

Caracterização Anestésica da Nanoemulsão não Lipídica de Propofol

Roberto Takashi Sudo, TSA¹, Laura Bonfá², Margarete Manhães Trachez, TSA³, Roberto Debom⁴, Marisa D. R. Rizzi⁵, Gisele Zapata-Sudo⁶

Resumo: Sudo RT, Bonfá L, Trachez MM, Debom R, Rizzi MDR, Zapata-Sudo G – Caracterização Anestésica da Nanoemulsão não Lipídica de Propofol.

Justificativa e objetivos: Uso clínico de formulação lipídica de propofol causa dor durante injeção, reação alérgica e crescimento microbiano. Propofol tem sido reformulado em diferentes apresentações não lipídicas para reduzir os efeitos adversos, mas essas mudanças podem modificar sua farmacocinética e farmacodinâmica. Neste trabalho, investigamos a farmacologia e a toxicologia do propofol lipídico (CLP) e da nanoemulsão não lipídica (NLP).

Método: CLP and NLP foram infundidos na veia jugular de ratos sob medida da pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR). Ambas as formulações (1%) foram infundidas ($40 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) durante 1 hora. Doses hipnóticas e anestésicas, assim como recuperações, foram determinadas. A dor induzida pelo veículo do CLP e NLP foi comparada por meio da contagem do número de contorções abdominais ("writhing test") após injeção intraperitoneal (i.p.) em camundongos. Ácido acético (0,6%) foi usado como controle positivo.

Resultados: As doses hipnóticas e anestésicas com 1% CLP ($6,0 \pm 1,3$ e $17,8 \pm 2,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente) e 1% NLP ($5,4 \pm 1,0$ e $16,0 \pm 1,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente) não foram significativamente diferentes. A recuperação da hipnose e da anestesia foi mais rápida com NLP do que com CLP. As alterações de FC, PA e FR causadas pelo NLP não foram significativamente diferentes das do CLP. Ácido acético e veículo do CLP provocaram $46,0 \pm 2,0$ e $12,5 \pm 0,6$ contorções em 20 min após injeção i.p., respectivamente. Observou-se ausência de contorções abdominais com veículo de NLP. Nenhuma resposta inflamatória abdominal foi notada com a injeção i.p. de ambos os veículos de propofol.

Conclusões: O NLP pode representar melhor alternativa do que o CLP para anestesia venosa com menores efeitos adversos.

Unitermos: ANESTÉSICO, Venoso: propofol; ANIMAIS: ratos.

Suporte financeiro: CNPq, FAPERJ, FUJB/UFRJ, INCT/INOFAR, Instituto do Milênio.

[Rev Bras Anesthesiol 2010;60(5): 475-483] ©Elsevier Editora Ltda.

INTRODUÇÃO

Propofol 2,6 diisopropilfenol é o anestésico endovenoso utilizado com mais frequência, sendo formulado em uma solução lipídica. A alta lipofilicidade permite sua ampla distribuição e rápida penetração no sistema nervoso central (SNC), conferindo controle eficiente do início e recuperação da anestesia¹. Para uso clínico, o propofol foi inicialmente formulado como um cremóforo a 16%^{1,2}, que foi ex-

cluído das pesquisas clínicas devido à incidência elevada de reações anafiláticas³.

Embora amplamente utilizado em anestesia e terapia intensiva, o propofol está associado a efeitos colaterais como dor decorrente de injeção e reações alérgicas, características relacionadas com sua formulação em macroemulsão⁴. Apesar das emulsões endovenosas serem estéreis, a presença de ácidos graxos pode aumentar a incidência de contaminação bacteriana ou o crescimento de fungos, o que levou os fabricantes a adicionarem agentes antimicrobianos a algumas formulações comerciais da emulsão lipídica⁵. Além disso, relatou-se que a emulsão lipídica induz hiperlipidemia⁶, causando síndrome de infusão do propofol, caracterizada por acidose metabólica severa, rabdomiólise e insuficiência renal e cardíaca⁷. A hiperlipidemia pode afetar crianças e adultos que recebem infusões de mais de $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de propofol por mais de 24 horas. Houve muitas tentativas para alterar sua formulação e propor alternativas a seu uso clínico a fim de reduzir os efeitos adversos do propofol^{8,9}.

