



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – PPGQB**

PIERRE BARNABÉ ESCODRO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA CLÍNICA DE UMA FORMULAÇÃO
NEUROLÍTICA INJETÁVEL PARA USO PERINEURAL EM EQUINOS**

Maceió-Alagoas

Dezembro/2011



**Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia - IQB
Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia - PPGQB**

PIERRE BARNABÉ ESCODRO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA CLÍNICA DE UMA FORMULAÇÃO
NEUROLÍTICA INJETÁVEL PARA USO PERINEURAL EM EQUINOS**

*Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
e Biotecnologia da Universidade Federal
de Alagoas para obtenção de título de
Doutor em Ciências, área de
concentração Biotecnologia.*

Orientador: Prof. Dr. Josealdo Tonholo

Co-orientador: Prof. Dr. Ticiano Gomes
do Nascimento

Maceió-Alagoas

Dezembro/2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- E74a Escodro, Pierre Barnabé.
Avaliação da eficácia e segurança clínica de uma formulação neurolítica injetável para uso perineural em equinos / Pierre Barnabé Escodro. – 2011.
147 f. : il. graf., tabs.
- Orientador: Josealdo Tonholo.
Co-Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.
- Bibliografia: f. 120-130.
Apêndices: f. 131-147.
1. Equinos – Dor. 2. Teste Clínico. 3. Dor – Avaliação bioquímica.
4. Suspensão neurolítica injetável. 5. Estabilidade química. I. Título.

CDU: 577



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384
Email: cpgqb@qui.ufal.br

ATA DE DEFESA DE TESE DO DOUTORANDO PIERRE BARNABÉ ESCODRO.

Aos dezenove (19) dias do mês de dezembro de 2011, às 14h00min, reuniu-se na Sala de Reuniões do IQB da Universidade Federal de Alagoas, a Comissão Examinadora de **Defesa de Tese do doutorando Pierre Barnabé Escodro**, composta pelos professores doutores: Josealdo Tonholo – Orientador (PPGQB/IQB/UFAL), Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento – Coorientador (ESENFAR/UFAL), Marília Oliveira Fonseca Goulart (PPGQB/IQB/UFAL), Sílvia Beatriz Beger Uchoa (PPGQB/CTEC/UFAL), Sonia Salgueiro Machado (PPGQB/IQB/UFAL) e Geraldo Eleno Silveira Alves (UFMG). Após a apresentação oral por 46 minutos do trabalho intitulado “**Avaliação da Eficácia e Segurança Clínica de uma Formulação Neurolítica Injetável para Uso Perineural em Equinos**”, o doutorando foi em seguida argüido pela Banca Examinadora, durante 3 horas e 10 minutos. Reunidos em sessão secreta, os membros da Comissão deliberaram pela APROVAÇÃO do doutorando, fazendo jus ao título de **Doutor em Ciências**, na Área de Concentração BIOTECNOLOGIA pelo Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. E sem mais para relatar, eu, Josealdo Tonholo assino a presente Ata, em comum acordo com os demais membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Josealdo Tonholo _____
Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento _____
Prof.ª Dr.ª Marília Oliveira Fonseca Goulart _____
Prof.ª Dr.ª Sonia Salgueiro Machado _____
Prof.ª Dr.ª Sílvia Beatriz Beger Uchoa _____
Prof. Dr. Geraldo Eleno Silveira Alves _____

ADENDO:

DEDICATÓRIA

Ao iniciar a trajetória acadêmica,
Acreditava que não chegaria aqui,
Pois um matuto doutor, seria eu
merecedor?
Só estou aqui por apoio que consegui
adquirir
E dedico este trabalho para
poder humildemente seguir:
As mulheres da minha vida,
por quem Deus me fez sorrir
A quem peço desculpas pela ausência
Amor incondicional, sentido do meu ir e vir
Ao meu pai, hoje no Oriente Eterno,
Que me ensinou a ser digno e honesto
para seguir
Meu exemplo e maior fã
Acreditava fielmente que chegaria aqui.
A Deus, também dedico esta tese
E agradeço cada dia que vivi.

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, unipotente e unipresente, a quem devemos o cosmos, a vida e a criação, do átomo ao arcanjo

A Jesus, espírito de luz que conduz e rege nosso planeta

Aos Amigos e Protetores espirituais pela constante presença, inspiração e disciplina

A minha esposa Lucinéia, pelo amor, paciência e apoio incondicional

As minhas filhas: Bruna, Agatha, Tabatha e Mel, felicidade e razão de minha vida

A minha mãe Irani, pela fé, amor e credibilidade infinita

Ao meu orientador e amigo Josealdo Tonholo, exemplo de trabalho e perseverança, por acreditar e aceitar este matuto como orientado, a quem devo gratidão eterna

Ao meu co-orientador Ticiano, companheiro de experimentos e amigo incondicional

Aos professores e irmãos Ricardo Vilani- UFPR e Armen Thomassian- UNESP-Botucatu, por toda a ajuda e apoio durante a realização deste trabalho

Aos mestres que tive pela vida afora, não poderia deixar de lembrar: Nicoletti, Cal, Dittrich, Deconto, Dorta, Hunziker, Pedro, Rosangela, Pachaly, Sueli, Jean, Ana Liz, Stelio, Ricardo Lisak, Dalva Martinhão, Cidinha Gaspar, Clélia entre tantos outros.

Aos mestres do IQB-UFAL, por me fazerem enxergar que Medicina Veterinária com Química é bem mais gostoso, em especial àqueles que me ensinaram na PG e de alguma forma contribuíram para a concretização desta tese, entre eles: Profa. Sônia, Profa. Marília, Profa. Adriana, Profa. Fabiane Caxico e Prof. PC.

Aos meus orientados do GRUPEQUI-UFAL, pela fidelidade, amor aos equinos e crença, destacando-se os dois primeiros alunos que acreditaram na concretização do Grupo: Cícero e Juliana.

Aos amigos adquiridos no programa de Pós-Graduação do IQB, entre eles alunos e técnicos, em especial a “Dra. Rejane” - Secretaria e ao Irmão André Rocha

Aos alunos, professores e técnicos da Unidade Viçosa, pela força e apoio
Ao Núcleo de Inovação Tecnológica-UFAL, em especial a Prof. Silvia Uchoa
pela paciência e apoio nas dúvidas em relação à tecnologia patentária
A FAPEAL, FINEP e CNPq pelo apoio nesta tese

RESUMO

O controle da dor crônica em eqüinos tem evoluído nos últimos anos em função da maior exigência esportiva dos animais nas diferentes modalidades e da implantação de metodologias de combate aos maus tratos. Cite-se ainda que as potencialidades econômicas geradas no círculo da eqüinocultura acabam por estimular o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos. Em atendimento a estes preceitos, o trabalho aqui apresentado traz a avaliação da eficácia e segurança clínica de uma formulação neurolítica injetável para uso perineural em eqüinos, até o momento inexistente no mercado nacional. A Suspensão Neurolítica Injetável foi formulada com etanol, triancinolona e bupivacaína, visando aproveitar o efeito neurolítico do etanol, sem causar as reações inflamatórias e dolorosas locais causadas pelo mesmo. A avaliação de estabilidade química foi realizada através da avaliação da perda de peso das amostras, variação de pH, tempo de sedimentação após a agitação e desenvolvimento de método cromatográfico para identificação e determinação simultânea dos teores de Bupivacaína e Triancinolona. O teste clínico foi realizado por 180 dias em cinco equinos, abordando dois aspectos: avaliação da eficácia da ação neurolítica e abolição da dor da SNI; e a eventual toxicidade relacionada à composição. Para a indução de claudicação nos eqüinos, foi desenvolvido método através de ferraduras, realizando posteriormente a infiltração perineural de 5 mL de SNI em cada ramo dos nervos palmares. A avaliação de toxicidade da SNI realizou-se através de monitoração das funções hepática, renal e muscular após as infiltrações, mensurando os níveis séricos de Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Creatinofosfoquinase (CK), Gamaglutamiltransferase (GGT), Uréia e Creatinina. A SNI apresentou estabilidade química satisfatória em temperaturas de 4°C e 20°C. O teste clínico indicou abolição da dor podal nos animais a partir de 96 horas da infiltração, com efeito mantido até 180 dias. A SNI não demonstrou causar toxicidade hepática, renal e/ou muscular, evidenciando a potencialidade de transformação em produto comercial.

Palavras-Chave: Suspensão neurolítica injetável. Estabilidade química. Teste clínico. Avaliação bioquímica. Dor em eqüinos.

ABSTRACT

The control of chronic pain in equines is growing up recent years in function of the highest performance required of the animals in the different sportive modalities and the new look for methodologies of combat to animal maltreatment. It is cited even, the economic potentialities in the economic chain of the equine breeding to stimulation of the development of new technologies and products. In attendance to these rules, the work presented here brings the evaluation of the effectiveness and clinical security of a injectable neurolytic formulation for perineural use in equines. This type of drug is not yet available in Brazilian market. The Injectable Neurolytic Suspension (SNI) was formulated with ethanol, triamcinolone and bupivacaine, aiming at to use to advantage the neurolytic effect of ethanol, with no collateral inflammatory reactions and painful in local injection. The evaluation of chemical stability was carried through the evaluation of the loss of weight of the samples, variation of pH, time of sedimentation after the agitation and development of chromatographic method for identification and simultaneous determination of bupivacaine and triamcinolone. The clinical test was carried through per 180 days in five horses, having approached two aspects: (a)evaluation of the effectiveness of the neurolytic action and pain suppression of the SNI, and (b)the eventual toxicity related to the composition. The lameness was induced in the horses through the development of horseshoes method, carrying later through perineural infiltration of 5 mL of SNI in each branch of the palmar nerves. The evaluation of the SNI toxicity was carried out monitoring of the hepatic, kidney and skeletal muscle functions, measuring the serum levels of alanina aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinofosfokinase (CK), Gamaglutamiltransferase (GGT), Urea and Creatinine. The SNI presented satisfactory chemical stability in temperatures of 4°C and 20°C. The clinical test indicated abolition of podal pain in the horses from 96 hours of infiltration, with effect kept up to 180 days. The SNI did not caused hepatic, kidney and/or skeletal muscle toxicity. All the results lead to a very promissory drug to this specific market in Brazil.

Key words: Injectable neurolytic suspension. Chemical stability. Clinical test.

Biochemical evaluation. Equine pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Fibras aferentes responsáveis pelas informações nociceptivas.....	25
Figura 1.2- Escala da Organização Mundial de Saúde para tratamento da dor.	28
Figura 1.3- Anatomia de um neurônio típico.....	32
Figura 1.4- Neurólise. No círculo e seta vermelho estão indicados os locais da degeneração walleriana; e no preto os locais da degeneração axônica.	32
Figura 1.5- Conjunto de possíveis eventos quando uma fibra motora é seccionada: A- Fibra nervosa normal; B- Lesão Nervosa (neurotemese) com 2 semanas; C-Proliferação de células de Schwann dá origem a um cilindro que é penetrado pelos axônios em crescimento , com 3 semanas (note musculatura atrofiada);D- regeneração bem sucedida e E- Quando Axônio não encontra as células de Schwann, ocorre crescimento desordenado, formando o neuroma.....	33
Figura 1.6- Lesões histopatológicas de neurotemese: A-Espessamento do epineuro (seta). HE 100X. B-Necrose do nervo. HE 400X.....	35
Figura 1.7- Lesões histopatológicas características de Axonotemese: A- Degeneração walleriana.. Luxol fast blue-640 x.; B-Presença de esferóides. HE 640 x.....	37
Figura 1.8- Estrutura Química da Bupivacaína	44
Figura 1.9- Estrutura molecular da triancinolona acetonido.....	45
Figura 3.1- Tempos das análises (t) para estudo da estabilidade química da SNI (t0: inicial, t2: 15 dias, t3: 30 dias, t4 :60 dias, t5: 90 dias, t6:180 dias).....	54
Figura 3.2- Organograma de análises das amostras de SNI em cada tempo de análise (t).....	55
Figura 3.3- Vista solar de ferradura utilizada no experimento, com discriminação dos orifícios submetidos a pressão com parafusos de ϕ 6 mm: PR (ranilha), PL (lateral sola), PM (medial sola) e PC (central sola).....	59
Figura 3.4- Extremidade do parafuso de ϕ 6 mm, emergindo através do orifício central da sola, correspondendo ao ponto PC (seta).....	60
Figura 3.5- Aperto do parafuso no orifício PL: a resistência à pressão e a leve reação dolorosa foram os parâmetros utilizados para determinar o comprimento do parafuso em cada ponto de maneira individual.....	61
Figura 3.6- Inervação do membro torácico distal esquerdo do equino (vista lateral). Em vermelho o local da infiltração da SNI no nervo palmar lateral (NP).....	63
Figura 3.7- Uso de neurolocalizador para melhor localização do Nervo Palmar.....	63
Figura 4.1- Variação da média das massas das amostras nos diferentes tempos de amostragem.....	69
Figura 4.2- Cromatograma de (1) bupivacaína (200 μ g/mL) em acetonitrila:água (60:40, v/v) e comprimento de onda de 263 nm.....	72
Figura 4.3- Cromatograma de (1) bupivacaína (100 μ g/mL) e (2) triancinolona (200 μ g/mL) em acetonitrila:água (60:40, v/v) e comprimento de onda de 257 nm.....	73
Figura 4.4- Cromatograma de (1) bupivacaína (100 μ g/mL) e (2) triancinolona (200 μ g/mL) em acetonitrila:tampão fosfato equimolar (0,01M; pH 6,8),(50:50, v/v) e comprimento de onda de 240 nm.....	74

Figura 4.5- Cromatograma de (1) bupivacaína (100 µg/mL) e (2) triancinolona (200 µg/mL) em acetonitrila:tampão fosfato equimolar (0,01M; pH 6,8), (45:55, v/v) e comprimento de onda de 230 nm.....	74
Figura 4.6- Cromatograma de (1) bupivacaína (100 µg/mL) e (2) triancinolona (200 µg/mL) em acetonitrila:tampão fosfato equimolar (0,01M; pH 6,8), (40:60, v/v) e comprimento de onda de 230 nm.....	75
Figura 4.7- Cromatograma de (1) bupivacaína (100 µg/mL) e (2) triancinolona (200 µg/mL) em acetonitrila:tampão fosfato equimolar (0,01M; pH 6,8), (40:60, v/v) e comprimento de onda de 230 nm.....	76
Figura 4.8- Curva de calibração da bupivacaína com método analítico proposto.....	77
Figura 4.9- Curva de calibração da triancinolona com método analítico proposto.....	77
Figura 4.10- Estudos de estabilidade acelerado de bupivacaína em diferentes temperaturas ao longo de 180 dias. Em cada ponto analisado, observamos os valores e as barras superior e inferior representando o valor médio e desvio padrão relativo das amostras CQ1, CQ2 e CQ3.....	78
Figura 4.11- Estudos de estabilidade acelerado de triancinolona em diferentes temperaturas ao longo de 180 dias. Em cada ponto analisado, observamos os valores e as barras superior e inferior representando o valor médio e desvio padrão relativo das amostras CQ1, CQ2 e CQ3.....	80
Figura 4.12- Graus de Claudicação dos Animais do Grupo Controle infiltrados com Soro Fisiológico, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M13 (30 dias), com pressão aplicada no Ponto PR.....	82
Figura 4.13- Graus de Claudicação dos Animais do Grupo Controle infiltrados com Soro Fisiológico, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M13 (30 dias), com pressão aplicada no Ponto PC.....	83
Figura 4.14- Graus de Claudicação dos Animais do Grupo Controle infiltrados com Soro Fisiológico, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M13 (30 dias), com pressão aplicada no Ponto PM.....	83
Figura 4.15- Graus de Claudicação dos Animais do Grupo Controle infiltrados com Soro Fisiológico, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M13 (30 dias), com pressão aplicada no Ponto PL.....	84
Figura 4.16- Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M18 (180 dias), com pressão aplicada no Ponto PR.....	87
Figura 4.17- Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M18 (180 dias), com pressão aplicada no Ponto PC.....	87
Figura 4.18- Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M18 (180 dias), com pressão aplicada no Ponto PM.....	88
Figura 4.19- Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M18 (180 dias), com pressão aplicada no PL.....	88
Figura 4.20- Níveis séricos de ALT nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	95
Figura 4.21- Níveis séricos de AST nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	96

Figura 4.22- Variação das médias de ALT séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	96
Figura 4.23- Variação das médias de AST séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	97
Figura 4.24- Níveis séricos de GGT nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	98
Figura 4.25- Variação das médias de GGT séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	99
Figura 4.26- Níveis séricos de CK nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	100
Figura 4.27- Variação das médias de CK séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	100
Figura 4.28- Níveis séricos de Uréia (mg/dL) nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	101
Figura 4.29- Variação das médias de Uréia séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	102
Figura 4.30- Níveis séricos de Creatinina (mg/dL) nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	103
Figura 4.31- Variação das médias de GGT séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	103
Figura 4.32- Níveis séricos de ALT nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	107
Figura 4.33- Níveis séricos de AST nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	108
Figura 4.34- Variação das médias de ALT séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	108
Figura 4.35- Variação das médias de AST séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	109
Figura 4.36- Níveis séricos de GGT nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	110
Figura 4.37- Variação das médias de GGT séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	111
Figura 4.38- Níveis séricos de CK nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	111
Figura 4.39- Variação das médias de CK séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	112
Figura 4.40- Níveis séricos de Uréia nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	113

