

# Determinação das doses letal 50 e 100 do propofol em nanoemulsão ou em emulsão lipídica pela via intraperitoneal em camundongos

## Determination of lethal doses 50 and 100 of propofol in lipid emulsion nor nanoemulsion intraperitoneally in mice

Martielo Ivan Gehrcke<sup>1</sup>; Ademir Cassiano da Rosa<sup>2</sup>; Renato Batista Tamanho<sup>3</sup>; Aury Nunes de Moraes<sup>4</sup>; Nilson Oleskovicz<sup>4\*</sup>

### Resumo

A formulação de um fármaco pode interferir na sua absorção para o sistema circulatório, podendo resultar em alterações da dose necessária para que se consiga determinado efeito. O objetivo deste estudo foi determinar as doses letais 50 (DL 50) e 100 (DL100) do propofol em nanoemulsão e emulsão lipídica em camundongos pela via intraperitoneal. Foram utilizados 160 animais pesando  $36,47 \pm 4,6g$ , os quais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: NANO e EMU que receberam propofol à 1% em nanoemulsão e em emulsão lipídica, respectivamente, pela via intraperitoneal. Iniciou-se com a dose de 250mg/kg (n=10) e a partir desta diminuiu-se ou aumentou-se a dose até que se obtivesse 0 e 100% de óbitos em cada grupo, desta forma foram constituídos sete subgrupos no NANO (n=10 cada subgrupo) nas doses de 200, 250, 325, 350, 400, 425 e 475 mg/kg e oito subgrupos no EMU (n=10 cada subgrupo) 250, 325, 350, 400, 425, 475, 525 e 575 mg/kg. No grupo CONTROLE (n=10) os animais receberam solução fisiológica no maior volume utilizado nos demais grupos para descartar óbito pelo volume injetado. As análises de DL50 e DL 100 foram obtidas através de regressão linear simples. A DL 50 foi de 320,95 mg/kg e 423,51 mg/kg e a DL 100 foi de 445,99 mg/kg e 595,31 mg/kg para os grupos NANO e EMU, respectivamente. Conclui-se que o propofol em nanoemulsão é 25 % mais potente quando comparado à emulsão lipídica pela via intraperitoneal.

**Palavras-chave:** Dose letal, potência, propofol, nanoemulsão, camundongos

### Abstract

The formulation of a drug can interfere with its absorption into the circulatory system and may result in changes in the dose required to achieve that particular effect. The aim of this study was to determine the lethal dose 50 (LD 50) and 100 (LD100) of a nanoemulsion of propofol and the lipid emulsion in mice intraperitoneally. One hundred sixty animals weighing  $36.47 \pm 4.6g$ , which were distributed randomly into two groups: NANO and EMU who received propofol 1% in the nanoemulsion and lipid emulsion, respectively, intraperitoneally. Began with a dose of 250mg/kg (n=10) and from this is decreased or increased the dose until achieving 0 and 100% of deaths in each group thus formed were seven subgroups in NANO (each subgroup n = 10) at doses 200, 250, 325, 350, 400, 425 and 475 mg/kg and in EMU eight subgroups (n= 10 each subset) 250, 325, 350, 400, 425, 475, 525 and 575 mg/kg. In the CONTROL group (n=10) animals received saline in the largest volume used in the other groups to rule

<sup>1</sup> Discente do programa de Pós Graduação em Ciência Animal. Universidade do estado de Santa Catarina, UDESC, Centro de Ciências Agroveterinárias, CAV, Lages, SC. E-mail: martielogehrcke@hotmail.com

<sup>2</sup> Discente do programa de Pós Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP. E-mail: cassivetr@hotmail.com

<sup>3</sup> Pesquisador, Médico Veterinário autônomo. Lages, SC. E-mail: renatotamanho@hotmail.com

<sup>4</sup> Profs. da UDESC, Centro de Ciências Agroveterinárias, CAV, Lages, SC. E-mail: a2anm@cav.udesc.br; a2no@cav.udesc.br

\* Autor para correspondência

out death by the volume injected. Analysis of LD 50 and LD 100 were obtained by linear regression. The LD 50 was 320, 95 mg / kg and 4243, 51mg / kg and the LD 100 was 445.99 mg / kg and 595.31 mg / kg to groups NANO and EMU, respectively. It follows that nanoemulsion is propofol in 25% more potent compared to the lipid emulsion intraperitoneally.

