação do escore dois (2) (THALHAMMER. *et al.*, 1995) foi a delimitação da duração do bloqueio motor.

Como solução livre, a literatura relata que a administração da mistura de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%, apresenta menor incidência de bloqueio motor, e maior tempo de analgesia pós-operatória, sendo dose-dependente, em comparação com a solução de bupivacaína racêmica (S50-R50), (FOSTER; MARKHAM, 2000).

A análise da eficácia anestésica *in vivo* das preparações (microesferas de bupivacaína racêmica S50-R50, microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% e bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%), elevou o

limiar de dor dos animais tratados; estatisticamente diferente do grupo controle (microesferas puras).

Comparações entre os complexos mostraram perfis de bloqueio sensorial semelhantes, e não revelam diferença significativa de resposta positiva ao teste sensitivo. A injeção dos anestésicos locais livres e encapsulados alterou a função motora com o bloqueio do nervo ciático. Houve a perda reversível dos reflexos motores em todos os animais tratados, embora tenha sido observada uma menor intensidade do bloqueio motor com a mistura de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% encapsulada em microesferas. As propriedades benéficas existentes do bloqueio nervoso diferencial da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% livre foram potencializadas na interação com as microesferas.

Os resultados indicam que a incorporação de bupivacaína (S50-R50) e (S75-R25) em microesferas resultou em significativo, mas relativa curta prolongação do bloqueio nervoso em comparação aos resultados de Masters. et al., 1993, aumentando a questão sobre a definição da ótima composição da microesfera e evitando-se consequências de um excesso ou um déficit da droga, que poderiam comprometer sua eficácia antes da administração da dose. Este sistema consistiu em uma matriz polimérica biodegradável que contém uma grande capacidade de armazenar o anestésico local. A taxa de degradação do co-polímetro de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) utilizado neste trabalho foi fundamental na determinação da taxa de liberação da droga encapsulada e dependeram da cristalinidade, hidrofobicidade e peso molecular do polímero. A configuração molecular das microesferas, contendo anestésico local por meio da emulsificação da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% com polímero (PLGA), e a eliminação do solvente por meio do método *spray-drye*” e liofilização do mesmo foram testadas in vitro com resultados semelhantes aos encontrados com a bupivacaína (TANAKA. et al., 2008).

Sob anestesia inalatória com fluotano, amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, antes do sacrifício dos animais, no 2º, 4º, 6º e 8º dia após a aplicação do anestésico local. As amostras de sangue anticoaguladas foram colocadas em tubos com ácido tetra-acético, associado à centrifugação para separar o plasma; foi, então, armazenado congelado para posterior análise da concentração plasmática da droga. Os resultados do estudo farmacodinâmico comprovaram a

liberação lenta e prolongada do anestésico proporcionada pela sua incorporação às microesferas. No entanto, a concentração plasmática do anestésico e o seu efeito não foram diretamente proporcionais. Apesar de o grupo (C) ter apresentado valores plasmáticos superiores por tempo prolongado, não houve diferença significativa quanto ao bloqueio nervoso alcançado entre os grupos (C) e (B).

Os resultados da análise histopatológica sugerem que não houve diferenças significativas entre os grupos (A), (B), (C), (D). As amostras apresentaram aspectos normais com relação ao contorno das bainhas de mielina, tamanho das células de Schwann, organização das suas lamelas e volume dos axônios envolvidos por elas. Em nenhum caso foi encontrado manifestação de processo neuropatológico (degeneração Walleriana) ou alterações clínicas nos animais, embora um animal do grupo de (D) tenha apresentado agitação exacerbada. Quando analisada a concentração plasmática deste animal, foram encontrados concentrações de AL, quatro vezes abaixo do limiar de toxicidade do sistema nervoso central em seres humanos ou ratos (OHMURA. *et al.*, 2001). O estresse provocado neste animal durante o processo de obtenção dos dados neste estudo pode ser o responsável pelo aparecimento desta manifestação clínica.

A despeito de claras diferenças entre ratos e humanos em termos de métodos, doses e volumes de solução anestésica, os resultados demonstrados nas condições deste estudo, a bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%, encapsulada em microesfera, comportou-se aparentemente de forma semelhante à microesfera de bupivacaína (S50-R50), não havendo diferença significativa entre estas formulações com relação ao bloqueio sensitivo. Porém, confirmou os estudos da literatura: há liberação lenta e prolongada do anestésico local, proporcionada pela sua incorporação às microesferas, quando comparada com as formulações livres (ESTEBE. *et al.*, 2003). Associados a estas qualidades, existem ainda dois grandes benefícios da mistura de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% encapsulada em microesfera: o menor grau de bloqueio motor quando comparada a todas as outras formulações e menor toxicidade. Embora novos estudos devam ser realizados, a mistura bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%. encapsulada em microesfera, representa uma alternativa mais segura e eficaz do que a bupivacaína (S50-R50) no controle da dor pós-operatória.

6 CONCLUSÃO

A liberação controlada de microesfera de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%, apresentou resultado semelhante em relação à analgesia quando comparado às outras formulações anestésicas com menor bloqueio motor.