Figura 4.41- Variação das médias de Uréia séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	114
Figura 4.42- Níveis séricos de Creatinina nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	115
Figura 4.43- Variação das médias de Creatinina séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1- Lesões histopatológicas encontradas em Nervos palmares de Equinos infiltrados com Sarapin (animais 1 a 5) e Etanol 99,5 %.(animais 6 a 9), após 6 meses.....	39
Tabela 1.2- Variação dos valores de referência para ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina para Equinos, segundo Kaneko (1997), Kerber e Trindade (2002) e Thomassian (2005).....	48
Tabela 3.1- Graus de Claudicação em Equinos, segundo Stashak (2002).....	60
Tabela 3.2- Momentos de avaliação da eficácia clínica da SNI e respectivos tempos.....	64
Tabela 4.1- Pesos (g), Média de Peso (g), Desvio Padrão e % da Mt das amostras de SNI a 20°C em cada tempo de amostragem (t).....	66
Tabela 4.2- Pesos (g), Média de Peso (g), Desvio Padrão e % da Mt das amostras de (SNI) a 30°C em cada tempo de amostragem (t).....	67
Tabela 4.3- Pesos (g), Média de Peso (g), Desvio Padrão e % da Mt das amostras de SNI a 40°C em cada tempo de amostragem (t).....	68
Tabela 4.4- Medidas de pH das amostras de SNI, Neocaína e Triancil pré-incubadas em diferentes temperaturas nos cinco tempos de amostragem(t).....	70
Tabela 4.5- Tempo de Sedimentação pós-agitação, em segundos, das amostras de SNI, nos diferentes tempos de amostragem, sob as três temperaturas.....	71
Tabela 4.6- Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M5 (1 hora), com pressão aplicada no Ponto PC, PR, PM, PL.....	85
Tabela 4.7- Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M6 (4 horas) a M12 (7 dias), com pressão aplicada no Ponto PC, PR, PM, PL.....	86
Tabela 4.8- Valores de ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina obtidos nas amostras séricas dos animais do Grupo Controle de T1(24hs.Pré) até T7(7dias).....	93
Tabela 4.9- Valores de ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina obtidos nas amostras séricas dos animais do Grupo Controle de T8(30 dias) até T13(180 dias).....	94
Tabela 4.10- Valores de ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina obtidos nas amostras séricas dos animais do Grupo SNI de T1(24hs.Pré) até T7(7dias).....	104
Tabela 4.11- Valores de ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina obtidos nas amostras séricas dos animais do Grupo SNI de T8(30 dias) até T13(180 dias)..	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

%	Porcento
%Mt	Manutenção de massa teórica
ϕ	Diâmetro
\leq	Menor ou igual
μA	Microampère
μg	Micro-grama
$\mu\text{g/mL}$	Micro-grama mililitro
μm	Micro-metro
A.I.N.E.	Anti-inflamatório não esteroidal
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEP-UFAL	Comitê de Ética em Pesquisa – Universidade Federal de Alagoas
CK	Creatinofosfokinase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultra-violeta
Cm	Centímetros
CQ	Amostra controle de qualidade
CQ1	Amostra controle de qualidade com concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ triancinolona e 45 $\mu\text{g/mL}$ bupivacaína
CQ2	Amostra controle de qualidade com concentração de 120 $\mu\text{g/mL}$ triancinolona e 90 $\mu\text{g/mL}$ bupivacaína
CQ3	Amostra controle de qualidade com concentração de 160 $\mu\text{g/mL}$ triancinolona e 120 $\mu\text{g/mL}$ bupivacaína
DP	Desvio padrão
ENSEFAR	Escola de Enfermagem e Farmácia- UFAL
EQU1	Equino 1
EQU2	Equino 2
EQU3	Equino 3
EQU4	Equino 4
EQU5	Equino 5
EQU6	Equino 6
EQU7	Equino 7
FSL-UFAL	Fazenda São Luiz-Universidade Federal de Alagoas
G	Gramas
GGT	Gamaglutamiltransferase
GRUPEQUI-UFAL	Grupo de Pesquisa em Equídeos-UFAL
HPLC	<i>High-precision liquid chromatography</i>
k'	Fator de retenção
Kg	Quilogramas
kgf/cm^2	Quilogramas-força por centímetro quadrado
mA	Miliampère
Mg	Miligramas
mg/dL	miligrama por decilitro

M1	Momento 1: avaliação pré infiltração
M2	Momento 2: 15 minutos após a infiltração
M3	Momento 3: 30 minutos após a infiltração
M4	Momento 4: 45 minutos após a infiltração
M5	Momento 5: 1 hora após a infiltração
M6	Momento 6: 4 horas após a infiltração
M7	Momento 7: 6 horas após a infiltração
M8	Momento 8: 24 horas após a infiltração
M9	Momento 9: 48 horas após a infiltração
M10	Momento 10: 72 horas após a infiltração
M11	Momento 11: 96 horas após a infiltração
M12	Momento 12: 7 dias após a infiltração
M13	Momento 13: 30 dias após a infiltração
M14	Momento 14: 60 dias após a infiltração
M15	Momento 15: 90 dias após a infiltração
M16	Momento 16: 120 dias após a infiltração
M17	Momento 17: 150 dias após a infiltração
M18	Momento 18: 180 dias após a infiltração
Mt	Massa teórica
Nm	Nanômetro
nº	Número
NIT-UFAL	Nucleo de Inovação Tecnológica-UFAL
NP	Nervo palmar medial
°C	Graus Celsius
P.M.	Peso molecular
PC	Parafuso central
pH	Potencial hidrogeniônico
PL	Parafuso lateral
PM	Parafuso medial
PR	Parafuso ranilha
q.s.p.	Quantidade suficiente para
r²	Coeficiente de correlação
seg.	Segundos
SET	Solução estoque de triancinolona
SES	Solução de Estoque da SNI
SNI	Suspensão neurolítica injetável
T	Tempo de amostragem para avaliação da estabilidade química da SNI
t1	t 24 horas
t2	t 15 dias
t3	t 30 dias
t4	t 60 dias
t5	t 180 dias
T	Tempo de amostragem para avaliação dos níveis bioquímicos séricos dos animais do Grupo Controle e Grupo SNI
T1	T 24 horas pré-infiltração da SNI
T2	T 6 horas pós-infiltração da SNI
T3	T 24 horas pós-infiltração da SNI
T4	T 48 horas pós-infiltração da SNI
T5	T 72 horas pós-infiltração da SNI

T6	T 96 horas pós-infiltração da SNI
T7	T 7 dias pós-infiltração da SNI
T8	T 30 dias pós-infiltração da SNI
T9	T 60 dias pós-infiltração da SNI
T10	T 90 dias pós-infiltração da SNI
T11	T 120 dias pós-infiltração da SNI
T12	T 150 dias pós-infiltração da SNI
T13	T 180 dias pós-infiltração da SNI
U/l	Unidades internacionais por litro
UR	Umidade relativa do ar

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Considerações Sobre a Dor	21
1.2 Neurólise: Classificação de Lesões Nervosas	29
1.3 Fármacos Neurolíticos	33
1.4 Anestésicos Locais e Analgesia Perineural	39
1.5 Triancinolona	44
1.6 Avaliação Bioquímica Sérica de Funções Hepática, Muscular e Renal em Equinos	46
2 OBJETIVOS	49
2.1 Objetivo Geral	49
2.2 Objetivos Específicos	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Desenvolvimento e preparação da Suspensão Neurolítica Injetável (SNI)	50
3.2 Avaliação da estabilidade química da Suspensão Neurolítica Injetável	52
3.2.1 Desenvolvimento de método cromatográfico para ensaios da SNI.....	52
3.2.2 Estudo de Estabilidade da Formulação SNI.....	53
3.2.2.1 Delineamento do Estudo de Estabilidade da SNI.....	53
3.2.2.2 Preparação das amostras para ensaio de estabilidade.....	55
3.2.2.3 Método de Quantificação das SNI submetidas ao Envelhecimento.....	57
3.2.2.4 Critérios de Validação dos Ensaios Analíticos de Estabilidade.....	57
3.3 Seleção de equinos e composição de grupos	57
3.4 Metodologia de indução de claudicação	58
3.5 Infiltração perineural com Solução Neurolítica Injetável nos nervos palmares	62
3.6 Avaliação da Eficácia Clínica da Suspensão Neurolítica Injetável	64
3.7 Avaliações bioquímicas séricas das funções hepática, muscular e renal	65
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	66

4.1 Avaliação de estabilidade química das SNI.....	66
4.1.1 Perda de Peso das Amostras.....	66
4.1.2 Variação de pH.....	69
4.1.3 Tempo de Sedimentação após agitação de suspensões.....	70
4.1.4 Desenvolvimento de método cromatográfico para determinação simultânea de Bupivacaína e Triancinolona na SNI.....	71
4.1.5 Monitoramento dos analitos durante estudo de estabilidade acelerado.....	78
4.2 Avaliação da eficácia clínica da Suspensão Neurolítica Injetável.....	81
4.2.1 Grupo Controle: Infiltração com solução fisiológica nos nervos palmares.....	81
4.2.2. Grupo SNI: Infiltração com SNI nos nervos palmares.....	85
4.3 Avaliações Bioquímicas	91
4.3.1 Grupo Controle Animais infiltrados com Soro Fisiológico.....	91
4.3.1.1 Alanina Aminotransferase - ALT e Aspartato Aminotransferase – (AST).....	95
4.3.1.2 Gamaglutamiltransferase (GGT).....	98
4.3.1.3 Creatinofosfokinase (CK).....	99
4.3.1.4 Uréia.....	101
4.3.1.5 Creatinina.....	102
4.3.2 Grupo SNI: Animais infiltrados com a SNI.....	104
4.3.2.1 Alanina Aminotransferase - ALT e Aspartato Aminotransferase – (AST).....	107
4.3.2.2 Gamaglutamiltransferase (GGT).....	110
4.3.2.3 Creatinofosfokinase (CK).....	111
4.3.2.4 Uréia.....	113
4.3.2.5 Creatinina.....	114
5 CONCLUSÕES	117
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
6.1 Tópicos Promissores.....	118
6.2 Oportunidades de Mercado e Negócios Gerados.....	119
REFERÊNCIAS.....	120
APÊNDICES.....	131

1 INTRODUÇÃO

Apesar de todo avanço científico e tecnológico, a dor, em suas variadas formas de manifestação, continua sendo um dos maiores problemas médicos que afetam milhões de pessoas e animais em todo mundo, sendo que métodos e terapias analgésicas são criadas ou inovadas a cada ano, no intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (ALLEN JR., 2003; NICOLETTI et al., 2007).

Na Medicina Veterinária, diversos métodos de analgesia são pesquisados e utilizados, buscando abolir temporariamente ou definitivamente a dor. O mercado pet e de equinos são os que mais contribuem com as pesquisas e desenvolvimento de terapias e fármacos antálgicos. O fato do desenvolvimento do mercado de analgésicos nestas espécies está alicerçado no amor que os proprietários apresentam por estes animais, e particularmente, nos casos dos eqüinos, às diversas modalidades esportivas que compreendem a atividade eqüestre. No Brasil, em 2009, o mercado de eqüinos movimentou R\$ 77.848.383,00 em medicamentos (SINDICATO DAS INDÚSTRIAS FARMACÊUTICAS VETERINÁRIAS, 2011).

Os esportes eqüestres são alvo de estudos de vários Grupos de Pesquisa no mundo, almejando inovações científicas e tecnológicas no intuito de melhorar o rendimento atlético dos animais e diminuir lesões músculo-esqueléticas, visto que o desempenho do eqüino atleta, nas suas mais variadas atividades esportivas, depende diretamente da higidez do aparelho locomotor. As altas exigências impostas às suas estruturas representam a maior causa de descarte e de perdas nos dias de treinamento de animais em atividade esportiva (JONES, 1987; BIRCH; GOODSHIP, 1999).

Na Região Nordeste Brasileira o esporte Vaquejada faz parte da cultura regional e é amplamente difundido, apresentando alto crescimento nos últimos dez anos, principalmente com a introdução de cavalos de maior valor zootécnico e a consolidação das regras do esporte. A movimentação financeira formal calculada anualmente atinge cifras de 164 milhões de reais, empregando diretamente mais de 1400 pessoas (ESTUDO COMPLEXO DO AGRONEGÓCIO CAVALO DO BRASIL, 2006). Por outro lado, a economia informal que abrange esse setor pode ser

centenas de vezes superior, tendo em vista a característica da informalidade dos criatórios e do esporte. Apesar da inexistência de dados estatísticos confiáveis de lesões registradas em animais de alta performance nessa modalidade, a vivência clínica de profissionais da área de Medicina Veterinária na Região Nordeste é claramente pautada para recuperação de eqüinos acometidos de lesões do aparelho locomotor, visando retorno à atividade esportiva. Assim, todo e qualquer conhecimento que traga possibilidade de atenuação de danos ou cura, terá também aplicabilidade regional.

Considerando-se a casuística de claudicações em equinos em relação à localização torácica ou pélvica, independentemente do esporte, vários autores concordam que a maioria delas (cerca de 80%) envolve os membros torácicos ou anteriores, sendo que mais da metade são distais ao carpo, nas quais as regiões relacionadas ao casco estão direta ou indiretamente envolvidas (DYSON et al., 1986; ESCODRO, 2001; STASHAK, 2002). Vários fatores estão relacionados a esta realidade, entre eles: 60 a 65% do peso do eqüinos está nos membros torácicos, atividade de esforço repetitiva, casqueamento incorreto, treinamento inadequado, pouca aptidão física, fatores genéticos, entre outros.

Muitas afecções causadoras de dor que acometem o aparelho locomotor de eqüinos tornam-se crônicas, desenvolvendo síndromes degenerativas, o que tem estimulado a pesquisa de terapias celulares, técnicas de analgesia e controle da dor na espécie.

Segundo Escodro et al. (2011), as terapias analgésicas são amplamente utilizadas em equinos, principalmente com os objetivos de manter os animais na carreira esportiva ou função desempenhada, realização de exames ou procedimentos clínico-cirúrgicos, melhorar o prognóstico clínico e cirúrgico em relação à determinada afecção e proporcionar melhor qualidade de vida (bem estar animal).

Para o controle da dor, diversas terapias são indicadas, entre elas: corticosteróides, anti-inflamatórios não esteroidais (A.I.N.E), α -2 agonistas, agentes e opióides. Porém estes tratamentos normalmente são eficazes em dores agudas, ou seja, dores apresentadas como sinal clínico de uma doença. Já nas dores crônicas,

que se tornam propriamente a doença, devido ao tempo prolongado de estímulo doloroso, faz-se restritivo o uso contínuo destas terapias, principalmente pelos efeitos adversos (como gastrites e falência renal) e dependência química. Nesses casos a dor crônica pode ser classificada em nociceptiva ou neuropática (COLLES; THOPSON, 1991; ALVES et al., 2007; ESCODRO et al., 2011a) .

A principal causa conhecida de dor crônica em eqüinos é a resultante de processos degenerativos na extremidade dos membros, especialmente nas falanges e articulações interfalângicas, constituindo um dos problemas mais comumente enfrentado pelos clínicos. Mais de um terço de todas as claudicações crônicas no cavalo são oriundos de lesões na metade palmar da extremidade do membro, que respondem positivamente, de forma temporária, ao bloqueio anestésico do Nervo Digital Palmar (Troter,1999). Dentre as enfermidades podais que compõe este grupo estão: a podosamoidite ou enfermidade do navicular, fratura do navicular, ossificação das cartilagens colaterais da falange distal, fratura angular ou do processo palmar da falange distal , artrite interfalângica, lesão osteoproliferativa dorsal e osteíte podal (VALDEZ et al., 1978; SCHNEIDER; MAYHEW; CLARKE, 1985; TURNER; MCILRAITH,1985; TURNER,1986; HARDY,1992; JACKMAN et al.,1993; HOLLMANN; HEINEMANN, 1994; DARABEINER; WHITE; SULLINS, 1997).

As lombalgias constituem outra importante causa de dor crônica em eqüinos, cujo diagnóstico é complexo e que apresentam como principais afecções: o contato entre os processos espinhosos ("*kissing-spines*"), desmites inter e supra-espinhosas e osteoartrite dos processos articulares (ALVES et al., 2007).

Nos casos de síndromes degenerativas crônicas na metade palmar do casco, responsivas ao bloqueio anestésico do Nervo Digital Palmar, a neurectomia digital palmar ou a neurólise química, através de agentes neurolíticos, podem apresentar os melhores resultados terapêuticos (ESCODRO, 2006). O objetivo do uso das soluções neurolíticas é o bloqueio "irreversível" ou reversível prolongado da condução nervosa à região cronicamente afetada (GRANT; GOODKIN; KLIOT, 1999; BUFFENOIR; DECQ; LEFAUCHEUR, 2005; GUTIÉRREZ, 2005; ESCODRO et al, 2011a).

A opção do uso de tratamentos promotores de neurólise deve levar em conta a ausência de resposta satisfatória aos tratamentos conservativos, visto que a neurólise é um tratamento paliativo e possui complicações associadas aos procedimentos (fraturas espontâneas, rupturas tendíneas, exungulação, entre outras), considerando-se seu uso em eqüinos como último recurso terapêutico, no intuito de promover o bem estar animal (ESCODRO, 2006). Além disso, a indicação e execução de procedimentos de neurólise devem ser realizados de forma criteriosa por médicos veterinários especialistas, visando não atingir nervos com funções motoras (mais proximais) e evitando acidentes com o equino e cavaleiro.

A maioria dos agentes neurolíticos utilizados em humanos pode ser administrada em eqüinos, porém existem proporcionalmente poucos estudos controlados sobre este assunto na medicina veterinária, o que na maioria das vezes trazem dúvidas e condutas errôneas na utilização desses fármacos (ESCODRO et al., 2011a).

No Brasil, até o momento, não existia composição farmacológica neurolítica nacional, fazendo com que os clínicos sempre tivessem que recorrer às soluções neurolíticas americanas ou argentinas, normalmente com formulações de sais de amônio e álcool benzílico 0,75 %, cujo alívio da dor não supera 90 dias. Portanto fazia-se necessário uma pesquisa direcionada para eqüinos, visando o desenvolvimento de uma composição neurolítica eficaz e duradoura, contextualizando a necessidade com duas vertentes: a da clínica de equinos, considerando a importância das claudicações e das dores crônicas nas perdas em dias de treinamento, diminuição de performance e na indução de maus tratos; e do potencial de inovação tecnológica e geração de patente, visto não existir produto ou composição nacional de indicação neurolítica para uso veterinário.