O objetivo do presente estudo foi comparar as propriedades anestésicas, incluindo indução e recuperação da anestesia, assim como a incidência de dor induzida pela macroemulsão lipídica de propofol a 1% (CLP) com a nanoemulsão não lipídica de propofol a 1% (NLP).

Recebido do Programa de Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

1. Pós-Doutorado, Professor Titular do Programa de Desenvolvimento de Fármacos – UFRJ

2. Mestre, Médico Anestesiologista – Hospital da Lagoa, RJ

3. Doutora, Professora Adjunta – UFF

4. Graduação em Farmácia, Diretor de PD&I – Cristália

5. Graduação em Farmácia, Supervisora de PD&I – Cristália

6. Pós-Doutorado, Professora Associada do Programa de Desenvolvimento de Fármacos – UFRJ

Submetido em 2 de março de 2010.

Aprovado para publicação em 3 de maio de 2010.

Endereço para correspondência:

Dr. Roberto Takashi Sudo

Rua República do Peru, 114, aptº 802,

Copacabana

22021-040 – Rio de Janeiro, RJ, Brasil

E-mail: rtsudo@farmaco.ufrj.br

MÉTODO

Os protocolos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O NLP, CLP e seus veículos foram doados pela Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

Preparo do NLP

O NLP (1%) foi preparado combinando-se propofol, macrogol hidroxistearato (Soluthol HS15®, BASF Corporation, Florham Park, NJ) e glicerol sob agitação contínua até que estivessem completamente homogêneos. A seguir, o pH foi ajustado para 6-8,5, usando NaOH para formar uma nanoemulsão clara contendo gotículas de 5-140 nm.

Determinação do HD₅₀ e LD₅₀

Cento e sessenta camundongos suíços do sexo masculino (20-25 g) foram separados aleatoriamente em dois conjuntos de quatro grupos (10 camundongos por grupo). Foram usados dez camundongos para cada dose progressivamente maior de CLP ou de NLP. O tamanho da amostra foi calculado para chegar a conclusões válidas para $p < 0,05$ com um poder de 90% para estimar uma diferença de 40% entre os grupos. Os camundongos receberam uma única injeção endovenosa de CLP a 1% ou NLP a 1%. A dose que promovia hipnose em 50% dos animais (HD₅₀) e a dose letal para 50% dos camundongos (LD₅₀) foram ambas obtidas através da administração endovenosa em *bolus* das formulações. O índice terapêutico foi, então, calculado como a razão LD₅₀/HD₅₀. A indução de hipnose foi considerada eficaz quando os camundongos perderam o reflexo postural da pata dianteira.

Registros da pressão arterial e do eletrocardiograma

Ratos Wistar machos (220-250 g) foram anestesiados com sevoflurano (Sevocris®, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e um cateter foi introduzido na artéria carótida interna para medir a pressão arterial (PA) usando um transdutor de pressão calibrado (Statham, P022). Um par de eletrodos externos foi colocado no peito do animal para registrar o eletrocardiograma (ECG). Além disso, um cateter foi introduzido na veia jugular de cada animal para as infusões endovenosas das formulações de propofol. Duas horas após o procedimento cirúrgico, o CLP ou NLP a 1% foi infundido a uma velocidade de 40 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ por 1 hora. A PA e o ECG foram registrados continuamente em um polígrafo (AstroMed Grass Physiological Recorder, Model 7400) antes e durante a administração de CLP ou NLP. As doses hipnóticas e anestésicas foram determinadas medindo-se o tempo necessário para perder o reflexo postural da pata dianteira e inibir o reflexo de dor à picada de agulha, respectivamente.

O tempo necessário para a recuperação de hipnose e anestesia também foi avaliado.

Teste de contorção abdominal

O teste de contorção abdominal foi usado para avaliar a dor causada pela injeção de dois tipos de formulação de propofol. Trinta camundongos suíços (20-25 g) do sexo masculino foram separados aleatoriamente em três grupos e cada um foi tratado com 5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ de uma solução de ácido acético a 0,6% (controle positivo) ou os veículos do CLP ou NLP. A frequência das contorções abdominais foi determinada 20 minutos após a injeção intraperitoneal (*i.p.*) de ácido acético ou dos veículos.

Avaliação histológica

A presença de lesão tecidual local ou inflamação induzida pelas formulações de propofol foi avaliada após a administração intraperitoneal de ácido acético, CLP ou NLP. Para a análise histológica, a membrana peritoneal foi removida, fixada em formol a 10%, embebida em parafina e corada com hematoxilina e eosina. As seções coradas pela hematoxilina e eosina foram observadas com um aumento de 400x (16 μm).