REFERÊNCIAS

- AKERMAN, B.; HELLBERG, I.B.; TROSSVIK, C. Primary evaluation of the local anesthetic properties of the amino amide agent ropivacaine. **Acta Anesthesiol. Scand.**, Munksgaard, v.32: 571-578, 1988.
- ARAÚJO, D.R.; PINTO, L.M.; BRAGA, A.F.A. Formulações de anestésicos locais de liberação prolongada: Aplicações terapêuticas. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, Rio de Janeiro, v.53, p.663-671, 2003.
- ARAÚJO, D.R.; FRACETO, L.F.; BRAGA, A.F.A. 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.**, Rio de Janeiro, v.55, p.316-328, 2005.
- BADER, A.M. *et al.* Comparison of bupivacaine and ropivacaine induced conduction blockade in the isolated rabbit vagus nerve. **Anesth. Analg.**, Cleveland, v.68, p.724-729, 1989.
- BARASH, P.G.; CULLEN, B.F.; STOELTING, R.K. Anestésicos locais. **Clinical Anaesthesia**. 4 ED., 2001; 449-469.
- BENOIT, J.P. Biodegradable microspheres in advances production technology. **Methods and industrial applications**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.35-72.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, London, v.353, p.1610-1615, 1999.
- BIBBY, D.; DAVIES, N.M.; TUCKER, I.G. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.197, p.111, 2000.
- BINDSCHAEDLER, C. *et al.* Polyanhydride microsphere formulation by solvent extraction. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.77, p.696-698, 1988.
- BLANCO, M.D.; BERNARDO, M.V.; GOMES, C. Bupivacaine-loaded comatrix formed by albumin microspheres included in a poly(lactide-co-glycolide) film: in vivo biocompatibility and drug release studies. **Biomaterials**, Guildford, v.20, p.1919-1924, 1999.
- BOOGAERTS, J.G.; LAFONT, N.D.; DECLERQ, A.G. Epidural administration of liposome associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. **J. Clin. Anesth.**, Stoneham, v.6, p.315-320, 1994.
- BORGEAT, A.; EKATODRAMIS, G.; SCHENKER, C.A. Postoperative nausea and vomiting in regional anesthesia. A review. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.98, p.530-547, 2003.

BRANNON-PEPPAS, L. **Polymers in controlled drug delivery**. Disponível em <http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>. Acesso em: 12/08/2009.

CAMPBELL, J.N. *et al.* Peripheral neural mechanism of nociception. In: WALL, P.D; MELZACK, R. (Ed.). **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989. p.22-25.

CARVALHO, W.A.; LEMONICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, Rio de Janeiro, v.48, p.137-158, 1998.

CARPENTER, R.L.; MACKAY, D. Local anesthetics. BARASH, P.G.; CULLEN, B.F.; STOELTING, R.K. **Clinical anesthesia**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.

CERVERO, F.; TATTERSALL, J.E. Somatic and visceral sensory integration in the thoracic spinal cord. **Progr. Brain Res.**, Amsterdam, v.67, p.189-205, 1986.

CESSÉLIN, F. Endomorphines et nociception. **Rev. Neurol.**, Paris, 1986; v.142, p.649-670, 1986.

COVINO, B.G. Pharmacology and toxicity of local anesthetic agents. **Lectures in Anesthesiology**, 1986.

COVINO, B.G. Pharmacology of local anaesthetic agents. **Br. J. Anaesth.**, Altrincham, v.58, p.701-716, 1986.

CURLEY, J.; CASTILLO, J.; HOTZ, J. Prolonged regional nerve block. Injectable biodegradable bupivacaine – polyester microspheres. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.84, p.1401-1410, 1996.

DALMORA, M.E.; DALMORA, S.L.; OLIVEIRA, A.G. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.222, p. 45-55, 2001.

DAVDA, J.; LABHASETWAR, V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.233, p.51-59, 2002.

DE AZEVEDO, M.M.M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. Monografia LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP. Disponível em: <http://lqes.iqm.unicamp.br>, 2003. Acesso em: 21/09/2009.

DENSON, D.D.; RAJ, P.P. Perineural infusions of bupivacaine for prolonged analgesia: Pharmacokinetic considerations. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.**, Munich, v.21, p.591-597, 1983.

DURAN, F.S.; HEAKETH, H.P. **An introduction to drug delivery for chemical engineers**. Disponível em: <http://engineeringenrowan.edu/hesketh/hesketh/cee%20drug%20delivery> pdf companies involved in polymeric drug delivery, 2003. Acesso em: 21/09/2009.

EKENSTAM, B.; EGNER, B.; PETTERSSON, G. N-Alkyl-pyrrolidire and N-alkyl-piperidine Carboxylic acid Amides **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v.11, p.1183, 1957.

ESTEBE, J.P. *et al.* Effect of dexamethasone on motor brachial plexus block with bupivacaine and with bupivacaine-loaded microspheres in a sheep model. **Eur. J. Anaesthesiol.**, Oxford, v.20, n.4, p.305-310, 2003.

FARREL,S.; HEAKETH,H.P. **An introduction to drug delivery for chemical engineers.** 2003. Disponível em: <http://engineering.engrowan.edu/hesketh/hesketh/cee%20drug%20delivery%20companies%20involved%20in%20polymeric%20drug%20delivery.pdf> Acesso em: 21/09/2009.

FELDMAN, H.S.; COVINO, B.G. Comparative motorblocking effects of bupivacaine and ropivacaine, a new amino amide local anesthetic, in the rat and dog. **Anesth. Analg.**, Cleveland, v.67, p.1047-1052, 1988.