1.1 Considerações Sobre a Dor

Segundo a International Association for the Study of Pain (IASP) a dor define-se como desagradável experiência sensorial e emocional, associada a uma lesão tecidual atual ou potencial, que é considerada como o quinto sinal vital. A dor é objeto de pesquisa de centenas de grupos científicos e tecnológicos no mundo (IASP, 1979; LUNA, 2006).

Para entender a dor, há a necessidade de abordar-se o tema nocicepção, que é o processo de reconhecimento dos sinais sensoriais desencadeados pela lesão tecidual. Este reconhecimento é realizado pelo sistema nervoso, através de nociceptores (transdutores sensoriais dos estímulos dolorosos), que são dotadas de canais iônicos. Quando são ativados durante a lesão, estes canais despolarizam e produzem potenciais de ação. A percepção de sensações oriundas de estímulos ou mecanismos traumáticos ou lesivos aos diversos órgãos ou tecidos do organismo traduz o conceito da dor, que pode ser classificada em Dor Fisiológica ou Dor Patológica (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Também é necessário conhecer as particularidades inerentes aos equinos, pois são animais “espécie tipo presa”, assim escondendo dores suportáveis, historicamente demonstrado pelo subtratamento da dor na espécie. Esta característica faz com que a dor crônica seja sub-analisada, ocorrendo a constatação da mesma de maneira tardia (WILSON, 2008).

A dor aguda em eqüinos é de fácil identificação, pois o animal apresenta uma expressão facial singular de excitação, dilatação de pupilas e narinas, taquicardia, taquipnéia, sudorese profunda, relutância ao levantar-se, falta de apetite e agressividade. Porém a identificação a dor crônica é complexa devido aos sinais clínicos menos evidentes, entre eles alternância de apoio de membros, apetite seletivo, perda de peso, hiperalgesia e sensibilidade aos estímulos não dolorosos como se os fossem, situação denominada de alodinia (WILSON, 2008; IDA; MARUCIO; GODOI, 2011).

As respostas protetoras ou de defesa aos estímulos dolorosos, como o reflexo de retirada do membro, fuga ou reação agressiva são aquelas responsivas a dor fisiológica. Estes sinais são característicos da dor aguda, produzidos por estímulos intensos na superfície da pele, como nos casos de queimadura e incisões. A dor inflamatória ou visceral é causada por estímulos não controlados e inevitáveis ao reflexo de defesa do organismo, normalmente de forma sub-aguda, apresentando respostas adaptativas específicas, que exteriorizam respostas autonômicas ou comportamentais variáveis pelo equino (FANTONI; MASTROCINQUE, 2002).

Os mecanismos neurofisiológicos relacionados à nocicepção são semelhantes nas espécies mamíferas, sendo que a trajetória do estímulo nociceptivo abrange da transdução à percepção dolorosa, ou seja, do estímulo nociceptivo à consciência e experiência emocional da dor (DWORKIN et al., 2003; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

A transdução consiste na transformação da energia física do estímulo nociceptivo em atividade elétrica, com ativação de nociceptores, dotados de canais iônicos, modulados por substâncias algogênicas, entre elas: acetilcolina, prostaglandinas, histamina, serotonina, bradicinina, leucotrieno, substância P, tromboxanos, fator de ativação plaquetária e potássio. A partir da transdução acontecerá transmissão do estímulo nociceptivo, que será processado por diversas lâminas da medula espinhal, adquirindo os aspectos físicos da dor por duas vias: as vias aferentes do tálamo que chegam a córtex cerebral e as vias aferentes ao sistema límbico relacionadas aos componentes emocional da dor (PISERA, 2005; VIÑUELA-FERNÁNDEZ et al., 2007; IDA; MARUCIO; GODOI, 2011).

A partir da geração da atividade elétrica, ocorre a transmissão do estímulo nociceptivo, ou seja, a propagação dos impulsos nervosos através das fibras aferentes ou nociceptores, levando-os até a medula espinhal. Estes nociceptores, ou ainda chamados por Messlinger (1997) de neurônios de primeira ordem, são classificados em três grandes grupos, segundo diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). São eles:

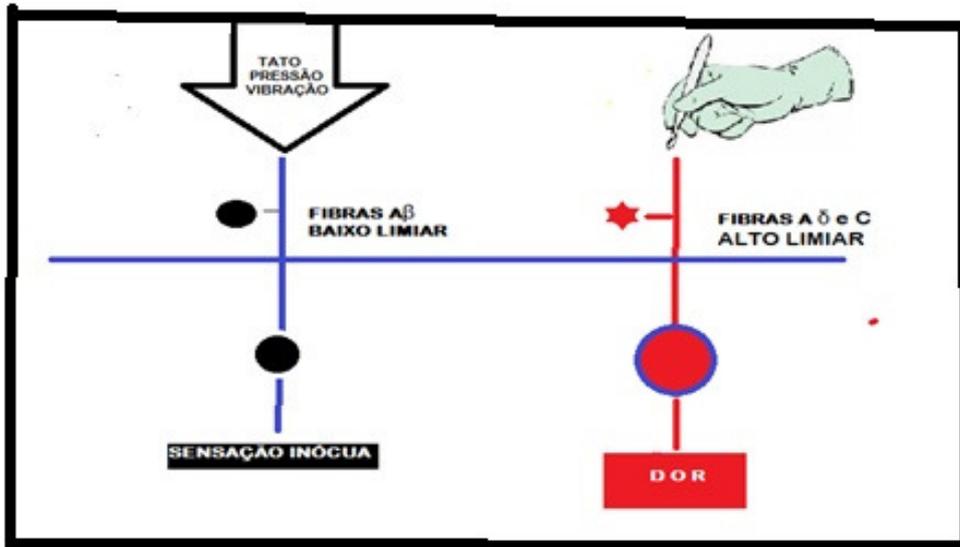
- Fibras A-β (A-Beta), de diâmetro grande (10 μm), mielinizadas e de condução rápida, responsáveis por sensações inócuas. Em condições normais não participam do processo de transmissão nociceptiva dolorosa.
- Fibras A-δ (A-Delta), com diâmetro intermediário (2 a 6 μm), mielinizadas. Sua velocidade de condução é intermediária, modulando a primeira fase da dor, mais aguda ou semelhante à pontada.
- Fibras C amielinizadas, de diâmetro pequeno (0,4 a 1,2 μm) e de velocidade de condução lenta. São responsáveis pela segunda dor ou difusa, caracterizada pela queimação persistente.

Em condições fisiológicas, estímulos dolorosos ativam nociceptores das fibras A- δ e C. Cada estímulo está associado com grau de inflamação, iniciando-se uma cascata de sensibilização periférica com eventos celulares. As células lesadas e fibras aferentes liberam uma série de mediadores químicos, incluindo Substância P, neurocinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, que geram efeitos sobre a excitabilidade das fibras aferentes sensoriais e simpáticas. Esses mediadores causam vasodilatação, com extravasamento de proteínas plasmáticas e recrutamento de células inflamatórias, ativando as fibras aferentes (HELLEBREKERS, 2002; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Os canais iônicos dos nociceptores são receptores ionotrópicos, podendo ser cátions não-seletivos ou canais de Na^+ não dependentes de potencial, incluindo receptores vanilóides I sensíveis à capsaina, canais iônicos dependentes de ATP e canais iônicos pH-dependentes. Uma vez ativados, os canais se abrem permitindo a entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} para o interior destes nociceptores, promovendo a despolarização da membrana. Se a despolarização é suficiente para ativar os canais de sódio dependentes de potencial, estes também são abertos, promovendo disparo dos potenciais de ação e a mediação da condução de estímulos sensoriais da inervação periférica para a medula espinhal. Neurônios sensoriais, em particular fibras C, expressam grande número de canais de Na^+ dependentes de potencial elétrico (GIORDANO, 2005; LEE; LEE; OH, 2005).

As fibras aferentes nociceptivas terminam no corno dorsal da medula, onde ocorrerá as sinapses com a via espinotalâmica, transportando os impulsos nervosos até o tálamo, de onde estes serão enviados às diversas áreas da córtex cerebral, permitindo a percepção e a reação à dor (BESSION, 1997; MILLAN, 1999; DREWES, 2006).

Figura 1.1 - Fibras aferentes responsáveis pelas informações nociceptivas.



Fonte: Autor, 2011.

Todo este mecanismo do estímulo nociceptor fará com que ocorram respostas reflexas supra-segmentares na medula, que quando acometerem os centros medulares de circulação e ventilação ocasionarão: hiperventilação, aumento de débito cardíaco, aumento de resistência periférica, hipertensão, taquicardia, taquipnéia e elevação de consumo de oxigênio; e quando acometerem os centros hipotalâmicos da função neuro-endócrina desencadearão aumento das secreções de: cortisol, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), glucagon, Adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico), Hormônio anti-diurético, hormônio do crescimento e renina; e diminuição de insulina e testosterona (Millan, 1999; DREWES, 2006).

Conforme observado, a velocidade de condução da informação dolorosa tanto na periferia quanto na medula espinhal é mais lenta que a informação inerente ao estímulo tátil, porém o processamento cerebral ou percepção dolorosa é consideravelmente mais veloz que o processamento da informação tátil, compensando a condução lenta. Assim ocorre um curto período de latência estímulo-resposta, gerando a resposta comportamental protetora imediata, que no ser humano é entendido como reflexo condicionado e que no equino pode compreender coices, mordidas e reações de fuga (PLONER, et al., 2006; IDA; MARUCIO; GODOI, 2011).

Os mecanismos até agora abordados estão relacionados à dor fisiológica, ou seja, uma entidade isolada, como uma incisão acidental ou um trauma externo de ocorrência única. Porém o que se observa na rotina clínica de eqüinos não são estímulos nocivos transitórios, mas sim processos dolorosos contínuos que caracterizam dor patológica, classificada em nociceptiva (inflamatória) ou neuropática. A primeira diz respeito a dores envolvendo estruturas somáticas ou viscerais, já a segunda envolvendo o sistema nervoso (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

A submissão de um paciente às dores contínuas sub-agudas, como é o caso da maioria das dores nociceptivas, fazem com que o equino apresente comportamento protetor e de inatividade temporária. Estes mecanismos de defesa são benéficos de imediato, porém com o tempo de exposição do estímulo, os aferentes nociceptivos persistem, aumentando os efeitos deletérios devido a cronicidade da lesão dolorosa. Assim, enquanto a dor aguda é o sinal clínico desencadeado por uma afecção, a dor crônica caracteriza-se pela própria afecção (ALMEIDA et al., 2006; ESCODRO et al., 2011a).

A dor crônica é aquela que persiste além do tempo esperado de uma doença ou injúria, arbitrariamente definida com duração maior que 3 a 6 meses. Pode ocasionar-se como reflexo de um estímulo externo contínuo ou espontaneamente. Normalmente, nos eqüinos estão duplamente associados. A consequência deste estímulo é uma resposta exagerada em duração e amplitude, o que ao médio prazo trará influencia da qualidade de vida do paciente e resposta pobre às terapias analgésicas convencionais (TRANQUILI et al., 2000; JI; WOOLF, 2001).

A dor patológica tem como principal característica a hipersensibilidade, resultando em alterações severas da função do sistema nervoso. Acarretará na diminuição do limiar de ativação dos nociceptores e resposta aumentada da medula aos estímulos sensoriais (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

No caso das dores patológicas (nociceptivas ou neuropáticas), o estímulo nociceptivo prolongado ou de intensidade severa ativa terminais nervosos aferentes silenciosos do tipo C polimoidais, existentes no local da injúria, disparando transmissão nervosa vigorosa, levando a hiperalgesia primária.

A estimulação das fibras C leva a hiperalgesia primária e conseqüente neuroplasticidade no Sistema Nervoso Periférico, ocorrendo ao curto prazo a estimulação em neurônios espinhais, chamado de sensitização ou “Wind-Up”, mediado por N-Metil-D-aspartato (NMDA), que se liga ao glutamato; enquanto que os receptores da taquicinina ligam-se a Substância P e neurocinina A. A sensitização leva a influxo de cálcio e ativação da proteína cinase C, que modifica estruturalmente o canal NMDA, aumentando sua sensibilidade ao glutamato. O resultado deste fenômeno é a facilitação da condução nervosa, em que estímulos outrora inócuos, passam a ser interpretados como dor (alodinia) e estabelece-se uma sensibilidade aumentada à estimulação nociva como resultado menor de limiar à nocicepção (PLONER et al, 2006; IDA; MARUCIO; GODOI, 2011).

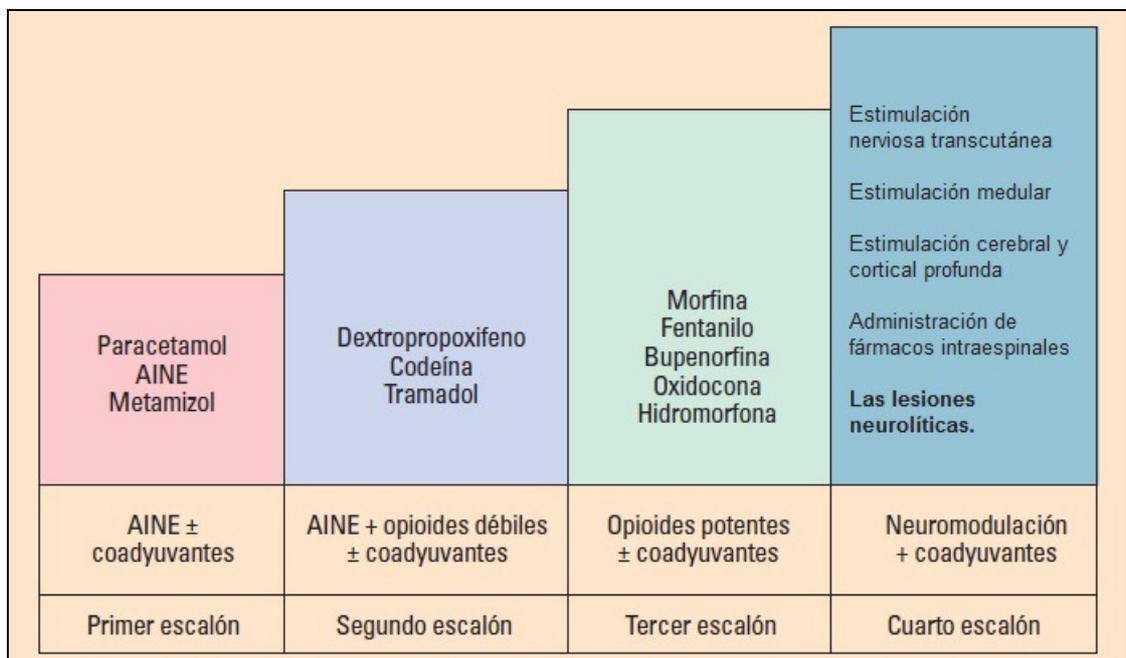
As fibras A β (responsáveis pelas sensações inócuas em condições fisiológicas), são neste momento recrutadas gerando dor como resultado do processamento central alterado no corno dorsal da medula espinhal (Klaumann *et al.*,2008).Finalmente os neurônios aferentes sofrem alterações fenotípicas importantes, em consequência da exposição a neurotrofinas como o fator de crescimento neuronal (NGF), liberado pelas células de Schwann, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos, aumentando a expressão de Substância P,glutamato, óxido nítrico e peptídeos relacionado ao gene calcitonina (TRANQUILLI, 2004; PISERA, 2005).

A dor neuropática, definida pela IASP (INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN, 2009) como uma dor originada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso, pode ser considerada um dos maiores desafios do complexo e intrigante universo das dores de natureza crônica, uma vez que mais de um terço dos pacientes não respondem de forma eficaz às drogas disponíveis no mercado (OSSIPOV; PORRECA, 2005; MCMAHON; KOLTZENBURG, 2006).

A dor neuropática pode estar associada à lesão nervosa primária ou relacionada ao tempo de ocorrência da sensitização, desta forma a dor nociceptiva ou inflamatória pode tornar-se neuropática, considerando o aspecto evolutivo crônico.

O tratamento da dor em eqüinos deve levar em conta as considerações realizadas até aqui, visto que se pode atuar de forma analgésica nas quatro vias neurofisiológicas do estímulo doloroso, isoladamente ou concomitantemente. Além disso, é necessário avaliar a escolha dos fármacos de acordo com o tipo de dor (somática, visceral, nociceptiva e neuropática) e tempo de evolução (aguda ou crônica). A Organização Mundial da Saúde classifica os tratamentos analgésicos em quatro escalões, como demonstra a Figura 1.2.

Figura 1.2 - Escala da Organização Mundial de Saúde para tratamento da dor.



Fonte: Alvarez et al. 2009.

No caso de um animal que será submetido à uma cirurgia eletiva, como orquiectomia, pode se atuar apenas na transdução nociceptiva, através de analgesia preemptiva, ou seja, aplicação da técnica analgésica anterior ao estímulo nocivo. Esta técnica de bloqueio da transdução pode ser realizada com anti-inflamatórios não esteroidais (A.I.N.E) pré-estímulos, como: fenilbutazona, flunixin meglumine, cetoprofeno, meloxicam e firocoxib; e com anestésicos locais no sítio da incisão (DOERTHY; VALVERDE, 2008; IDA; MARUCIO; GODOI, 2011).