**Key words:** Lethal dose, potency, propofol, nanoemulsion, mice

## Introdução

O propofol (2-diisopropilfenol) é um anestésico intravenoso de curta duração rotineiramente utilizado na prática hospitalar em humanos e em pacientes veterinários (DUKE, 1995; SEBEL; LOWDON, 1997). Sua alta aceitação entre os anesthesiologistas está associada as suas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas que caracterizam um rápido início de efeito, curta duração da anestesia, mínimas alterações cardiorespiratórias e principalmente diferentes vias de biotransformação, além da hepática (WHITE, 2001).

Deste a sua introdução na rotina anestesiológica, este fármaco passou por alterações em sua formulação, pois suas características químicas como alta lipossolubilidade e sua natureza oleosa em temperatura ambiente, inviabilizavam sua administração intravenosa na forma de sal, necessitando de uma formulação à base de lipídios que atualmente constitui-se de óleo de soja, lecitina de ovo e glicerol (BAKER; NAGUIB, 2005). Entretanto, esta formulação possui desvantagens como: contaminação bacteriana, lipemia, risco de embolismo lipídico, dor à aplicação e instabilidade térmica da emulsão (BAKER; NAGUIB, 2005; BARBOSA, 2007; STRACHAN; MANSEL; CLUTTON, 2008).

Frente a estas desvantagens, diversos estudos tentaram eliminar esse veículo lipídico utilizando a tecnologia das nanoemulsões (MOREY et al., 2006; KIM et al., 2007; TAMANHO, 2010; SUDO et al., 2010; GEHRCKE, 2012). Estas, caracterizam-se pela alta estabilidade, menor proliferação bacteriana, menor tamanho molecular e sem apresentar dor à aplicação (BAKER; NAGUIB, 2005). Ainda, sabe-

se que existem diferentes nanoemulsões, e alguns estudos apontam diferenças na farmacocinética de diferentes formulações, o que pode resultar em alteração das doses utilizadas (DUTTA; EBLING, 1997; MOREY et al., 2006; KIM et al., 2007; DATE; NAGARSENKER, 2008).

Sudo et al. (2010) encontraram equipotência das doses de propofol em emulsão lipídica e de uma nanoemulsão à base de macrogol e glicerol por via intravenosa. No entanto, por esta via sabe-se que a formulação pouco interfere na dose, pois a biodisponibilidade é de 100% (WILKINSON, 2005). Embora o uso habitual do propofol seja por esta via, é citada sua utilização por outras vias como: intraóssea, no caso de aves (GUIMARÃES et al., 2006) e pacientes pediátricos (SOARES et al., 2011), e intraperitoneal, em animais de laboratório (BANASZCYK, et al., 2002; ALVES et al., 2009). Nestas, a formulação, características químicas e tamanho molecular podem interferir na biodisponibilidade do fármaco (WILKINSON, 2005).

Desta forma, objetivou-se verificar às doses letais 50 e 100 do propofol em emulsão lipídica e em nanoemulsão por via intraperitoneal em camundongos para averiguar a equipotência de ambas por esta via.

## Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da instituição de origem (Protocolo nº 1.30/06). Para tal, foram utilizados um total de 160 camundongos, machos e fêmeas, da linhagem Balb/C, hípidos, com idade entre 8 e 12 semanas, pesando  $36,47 \pm 4,6g$ . No biotério, os mesmos foram mantidos em um