FLETCHER, D.; LE CORRE, P.; GUILBAUD, G. Antinociceptive effect of bupivacaine encapsulated in poly(D,L)- lactide-co-glycolide microspheres in the acute inflammatory pain model of carrageenin-injected rats. **Anesth. Analg.**, Cleveland, v.84, p.90-94, 1987.

FOSTER, R.H.; MARKHAM, A. Levobupivacaine: a review of its pharmacology and use as a local anaesthetic. **Drugs**, New York, v.59, p.551-579, 2000.

FROMMING, K. H.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins in pharmacy. **Topics in inclusion science.** Budapest: Kluwer Academic, 1994. p.50-51.

GATTI, A.M.; RIVASI, F. Nanotechnology and control delivery systems of drugs. **Biomaterials.** Guildford, v.23, p.23-81, 2002.

GAUR, U. *et al.* Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.202, p.1-10, 2000.

GOMES, A.S.; DE MELO, C.P. First brazilian winter school on nanobiotechno. **rede Nanobiotec**, Campinas - São Carlos - Ribeirão Preto. 2002. v.1, p.146.

GOZZANI, J.L. Fisiologia e neurofarmacologia da dor. In: YAMASHITA, A. *et al.* **Anesthesiologia.** 5 ed. São Paulo Atheneu, 2000. p.1151-1155.

GRANT, G.J. *et al.* A rat sciatic nerve model for independent assessment of sensory and block induced by local anesthetics. **Anesth. Analg.**, Cleveland, v.75, p.889-894, 1992.

GRANT, G.J.; BARENHOLZ, Y.; PISKOUN, B. DRV liposomal bupivacaine: preparation, characterization and in vivo evaluation in mice. **Pharm. Res.**, New York, v.18, p.336-343, 2001.

GRANT, G.L.; BANSINATH, M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Reg. Anesth. Pain Med.**, Secaucus, v.26, p.61-63, 2001.

HA, J. C.; LEE, Y. M.; KIM, S.Y.J. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) poly(ethyleneoxide) (pluronic)/poly(epsilon-caprolactone) (PCL) amphiphilic block

- copolymericnanospheres - I. Preparation **J. Control. Release**, Amsteradm, v.62:381-392, 2000.
- HARUYAMA,T. Micro and nanobiotechnology for biosensing cellular responses. **Adv.Drug Deliv. Rev.** Amsterdam, v.55, p.393-401, 2002.
- HU, D.; HU, R.; BERDE, C.B. Neurologic evaluation of infant and adult rats before and after sciatic nerve blockade. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.86, p.957-965, 1997.
- ILFELD, B.M. *et al.* Ambulatory perineural infusion: the patients´ perspective. **Reg. Anesth. Pain Med.**, Secaucus, v.28, p.418-423, 2003.
- INOUE, K. *et al.* News drugs administration routes. **Drug Des. Deliv.**, Chur, v.4, p.55-66, 1989.
- ITO, Y. *et al.* A microfabrication method of a biodegradable polymer chip for a controlled release system. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, Utrecht, v.16, p.949-955, 2005.
- JAIN, A. K.; THOMAS, N. S.; PANCHAGNULA, R. Transdermal drug delivery hydrochloride. I. Effect of terpenes. **J. Control. Release**, Amsteradm, v.79, p.93-101, 2002.
- KAWASHIMA, Y. Preface nanoparticulate systems for improved drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** Amsterdam, v.1, p.1-2, 2001.
- KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Adv. Drug Deliv. Rev.** Amsterdam, v.47, 65-81, 2001.
- KREUTER, J. *et al.* Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. **J. Drug Target.**, Yverdon, v.10, p.317-325, 2002.
- KWON, G.S. Block copolymer micelles as drug delivery systems. **Adv.Drug Deliv. Rev.** Amsterdam, v.54, p.167-172, 2002.
- LAFONT, N.D.; LEGROS, F.D.; BOOGAERTS, J.G. Use of liposome- associated bupivacaine in a cancer pain ayndrome. **Anaesthesia**. Philadelphia, v.51, p.578-579, 1996.
- LANGERMAN, L.; GRANT, G.J.; ZAKOWSKI, M. Prolongation of epidural anesthesia using a lipid carrier with procaine, lidocaine and tetracaine. **Anesth. Analg**, Cleveland, v.75, p.900-905, 1992.
- LE BARS, D.; VILLANUEVA, L. Electrophysiological evidence for the activation of descending inhibitory controls by nociceptive afferent pathways. **Progr. Brain Res.**, Amsterdam, v.77, p.275-299, 1988.
- LE CORRE, P.; LÊ GUEVELLO, P.; GAJAN, V. Preparation and characterization of bupivacaine- loaded polylactide and polylactide-co-glycolide microspheres. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.107, p.41-49, 1994.
- LE CORRE, P. *et al.* Spinal controlled delivery of bupivacaine from DL-lactic acid oligomer microspheres. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.84, p.75-78, 1995.

LE CORRE, P. *et al.* Spray-dried bupivacaine-loaded microspheres: in vitro evaluation and biopharmaceutics of bupivacaine following brachial plexus administration in sheep. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.238, p.191, 2002.