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm DP. Diferenças entre as diversas doses foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ usando-se análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Dunnett. Para comparar diversos grupos utilizou-se Anova seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls.

RESULTADOS

Para determinar o HD₅₀ e o LD₅₀, as percentagens de hipnose e morte em relação às doses das formulações foram tabuladas, respectivamente. A regressão linear foi utilizada para calcular o HD₅₀ e o LD₅₀, que foram de 15,4 e 44,4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para CLP a 1%, respectivamente. Foram observados resultados semelhantes com NLP a 1%, em que o HD₅₀ e o LD₅₀ foram de 11,5 e 49,0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente. Portanto, não se observou diferença significativa no índice terapêutico entre o CLP (2,88) e o NLP (4,26).

A latência para perda do reflexo de recuperação postural da pata dianteira e de dor à picada de agulha após a infusão endovenosa foi usada para calcular as doses necessárias para induzir hipnose e anestesia. Não foram observadas diferenças significativas entre as doses hipnóticas e anestésicas do CLP e NLP (Tabela I). As doses de NLP a 1% que produziram hipnose e anestesia foram de $7,5 \pm 1,1$ e $16,0 \pm 1,4$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente. Em contraste, a recuperação de

Tabela I – Doses Hipnóticas e Anestésicas do CLP e NLP Induzidas pela Infusão Endovenosa em Ratos

Formulação	Hipnose			Anestesia		
	Latência (min)	Dose (mg.kg ⁻¹)	Recuperação (min)	Latência (min)	Dose (mg.kg ⁻¹)	Recuperação (min)
1% CLP	4,0 ± 0,9	6,0 ± 1,3	40,6 ± 3,1	11,9 ± 1,8	17,8 ± 2,6	19,8 ± 1,5
1% NLP	5,4 ± 1,0	7,5 ± 1,1	19,3 ± 3,4*	11,2 ± 1,2	16,0 ± 1,4	7,9 ± 0,7*

Os dados são apresentados como média ± DP (n = 8). *p < 0,05 NLP vs. CLP.

hipnose e anestesia foi mais rápida (p < 0,05) após a infusão do NLP por 1 hora do que de CLP. O tempo necessário para a recuperação completa da hipnose e anestesia foi de 19,3 ± 3,4 e 7,9 ± 0,7 min, respectivamente. O tempo de recuperação após a exposição ao CLP foi duas vezes mais longo (Tabela I).

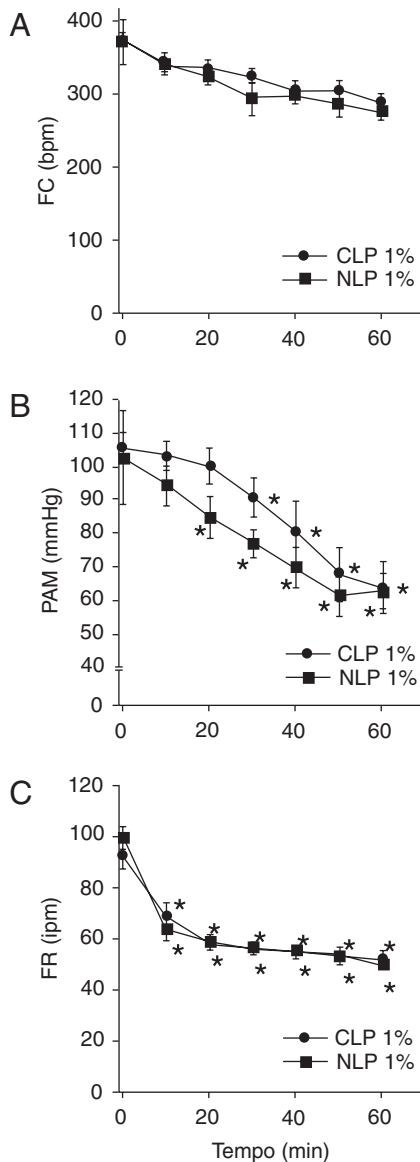


Figura 1. Efeito da infusão de CLP e NLP por 60 minutos na frequência cardíaca (FC) (A), pressão arterial média (PAM) (B) e frequência respiratória (FR) (C) de ratos. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 6). *p < 0,05 vs. controle (tempo 0).