ambiente sob condições controladas obedecendo fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro/dia (controlado através de timer), e com temperatura controlada entre 20 e 24°C (mantida através de condicionador de ar, aferida por termômetro de ambiente). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno próprias para a espécie, tendo como cama maravalha de madeira, e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Inicialmente os animais foram alocados em dois grupos principais: EMU, os quais receberam propofol a 1% em emulsão lipídica e NANO, que receberam propofol em nanoemulsão a 1%, ambos os tratamentos administrados por via intraperitoneal. Baseado nos estudo de Banaszczyk et al. (2002), iniciou-se com a dose de 250mg/kg (n=10 em cada grupo), que seria a dose máxima da emulsão lipídica que não acarretaria em óbitos, e a partir desta, diminuiu-se se ou aumentou-se a mesma com objetivo de obter 0 e 100% de óbitos. Assim, ao final do estudo, obteve-se oito subgrupos no EMU (n=10, cada subgrupo) com as doses de 250, 325, 350, 400, 425, 475, 525 e 575 mg/kg e sete subgrupos no NANO (n=10, cada subgrupo) com 200, 250, 325, 350, 400, 425 e 475 mg/kg. Ainda, para descartar possíveis óbitos por excesso de volume de injeção, realizou-se um grupo controle (CONTROLE, n=10) no qual foi administrado solução fisiológica com o maior volume obtido com as doses acima.

Após a administração dos tratamentos, os animais foram posicionados sobre colchão térmico e avaliaram-se os tempos de: latência, recuperação total, óbito e também o número de óbitos. Os animais foram monitorados constantemente por até sete horas e a partir disso considerava-se que o óbito era decorrente de causas adversas sem relação com o anestésico. Ao final do estudo, aqueles que tiveram recuperação total e os com tempo de hipnose acima do proposto eram eutanasiados após indução anestésica, caso necessário, seguido por deslocamento cervical, conforme normas aprovadas pelo COBEA (Comitê Brasileiro de Experimentação Animal).

A determinação das doses letais (DL) 50 e 100, nas quais obteve-se 50 e 100 % de óbitos, respectivamente, foi realizada através de análise de regressão linear com auxílio do programa SIGMA STATIC 5.0. Entre os grupos utilizou-se ANOVA, seguida de Teste t com correção de Welch para o tempo de latência. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ . Para os demais parâmetros não foi aplicada análise estatística, visto que as doses não eram equipotentes.

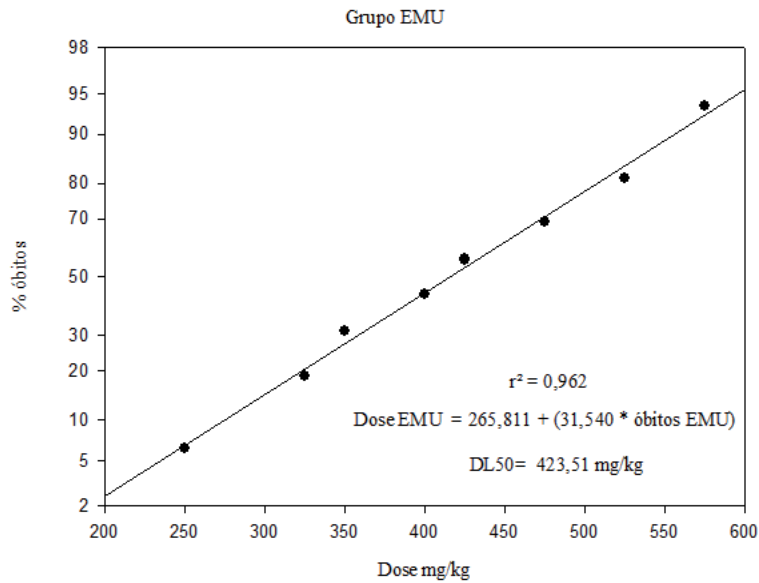
## Resultados e Discussão

O coeficiente de correlação ( $r^2$ ) demonstrou correlação positiva entre o número de óbitos e a dose utilizada tanto em EMU ( $r^2=0,9619$ ) quanto em NANO ( $r^2=0,9300$ ) (Figuras 1 e 2). A DL 50 foi de 320,95 mg/kg e 423,51 mg/kg e a DL 100 foi de 445,99 e 595,31 mg/kg para os grupos NANO e EMU, respectivamente. Todos os animais do grupo controle permaneceram sem alterações no comportamento, sem resultar em sedação ou óbito pelo volume injetado.

A análise de regressão linear revelou uma maior potência da nanoemulsão em relação à emulsão lipídica, pois foi necessária uma dose 25% menor para que se obtivesse o mesmo número de óbitos, obtendo-se uma relação de 1: 1,3.