No entanto, se o paciente apresenta um processo doloroso anterior ao procedimento, como nos casos das cólicas e fraturas, pensa-se em além de atuar na transdução, também agir na transmissão do impulso nervoso, através de bloqueios

anestésicos locais perineurais e loco-regionais; e na modulação nociceptiva, através de opióides ou α -2 agonistas, que estão sendo amplamente pesquisados em diversas vias de aplicação na espécie equina, entre elas: a intramuscular, epidural e articular (IDA; MARUCIO;GODOI, 2011).

Correlacionando o tipo de dor com a pesquisa contida nesta tese, a mesma abordará a dor associada às síndromes degenerativas crônicas em equinos, especificamente as associadas às afecções distais dos membros torácicos, entre elas: podosesamoidite ou enfermidade do navicular, fratura do navicular, calcificação das cartilagens colaterais da falange distal, fratura angular ou do processo palmar da falange distal, artrite interfalângica, lesão osteoproliferativa dorsal e osteíte podal (VALDEZ; ADAMS; PEYTON, 1978; SCHNEIDER; MAYHEW; CLARKE, 1985; TURNER; MCILRAITH, 1985; TURNER, 1986; HARDY, 1992; JACKMAN et al., 1993; HOLLMANN; HEINEMANN, 1994; DABAREINER; WHITE; SULLINS,1997).

A dor relacionada aos grupos de afecções supracitados refere-se à dor crônica, inicialmente tendo caráter inflamatório ou nociceptivo, com sensibilização ou “wind-up” presente, podendo evoluir à uma dor neuropática.

Para o tratamento paliativo dessas afecções, como também ocorre nas neoplasias terminais em humanos, sugere-se o bloqueio perineural ou loco-regional de ação prolongada, tentando denervar a região sede da dor, através de neurólise química ou cirúrgica. Para avaliar-se previamente o resultado do tratamento, é indicado realizar um bloqueio com anestésico local na estrutura nervosa, avaliando-se o efeito terapêutico que será obtido com a neurólise. Em pacientes onde a dor é neuropática devido à cronicidade da evolução, pode-se atuar concomitantemente na percepção dolorosa, através de psicotrópicos.

1.2 Neurólise: Classificação de Lesões Nervosas

Neurólise é a destruição de um tecido nervoso para promover analgesia, podendo ser realizada cirúrgica ou quimicamente (STEDMAN,1996). Segundo Rowe (1998), existem quatro métodos de neurólise: bloqueio químico com neurolítico, crioanalgesia, radiofrequência ou cirurgicamente.

Os bloqueios nervosos com neurolíticos são procedimentos muito utilizados para interromper a transmissão nervosa por tempo prolongado ou definitivamente, sendo indicados para dor crônica recorrente que não respondeu ao tratamento clínico conservativo. O bloqueio com neurolíticos só pode ser feito se houver alívio da dor com o bloqueio anestésico prévio, além de serem utilizados em fibras aferentes sensitivas, sem ou com pouca função motora (FERRANTE, 2000; PORTER, 2000; RYKOWSKI; HILGER, 2000).

A lesão em um nervo periférico pode causar desde um déficit físico leve e transitório, até perda total da função sensitiva e/ou motora, sendo classificada em três categorias, em ordem crescente de acordo com a gravidade: neuropraxia, axonotemese e neurotemese. Na neuropraxia, ocorre perda da condução dos impulsos nervosos, porém sem degeneração estrutural do nervo, o que permite o retorno da função; na axonotemese, a lesão é mais grave que a anterior e mesmo que não haja perda da continuidade anatômica do nervo, existe degeneração walleriana, porém ainda há possibilidade de regeneração; finalmente a neurotemese é a lesão mais grave, com descontinuidade e destruição dos elementos neurais (ADAIR; ANDREWS, 1995).

Quan e Bird (1999), citaram Seddon em 1943 e posteriormente Sunderland em 1951, como os pioneiros em apresentar uma classificação para lesões de nervos periféricos, que ainda hoje é utilizada, ou seja:

Neuropraxia (ou Tipo 1) = ocorre desmielinização focal, bloqueio da condução nervosa, porém sem degeneração dos axônios; é a forma mais leve de lesão

Axonotemese (ou Tipo 2) = ocorre degeneração dos axônios, com o endoneuro permanecendo intacto

Axonotemese (Tipo 3) = ocorre degeneração dos axônios, ruptura do endoneuro, com perineuro intacto

Axonotemese (Tipo 4) = degeneração dos axônios, ruptura do endoneuro e perineuro, com epineuro intacto.

Neurotemese (ou Tipo 5) = degeneração completa dos axônios e ruptura de todos os elementos de tecido conjuntivo neural, incluindo o epineuro; é a forma mais severa de lesão nervosa

Quando um neurônio é lesado há degeneração da extremidade distal e da lesão da extremidade proximal até o nível do primeiro nódulo de Ranvier. Após uma lesão nervosa, ocorre um processo degenerativo no segmento distal, denominado degeneração walleriana ou centrífuga e no segmento proximal, conhecido como

degeneração axônica ou centrípeta (Figura 1.4). A degeneração walleriana é um processo de degradação de todas as estruturas do axônio distal à lesão, que perde a continuidade com o corpo celular do neurônio. A degeneração axônica ocorre em alguns milímetros ou centímetros proximalmente à lesão e a sua extensão varia de acordo com a intensidade do trauma. Nos processos de degeneração walleriana e axônica, há fagocitose das estruturas degradadas por macrófagos e células de Schwann (HOLLMANN; HEINEMANN, 1994; NEIRA; ORTEGA; CARRASCO, 1996).

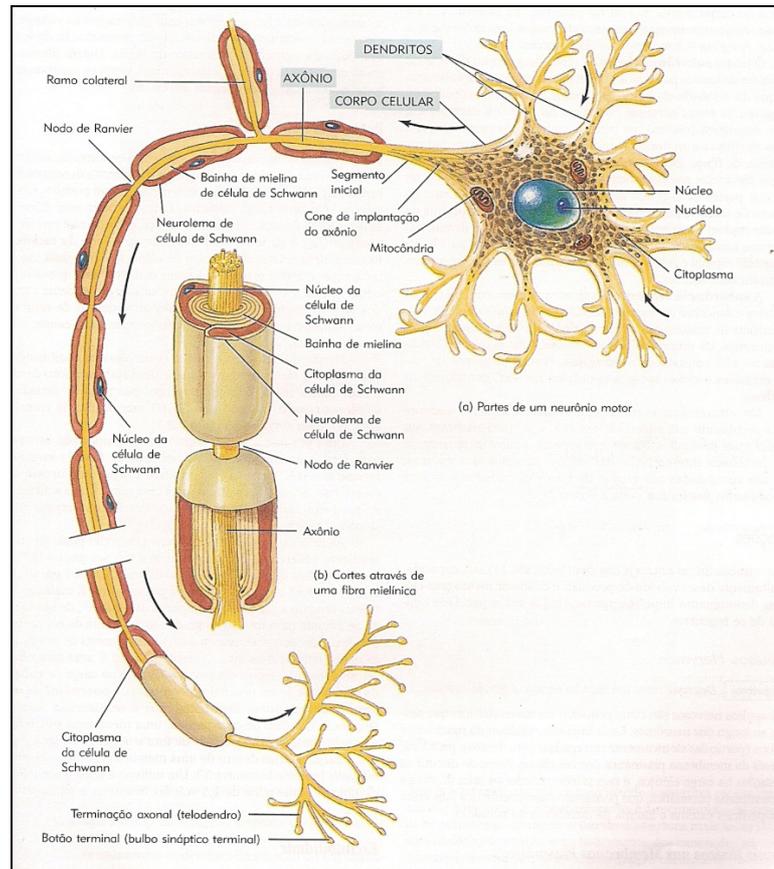
Existem diferentes mecanismos de lesão dos nervos periféricos, sendo que cada um deles causam dano específico no nervo. Os trabalhos sobre a etiologia das lesões em nervos periféricos em humanos, apontam em sua esmagadora maioria para os traumas mecânicos, através de variadas formas de traumas, laceração, estiramento, iatrogênica, entre outras (GRANT; GOODKIN; KLIOT, 1999), e a consequência pode ser a neuropraxia, axonotemese ou neurotemese.

A neurólise química, dependendo do princípio farmacológico e concentração administrada pode causar neurite com reação dolorosa intensa local, e em casos extremos ocorre a formação de uma massa amorfa: o neuroma. O modelo de neuroma replica a síndrome da dor fantasma observada em pacientes submetidos à amputação ou transecção nervosa em membros intactos (GRANT; GOODKIN; KLIOT, 1999; BUFFENOIR; DECQ; LEFAUCHEUR, 2005), que pode inviabilizar a infiltração química.

Os neuromas (Figura 1.5) apresentam presença de focos ectópicos nas fibras nervosas periféricas lesadas, o qual mantém os impulsos nervosos aferentes para o Sistema Nervoso Central. A entrada destes impulsos ectópicos na medula espinhal sensibiliza os neurônios do corno dorsal da medula (DEVOR, 1994; GRACEY et al., 1992). Canais de sódio dependentes de potencial parecem ser os responsáveis pela manutenção dos impulsos ectópicos aferentes (PORRECA et al., 1999).

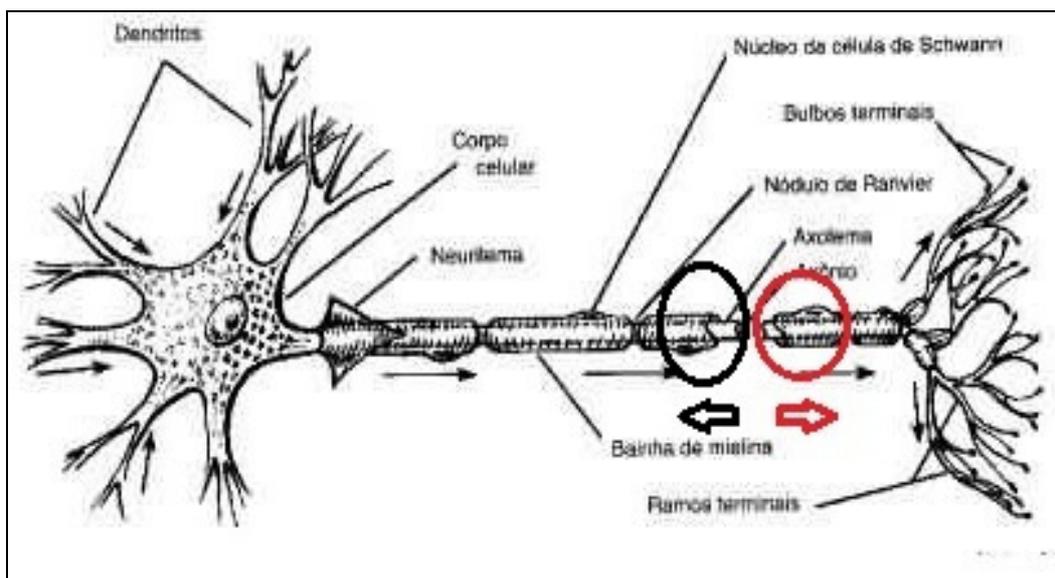
Estudos histológicos apresentam como base para identificação de um neuroma, os seguintes critérios: crescimento desordenado dos brotamentos axonais, proliferação de células de Schwann, erosão/perda do perineuro, perda da arquitetura funicular com ruptura da bainha epineural, crescimento desordenado dos axônios e presença de fibrose intra-neural (KRYGER, et al. 2001; ESCODRO, 2004).

Figura 1.3 - Anatomia de um neurônio típico.



Fonte: Tortora, 2004.

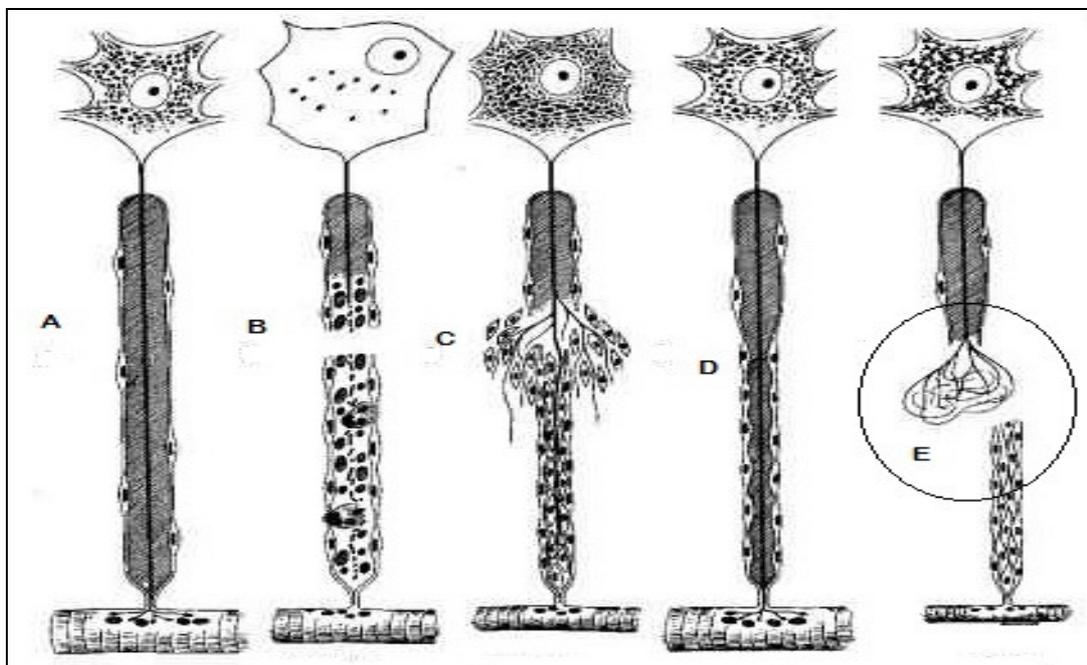
Figura 1.4 - Neurólise. No círculo e seta vermelha estão indicados os locais da degeneração walleriana; e no preto os locais da degeneração axônica.



Fonte: Moraes, 2001 – (Adaptada)

Assim o maior desafio do uso dos neurolíticos diz respeito à qualidade da lesão nervosa que será proporcionada a partir do fármaco neurolítico. O ideal seria a axonotemese e neurotemese, por ser de efeito mais duradouro, porém sem causar dor após a infiltração, reação inflamatória, neurite e/ou neuroma.

Figura 1.5 - Conjunto de possíveis eventos quando uma fibra motora é seccionada: A- Fibra nervosa normal; B- Lesão Nervosa (neurotemese) com 2 semanas; C-Proliferação de células de Schwann dá origem a um cilindro que é penetrado pelos axônios em crescimento, com 3 semanas (note musculatura atrofiada);D- Regeneração bem sucedida e E- Quando Axônio não encontra as células de Schwann, ocorre crescimento desordenado, formando o neuroma.



Fonte: Moraes, 2011.

1.3 Fármacos Neurolíticos

A discussão acerca da infiltração dos fármacos neurolíticos, basicamente envolve três fatores: tempo de latência, duração do efeito e presença de neurite e/ou inflamação local dolorosa (ESCODRO, 2011a).

Diferentes substâncias químicas têm sido utilizadas para interromper intencionalmente as vias nociceptivas, como álcool, fenol, glicerol, sais de amônio, clorocresol, nitrato de prata e solução salina hipertônica (ROWE, 2003).

Os neurolíticos produzem lesão nas fibras nervosas dependendo da concentração do agente em contato com o tecido. A injeção intra ou perineural, por exemplo, produzem alterações axonais importantes e degeneração waleriana (LIPTON, 1993; NEIRA; ORTEGA; CARRASCO, 1996).

Quando se produz uma lesão na fibra nervosa, um dos principais achados histopatológicos é a degeneração walleriana, importante para se obter o efeito clínico desejado de longa duração. A persistência da lâmina basal ao redor da célula de Schwann permite a regeneração adequada das fibras nervosas, evitando a formação de neuroma doloroso, justificando a utilização do fármaco como neurolítico (VIEL et al., 2005).

Sabe-se que a citotoxicidade de um neurolítico, está diretamente relacionada com a concentração utilizada do agente e o local de deposição. A infiltração extrafascicular tem efeitos menos drásticos sobre o nervo e caracteriza-se por edema no interior do endoneuro, alterações inflamatórias e lesão na bainha de mielina e células de Schwann, enquanto que, a infiltração intrafascicular é muito mais agressiva ao nervo, causando em geral, degeneração walleriana (WOOD, 1978; VIEL et al., 2005).

Os principais fármacos neurolíticos utilizados na rotina de eqüinos são sais de amônio, fenóis e alcoóis.

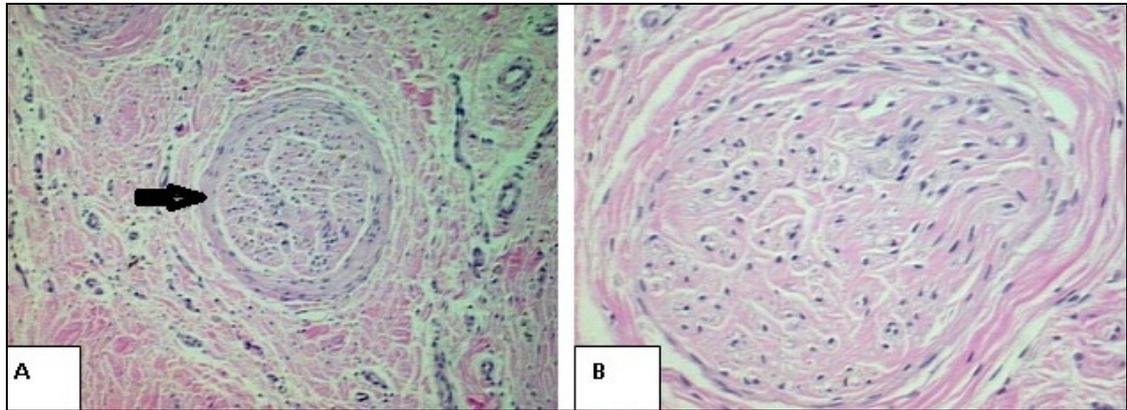
❖ Sais de Amônio:

Algumas apresentações comerciais, principalmente argentinas, estão disponíveis no mercado, entre elas o Equipin Plus®, que contém cloreto de amônio a 2% e álcool Benzílico 1%, com indicações de infiltrações subcutâneas perineurais à articulares

A lesão nervosa dos sais de amônio compreendem neuropraxia, até a concentração de 10%, o que traz um efeito aproximado de 2 a 4 semanas, podendo ser uma boa opção em pós-operatórios, visto o curto tempo de ação. A neurotoxicidade é bem menor que o fenol a 5% (KOBAYASHI et al., 1997).