LEE, K.C. *et al.* Thermal hyperalgesia accelerates and MK-801 prevents the development of tachyphylaxis to rat sciatic nerve blockade. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.81, p.1284-1293, 1994.

LE GUEVELLO, P.; LE CORRE, P.; CHEVANNE, F. High-performance liquid chromatographic determination of bupivacaine in plasma samples for biopharmaceutical studies and applications to several other local anesthetics. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, n.622:284-290, 1993.

LEGROS, F.; LUO, H.; BOURGEOIS, I. Influence of different liposomal formulation on the pharmacokinetics of encapsulated bupivacaine. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.73, p.851, 1990.

LEWIS, D.H. Controlled release of bioactive agents from lactide/ glycolide polymers. In: CHASIN M. LANGER, R. (Ed.). **Biodegradable polymers as drug delivery systems** New York: Marcel Dekker, 1990. p.1-41.

LIENTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. Liposomes – Preparation, characterization and preservation. **Method Biochem Anal.**, v.33, p.337-462, 1988.

LIMA, K.M.; RODRIGUES-JR, J. M. New developments and strategies drug delivery. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.32, p.171, 1999.

LIPFERT, P.; SEITZ, R.J.; AMDT, J.O. Ultralong-lasting nerve block: Triethyl-dodecyl ammonium bromide is probably a neurotoxin rather than a local anesthetic. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.67, p.896-904, 1987.

LOCKMAN, P.R. The transport of choline. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, v.28, p.749-771, 2002.

LOFGREN, N. **Studies on local anesthetics. xylocaine:** new synthetic drug. Stockholm: Hoeggstroms, 1948.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int J Pharm.**, Amsterdam, v.225, p.15-30, 2001.

MASTERS, D.B. *et al.* Prolonged regional nerve blockade by controlled release of local anesthetic from a biodegradable polymer matrix. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.79, p.340-346, 1993.

MAXWELL, D.J.; RETHELY, M. Ultrastructure and synaptic connections of cutaneous afferent fibres in the spinal cord. **Trends Neurosc.**, Cambridge, v.10, p.117-123, 1987.

MATHER, L.E.; CHANG, D.H. Cardiotoxicity with modern local anesthetics: is there a safer choice? **Drugs**, New York, v.61, p.333-342, 2001.

MATIOLI, G. Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, agricultura, biotecnologia, química e produtos gerais. **Guhur, J. V. M.** ed., Eduem, Maringá, pg 124, 2000.

MIDDLETON, J.C.; TRIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as medical **devices**. 2002. Disponível em: <http://www.devicelink.com/mpb/archive/98/03/002.html>. Acesso em: 21/09/2009.

MULROY, M.F.; LARKIN, K.L.; BATRA, M.S. Femoral nerve block with 0,25% or 0,5% bupivacaine improves postoperative analgesia following outpatient arthroscopic anterior cruciate ligament repair. **Reg. Anesth. Pain Med.**, Secaucus, v.26, p.24-29, 2001.

NASCIMENTO, A. *et al.* Impregnation and release of aspirin from chitosan/poly(acrylic acid) graft copolymer microspheres. **J. Microencapsul.**, London, v.3, p.679-684, 2001.

NEAL, J.M. *et al.* Brachial plexus anesthesia: Essentials of our current understanding. **Reg. Anesth. Pain Med.**, Secaucus, v.27, p.402-428, 2002

OHMURA, S. *et al.* Systemic toxicity and resuscitation in bupivacaine, levobupivacaine, or ropivacaine-infused rats. **Anesth Analg**, Cleveland, v.93, p.743-74, 2001.

OKTAR, N. Nanobiotechnology: A new world of nanomaterials. **J. Neurol. Sci.**, Amsterdam, v.20, p.205-206, 2003.

PARIS, A.; PESSEY, V. The future of nanomaterials and nanobiotechnology. **LabsPlus. Intern.**, v.17, p.14-18, 2003,

PARK, K. Recent developments in hydrogels – preface. **Adv. Drug Deliv. Rev.** Amsterdam, v.54, p.1-9, 2002.

PAVANETTO, F. *et al.* Spray-dried albumin microspheres for the intra-articular delivery of dexamethasone. **J. Microencapsul.**, London, v.11, p.445-454, 1994.

PEPPES, N. A. **Hydrogels in medicine and pharmacy**. Boca Raton: CRC Press, 1987.

PINTO REIS, C. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**. New York, v.2, p.8-21, 2006.

PORTE, H.; COUARRAZE. G. Microencapsulation processes for the manufacture of systems providing modified release of the active constituent. In: CHULIA, D.; DEEUI, M.; POURCELOT, Y. (Ed.). Título do livro. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1994.

RANADE, V.V. Drug delivery systems. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. **J. Clin. Pharmacol.**, Stamford, v.29, p.685-694, 1989.

ROSEMBERG, P.H.; KYTTA, J.; ALILA, A. Absorption of bupivacaine, etidocaine, lignocaine and ropivacaine into N-heptane, rat sciatic nerve and human extradural and subcutaneous fat. **Br. J. Anaesth.**, Altrincham, v.58, p.310-314, 1986.

SANDERSON, J.B. **Biological microtechnique**. Preston: BIOS Scientific Publishers, 1994. p.224.

SANTOS, A.C.; FINSTER, M. Local anesthetics. In: CHESTNUT, D.H. (Ed.). **Obstetric anesthesia: principles and practice**. 2nd ed. St Louis: Mosby, 1999. p.209-232.