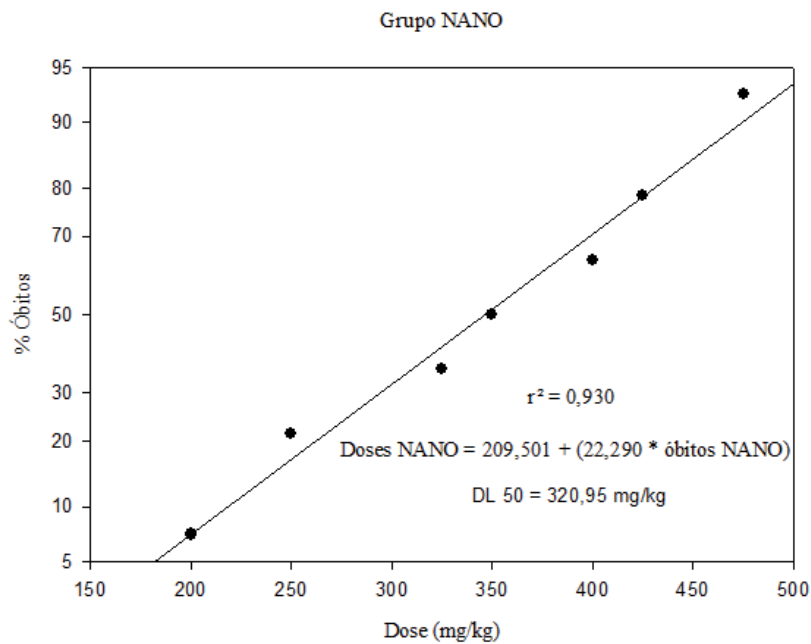
Na patente de registro da nanoemulsão utilizada neste estudo (CRISTÁLIA PRODUTOS QUÍMICOS FARMACÊUTICOS LTDA, 2008), o laboratório afirma uma potência maior da mesma, corroborando os resultados deste estudo. Entretanto, sem explicar o fator que leve a este resultado. Acredita-se que as nanoemulsões sejam mais potentes por apresentarem uma maior quantidade de moléculas do fármaco disponíveis após dissolução no sangue, já que as emulsões lipídicas mesmo após a liberação do princípio podem apresentar moléculas não disponíveis para início de efeito (DUTTA; EBLING, 1997; LEBLANC et al., 2000; BAKER; NAGUIB, 2005).

**Figura 1.** Percentual de óbitos de camundongos, em relação à dose (mg/kg) de propofol em emulsão lipídica a 1% administrado via intraperitoneal(EMU).



Fonte: Elaboração dos autores.

**Figura 2.** Percentual de óbitos de camundongos, em relação à dose (mg/kg) de propofol em nanoemulsão a 1% administrado via intraperitoneal (NANO).



Fonte: Elaboração dos autores.

Por outro lado, Sudo et al. (2010) utilizando as mesmas formulações deste estudo por via intravenosa em camundongos, não encontraram diferenças nas doses letal e hipnótica 50. Isto, provavelmente ocorreu em virtude das diferentes vias utilizadas entre os estudos. Embora as formulações sejam diferentes e o tamanho da partícula seja menor na nanoemulsão, ambas contem a mesma concentração de propofol o que por via intravenosa não acarretaria diferenças. Entretanto, por via intraperitoneal ocorre absorção dos fármacos para a circulação sistêmica, e isso pode sofrer influências da formulação utilizada (WILKINSON, 2005). Da mesma forma, Tamanho (2010) e Corrêa (2010) em felinos e caninos, respectivamente, não encontraram diferenças nas doses hipnóticas de ambas as formulações por via intravenosa.

Contudo, em virtude da alta estabilidade das nanoemulsões, após a administração intravenosa, ocorre um curto atraso na liberação do fármaco, o que acarretaria em uma latência maior em comparação a emulsão lipídica (MOREY et al., 2006; DATE; NAGARSENKER, 2008). Este fator em particular pode acarretar erro na determinação de doses hipnóticas em estudos conduzidos de forma de administração dose efeito. Neste sentido, recomenda-se a utilização do mesmo paciente para diferentes doses a fim de se evitar sobredose do fármaco decorrente do retardo na sua liberação.