Investigamos também se a infusão de NLP interferiu com a frequência cardíaca e a pressão arterial nos ratos Wistar. Não foram observadas diferenças significativas entre os animais que receberam infusão de NLP e CLP em relação aos parâmetros hemodinâmicos. A frequência cardíaca (FC) de controle de 372,0 ± 30,0 bpm não apresentou alteração significativa após a infusão de NLP a 1% (Figura 1A). Entretanto, houve redução na pressão arterial média (PAM) após a infusão de NLP por 1 hora. O NLP reduziu a PAM de 102,4 ± 13,8 para 62,4 ± 5,3 mmHg (p < 0,01), enquanto o CLP reduziu a PAM de 105,3 ± 4,3 para 63,5 ± 7,5 mmHg (p < 0,01) (Figura 1B). Também, como pode ser visto na Figura 1C, NLP e CLP reduziram significativamente a frequência respiratória, mas sem diferença relevante entre os dois fármacos.

Para determinar se o NLP induziu dor semelhante ao CLP, comparamos o número de contorções abdominais induzidas pela injeção i.p. de ácido acético (0,6%) e dos veículos do CLP e NLP em camundongos. O ácido acético e o veículo lipídico do CLP produziram 46,0 ± 2,0 (n = 10) e 12,5 ± 0,6 (n = 10) contorções durante os 20 minutos após a injeção i.p., respectivamente. Não foram observadas contorções abdominais após o tratamento de camundongos com o veículo do NLP.

A análise das fotomicrografias não demonstrou resposta inflamatória significativa após a injeção i.p. das duas formulações de propofol (Figura 2).

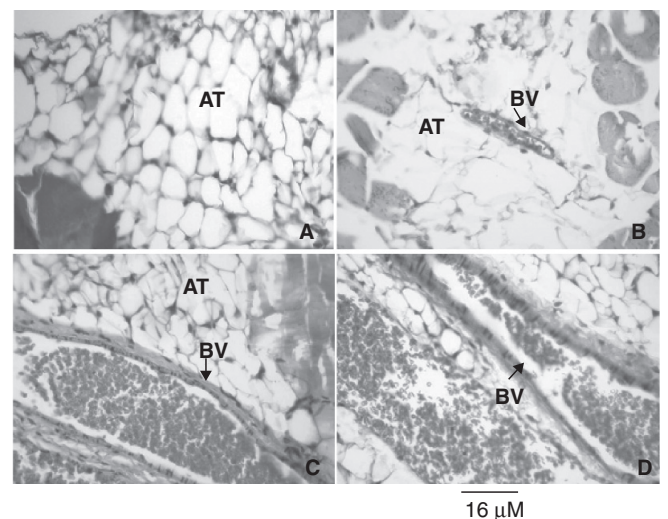


Figura 2. Fotomicrografia representativa dos tecidos peritoneais de camundongos corados pela hematoxilina-eosina após a injeção i.p. de soro fisiológico (A), ácido acético (B), NLP (C) e CLP (D). As setas indicam AT = tecido adiposo e BV = vaso sanguíneo.

DISCUSSÃO

A emulsão lipídica de propofol, que contém óleo de soja (10%) e triglicerídeos de cadeia longa, é o anestésico endovenoso usado com mais frequência e seu uso está associado a efeitos colaterais, incluindo hipotensão arterial, redução na frequência cardíaca e dor no ato da injeção em 80% a 90% dos pacientes^{10,11}. O propofol aumenta o risco de embolia e hipertrigliceridemia após infusão endovenosa prolongada. Essas reações adversas motivaram tentativas de desenvolver novas formulações de propofol mais seguras. Existem diversas formulações de propofol, incluindo: 1. preparação básica com a adição de ácido etilenodiaminotetracético ou sulfato para minimizar o crescimento bacteriano¹²; 2. emulsão contendo diferentes triglicerídeos de cadeia longa e média para reduzir a quantidade de lipídios séricos^{13,14,15}; 3. um pró-fármaco de propofol¹⁶; 4. análogos do propofol solúveis em água^{17,18} e 5. propofol baseado em uma formulação de ciclodextrina não lipídica^{6,19,20}.