A maior dúvida na utilização dos sais de amônio é o período de latência, que segundo autores pode variar de 12 a 36 horas em ratos (KOBAYASHI et al.,1997).

Figura 1.6 - Lesões histopatológicas de neurotemese: A-Espessamento do epineuro (seta). HE 100X. B-Necrose do nervo. HE 400X.



Fonte: Escodro , 2004.

Araújo, Bezerra e Dornbusch (2010) relataram o uso de Cloreto da Amônio a 3% na inserção do ligamento acessório do Tendão Flexor Digital Superficial em equino com deformidade flexural cárpica menor que 20°, sendo que a dor neuropática foi abolida e após 20 dias. O paciente melhorou significativamente o apoio com a terapia clínica concomitante, não necessitando de tratamento cirúrgico.

❖ Fenóis

Os fenóis são utilizados como neurolíticos e preferidos em bloqueios periféricos por causar uma menor incidência de neurites em relação aos álcoois, porém, segundo Porter (2000), o efeito dos fenóis tem menor duração e menor intensidade em comparação aos álcoois. A concentração do fármaco utilizado varia de 5 a 10%, sendo que a injeção é menos dolorosa.

O uso de fenol de 5 a 10 % é amplamente discutido e aprovado na infiltração do nervo obturador em humanos com traumas da medula espinhal, onde a espasticidade do arco reflexo adutor é uma complicação constante, causando dor e dificuldades para execução de fisioterapia (GUNDU; KALYON; DURSUN, 1992).

Segundo Buffenoir; Decq; Lefaucheur (2005) o tempo de latência do fenol a 6% é de uma semana em média, com duração satisfatória de três meses. Os fenóis

são pouco utilizados na medicina equina, podendo representar uma boa opção nos pós-operatórios onde a dor pode representar complicações.

❖ Alcoóis

Os alcoóis são amplamente utilizados com intuito de promover neurólise em diversas espécies de pacientes, sendo utilizados: álcool isopropílico, álcool benzílico e etanol.

O álcool etílico ou etanol, um dos mais conhecidos neurólíticos, atua extraíndo os fosfolípidos e colesterol do tecido nervoso, além de provocar a precipitação das lipoproteínas e mucoproteínas, e quando injetados diretamente em concentração e volume determinados, provoca bloqueio da condução nervosa, podendo causar anestesia ou hipoestesia, além de paralisia, se afetar os nervos motores (LIPTON, 1993; NEIRA; ORTEGA; CARRASCO, 1996).

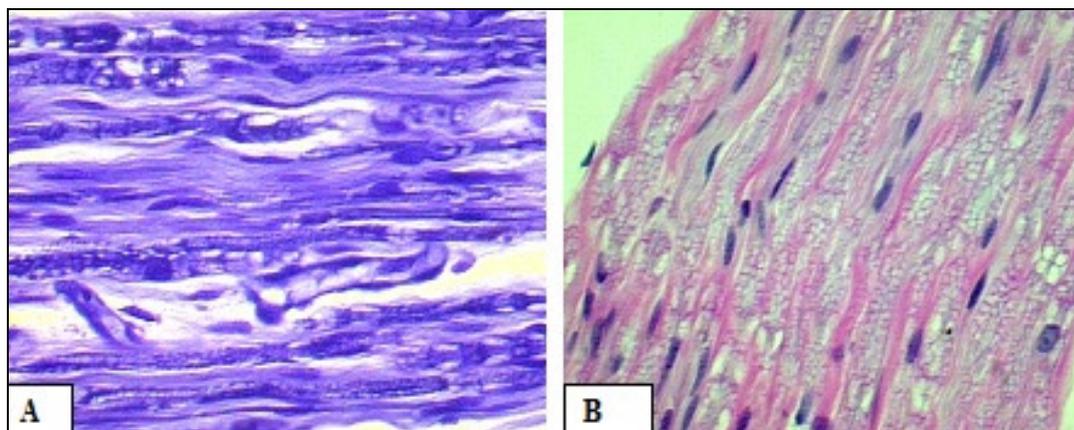
Ferrante (2000) citou que o álcool tem seu efeito neurólítico decorrente da precipitação de lipoproteínas e mucoproteínas em nervos periféricos, produzindo degeneração e prejuízos tanto nas células de Schwann quanto nos axônios e histologicamente pode ser observado degeneração da mielina, além de pontos de inflamação focal no nervo bloqueado.

Booth e McDonald (1992) relataram que álcool injetado em nervos e gânglios, em concentrações elevadas (80 a 95%), causa destruição do tecido por sua ação desidratante e de precipitação de proteínas, proporcionando alívio da dor das partes enervadas. A dor estará ausente até a restauração das fibras nervosas e transmissão normal de impulsos, e algumas vezes a destruição do nervo é permanente.

Segundo Myers e Katz (1992) e Lipton (1993), na concentração de 95%, o etanol causa lesão não seletiva no tecido nervoso, entretanto em concentrações inferiores a 80%, apresentam efeitos variáveis sobre a função motora do nervo. Além disso, é muito irritante, provoca dor no local da injeção e apresenta ampla difusão através dos tecidos. Em nervos periféricos, o etanol produz lesão nas células de Schwann, acometendo as mitocôndrias citoplasmáticas, interrupção da bainha de mielina e degeneração walleriana.

A grande desvantagem do uso do etanol é sua propriedade irritante, que provoca dor no local da injeção e apresenta ampla difusão através dos tecidos. Na medicina veterinária de eqüinos utiliza-se com freqüência o Sarapin® para infiltrar nervos periféricos dos membros e nervos vertebrais, no entanto a duração do efeito não passa de dois a três meses, o que requer repetição da infiltração, muitas vezes causando fibroses e neuromas dolorosos. O Sarapin® é um neurolítico alcalóide (álcool benzílico a 0,75%), de uso humano, indicado principalmente nas síndromes dolorosas relacionadas ao nervo ciático, neuralgia intercostal, neurites, neuralgia lombar e do trigêmio, entre outras, que tem seu uso. Em Medicina Veterinária, um dos seus usos mais comuns, tem sido para ablação química do nervo digital palmar em eqüinos com enfermidade do navicular, quando injetado diretamente no nervo. A melhora clínica pode durar de 2 a 3 meses (ESCODRO, 2004; ALVES et al., 2007) .

Figura 1.7 - Lesões histopatológicas características de Axonotemese: A- Degeneração walleriana. Luxol fast blue-640 x.; B-Presença de esferóides. HE 640 x.



Fonte: Escodro, 2004.

Nicoletti et al. (2007) ,em estudo comparativo da infiltração de Sarapin® (Grupo A) e Solução Etanólica a 99,5% (Grupo B), no Nervo Palmar de eqüinos, notaram tempo de latência entre 7 e 30 dias, sendo que com 150 dias a sensibilidade havia voltado no grupo A e com 180 dias era ausente no Grupo B. Porém todos os animais do Grupo B tiveram reação inflamatória local no local de aplicação, que estendeu-se por três a quatro semanas. Desta forma os autores comprovaram a ação duradoura do etanol, porém com a indesejável e restritiva reação inflamatória local.

Exames histopatológicos em segmentos dos nervos Palmares infiltrados com o álcool benzílico 0,75% (Sarapin®) mostraram alterações características predominantes de axonotemese, enquanto que nos segmentos infiltrados com o álcool etílico absoluto (etanol), apresentaram características predominantes de neurotemese (NICOLETTI et al., 2007).

Foi realizada infiltração perineural de etanol a 49,75% nos Nervos Digitais Palmares e Palmares de 8 animais com enfermidades crônicas distintas, que resultavam em dor neuropática intensa. Todos os animais apresentaram hipoestesia ou analgesia durante 120 dias, porém cinco (62,5 %) dos animais infiltrados apresentaram reação inflamatória e dolorosa intensa (ESCODRO et al., 2011b).

Portanto a utilização do etanol é restrita, pois mesmo sendo um neurolítico potente e duradouro, as reações locais de neurite e inflamação dolorosa desabonam seu uso, principalmente em médias e altas concentrações. Além disso, os autores trazem indicações terapêuticas com variações de concentração de 3 a 95 % (MYERS; KATZ, 1992; QUAN; BIRD, 1999; GASPARINI; SARAIVA, 2004).

Além das infiltrações perineurais, Guimarães et al. (2011) relatam sucesso na infiltração de álcool benzílico 0,75% sobre reação periostal em segunda falange, obtendo analgesia em 15 dias. Já Wolker et al. (2011) cita que o etanol 70% não foi eficaz no intuito de produzir artrodese na articulação interfalângica proximal.

Dockery (2003), considerando sua experiência no tratamento de neuroma interdigital ou neuroma de Morton em humanos, relataram que a adição de anestésicos locais é um ótimo coadjuvante na diminuição da dor durante a infiltração e das reações inflamatórias imediatas. Para tanto, promoveram a neurólise química com solução de 4 % de etanol, associada à cloridrato de bupivacaína (com e sem vasoconstritor) na concentração de 0,5%.

Desta forma, o uso de anestésicos locais na formulação de uma composição neurolítica de uso veterinário pode apresentar-se como opção viável, podendo exteriorizar menores reações adversas, visto a diminuição da dor no momento da infiltração e minimização das respostas inflamatórias locais imediatas.

Tabela 1 - Lesões histopatológicas encontradas em nervos palmares de equinos infiltrados com Sarapin (animais 1 a 5) e Etanol 99,5 %.(animais 6 a 9), após 6 meses.

ANIMAL	RESULTADO HISTOPATOLÓGICO	CLASSIFICAÇÃO DA LESÃO
1	focos de necrose, infiltração inflamatória perivascular, degeneração walleriana	Neurotemese
2	presença de esferóides	Axonotemese
3	raros esferóides	Axonotemese
4	discreto infiltrado mononuclear no perineuro e focos de necrose, degeneração walleriana	Neurotemese
5	presença de esferóides	Axonotemese
6	focos de necrose, infiltrado inflamatório mononuclear	Neurotemese
7	focos de necrose	Neurotemese
8	espessamento do perineuro, necrose de feixes nervosos	Neurotemese
9	degeneração walleriana	Axonotemese

Fonte: Escodro, 2004.

1.4 Anestésicos Locais e Analgesia Perineural

Os anestésicos locais são fármacos que bloqueiam de forma reversível a condução nervosa, quando aplicados localmente no tecido nervoso, em concentração apropriada. Importante é lembrar que a grande vantagem dos anestésicos locais é o fato de seu efeito ser reversível; após seu emprego há recuperação completa da função nervosa sem que se evidencie dano estrutural nas células ou fibras nervosas. Causam perda da sensibilidade dolorosa pelo bloqueio da condução nervosa do estímulo doloroso ao Sistema Nervoso Central, porém, não causam perda da consciência, como ocorre com os anestésicos gerais (MASSONE, 1994).

Todos os anestésicos locais são sais de bases fracas, geralmente sob a forma de cloridrato, com pKa maior do que 7,4, daí o fato destes não exercerem efeito adequado em regiões inflamadas, em que o pH local é baixo, dificultando a sua difusão (LUNA, 1998).

Os anestésicos locais interrompem a propagação do estímulo conduzido pelos nervos periféricos, prevenindo a transferência do estímulo nocivo e causando a analgesia completa dos tecidos. Eles se ligam a canais de sódio e impedindo a despolarização. Os nervos menores não mielinizados (fibras C) são mais susceptíveis aos anestésicos locais enquanto que os nervos mais largos e mielinizados levam um tempo maior para serem dessensibilizados (LUNA, 1998; KLAUMANN, 2008).

O bloqueio dos canais de sódio é pH dependente, por isso ocorre um aumento do bloqueio quando o pH está alcalino e uma redução em condições de enfermidade onde o pH local é ácido (inflamação). Nestas ocasiões (pH local ácido) a adição de bicarbonato diminui o período de latência e prolonga a duração da ação, apesar de que a solução não apresenta estabilidade química (MASSONE, 1994; LUNA, 1998).

A duração da ação depende da lipossolubilidade do fármaco, do pH ao redor do tecido, do grau de afinidade (ligação) às proteínas plasmáticas e do fluxo sanguíneo da região. Quanto maior a lipossolubilidade do anestésico maior será o seu efeito (MASSONE, 1994).

No intuito de prolongar a duração da anestesia a adrenalina (vasoconstrictor) pode ser utilizada na concentração de 1:200.000 (0,1 mL de uma solução milesimal de adrenalina comercialmente disponível adicionado à 20 mL do anestésico local) com o intuito de prolongar a duração da anestesia. No entanto, deve se evitar o uso de anestésicos locais associados aos vasoconstritores em extremidades, tais como membros, devido ao risco de isquemia local e necrose tissular (LUNA, 1998).

Os bloqueios anestésicos perineurais dos membros em equinos, segundo Schumacher e Castro (2008), são indicados para:

- ✓ Fins diagnósticos: com intuito de localizar a sede da dor da claudicação.
- ✓ Fins anestésicos:
 - a) através da promoção de analgesia em cirurgias com o paciente em posição quadrupedal, sendo fundamental coadjuvante nas tranquilizações e neuroleptoanalgesias;
 - b) proporcionando analgesia adicional em equinos submetidos à anestesia geral, diminuindo a quantidade de anestésico e riscos inerentes, além de evitar o “efeito fantasma” em casos de exérese cirúrgicas, principalmente na ostectomias metacárpicas acessórias (ESCODRO; GIANINI; LOPES, 2007).
- ✓ Fins terapêuticos: os anestésicos perineurais de longa duração e os neurolíticos podem ser utilizados em pós-operatórios dolorosos e afecções crônicas como a laminite e síndromes degenerativas distais do membro Escodro et al., 2011a).

O método de diagnóstico através do bloqueio anestésico perineural necessita de pouco material e pode ser realizado facilmente a campo, bastando apenas que o profissional conheça a farmacologia dos anestésicos locais e a anatomia regional, particularmente, o suprimento nervoso e as estruturas que podem ser danificadas por injeção indevida. Esse método auxilia na identificação da região do membro que está lesionado e causando claudicação. Sendo assim, nem sempre é necessária a utilização de exames complementares, e quando se faz necessário, a solicitação será direcionada para a região específica identificada através do bloqueio perineural, bem como o tratamento da mesma (GAYNOR; HUBLELL, 1991; BITTAR; FERRAZ; ESCODRO, 2007).

Quando são utilizados para determinação do local da dor causadora da claudicação, o anestésico local deve ser depositado precisamente adjacente ao nervo, utilizando o menor volume possível necessário para impedir a condução nervosa. Segundo Schumacher e Castro (2008), o volume de anestésico local usado para anestesiar nervos localizados na porção proximal do membro geralmente é maior que aquele usado para anestesiar nervos na porção distal do membro, pois os

troncos nervosos localizados proximalmente são mais espessos e profundos, o que torna mais difícil sua localização precisa.

É comum encontrar-se várias regiões causadoras de claudicação ou descobrir-se que outros membros podem estar contribuindo para o quadro de claudicação. Nestes casos, a anestesia local permitirá que se interpretem com qual porcentagem cada região contribui para a claudicação (NYROP; COFFMAN; DEBOWES, 1983; STASHAK, 2002).

Segundo Nyrop, Coffman e Debowes (1983) a anestesia local é o exame complementar mais importante na avaliação das claudicações. O princípio de seu uso é que uma vez que uma lesão dolorosa seja dessensibilizada, a claudicação ou resposta dolorosa à palpação ou manipulação resolvem-se parcial ou completamente. Isso demonstra que o local da dor localiza-se na área dessensibilizada que pode então ser examinada por outros métodos, geralmente radiografia e ultra-sonografia. A utilização de bloqueios anestésicos como meio de diagnóstico de claudicação em eqüinos é bastante aceita na prática veterinária, sendo benéfica nos casos em que, mesmo após uma anamnese eficiente e um acurado exame físico, a origem e a região específica desta claudicação ainda não tenham sido identificadas (DYSON, 1986; GILBSON; STASHAK, 1989; KEG et al., 1992).

Os anestésicos locais mais utilizados na rotina clínica de equinos são: o cloridrato de lidocaína a 2%, cloridrato de mepivacaína a 2% e cloridrato de bupivacaína a 0,25 ou 0,5%.

A lidocaína é um anestésico local aminoamida, com pKa de 7,9, que pode ser utilizado na concentração de 1 a 2%, fornecendo aproximadamente de 30 a 60 minutos de efeito analgésico, com período de latência de 05 a 10 minutos (LUNA, 1998)

A utilização mais freqüente da lidocaína é nos bloqueios perineurais e na anestésias epidurais. A lidocaína tem reduzido a dor de forma significativa sem a perda do reflexo (KEG et al., 1992; BITTAR; FERRAZ; ESCODRO, 2007). A dose segura é de 4mg/Kg (LUNA, 1998).

Um dos anestésicos locais mais potentes e de maior duração utilizado na medicina eqüina é a aminoamida de xilidina denominada bupivacaína, de fórmula $C_{18}H_{28}N_2O$ (Figura 1.8), que apresenta pKa de 8,1. Sendo mais lipossolúvel que a lidocaína e quatro vezes mais potente, a bupivacaína possui um período de latência variável de 10 a 30 minutos, apresentando um tempo de ação longo, variando de 180 a 480 minutos (SCHUMACHER; CASTRO, 2008).