SIMONETTI, M.P.B.; CARVALHO, M. Comparação dos efeitos da ropivacaína, levobupivacaína e bupivacaína racêmica sobre o marcapasso atrial de ratos. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, Rio de Janeiro, v.47, p.140, 1997.

SIMONETTI, M.P.B.; VALINETTI, E.A.; FERREIRA, F.M. Avaliação da atividade anestésica local da S(-) bupivacaína: estudo experimental in vivo em nervo ciático de rato. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, Rio de Janeiro, v.47, p.425-434, 1997.

SIMONETTI, M.P.B.; BATISTA, R.A.; FERREIRA, F.M.C. Estereoisomeria: a interface da tecnologia industrial de medicamentos e da racionalização terapêutica. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, Rio de Janeiro, v.48, p.390-399, 1998.

SCURLOCK, J.E.; CURTIS, B.M. Tetraethylammonium derivatives: ultralong-acting local anesthetics. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.54, p.265-269, 1981.

SCHAFFAZICK, S.R. *et al.* Caracterização e Estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farm. Bonaer.*, Buenos Aires, v.21, p.99-106, 2002.

SHERSTOV A,Y.U. *et al.* Interaction of nanoparticlebound ampicillin with the leucocytes of peripheral blood Abstr. III Conf. **Pharm. Sci. Clin. Pharmacol.**, Jerusalem, v.26, 1996.

SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients' in critical reviews in food science and nutrition, **Ciência Hoje**, São Paulo, v.33, p.501-547, 1993.

SOMA, C.E. *et al.* Ability of Doxorubicin-Loaded Nanoparticles to Overcome Multidrug Resistance of Tumor Cells After Their Capture by Macrophages. **Pharmaceutical Research**. 16(11):1710-1716, 1999.

STEPHAN. F. K.; ZUCKER. I. Rat drinking rhythms: central visual pathways and endocrine factors mediating responsiveness to environmental illumination. **Physiol Behav**. 1972; 8(2):315–326.

TANAKA, P.P. *et al.* Preparação, caracterização e avaliação em vitro de microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (S75-R25). **Rev. Bras. Anesthesiol.**, Rio de Janeiro, v.58, p.15-22, 2008.

THALHAMMER, J.G. *et al.* Neurological evaluation of the rat during sciatic nerve block with lidocaine. **Anesthesiology**, Philadelphia, v.82, p.1013-1025, 1995.

VALE, N.B. Princípios de farmacodinâmica de drogas anestésicas. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, Rio de Janeiro, v.44, p.13-24, 1994.

WAKIYAMA, N.; JUNI, K.; NAKANO, M. Preparation and evaluation in vitro of polylactic acid microspheres containing local anesthetics. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.29, p.3363-3368, 1981.

WHITESIDE, J.B.; WILD SMITH, J.A. Developments in local anesthesia drugs. **Br. J. Anaesth.**, Altrincham, v.87, p. 27-35, 2001.

WOOLF, C.J. Recent advances in the pathophysiology of acute pain. **Br. J. Anaesth.**, Altrincham, v.63, p. 139-146, 1989.

YAKSH, T.L.; HAMMOND, D.L. Peripheral and central substrates involved in the rostral transmission of nociceptive information. **Pain**, Amsterdam, v. 13, n.1, p.1-85, 1982.

YANO, H. *et al.* Control delivery systems. **J. Control Release**, Amsterdam, v.79,p.103, 2002.

ANEXOS

PLANILHA DE COLETA DE DADOS

TABELA 2 - GRUPO A - MICROESFERA

RATO	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
IDENTIFICAÇÃO	6D	8D	10E	12E	17D	19E	26E	29D
1 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	1	1	1	1	2	2	1	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	1	1	1	1	2	1	1
TESTE MOTOR DA PATA D	1	1	1	1	1	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	1	1	1	1	1	1	1	1
2 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	1	1	1	1	1	2	1	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	1	1	1	1	2	1	1
TESTE MOTOR DA PATA D	1	1	1	1	1	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	1	1	1	1	1	1	1	1
3 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	1	X	1	1	1	1	X	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	X	1	1	1	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA D	1	X	1	1	1	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA E	1	X	1	1	1	1	X	1
4 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	1	X	1	1	2	1	X	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	X	1	1	1	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA D	1	X	1	1	1	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA E	1	X	1	1	1	1	X	1

M- microesfera

TABELA 3 - GRUPO A - MICROESFERA

RATO	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
IDENTIFICAÇÃO	6D	8D	10E	12E	17D	19E	26E	29D
5 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	1	X	2	1	X	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	1	X	1	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	1	X	1	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	1	X	1	1	X	1
6 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	1	X	1	1	X	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	1	X	1	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	1	X	1	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	1	X	1	1	X	1
7 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	X	X	X	1	X	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	X	X	X	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	X	X	X	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	X	X	X	1	X	1
8 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	X	X	X	1	X	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	X	X	X	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	X	X	X	1	X	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	X	X	X	1	X	1
Complicações	A			C				

M- microesfera , A- agressividade, C- lesão ocular

TABELA 4 - GRUPO B- MICROESFERA DE BUPIVACAÍNA RACÊMICA (S50-R50)