A despeito da diversidade de preparações de propofol, a incidência de dor após a injeção não sofreu alterações significativas. Essa dor pode ser minimizada pela administração prévia de lidocaína. O mecanismo farmacológico da dor induzida pelo propofol ainda é desconhecido²¹. Postulou-se o envolvimento da cascata da calcitrina-cinina-bradicinina^{22,23}. Outra hipótese está relacionada à ativação química direta de nociceptores no endotélio vascular induzida pelo propofol²⁴. O propofol pertence a um grupo de fenóis que apresentam estabilidade química e baixa toxicidade, mas pode causar irritação da pele e mucosas. Assim, espera-se que a injeção de um *bolus* de propofol cause dor²⁵. Testamos se o NLP produz dor visceral em um modelo no qual o número de contorções foi avaliado após a injeção *i.p.* dos compostos. As contorções induzidas pelo ácido acético foram usadas como controle positivo²⁶. O veículo do NLP produziu um número menor de contorções abdominais do que o veículo do CLP, indicando que os animais desenvolveram menos dor com a injeção do NLP.

A injeção de NLP a 1% produziu efeitos hipnóticos e analgésicos semelhantes aos do CLP, com a vantagem de uma recuperação mais rápida. O índice terapêutico do NLP foi semelhante ao de outros anestésicos endovenosos, variando de 2 a 4, o que revela sua segurança. As alterações nos parâmetros hemodinâmicos induzidas pelo NLP não foram significativamente diferentes das induzidas pelo CLP. Portanto, este estudo fornece incentivo para o desenvolvimento de nanoemulsão não lipídica de propofol. Nossos resultados demonstram que o NLP pode ser usado clinicamente em anestesiologia como um anestésico endovenoso que não apresenta efeitos adversos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES), Fundação Universitária Jose Bonifácio (FUJB), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Além disso, também recebeu apoio financeiro parcial de *fellowships* do CNPq (para GZS, RTS). O NLP foi fornecido pela Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos (Itapira, SP, Brasil).

REFERENCIAS / REFERENCES

- Glen JB – Animal studies of the anesthetic activity of ICI 35-868. *Br J Anaesth*, 1980;52: 731-742.
- Rolly G, Versichelen L, Zubair NA – Use of ICI 35868 as an anesthetic induction agent. *Acta Anaesth Belg*, 1980;31:241-247.
- Shao X, Li H, White PF et al – Bisulfite-containing propofol: is it a cost-effective alternative to Diprivan for induction of anesthesia? *Anesth Analg*, 2000;91:871-875.
- Kay B, Rolly G – ICI35868 – The effect of a change of formulation on the incidence of pain after intravenous injection. *Acta Anesthesiol Belg*, 1997;28:317-322.
- Jones C – Fundamentals of emulsions. *Am J Anesth*, 2000;27(Suppl): 12-15.
- Egan TD – Target-controlled drug delivery. progress toward an intravenous "vaporizer" and automated anesthetic administration. *Anesthesiology*, 2003;99:1214-1219.
- Sabsovich I, Rehman Z, Yunen J et al – Propofol infusion syndrome: a case of increasing morbidity with traumatic brain injury. *Am J Crit Care*, 2007;16:82-85.
- Dubey PK, Kumar A – Pain on injection of lipid-free Propofol and Propofol emulsion containing medium-chain triglyceride: a comparative study. *Anesth Analg*, 2005;101:1060-1062.
- Baker MT, Naguib M – Propofol: the challenges of formulation. *Anesthesiology*, 2005;103:860-876.
- Abad-Santos F, Galvez-Mugica MA, Santos MA et al – Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single *bolus* of propofol 2% in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 2003;43:397-405.
- Ando R, Watanabe C – Characteristics of propofol-evoked vascular pain in anaesthetized rats. *Br J Anaesth*, 2005;95:384-392.
- Hart B – Diprivan: a change of formulation. *Eur J Anesthesiol*, 2000;17:71-73.
- Rau J, Roizen MF, Michael F, Doenicke AW, O'Connor M, Strohschneider U – Propofol in a emulsion of long- and medium-chain triglycerides: the effect on pain. *Anesth Analg*, 2001;93:382-384.
- Doenicke AW, Roizen MF, Rau J et al – Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol in a new solvent. *Anesth Analg*, 1997;85:1399-1403.
- Paul M, Dueck M, Kampe S, et al – Pharmacological characteristics and side effects of a new galenic formulation of propofol without soyabean oil. *Anaesthesia*, 2003;58:1056-1062.
- Banaszczyk MG, Carlo AT, Milan V et al. – Propofol phosphate, a waterdrug soluble propofol prodrug: in vivo evaluation. *Anesth Analg*, 2002;95:1285-1292.
- Cooke A, Anderson A, Buchanan K et al. – Water-soluble propofol analogues with intravenous anaesthetic activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001;11:927-930.
- Trapani A, Laquintana V, Lopodota A et al. – Evaluation of new propofol aqueous solution for intravenous anesthesia. *Int J Pharm*, 2004;278:91-98.
- Bielen SJ, Lysco GS, Cough WB – The effect of a cyclodextrin vehicle on the cardiovascular profile of propofol in rats. *Anesth Analg*, 1996;82:920-924.
- Trapani G, Latrofa A, Franco M – Inclusion complexation of propofol with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: physicochemical, nuclear magnetic resonance spectroscopic studies, and anesthetic properties in rat. *J Pharm Sci*, 1998;87:514-518.
- Huang YW, Buerkle H, Lee TH et al – Effect of pretreatment with ketorolac on propofol injection pain. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2002;46:1021-1024.