As diferenças observadas entre os grupos deste estudo, justificam-se pela diferença entre as formulações, uma vez que as nanoemulsões possuem moléculas de até 100 nanômetros e as emulsões lipídicas podem chegar até 1000 nanômetros (BAKER; NAGUIB, 2005). Esta diferença de tamanho molecular resulta em uma maior velocidade e quantidade de absorção do fármaco, pois quanto menor a molécula mais facilmente ela atravessa as barreiras celulares (WILKINSON, 2005). Isso pode resultar em maior quantidade de fármaco no sítio de ação.

Estas hipóteses se confirmam ao analisarmos o tempo de latência após administração (Tabela 1). O NANO apresentou menores tempos de latência em relação ao EMU. Assim, mesmo que a nanoemulsão possa acarretar atraso no início de efeito quando administrada pela via intravenosa, por via intraperitoneal, esta possui maior velocidade de absorção e rápido início de efeito quando comparada a emulsão lipídica.

Com base nos resultados obtidos pode-se inferir que o propofol em nanoemulsão é 25% mais potente que a emulsão lipídica convencional pela via intraperitoneal em camundongos. A rápida absorção observada e a maior biodisponibilidade da nanoemulsão verificadas pelo menor tempo de latência e menor dose requerida, abre campo para novas pesquisas referentes a outras vias de administração para o propofol, tanto em emulsão lipídica como em nanoemulsão.

**Tabela 1.** Número de óbitos (NO), tempos de latência (TL em segundos) para óbito (TPO em minutos) e de recuperação total (TRT em minutos) em camundongos após administração de diferentes doses de propofol à 1%, pela via intraperitoneal, em nanoemulsão (NANO) ou emulsão lipídica (EMU).

Dose	NO		TL (seg)		TRT(min)		TPO(min)	
	EMU	NANO	EMU	NANO	EMU	NANO	EMU	NANO
200	-	0	-	150±31,62	-	97,2±93,56	-	-
250	0	1	288±73,75	177±22,13*	160,7±85,01	322,7±117,81	-	135±0
325	1	6	270±64,80	204±41,95*	315,7±96,59	420±0	77±0	52,33±31,59
350	4	9	282±40,49	124±10,13*	324±108,6	420±0	173,25±21,91	44,25±23,86
400	5	9	288±47,32	173±20,00*	249±102,16	420±0	123,6±46,24	77,33±107,10
425	4	8	372±83,90	198±49,39*	317±138,34	420±0	102,25±31,53	61,87±31,62
475	7	10	282±40,49	216±41,95*	420±0	-	81,71±21,17	31,5±11,82
525	7	-	282±49,39	-	420±0	-	84,57±36,85	-
575	10	-	256±42,73	-	-	-	121±107,68	-

\*Diferente de EMU (Teste t com correção de Welch,  $P \leq 0,05$ ).

Fonte: Elaboração dos autores.

## Referências

ALVES, H. C.; VALENTIM, A. M.; OLSSON, I. A.; ANTUNES, L. M. Intraperitoneal anaesthesia with propofol, medetomidine and fentanyl in mice. *Laboratory Animals*, London, v. 43, n. 1, p. 27-33, nov. 2009.

BAKER, M. T.; NAGUIB, M. Propofol: the challenges of formulation. *Anesthesiology*, Iowa, v. 103, n. 4, p. 860-876, oct. 2005.

BANASZCZYK, M. G.; CARLO, A. T.; MILLAN, V.; LINDSEY, A.; MOSS, R.; CARLO, D. J.; HENDLER, S. S. Propofol phosphate, a water-soluble propofol prodrug: in vivo evaluation. *Anesthesia and Analgesia*, California, v. 95, n. 5, p. 1285-1292, nov. 2002.

BARBOSA, F. T. Síndrome da infusão do propofol. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, Rio de Janeiro, v. 57, n. 5, p.539-542, oct. 2007.