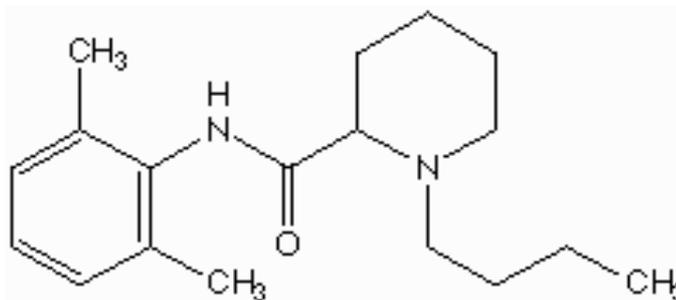
A potência dos anestésicos locais é determinada pela lipossolubilidade dos mesmos, que aumenta em função da quantidade de carbonos da molécula. Assim a bupivacaína, por possuir um grupo butil ligado ao grupamento amina é mais potente que a lidocaína, que apresenta um grupamento metil. Isso traduz o coeficiente de solubilidade da bupivacaína ser 27,5 e o da lidocaína ser 2,9 (STOELTING, 1999; MORGAN; MIKAIL; MURRAY, 2002).

Quanto ao grau de ligação protéica, verificou-se que também afeta a atividade do anestésico local, já que a forma livre é que tem atividade farmacológica. A α -1 glicoproteína ácida é a proteína com que o anestésico local tem maior afinidade, mas também pode haver ligação com a albumina. O aumento da taxa de ligação protéica está relacionado com aumento da duração de ação. Assim, a bupivacaína é o fármaco que tem maior ligação protéica (97%) e, portanto, com maior duração da anestesia, seguida pela ropivacaína (94%) e lidocaína (65%) (STOELTING, 1999; MORGAN; MIKAIL; MURRAY, 2002).

Na anestesia regional a bupivacaína tem forte indicação quando a intenção é causar alívio da dor por um tempo prolongado (04 a 06 horas), como em pós-operatórios de cirurgias músculo-esqueléticas.

No entanto, a bupivacaína provou ser mais cardiotoxicidade que os outros anestésicos locais podendo causar arritmias ventriculares e depressão miocárdica quando administrada por via intravenosa e com doses superiores a 1 mg/Kg (SCHUMACHER; CASTRO, 2008).

Figura 1.8 - Estrutura Química da Bupivacaína.



Fonte: Massone, 1994.

1.5 Triancinolona

Ao realizar a proposição de desenvolver uma composição neurolítica que contenha anestésico local, no caso a bupivacaína, vislumbrou-se a possibilidade de diminuir a dor no momento da infiltração e minimizar a liberação de substâncias algogênicas em curto prazo, tempo correspondente à ação analgesia perineural proporcionado pelo anestésico local. Porém em médio prazo, não havia certeza de que os mediadores inflamatórios não agiriam no local, desencadeando uma reação inflamatória e prejuízos estéticos no local da infiltração, como já citaram Nicoletti et al. (2007) ao infiltrarem etanol 99,5 % em nervos palmares de eqüinos.

Desta forma almejou-se a utilização concomitante de um agente antiinflamatório glicorticóide ou corticosteróide local, interferindo na degradação dos fosfolipídios da membrana celular, agindo na cascata do ácido araquidônico através da inibição das fosfolipases.

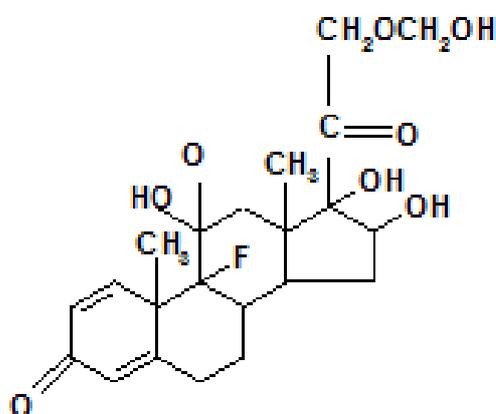
Devido ao extenso uso de corticosteróides no tratamento de doenças alérgicas e inflamatórias, nos últimos anos houve incremento significativo na pesquisa dos corticosteróides sintéticos, visando aumentar as propriedades terapêuticas, diminuindo os efeitos adversos. A triancinolona é um desses fármacos, amplamente utilizados na oftalmologia, dermatologia e ortopedia em infiltrações e uso local, pois apresenta a característica de ser de ação intermediária, com atividade antiinflamatória 5 e atividade retentora de sódio muito fraca em comparação à hidrocortisona (considerada como ação antiinflamatória 1 e retentora de sódio 1). Também supera outros potentes candidatos corticosteróides a compor a composição neurolítica como a prednisona (atividade antiinflamatória 4).

Além disso, o acetonido e hexacetonido de triancinolona são amplamente utilizados em medicina veterinária nas infiltrações intra-articulares, com doses variando entre 6 a 18 mg por articulação (dimensão articular dependente), sendo que causam menor incidência de lesões morfológicas na cartilagem articular, comparado com os resultados obtidos da infiltração de acetato de metilprednisolona, que possui mesma atividade antiinflamatória (KATZUNG,1994; HARVEY; CHAMPE;MYCEK, 1998; DECHANT, et al., 2003; KAY et al., 2008).

A triancinolona é um corticosteróide derivado do cortisol, que difere pela presença de uma dupla-ligação entre os átomos de carbono 1 e 2 do Anel A e a adição do flúor 9. A presença da insaturação e do halogênio na molécula prolonga a meia-vida deste fármaco em mais de 50% em relação à hidrocortisona (HARVEY; CHAMPE;MYCEK, 1998).

Sua estrutura química é a 9á-fluor-11â,16á,17á,21-tetrahidroxipregna-1,4-diene-3,20-dione, podendo estar na forma comercial ligada a um grupamento acetonido, apresentando fórmula estrutural $C_{24}H_{31}FO_6$ e peso molecular de 434,5. É um pó branco com ponto de ebulição de $277^{\circ}C$, sendo solúvel em etanol e metanol (THE PHARMACEUTICAL SOCIETY OF GREAT BRITANY, 1986; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2005).

Figura 1.9 - Estrutura molecular da triancinolona acetonido.



Fonte: Harvey; Champe; Mycek, 1998.

1.6 Avaliação Bioquímica Sérica de Funções Hepática, Muscular e Renal em Equinos

A quantificação bioquímica sérica de determinadas enzimas e substâncias consiste em importante ferramenta para avaliar as funções específicas dos órgãos. Quando um fármaco ou composição é desenvolvida, o teste de segurança clínica deve ser realizado, visando evitar complicações cardio-respiratórias e alterações nas funções renais, hepáticas e musculares.

Assim Meyer e Harvey (2004) dizem que certas enzimas apresentam uma atividade tecidual mínima ainda que tornem-se notavelmente aumentadas no soro. O aumento de produção começa em algumas horas após indução por fármacos, continuando por um período de tempo. Se não ocorrer o decréscimo dos valores séricos da determinada substância ou enzima, pode-se suspeitar de que o fármaco está causando toxicidade ao órgão correspondente.

Essas enzimas estão normalmente ligadas à membrana e apresentam um aumento mínimo após um insulto agudo. Qualquer aumento inicial é provavelmente um reflexo da atividade enzimática sobre fragmentos de membrana liberados diretamente no plasma como resultado de dano celular (JACOBSON; WITT-SULLIVAN, 1992).

As principais enzimas utilizadas para avaliar a função hepática são a Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST), que são enzimas mitocondriais importantes no ciclo de Krebs presentes nos hepatócitos, eficientes para mensurar necrose tissular (MEYER; HARVEY, 2004).

A ALT aumenta drasticamente em lesões hepáticas agudas, enquanto que a AST tem meia vida de 18 horas, com atividade persistindo por 7 a 10 dias (NELSON; COUTO, 2006a). Quando uma toxina está presente na circulação, ocorre uma injúria hepatocelular o que resulta num aumento da alanina aminotransferase (ALT) sérica (LASSEN; THRALL, 2006a).

As mais altas concentrações de aspartato aminotransferase (AST) estão localizadas principalmente nas células musculares esqueléticas e nos hepatócitos, assim havendo a necessidade da avaliação concomitante da enzima

Creatinofosfokinase (CK). Se as duas estiverem aumentadas sugerem lesão muscular, quando só a AST indica hepatopatia (JACOBSON; WITT-SULLIVAN, 1992; MEYER; HARVEY, 2004).

A CK é a enzima músculo-esquelética de maior utilização para avaliação da função muscular na espécie equina, sendo detectado aumento rápido em lesões leves. No caso de recuperação muscular, os níveis retornam ao normal em poucas horas. Em contrapartida a AST necessita de lesão mais ampla para serem liberadas (KERBER; TRINDADE, 2002).

Porém, na medicina veterinária, as espécies diferem-se em relação ao ALT, sendo que citoplasma do hepatócito rico em ALT são encontrados no cão, gato e primatas. Já os equinos e ruminantes são notáveis exceções, devido ao fato de serem herbívoros (MEYER; HARVEY, 1995), o que leva a necessidade da avaliação da enzima Gamaglutamiltransferase (GGT) concomitante.

A GGT tem alta concentração na cortex renal e apresenta quantidades menores no pâncreas, mucosa intestinal e epitélio biliar. Como a pancreatite é rara em equinos e a GGT renal é eliminada pela urina, esta torna-se ótimo indicador de hepatopatias na espécie (KERBER; TRINDADE, 2002).

Os principais testes para avaliação de função renal em equinos são a quantificação sérica de Uréia e Creatinina. A uréia sérica representa uma das determinações bioquímicas mais utilizadas na avaliação da função renal dos animais domésticos (HAGIWARA, 1982; COLES; THOMPSON, 1984).

Fisiologicamente a uréia se eleva devido à dieta hiperprotéica ou idade, apresentando-se diminuída nos indivíduos com dietas de baixo valor protéico ou alto teor glicídico. Elevações da uréia ocorrem também por catabolismo elevado, jejum prolongado e nos casos de febre e septicemia (MEYER; HARVEY, 2004; NELSON; COUTO, 2006b).

Segundo Nelson e Couto (2006b) a constância na formação e excreção da creatinina faz dela um marcador muito útil de função renal, principalmente da filtração glomerular, em virtude da sua relativa independência de fatores como dieta, grau de hidratação e metabolismo protéico. Assim, a determinação da creatinina

plasmática é um marcador de função renal mais seguro do que a uréia, porém a disfunção renal deve ser avaliada através das dosagens de uréia e creatinina concomitantemente (LASSEN; THRALL, 2006b).

A Tabela 1.2 traz as referências dos níveis séricos de ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina citados por Kerber e Trindade (2002); Thomassian (2005); Kaneko, Harvey e Bruss (2008).

Tabela 1.2 - Variação dos valores de referência para ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina para Equinos, segundo Kaneko, Harvey e Bruss (2008), Kerber e Trindade (2002) e Thomassian (2005).

Valor de Referência dos Parâmetros Bioquímicos Séricos em Equinos				
	Kerber e Trindade (2002)	Thomassian (2005)	Kaneko <i>et al.</i> (2008)	
ALT (Alanina Aminotransferase)	3-25 U/l	3-23 U/l	3-23 U/l	
AST (Aspartato Aminotransferase)	200-500 U/l	226-366 U/l	226-366 U/l	
CK (Creatinofosfokinase)	90-500 U/l	2-23 U/l	2,4-23,4 U/l	
GGT (Gamaglutamiltransferase)	12-45 U/l	4,3 – 13 U/l	4,3-13,4 U/l	
Creatinina	0,6-1,8 mg/dL	1,2-1,9 mg/dL	1,2-1,9 mg/dL	
Uréia	8-27 mg/dL	25-47 mg/dL	10-24 mg/dL	

Fonte: Kerber; Trindade, 2002; Thomassian, 2005; Kaneko; Harvey; Bruss, 2008.

Avaliando a Tabela 1.2 nota-se significativa variância e aumento entre os níveis séricos de AST, GGT, CK e Uréia referenciados por Kerber;Trindade(2002), em relação aos demais autores,fato que pode ser justificado devido os primeiros apresentarem dados de cavalos da raça Puro Sangue Inglês de utilidade corrida, com dieta hiperproteíca (aumento de GGT e Uréia) e maiores exigências osteo-musculares (aumento de AST e CK).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliação da eficácia e segurança clínica de uma Suspensão Neurolítica Injetável (SNI) de uso Veterinário, com indicação terapêutica para dores neuropáticas e dores associadas às doenças degenerativas crônicas de equinos.

2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Desenvolvimento de um método cromatográfico (CLAE-UV) para ensaios de identificação, teor e estabilidade de bupivacaína e triancinolona.
- ✓ Avaliação da estabilidade química dos fármacos bupivacaína e triancinolona presentes na formulação da SNI.
- ✓ Desenvolvimento de SNI de uso Veterinário, com indicação terapêutica para dores neuropáticas e dores associadas às doenças degenerativas crônicas de eqüinos.
- ✓ Utilização de modelo de ferradura experimental para indução de claudicação em eqüinos, simulando dores associadas as afecções degenerativas distais, objetivando o ensaio clínico para avaliação da eficácia clínica da SNI.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto denominado “Estudo da viabilidade química e clínica de Solução Etanólica para uso em equinos”, que originou a tese referida, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (CEP - UFAL) sob processo nº 012716/2010-81, apresentando a seguinte metodologia:

3.1 Desenvolvimento e preparação da Suspensão Neurolítica Injetável (SNI)

Buscando utilizar as propriedades neurolíticas do etanol, minimizando ou anulando suas reações adversas, concomitantemente com a inexistência de composição neurolítica patenteada no Brasil (evidenciado pela exaustiva revisão patentária realizada em conjunto com o NIT/UFAL), desenvolveu-se uma suspensão neurolítica injetável (SNI), onde o etanol é componente de uma composição em veículo aquoso, na forma de suspensão, que conta ainda com Bupivacaína e Triancinolona.

Visto a indefinição dos pesquisadores em relação à concentração ideal do etanol em injeções perineurais, que em humanos variam terapêuticamente de 3 a 99,5% (MYERS; KATZ, 1992; QUAN; BIRD, 1999; GASPARINI; SARAIVA, 2004), a pesquisa determinou a concentração etanólica na SNI através da coleta de dados da experiência clínica de profissionais militantes da medicina eqüina, além dos resultados obtidos por Nicoletti et al. (2007) e Escodro et al. (2011b), envolvendo a infiltração de etanol em diferentes concentrações nos nervos digitais palmares e palmares de eqüinos. Assim foi estabelecida a concentração de etanol na SNI em 19,9%.

O uso do anestésico local bupivacaína na SNI foi alicerçado em pesquisas que demonstraram a diminuição dos efeitos deletérios do etanol, quando realizadas infiltrações prévias de anestésico local (DOCKERY, 2003). Assim a bupivacaína foi escolhida por ser um anestésico local altamente lipossolúvel, apresentando analgesia de 180 a 480 minutos (STOELTING, 1999; LAMOUNT, 2008).

A triancinolona foi utilizada na SNI por ser um antiinflamatório esteroide, que em infiltrações teciduais apresentam meia vida de 18 a 36 horas (agente

glicocorticóide de ação intermediária), amplamente utilizada no tratamento de quelóides em humanos (LAYTON; YIP; CUNLIFE, 1994; WICKE et al., 2000; DAMIANI et al., 2001; MORENO; MATOS; FEVEREIRO, 2001).

Desta forma a proposição foi que a bupivacaína proporcionasse analgesia de curto prazo e a triancinolona ação antiinflamatória em médio prazo, diminuindo a ação irritante e inflamatória do etanol, por consequência inibindo os mediadores inflamatórios locais, edema, deposição de fibrina, migração fagocítica, proliferação capilar, deposição de colágeno e tecido cicatricial. Abaixo segue a composição da formulação da SNI:

Cloridrato de Bupivacaína-----	0,3%
Hexacetono de Triancinolona-----	0,4%
Etanol-----	19,9%
Veículo Aquoso-----	q.s.p.

A Preparação da SNI foi realizada no Laboratório Multidisciplinar da UFAL, unidade de Ensino Viçosa, utilizando-se como matérias-primas apresentações comerciais de comprovada qualidade do mercado Brasileiro, são elas: Triancil® (Laboratório Apsen Farmacêutica S.A.), suspensão comercial de Hexacetono de Triancinolona, cuja apresentação comercial é frasco de 5 mL a 2 %; Neocaína® (Laboratório Cristália S.A.), solução comercial estéril de bupivacaína sem vasoconstrictor, com apresentação em frascos de 20 mL a 0,5%; e Álcool Etílico V/V solução injetável (Divisão de Farmácia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – ICHCFMUSP), apresentação em ampolas de 10 mL a 99,5%.

A formulação da SNI foi preparada em condições assépticas, em cabine de segurança biológica ou capela de fluxo laminar (Filtracom – Valinhos, SP, Brasil), transferindo-se os conteúdos das amostras comerciais para frascos-ampolas estéreis impermeáveis âmbar de 10 mL, sendo infundido 6 mL de Neocaína®, 2 mL de Álcool Etílico V/V solução injetável 99,5% e 2 mL de Triancil®. Foram utilizadas seringas de insulina de 1,00 mL e agulhas 30X07 estéreis, de forma individual, na transferência.

3.2 Avaliação da estabilidade química da Suspensão Neurolítica Injetável

As análises de desenvolvimento de método cromatográfico e estudos de estabilidade foram realizadas no Laboratório Industrial Farmacêutico de Alagoas S.A., através de:

- ✓ Estudo de Estabilidade Química Acelerado de seis meses e,
- ✓ Estudo de Estabilidade de Prateleira a temperatura ambiente.

As amostras dos fármacos cloridrato de bupivacaína e triancinolona foram preparadas conforme descrito em 3.1.