22. Iwama H, Nakane M, Ohmori S et al – Nafamostat mesilate, a kaliein inhibitor, prevents pain on injection with propofol. *Br J Anesth*, 1998;81:963-964.
23. Ohmizo H, Obara S, Iwana H – Mechanism of injection pain with long and long-medium chain triglyceride emulsive propofol. *Can J Anaesth*, 2005;52:595-599.
24. Fujii Y, Nakayama M – A lidocaine/metoclopramide combination decreases pain on injection of propofol. *Can J Anesth*, 2005;52:474-477.
25. Doenick AW, Roizen MF, Rotzen MF et al – Reducing pain during propofol injection: the role of solvent. *Anesth Analg*, 1996;82:472-474.
26. Martinez V, Coutinho SV, Thakur S et al – Differential effects of chemical colonic irritation on behavioral pain response to intraperitoneal acetic acid in mice. *Pain*, 1999;81:179-186.

Resumen: Sudo RT, Bonfá L, Trachez MM, Debom R, Rizzi, MDR, Sudo, GZ – Caracterización Anestésica de la Nanoemulsión no Lipídica de Propofol.

Justificativa y objetivos: El uso clínico de la formulación lipídica del propofol, causa dolor durante la inyección, reacción alérgica y crecimiento microbiano. El propofol ha sido reformulado en diferentes presentaciones no lipídicas para reducir los efectos adversos, pero esos cambios pueden modificar su farmacocinética y farmacodinámica. En este trabajo, investigamos la farmacología y la toxicología del propofol lipídico (CLP) y de la nanoemulsión no lipídica (NLP).

Método: El CLP y el NLP fueron infundidos en la vena yugular de ratones midiendo la presión arterial (PA), frecuencia cardíaca (FC) y frecuencia respiratoria (FR). Las dos formulaciones (1%) fueron infundidas (40 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) durante 1 hora. Dosis hipnóticas y anestésicas y recuperaciones, fueron determinadas. El dolor inducido por el vehículo del CLP y NLP se comparó por medio del conteo del número de contorciones abdominales ("writhing test") después de la inyección intraperitoneal en ratones. El ácido acético (0,6%) fue usado como control positivo.

Resultados: Las dosis hipnóticas y anestésicas con 1% CLP ($6,0 \pm 1,3$ y $17,8 \pm 2,6$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente) y 1% NLP ($5,4 \pm 1,0$ y $16,0 \pm 1,4$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente), no fueron significativamente diferentes. La recuperación de la hipnosis y de la anestesia fue más rápida con NLP que con CLP. Las alteraciones de FC, PA y FR causadas por el NLP no fueron significativamente diferentes de las del CLP. El ácido acético y el vehículo del CLP provocaron $46,0 \pm 2,0$ y $12,5 \pm 0,6$ contorciones en 20 minutos después de la inyección *i.p.*, respectivamente. No se observaron contorciones abdominales con vehículo de NLP. Ninguna respuesta inflamatoria abdominal fue notada con la inyección *i.p.* de los dos vehículos de propofol.

Conclusiones: El NLP puede representar una mejor alternativa que el CLP para la anestesia venosa, con menores efectos adversos.