CORRÊA, A. L. Efeitos hemodinâmicos e metabólicos de uma nanoemulsão de propofol em cães. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias. Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

CRISTÁLIA PRODUTOS QUÍMICOS FARMACÊUTICOS LTDA, São Paulo-BR, Ogari de Castro Pacheco, Roberto Debom Moreira, Marisa Dutra Rodrigues Rizzi. Microemulsão óleo/água de propofol estável e pronta para uso. nº PI 0604377-1 A. BR. 27 out. 2006. 24 jun. 2008. República Federativa do Brasil-Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior-Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, Elsevier, v. 355, n. 1-2, p. 19-30, jan. 2008.

DUKE, T. A new intravenous anesthetic agent: Propofol. *Canadian Veterinary Journal*, Ottawa, v. 36, n. 3, p. 181-183, may 1995.

DUTTA, S.; EBLING, W. F. Emulsion formulation reduces propofol's dose requirements and enhances safety. *Anesthesiology*, Iowa, v. 87, n. 6, p. 1394-1405, dec. 1997.

GEHRCKE, M. I. *Farmacocinética do propofol em nanoemulsão em gatos*. 2012. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias. Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

GUIMARÃES, L. D.; NATALINI, C.; FLORES, F. N.; CAMARGO, S. F.; BOPP, S.; PIPPI, N. L. Avaliação de duas doses de propofol para infusão contínua em pombos domésticos. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 34, n. 3, p. 325-329, oct. 2006.

KIM, K. M.; CHOI, B. M.; PARK, S. W.; LEE, S. H.; CHRISTENSEN, L. V.; ZHOU, J.; YOO, B. H.; SHIN, H. W.; BAE, K. S.; KERN, S. E.; KANG, S. H.; NOH, G. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol microemulsion and lipid emulsion after an intravenous bolus and variable rate infusion. *Anesthesiology*, Iowa, v. 106, n. 5, p. 924-934, may 2007.

- LEBLANC, P. P.; AIACHE, J. M.; BESNER, J. G.; BURI, P.; LESNE, M. *Tratado de biofarmácia e farmacocinética*. São Paulo: Instituto Piaget, 2000. 396 P.
- MOREY, T. E.; MODELL, J. H.; SHEKHAWAT, D.; GRAND, T.; SHAH, D. O.; GRAVENSTEIN, N.; MCGORRAY, S. P.; DENNIS, D. M. Preparation and anesthetic properties of propofol microemulsions in rat. *Anesthesiology*, Iowa, v. 104, n. 6, p. 1184-1190, jun. 2006.
- SEBEL, P. S.; LOWDON, J. D. Propofol: a new intravenous anesthesia. *Canadian Journal of Anaesthesia*, Ottawa, v. 44, n. 2, p. 24-30, aug. 1997.
- SOARES, A. V.; GEHRCKE, M. I.; MORAES, A. N.; FLORES, F. N.; CORREA, A. L.; OLESKOVICZ, N. Dexmedetomidina e cetamina S(+) por via oral ou intramuscular em gatas pediátricas: sedação e parâmetros fisiológicos. *MEDVEP. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação*, Curitiba, v. 9, n. 30, p. 502-506, 2011.
- STRACHAN, F. A.; MANSEL, J. C.; CLUTTON, R. E. A comparison of microbial growth in alfaxalone, propofol and thiopental. *The Journal of Small Animal Practice*, England, v. 49, n. 4, p. 186-190, apr. 2008.
- SUDO, R. T.; BONFÁ, L.; TRACHEZ, M. M.; DEBOM, R.; RIZZI, M. D. R.; SUDO, G. Z. Caracterização Anestésica da Nanoemulsão não Lipídica de Propofol. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, Rio de Janeiro, v. 60, n. 6, p. 479-483, sept./oct. 2010.
- TAMANHO, R. B. *Efeitos cardiorespiratórios e metabólicos do propofol nas formulações em emulsão lipídica e nanoemulsão em felinos*. 2010. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias. Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.
- WHITE, P. F. Propofol. In: \_\_\_\_\_. *Tratado de anestesia venosa*. Porto Alegre: Arthmed, 2001. p. 121-160.
- WILKINSON, G. R. Farmacocinética: dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação dos fármacos. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GOODMAN, A. G.; GILMAN, A. G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. p. 3-24.