RATO	MB1	MB2	MB3	MB4	MB5	MB6	MB7	MB8
IDENTIFICAÇÃO	1D	2D	9E	14E	18D	24D	28E	31D
1 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	1	12	2	12	12	1	1	12
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	2	2	12	4	1	12	3
TESTE MOTOR DA PATA D	1	4	1	1	3	1	1	2
TESTE MOTOR DA PATA E	1	1	1	1	1	1	2	1
2 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	1	8	3	10	10	1	5	9
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	2	3	10	4	1	10	1
TESTE MOTOR DA PATA D	1	1	1	1	1	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	1	1	1	1	1	1	1	1
3 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	1	2	1	1	1	4
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	1	3	1	1	3	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	1	1	1	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	1	1	1	1	1	1
4 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	1	2	1	1	1	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	1	2	1	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	1	1	1	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	1	1	1	1	1	1

MB- microesfera de bupivacaína

TABELA 5 - GRUPO B- MICROESFERA DE BUPIVACAÍNA RACÊMICA (S50-R50)

RATO	MB1	MB2	MB3	MB4	MB5	MB6	MB7	MB8
IDENTIFICAÇÃO	1D	2D	9E	14E	18D	24D	28E	31D
5 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	X	2	X	1	1	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	X	2	X	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	X	1	X	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	X	1	X	1	1	1
6 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	X	1	X	1	1	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	X	2	X	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	X	1	X	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	X	1	X	1	1	1
7 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	X	X	X	X	1	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	X	X	X	X	1	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	X	X	X	X	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	X	X	X	X	1	1
8 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	X	X	X	X	1	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	X	X	X	X	1	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	X	X	X	X	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	X	X	X	X	1	1
Complicações								D

MB- microesfera de bupivacaína, D- bolhas de queimadura

TABELA 6 - GRUPO C: MICROESFERA DE BUPIVACAÍNA EM EXCESSO
ENANTIOMÉRICO DE 50%

RATO	ML1	ML2	ML3	ML4	ML5	ML6	ML7	ML8
IDENTIFICAÇÃO	3D	4D	11E	15E	23E	27D	30E	32D
1 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	12	12	1	1	1	2	1	12
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	12	12	12	12	1	12	1
TESTE MOTOR DA PATA D	4	3	1	1	1	2	1	2
TESTE MOTOR DA PATA E	1	1	3	3	4	1	4	1
2 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	5	7	1	2	3	2	1	12
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	1	6	6	10	1	5	5
TESTE MOTOR DA PATA D	1	1	1	1	1	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	1	1	1	1	1	1	1	1
3 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	1	1	1	1	1	X	X	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	1	1	1	1	X	X	1
TESTE MOTOR DA PATA D	1	1	1	1	1	X	X	1
TESTE MOTOR DA PATA E	1	1	1	1	1	X	X	1
4 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	1	2	1	1	1	X	X	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	1	1	1	1	X	X	1
TESTE MOTOR DA PATA D	1	1	1	1	1	X	X	1
TESTE MOTOR DA PATA E	1	1	1	1	1	X	X	1

ML- microesfera de levobupivacaína

TABELA 7 - GRUPO C: MICROESFERA DE BUPIVACAÍNA EM EXCESSO
ENANTIOMÉRICO DE 50%

RATO	ML1	ML2	ML3	ML4	ML5	ML6	ML7	ML8
IDENTIFICAÇÃO	3D	4D	11E	15E	23E	27D	30E	32D
5 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	1	1	1	X	X	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	1	2	2	X	X	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	1	1	1	X	X	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	1	1	1	X	X	1
6 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	1	1	1	X	X	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	1	2	1	X	X	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	1	1	1	X	X	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	1	1	1	X	X	1
7 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	X	1	1	X	X	X
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	X	1	1	X	X	X
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	X	1	1	X	X	X
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	X	1	1	X	X	X
8 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	X	1	1	X	X	X
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	X	1	1	X	X	X
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	X	1	1	X	X	X
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	X	1	1	X	X	X
complicações				A				

ML- microesfera de levobupivacaína, A- hematúria

TABELA 8 - GRUPO D- BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE 50%

RATO	LB1	LB2	LB3	LB4	LB5	LB6	LB7	LB8
IDENTIFICAÇÃO	5D	7D	13E	16E	20E	21D	22D	25E
1 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	10	12	1	3	*	6	12	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	5	8	11	*	1	3	12
TESTE MOTOR DA PATA D	1	4	1	1	*	3	4	1
TESTE MOTOR DA PATA E	4	2	2	4	*	1	1	4
2 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	1	4	1	1	1	12	4	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	1	2	4	3	1	5	2	9
TESTE MOTOR DA PATA D	1	1	1	1	1	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	1	1	1	1	1	1	1	1
3 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	1	1	1	X	1	2	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	1	1	3	X	1	1	2
TESTE MOTOR DA PATA D	X	1	1	1	X	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	1	1	1	X	1	1	1
4 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	1	1	1	X	1	1	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	1	1	1	X	1	1	2
TESTE MOTOR DA PATA D	X	1	1	1	X	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	1	1	1	X	1	1	1