Os reagentes e solventes utilizados para as diluições e o desenvolvimento de método cromatográfico foram o Metanol grau CLAE e Acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker®); e para a preparação de 250 mL Tampão Fosfato Equimolar (0,01M; pH 6,8) foram empregadas 0,048 gramas de Fosfato de Potássio Monobásico Anidro PA (P.M.: 136,09; CAS: 7778-77-00; QHEMIS) e 0,072 g de Fosfato de Potássio Dibásico Anidro PA (P.M.: 174,18; CAS.: 7758-11-4; QHEMIS).

3.2.1 Desenvolvimento de método cromatográfico para ensaios com a SNI

O método cromatográfico (CLAE-UV) foi desenvolvido para ensaios de identificação, doseamento e avaliação da estabilidade de forma simultânea de bupivacaína e triancinolona. Baseou-se nos métodos cromatográficos da farmacopéia americana para bupivacaína (The United States Pharmacopeia, 2008) e para triancinolona (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2005), realizando os ajustes e adaptações necessárias. O sistema cromatográfico consistiu de um sistema degaseificador DGU-20 AS acoplado a Bomba de alta pressão, modelo LC-20AT conectado ao Forno CTO 10AS, ao detector UV SPD-20A e controlador CBM-20A, todos da Shimadzu.

A melhor condição analítica de separação dos fármacos foi obtida usando fase móvel contendo acetonitrila: tampão fosfato equimolar (0,01 M; pH 6.80), na proporção (43:57, v/v). Um fluxo da fase móvel de 0,8 mL/minuto foi eluído por uma coluna analítica Shimpack C₁₈ (250 mm x 4,6mm, d.i. 5µm), conectada a uma pré-coluna da phenomenex C₁₈ (4,0 mm x 3,0mm, d.i. 5µm) e mantida na temperatura a

35°C. As amostras foram detectadas no UV em comprimento da onda de 230 nm. A pressão da bomba foi mantida em 122 kgf/cm², com volume de injeção de 20 µl. O tempo total de cada análise não ultrapassou 11 minutos.

Outras condições analíticas foram testadas com a variação do comprimento de onda do detector UV (263, 257 e 240 nm), variação da composição da fase móvel (água: acetonitrila) e variação da proporção entre os solventes que compõe a fase móvel (40:60,45:55, 50:50, 60:40, v/v).

Na melhor condição analítica obtida, bupivacaína e triancinolona foram analisadas nas faixas de concentração de 2,00 a 200 µg/mL e 2,66 a 266 µg/mL, respectivamente.

3.2.2 Estudo de Estabilidade da Formulação SNI

3.2.2.1 Delineamento do Estudo de Estabilidade da SNI

O estudo da estabilidade química da SNI buscou seguir os critérios exigidos pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) segundo a resolução 01, de 29 de Julho de 2005 (ANVISA, 2005), onde a mesma define um guia para a realização de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos, levando em conta fatores ambientais e propriedades físico-químicas das substâncias ativas.

Assim, conforme normatização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005),

A análise de formas farmacêuticas líquidas devem apresentar estudo de perda de peso, pH, tempo de sedimentação das partículas após agitação das suspensões, além da identificação e determinação do teor do produto (doseamento dos princípios ativos)".

Para a avaliação de estabilidade química foram preparados 60 frascos de 10 mL da SNI (conforme descrito em 3.1) em embalagem impermeável de vidro âmbar. Vinte (20) embalagens foram destinadas para o estudo de estabilidade acelerado (ANVISA, 2005), realizado em estufa climatizada sob temperatura programada de 40°C (Câmara Climática Atmosférica controlada mod. LBF-240-Binder) com variação de ± 0,8°C, a 75% de umidade relativa do ar (UR) com variação de 5%. Outros vinte (20) frascos foram mantidos em estufa com temperatura de 30°C com variação de ±

0,8 °C, a 75% de umidade relativa do ar (UR) com variação de 5% (Câmara Climática Atmosférica controlada mod. KBF-720-Binder); e os últimos vinte (20) frascos mantidos em temperatura a 20°C e UR 75% em sala com climatização controlada com variação de $\pm 2^\circ\text{C}$. Outros nove (09) frascos foram mantidos em geladeira com temperatura de 4°C que funcionaram como controle das amostras SNI.

Grupos controle foram estabelecidos com amostras de produtos comerciais de triancinolona (Triancil®) e de bupivacaína (Neocaína®), os quais foram estocados em cada condição ambiental (20°C, 30°C e 40°C) usando seis frascos de cada produto comercial, nas 3 condições experimentais estudadas.

Foram pré-estabelecidos cinco (05) tempos de análise (t) que corresponderam aos 05 pontos de análises em intervalos espaçados de tempo conforme demonstrado na Figura 3.1.

Figura 3.1 - Tempos das análises (t) para estudo da estabilidade química da SNI (t0: inicial, t2: 15 dias, t3: 30 dias, t4 :60 dias, t5: 90 dias, t6:180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

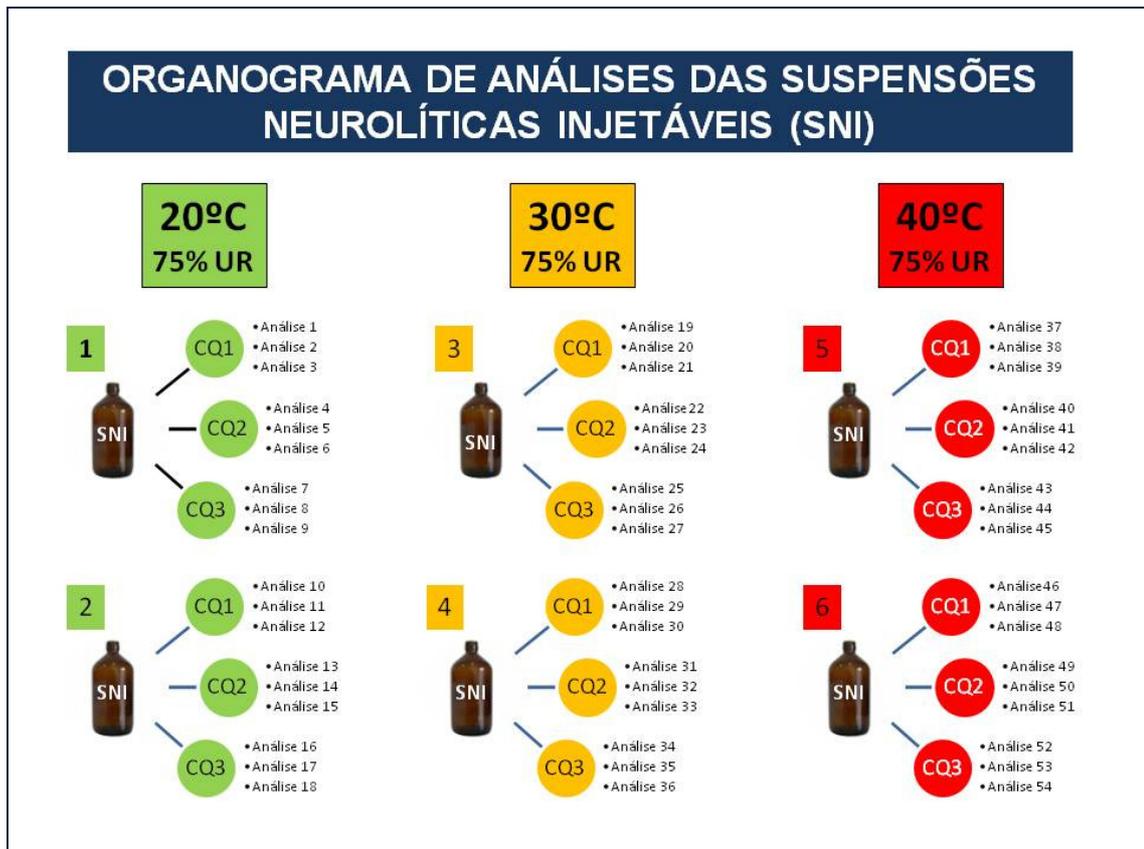
Nestes tempos de análise, os frascos eram pesados em balança microanalítica (Mettler Toledo, Micronal S/A), o pH era mensurado em pHmetro de bancada (pHmetro mod. ESB2-Metronic, com eletrodo de vidro combinado), o tempo de sedimentação era avaliado após agitação e o método cromatográfico executado.

Para obter uma adequada precisão e exatidão do ensaio, no momento das análises de cada ponto de análise foram analisadas duas amostras para cada situação de temperatura (20°C, 30°C e 40°C). Cada amostra era analisada em três concentrações diferentes, denominadas de Amostras de Controle de Qualidade.

As Amostras de Controle de Qualidade (CQ) apresentavam as respectivas concentrações de triancinolona e bupivacaína: 60 µg/mL e 45 µg/mL (CQ1), 120 µg/mL e 90 µg/mL (CQ2) e 160 µg/mL e 120 µg/mL (CQ3). Cada amostra CQ era

analisada em triplicata, totalizando nove análises por amostra CQ e dezoito análises por temperatura (20°C, 30°C e 40°C), totalizando 54 análises da SNI por tempo (Figura 3.2.).

Figura 3.2 - Organograma de análises das amostras de SNI em cada tempo de análise (t).



Fonte: Autor, 2011.

3.2.2.2 Preparação das amostras para ensaio de estabilidade

Os frascos de 10 mL da SNI apresentam na formulação 0,3 % de Cloridrato de Bupivacaína (3 mg/mL) e 0,4% de Hexacetonido de Triancinolona (4 mg/mL), sendo que para obtenção de CQ1, CQ2 e CQ3, empregou-se a seguinte metodologia de solubilização com auxílio de banho ultrassônico (10 minutos) e diluição:

- ✓ Solução de Estoque da SNI (SES): diluiu-se 10 mL da SNI, contendo 40mg (40.000 µg/mL) de Triancinolona e 30mg (30.000 µg/mL) de Bupivacaína, em Metanol (grau CLAE), até obtenção de um volume final de 50 mL, obtendo a

concentração de 800 µg/mL e 600 µg/mL de triancinolona e bupivacaína respectivamente.

- ✓ CQ1: Diluiu-se 0,75 mL da SES em Metanol (grau CLAE), até perfazer balão volumétrico de 10 mL, obtendo concentrações de 60 µg/mL e 45 µg/mL de triancinolona e bupivacaína respectivamente.
- ✓ CQ2: Diluiu-se 1,5 mL da SES em Metanol (grau CLAE), até perfazer balão volumétrico de 10 mL, obtendo concentrações de 120 µg/mL e 90 µg/mL de triancinolona e bupivacaína respectivamente.
- ✓ CQ3: Diluiu-se- 2 mL da SES em Metanol (grau CLAE), até perfazer balão volumétrico de 10 mL, obtendo concentrações de 160 µg/mL e 120 µg/mL de triancinolona e bupivacaína respectivamente.
- ✓ Para efeito de comparação, em cada tempo (t) realizou-se as análises de amostra padrão, com os produtos comerciais Triancil® e Neocaína®, preparando a suspensão imediatamente antes da análise, conforme as concentrações de CQ1, CQ2 e CQ3. Foram realizadas três injeções de cada CQ. Para tal procedimento, estabeleceu-se a metodologia de solubilização com auxílio de banho ultrassônico (10 minutos) e diluição:
- ✓ Solução de Estoque de Triancinolona (SET): diluiu-se 10 mL de Triancil® 2%, contendo 200mg (200.000 µg) de Triancinolona, em Metanol (grau CLAE), até obtenção de um volume final de 100 mL, obtendo solução de estoque do Padrão com concentração de 2 mg/mL ou 2000 µg/mL.
- ✓ CQ1: Diluiu-se 300µL da SET e 90µL de Neocaína® a 0,5%, (5000µg/mL), em Metanol (grau CLAE), até perfazer balão volumétrico de 10 mL, obtendo concentrações de 60 µg/mL e 45 µg/mL de triancinolona e bupivacaína respectivamente.
- ✓ CQ2: Diluiu-se 600µL da SET e 180µL de Neocaína® a 0,5%, (5000µg/mL), em Metanol (grau CLAE), até perfazer balão volumétrico de 10 mL, obtendo concentrações de 120 µg/mL e 90 µg/mL de triancinolona e bupivacaína respectivamente.
- ✓ CQ3: Diluiu-se 800µL da SET e 240µL de Neocaína® a 0,5%, (5000µg/mL), em Metanol (grau CLAE), até perfazer balão volumétrico de 10 mL, obtendo concentrações de 160 µg/mL e 120 µg/mL de triancinolona e bupivacaína respectivamente.

3.2.2.3 Método de Quantificação das SNI submetidas ao Envelhecimento

As amostras de SNI submetidas ao envelhecimento foram quantificadas através do método de uma única concentração (método farmacopéico de ensaio de teor), no qual cada área do pico cromatográfico das amostras CQ que foram submetidas ao envelhecimento era comparada com a área do pico cromatográfico das amostras comerciais que não foram submetidas ao envelhecimento. A expressão abaixo mostra o cálculo de quantificação para cada amostra CQ:

$$\% \text{ Teor (CQ)} = \frac{\text{Área Cromatográfica Amostra Envelhecida}}{\text{Área Cromatográfica Amostra Comercial não Envelhecida}} \times 100$$

Cálculo da média, desvio padrão e desvio padrão relativo eram calculados para cada amostra CQ após análise por CLAE.

3.2.2.4 Critérios de Validação dos Ensaio Analíticos de Estabilidade

Os dados obtidos das corridas analíticas foram avaliados quanto a precisão e exatidão da medida ($\leq 5\%$), além da linearidade na curva de calibração. Medidas de probabilidade através da estatística do valor P com nível de significância de (0,05) e foram calculadas para verificar os valores constantes de massa ou a tendência de degradação. A análise de variância (ANOVA) para verificar similaridade ou diferença da perda de massa entre os níveis de concentração (CQ) através da análise estatística dos postos de Bonferroni.

3.3 Seleção de eqüinos e composição de grupos

Foram utilizados sete eqüinos adultos sadios, sem raça definida, adquiridos pelo Grupo de Pesquisa em Equídeos da Universidade Federal de Alagoas (GRUPEQUI-UFAL). Os mesmos foram submetidos aos exames de Anemia Infecciosa Equina e Mormo e, após constatação dos resultados negativos, levados à Fazenda São Luiz da Universidade Federal de Alagoas (FSL-UFAL), na cidade de Viçosa. Os animais ficaram sob observação por 90 dias antes dos experimentos, para garantir procedência de sanidade.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, o primeiro com dois animais e o segundo com cinco animais, numerados respectivamente de 1 a 2 (Grupo Controle: infiltração de solução fisiológica), sendo denominados EQU1 e EQU2; e de 3 a 7 (Grupo SNI: Infiltração da Suspensão Neurolítica Injetável - SNI), denominados: EQU3, EQU4, EQU5, EQU6 e EQU7. Durante o experimento, os animais foram mantidos na FSL-UFAL, em piquetes separados por grupos, alimentados com pastagem, ração comercial Proequi Guabi® (3 kg/dia/animal/divididos em duas alimentações), sal mineralizado Centaurus® (50 g/dia/animal) e água *ad-libitum*. O Grupo Controle foi composto por duas fêmeas, de 280 e 310 kg, com idade de 7 e 5 anos. Já o Grupo SNI apresentou composição de 4 fêmeas e um macho castrado, com idades entre 3 e 6 anos, pesando de 310 a 406 kg.

3.4 Metodologia para indução de claudicação

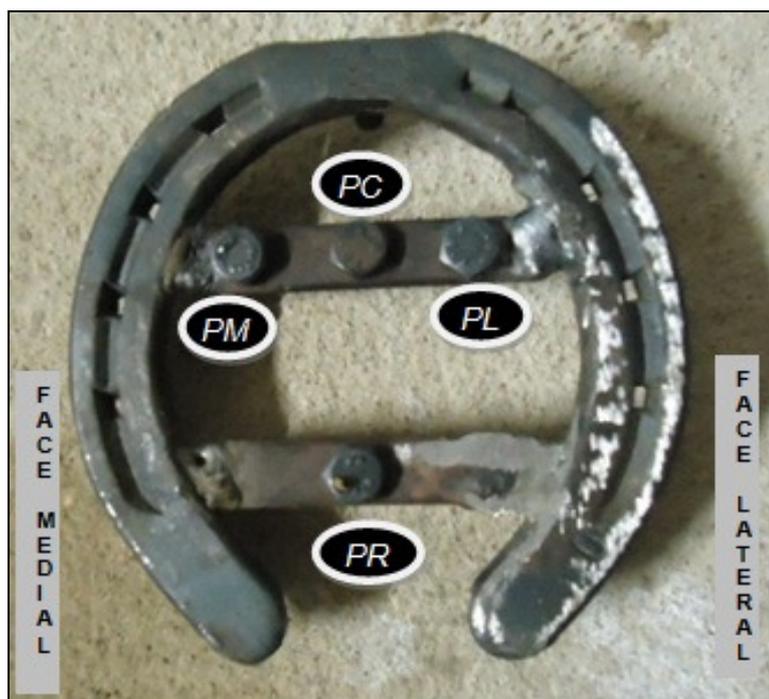
Para simular a claudicação em eqüinos, com propósitos pedagógicos ou científicos, vários modelos experimentais de claudicação são descritos para indução principalmente de osteíte podal, osteoartrite, sinovite e tendinite (AUER et al., 1980; GOODSHIP et al., 1982; MERKENS; SCHAMHARDT, 1983; FIRTH; SEUREN; WENSING, 1987; ALVES et al., 2001; XIE; OTT; COLAHAN, 2001). Estes modelos, elaborados a partir de ferraduras adaptadas, apresentam efeitos variáveis e o retorno à locomoção normal nem sempre é completa em todos os animais experimentais. Nesta pesquisa foi empregado o modelo experimental por Escodro (2004) modificado.