LB- levobupivacaína

TABELA 9 - GRUPO D- BUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE 50%

RATO	LB1	LB2	LB3	LB4	LB5	LB6	LB7	LB8
IDENTIFICAÇÃO	5D	7D	13E	16E	20E	21D	22D	25E
5 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	1	X	X	X	1	1	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	1	X	X	X	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	1	X	X	X	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	1	X	X	X	1	1	1
6 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	1	X	X	X	1	1	1
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	1	X	X	X	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA D	X	1	X	X	X	1	1	1
TESTE MOTOR DA PATA E	X	1	X	X	X	1	1	1
7 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	X	X	X	1	1	X
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	X	X	X	1	1	X
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	X	X	X	1	1	X
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	X	X	X	1	1	X
8 DIA								
TESTE SENSITIVO DA PATA D	X	X	X	X	X	1	1	X
TESTE SENSITIVO DA PATA E	X	X	X	X	X	1	1	X
TESTE MOTOR DA PATA D	X	X	X	X	X	1	1	X
TESTE MOTOR DA PATA E	X	X	X	X	X	1	1	X
complicações						A		

LB- levobupivacaína, A- agitação

TABELA 10 - TEMPO DE RESPOSTA OBSERVADA AO TESTE SENSITIVO DO GRUPO A

	PATA DIREITA					PATA ESQUERDA					p
	n	Média	DP	Med	Min-Max	Média	DP	Med	Min-Max		
1º dia	08	1,25	0,46	1,00	1,00 – 2,00	1,25	0,35	1,00	1,00 – 2,00	0,35	
2º dia	08	1,12	0,35	1,00	1,00 – 2,00	1,12	0,35	1,00	1,00 – 2,00	1,00	
3º dia	06	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	
4º dia	06	1,16	0,40	1,00	1,00 – 2,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	0,36	
5º dia	04	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	
6º dia	04	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	
7º dia	02	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	
8º dia	02	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	

Teste t de Wilcoxon

TABELA 11 - TEMPO DE RESPOSTA OBSERVADA AO TESTE SENSITIVO DO GRUPO B

	PATA DIREITA					PATA ESQUERDA					p
	n	Média	DP	Med	Min-Max	Média	DP	Med	Min-Max		
1º dia	08	5,25	5,59	1,50	1,00 – 12,00	7,87	5,69	12,00	1,00 – 12,00	0,49	
2º dia	08	4,12	3,79	2,50	1,00 – 12,00	4,37	3,20	5,00	1,00 – 10,00	0,94	
3º dia	06	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	
4º dia	06	1,16	0,40	1,00	1,00 – 2,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	0,36	
5º dia	04	1,00	1,00	1,00	1,00 – 1,00	1,50	0,57	1,50	1,00 – 2,00	0,18	
6º dia	04	1,00	1,00	1,00	1,00 – 1,00	1,25	0,50	1,00	1,00 – 2,00	0,39	
7º dia	02	1,00	1,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	
8º dia	02	1,00	1,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	

Teste t de Wilcoxon

TABELA 12- TEMPO DE RESPOSTA OBSERVADA AO TESTE SENSITIVO NO GRUPO C

	PATA DIREITA					PATA ESQUERDA					p
	n	Média	DP	Med	Min-Max	Média	DP	Med	Min-Max		
1º dia	08	6,62	5,75	7,00	1,00 – 12,00	4,62	4,65	2,50	1,00 – 12,00	0,43	
2º dia	08	5,87	3,87	6,50	1,00 – 10,00	4,00	3,85	2,50	1,00 – 10,00	0,26	
3º dia	06	1,66	1,21	1,00	1,00 – 4,00	1,66	1,03	1,00	1,00 – 3,00	1,00	
4º dia	06	1,16	0,40	1,00	1,00 – 2,00	1,16	0,40	1,00	1,00 – 2,00	1,00	
5º dia	04	1,25	0,50	1,00	1,00 – 2,00	1,25	1,00	1,00	1,00 – 2,00	1,00	
6º dia	04	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,25	1,00	1,00	1,00 – 2,00	0,39	
7º dia	02	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	
8º dia	02	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	

Teste t de Wilcoxon

TABELA 13 –TEMPO DE RESPOSTA OBSERVADA AO TESTE SENSITIVO DO GRUPO D

	PATA DIREITA					PATA ESQUERDA					p
	n	Média	DP	Med	Min-Max	Média	DP	Med	Min-Max		
1º dia	08	6,42	4,92	6,00	1,00 – 12,00	5,85	4,56	5,00	1,00 – 12,00	0,86	
2º dia	08	3,12	3,83	1,00	1,00 – 12,00	3,37	2,66	2,50	1,00 – 9,00	0,87	
3º dia	06	1,16	0,40	1,00	1,00 – 2,00	1,50	0,83	1,00	1,00 – 3,00	0,46	
4º dia	06	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,16	0,40	1,00	1,00 – 2,00	0,36	
5º dia	04	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	
6º dia	04	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	
7º dia	02	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	
8º dia	02	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	0,00	1,00	1,00 – 1,00	1,00	

Teste t de Wilcoxon

TABELA 14 - RESPOSTA OBSERVADA AO TESTE MOTOR NO GRUPO A

	PATA DIREITA				PATA ESQUERDA				p
	1	2	3	4	1	2	3	4	
1º dia	08	00	00	00	00	00	00	00	---
2º dia	08	00	00	00	08	00	00	00	1,00
3º dia	06	00	00	00	08	00	00	00	1,00
4º dia	06	00	00	00	06	00	00	00	1,00
5º dia	04	00	00	00	06	00	00	00	1,00
6º dia	04	00	00	00	04	00	00	00	1,00
7º dia	02	00	00	00	04	00	00	00	1,00
8º dia	02	00	00	00	02	00	00	00	1,00

Teste qui-quadrado de Pearson

TABELA 15 - RESPOSTA OBSERVADA AO TESTE MOTOR NO GRUPO B

	PATA DIREITA				PATA ESQUERDA				p
	1	2	3	4	1	2	3	4	
1º dia	04	02	01	01	00	00	00	00	0,43
2º dia	08	00	00	00	04	00	02	02	0,28
3º dia	06	00	00	00	08	00	00	00	1,00
4º dia	06	00	00	00	06	00	00	00	1,00
5º dia	04	00	00	00	06	00	00	00	0,42
6º dia	04	00	00	00	04	00	00	00	1,00
7º dia	02	00	00	00	04	00	00	00	1,00
8º dia	02	00	00	00	02	00	00	00	1,00

Teste qui-quadrado de Pearson

TABELA 16 - RESPOSTA OBSERVADA AO TESTE MOTOR NO GRUPO C

	PATA DIREITA				PATA ESQUERDA				p
	1	2	3	4	1	2	3	4	
1º dia	05	01	01	01	00	00	00	00	0,52
2º dia	08	00	00	00	07	01	00	00	0,63
3º dia	06	00	00	00	08	00	00	00	0,26
4º dia	06	00	00	00	06	00	00	00	1,00
5º dia	04	00	00	00	06	00	00	00	1,00
6º dia	04	00	00	00	04	00	00	00	1,00
7º dia	02	00	00	00	04	00	00	00	1,00
8º dia	02	00	00	00	02	00	00	00	1,00

Teste qui-quadrado de Pearson

TABELA 17 – RESPOSTA OBSERVADA AO TESTE MOTOR DO GRUPO D

	PATA DIREITA				PATA ESQUERDA				p
	1	2	3	4	1	2	3	4	
1º dia	04	00	01	02	00	00	00	00	0,61
2º dia	08	00	00	00	02	02	00	03	0,26
3º dia	06	00	00	00	08	00	00	00	0,67
4º dia	06	00	00	00	06	00	00	00	1,00
5º dia	04	00	00	00	06	00	00	00	1,00
6º dia	04	00	00	00	04	00	00	00	1,00
7º dia	02	00	00	00	04	00	00	00	1,00
8º dia	02	00	00	00	02	00	00	00	1,00

Teste qui-quadrado de Pearson

TABELA 18 -RESPOSTA COMPARADA AO TESTE SENSITIVO NOS GRUPOS A, B, C, D

	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D	p
1º dia	1,00 (1,00 – 2,00)	7,00 (1,00 – 12,00)	2,50 (1,00 – 12,00)	5,50 (1,00 – 12,00)	0,004*
2º dia	1,00 (1,00 – 2,00)	4,00 (1,00 – 12,00)	3,50 (1,00 – 10,00)	2,00 (1,00 – 12,00)	0,001*
3º dia	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00 (1,00 – 4,00)	1,00 (1,00 – 3,00)	0,03*
4º dia	1,00 (1,00 – 2,00)	1,00 (1,00 – 2,00)	1,00 (1,00 – 2,00)	1,00 (1,00 – 2,00)	0,88
5º dia	1,00 (1,00 – 2,00)	1,00 (1,00 – 2,00)	1,00 (1,00 – 2,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	0,47
6º dia	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00 (1,00 – 2,00)	1,00 (1,00 – 2,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	0,55
7º dia	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00
8º dia	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	1,00

Anova de Kruskal-Wallis * A é diferente de B, C e D. Não se observa diferença entre B, C e D

TABELA 19 – RESPOSTA COMPARADA AO TESTE MOTOR NOS GRUPOS A, B, C, D

	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D	p
1º dia	08 (38,10%)	04 (19,05%)	05 (23,81%)	04 (19,05%)	0,05*
2º dia	16 (30,19%)	12 (22,64%)	15 (28,30%)	10 (18,87%)	0,03**
3º dia	14 (100,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	< 0,01
4º dia	12 (100,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	< 0,01
5º dia	10 (100,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	< 0,01
6º dia	08 (100,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	< 0,01
7º dia	06 (100,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	< 0,01
8º dia	04 (100,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	00 (0,00%)	< 0,01

Teste qui-quadrado de Pearson * A é diferente de B, C e D. ** A é diferente de B e D. C é diferente de D

TABELA 20 - CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO GRUPO A

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO EM (ng/ml)
6	ND
8	ND
10	ND
12	ND
17	ND
19	ND
26	ND
29	ND

ND: Nada detectável

TABELA 21 - CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO GRUPO B

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÕES EM (ng/ml)
1	84,8
2	79
9	ND
14	ND
18	ND
24	ND
28	ND
31	ND

ND: Nada detectável

TABELA 22 - CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO GRUPO C

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÕES EM (ng/ml)
3	202,7
4	255,7
11	136,6
15	ND
23	81,6
27	356,1
30	ND
32	139

ND: Nada detectável

TABELA 23 - CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO GRUPO D

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÕES EM (ng/ml)
5	ND
7	ND
13	ND
16	ND
20	ND
21	ND
22	ND
25	ND

ND: Nada detectável