Nos animais dos grupos Controle e SNI, foram colocadas ferraduras nos membros torácicos, sendo a ferradura do membro torácico direito sem adaptações (utilizada no cotidiano de ferrageamento), enquanto que no membro torácico esquerdo foi confeccionada ferradura com duas barras e 4 orifícios com rosca para parafuso de 6 mm de diâmetro e diferentes comprimentos, situados estrategicamente nos pontos: PR (ranilha), PL (lateral sola), PM (medial sola) e PC (central sola), conforme descrito nas Figuras 3.3. e 3.4. O comprimento do parafuso em cada orifício de pressão foi determinado de forma isolada e individual, levando em conta dois parâmetros: resistência do parafuso à superfície solar e leve resposta dolorosa do animal. Os comprimentos variaram entre 11 e 20 mm, estando os mais

curtos relacionados aos pontos da sola (PC, PM e PL) e os compridos ao ponto da ranilha (PR).

Após a colocação das ferraduras, realizadas por um mestre ferreiro, observando-se previamente os cuidados habituais de preparação do casco, cada parafuso foi apertado isoladamente com chave em direção à superfície da sola, causando claudicação. Após a avaliação de um ponto, o parafuso era retirado, o animal submetido à caminhada de um a dois minutos (para esquecer a sensibilidade anterior) e retornava para nova avaliação, em outro ponto de pressão. Para efeito de padronização da técnica o parafuso foi apertado pela mesma pessoa em todas as avaliações.

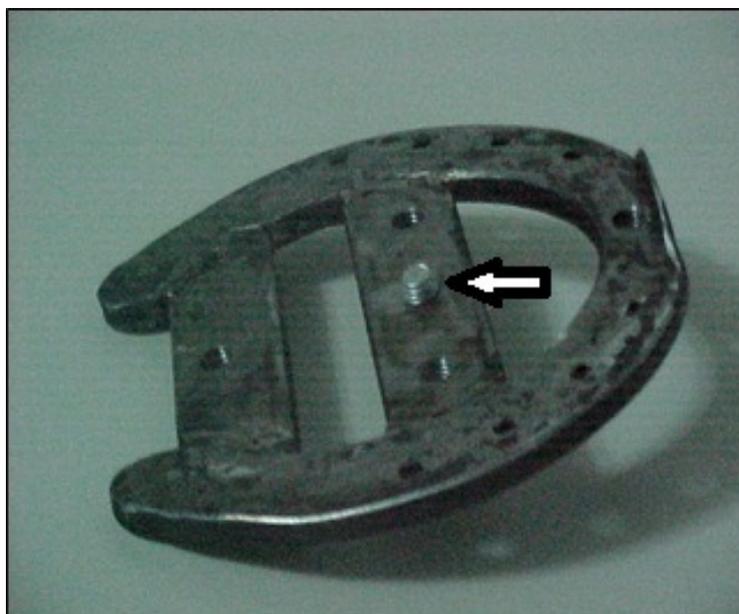
Figura 3.3 - Vista solar de ferradura utilizada no experimento, com discriminação dos orifícios submetidos a pressão com parafusos de ϕ 6 mm: PR (ranilha), PL (lateral sola), PM (media l sola) e PC (central sola).



Fonte: Autor, 2011.

Os graus de claudicação decorrentes do modelo experimental, foram classificados de 1 a 4, segundo Stashak (2002), conforme descrito na Tabela 3.1. Nesta pesquisa padronizou-se como Grau 0 a ausência de claudicação.

Figura 3.4 - Extremidade do parafuso de ϕ 6 mm, emergindo através do orifício central da sola, correspondendo ao ponto PC (seta).



Fonte: Autor, 2011.

Tabela 3.1 - Graus de Claudicação em Equinos, segundo Stashak, 2002.

GRAU 1	A claudicação é leve e não observada ao passo, mas reconhecida ao trote. Os movimentos típicos de elevação e abaixamento da cabeça e pescoço não são evidentes
GRAU 2	Observa-se alteração locomotora ao passo, sendo bastante evidente ao trote. O movimento de elevação da cabeça e pescoço quando apoia o membro comprometido pode ser notado.
GRAU 3	A claudicação é óbvia ao passo e ao trote e os movimentos típicos de elevação e abaixamento da cabeça e pescoço quando apoia respectivamente o membro claudicante e o normal são claramente definidos.
GRAU 4	Claudicação grave, sem condições de apoio com o membro comprometido.

Fonte: Stashak , 2002.

Figura 3.5 - Aperto do parafuso no orifício PL: a resistência à pressão e a leve reação dolorosa foram os parâmetros utilizados para determinar o comprimento do parafuso em cada ponto de maneira individual.



Fonte: Autor, 2011.

Após registrar o respectivo grau de claudicação do animal em relação ao ponto estimulado dolorosamente, analisado ao passo e trote, a pressão do parafuso foi aliviada e o animal submetido a caminhada até o restabelecimento da normalidade locomotora. Após o restabelecimento locomotor, novo procedimento de aperto de parafuso era realizado em outro ponto, até realizar as quatro avaliações (PR,PC,PM e PL).

Concluído os testes iniciais e estabelecido o Grau de Claudicação através do modelo experimental de ferradura, aguardou-se três dias entre a colocação da ferradura e a infiltração perineural da SNI, evitando-se problemas dolorosos secundários relacionados ao procedimento de ferrageamento, como picadas de cravo e pododermatites antissépticas.

3.5 Infiltração perineural com Solução Neurolítica Injetável nos nervos palmares

Para a realização da infiltração da SNI nos Nervos Palmares Medial e lateral, dos membros torácicos esquerdos dos equinos, utilizou-se a metodologia utilizada por Nicoletti et al. (2007), alicerçando a mesma através das referências anatômicas citadas por Berg (1978); Kainer (1990) e Stashak (2002), Assim localizaram-se os Nervos palmares laterais e mediais entre os tendões flexores digitais e o ligamento suspensório do boleto (Figura 3.6).

Os nervos palmares são responsáveis pela inervação sensorial das estruturas situadas dentro do casco. Berg (1978); Kainer (1990) e Stashak (2002) citam que os nervos palmares são responsáveis pela inervação sensorial e vasomotora da pele do boleto, articulações metacarpofalangeana, interfalangeanas, cório coronário, córions laminar e solar, e estruturas anatômicas da falange distal.

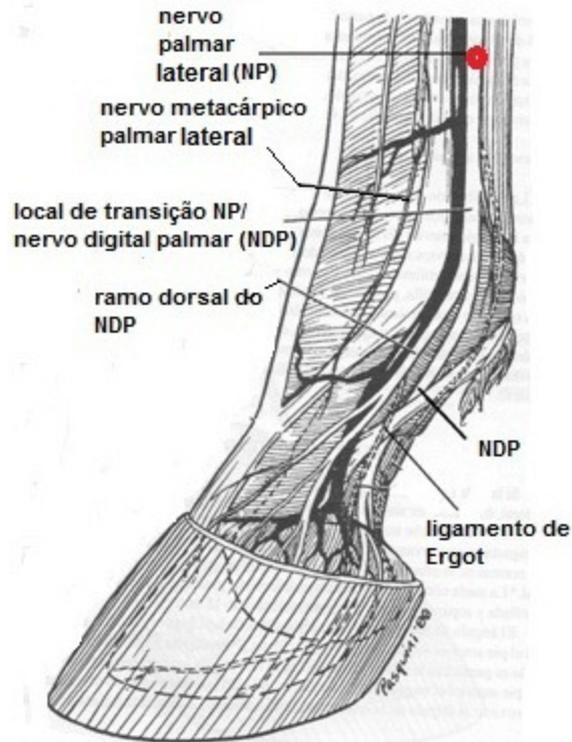
Para maior confiabilidade na localização do nervo no momento da infiltração, utilizou-se estimulador de nervo periférico ou neurolocalizador (Neurolocalizador MyoTest VI - Amrra Electromedicina - Buenos Aires, Argentina), variando decrescentemente a corrente entre 5 a 0,5 mA, com amplitude de pulso de 100 μ A. Só foram realizadas as infiltrações quando a estímulo elétrico igual ou menor a 0,5 mA ainda promovesse resposta motora, indicando proximidade menor que 0,3 centímetro da ponta da agulha em relação ao nervo (RIVERÓN et al., 2009; CREDIE et al., 2011).

Assim padronizaram-se as infiltrações conforme o grupo:

- ✓ Grupo Controle- Infiltração de Solução Fisiológica NaCl 0,9% nos nervos palmares: Os animais (EQU1 e EQU2) foram infiltrados com 5 mL de Solução Fisiológica (NaCl 0,9%), no nervo palmar medial e 5 mL no nervo palmar lateral do membro torácico esquerdo, aproximadamente 15 cm proximal à articulação metacarpofalângica.
- ✓ Grupo SNI - Infiltração de Suspensão Neurolítica Injetável (SNI) nos nervos palmares: Os animais (EQU3, EQU4, EQU5, EQU6 e EQU7)

foram infiltrados com de 5 mL de SNI no nervo Palmar medial e 5 mL no nervo palmar lateral do membro torácico esquerdo, com procedimentos idênticos aos realizados com os animais do Grupo Controle.

Figura 3.6 - Inervação do membro torácico distal esquerdo do eqüino (vista lateral). Em vermelho o local da infiltração da SNI no nervo palmar lateral (NP).



Fonte: Kainer, 1990 . (Adaptada)

Figura 3.7- Uso de neurolocalizador para melhor localização do Nervo Palmar.



Fonte: Autor, 2011

3.6 Avaliação da Eficácia Clínica da Suspensão Neurolítica Injetável

A avaliação da eficácia clínica da SNI foi realizada a partir do modelo experimental de indução de claudicação já descrito em 3.3. O objetivo principal foi identificar o tempo de início da ação neurolítica da SNI (tempo de latência) e avaliar possíveis alterações no efeito analgésico durante 180 dias.

Esta avaliação também apresentou como objetivos: identificar o tempo de latência e efeito da bupivacaína 0,3% na SNI; avaliar possíveis reações inflamatórias locais; observar alterações comportamentais associadas à dor e avaliar possíveis prejuízos estéticos aos animais.

Foi utilizado como critério de avaliação dos graus de claudicação, o citado por Stashak (2002), conforme descrito na Tabela 3.1., considerando a ausência de claudicação grau 0. Após cada avaliação, as ferraduras e os parafusos foram removidos.

Os testes foram efetuados em dezoito momentos (M), sendo: Pré-infiltração (M1) e após a infiltração convencionou-se: 15 minutos (M2); 30 minutos (M3), 45 minutos (M4), 1 hora (M5), 4 horas (M6), 6 horas (M7), 24 horas (M8), 48 horas (M9), 72 horas (M10), 96 horas (M11), 7 dias (M12), 30 dias (M13), 60 dias (M14), 90 dias (M15), 120 dias (M16), 150 dias (M17) e 180 dias (M18), conforme descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Momentos de avaliação da eficácia clínica da SNI e respectivos tempos.

Momento (M)	Tempo de Avaliação	Momento (M)	Tempo de Avaliação
M1	Pré Infiltração SNI	M10	72 horas
M2	15 minutos	M11	96 horas
M3	30 minutos	M12	7 dias
M4	45 minutos	M13	30 dias
M5	1 hora	M14	60 dias
M6	4 horas	M15	90 dias
M7	6 horas	M16	120 dias
M8	24 horas	M17	150 dias
M9	48 horas	M18	180 dias

Fonte: Autor, 2011.

3.7 Avaliações bioquímicas séricas das funções hepática, muscular e renal

Com propósito de avaliar possível toxicidade hepática, renal e muscular da SNI, foram realizados exames sorológicos quantificando enzimas específicas, escolhendo-se as Transaminases (Alanina Aminotransferase - ALT e Aspartato Aminotransferase - AST), Creatinofosfokinase (CK), Gamaglutamiltransferase (GGT), Uréia e Creatinina.

As coletas de sangue foram efetuadas em 13 tempos de amostragem (T), sendo T1 (24 horas antes das infiltrações perineurais), T2 (6 horas), T3 (24 horas), T4 (48 horas), T5 (72 horas), T6 (96 horas), T7 (7 dias), T8 (30 dias), T9 (60 dias), T10 (90 dias), T11 (120 dias), T12 (150 dias) e T13 (180 dias).

Os tubos foram submetidos à centrifugação a 2500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, obtendo soro sanguíneo, cujas amostras foram acondicionadas em microtubos *ependorf* sob congelamento (-20°C). As amostras foram analisadas em prazo máximo de 15 dias após o congelamento.

Os exames séricos bioquímicos foram realizados no Laboratório Multidisciplinar da UFAL, unidade de Ensino Viçosa, utilizando-se de um espectrofotômetro Photonics 2000UV (Bel Equipamentos Analíticos Ltda., Brasil), com kits para ALT, AST, CK, GGT, Uréia e Creatinina Labtest® (Labtest Diagnóstica S/A, Brasil). Os valores encontrados foram comparados com valores de referência para a espécie, conforme descrito na Tabela 1.2.

O cálculo dos valores da média aritmética, desvio-padrão e variação dos resultados obtidos nos parâmetros bioquímicos foram realizados através do programa de computador ASSISTAT Versão 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009). A normalidade dos dados foi verificada pelo Teste Shapiro-Wilk. Posteriormente realizou-se a análise de variância utilizando o delineamento em blocos casualizados, onde cada animal foi considerado um bloco, bem como o Teste de Tukey, considerando nível de significância igual ou menor a 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação de estabilidade química das SNI

4.1.1 Perda de Peso das Amostras

No momento inicial do experimento foram pesadas as 60 amostras de SNI em balança microanalítica, sendo 20 encaminhadas para cada condição de estresse térmico (20°C, 30° e 40°). O peso inicial foi denominado de massa teórica (Mt).

Em cada tempo de amostragem (t) foram retiradas 3 amostras para pesagem e determinação da massa média, em gramas (g), com possível detecção de perda em relação a média da Mt para as condições de estresse térmico pré-estabelecida. As Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 identificam o peso (em gramas) de cada amostra SNI para as três condições de estresse térmico, bem como a media de peso, desvio padrão e porcentagem de manutenção da massa teórica (Mt). Não houve perda de massa significativa (perda maior ou igual a 5%) para nenhuma amostra até o tempo t5 (180 dias).

Tabela 4.1 - Pesos (g), Média de Peso (g), Desvio Padrão e % da Mt das amostras de SNI a 20°C em cada tempo de amostragem (t). (Continua)

AMOSTRAS DA SNI A 20°C						
	t0 (inicial)	t2 (15 dias)	t3 (30 dias)	t4 (60 dias)	t4 (90 dias)	t5 (180 dias)
1	37,0594	37,0601				
2	36,6052	36,6059				
3	36,9969		36,9993			
4	36,6237				36,623	
5	36,7479				36,7468	
6	37,6440				37,6432	
7	37,4675		37,4688			
8	36,5948	36,5949				
9	36,7861					
10	36,5749					
11	36,5289					36,5274
12	36,555					
13	36,8931			37,3344		
14	37,3334					
15	37,1055					
16	36,2880			36,2896		

						(Conclusão)
17	36,3665			36,3683		
18	36,2806		36,2818			
19	36,6125					36,6112
20	36,9181					36,9174
Média	36,7991	36,7536	36,9166	36,6641	37,0043	36,6853
Desvio Padrão	0,378	0,265	0,598	0,582	0,557	0,205
%Mt	100	99,88	100,32	99,63	100,56	99,69

Fonte: Autor, 2011.

Tabela 4.2 - Pesos (g), Média de Peso (g), Desvio Padrão e % da Mt das amostras de SNI a 30°C em cada tempo de amostragem(t).

AMOSTRAS DA SNI A 30°C						
	t0 (inicial)	t1 (15 dias)	t2 (30 dias)	t3 (60 dias)	t4 (90 dias)	t5 (180 dias)
21	36,9326	36,9335				
22	37,0088	37,0095				
23	36,94		36,9407			
24	36,3353		36,3354			
25	37,4307		37,4309			
26	36,5137					
27	36,4272			36,4285		
28	37,4919			37,4920		
29	36,3716					
30	36,1593					
31	36,9529					
32	36,8464					
33	36,6894					36,6861
34	36,5382			36,5379		36,5362
35	36,4126					36,4108
36	37,098	37,0972				
37	36,3252				36,3000	
38	36,9754				36,9460	
39	37,0497				36,9840	
40	36,5504					
Média	36,7520	37,0130	36,9023	36,820	36,7430	36,5440
Desvio Padrão	0,375	0,082	0,549	0,585	0,384	0,138
%Mt	100%	100,71	100,41	100,18	99,97	99,43

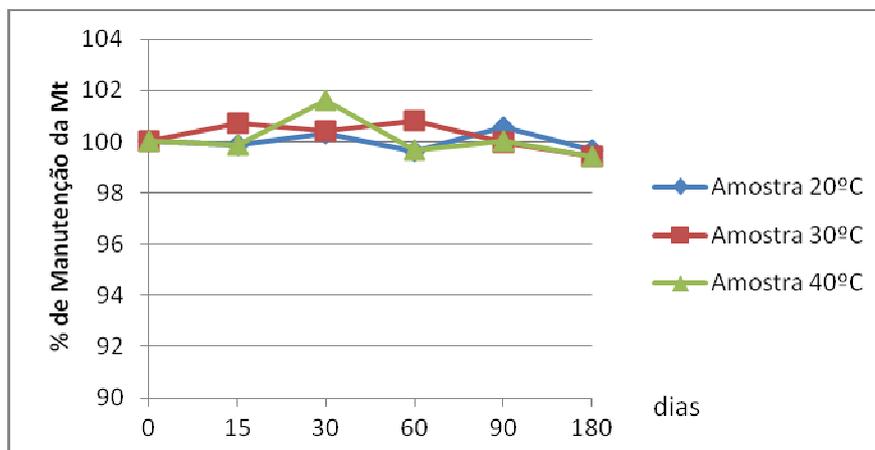
Fonte: Autor, 2011.

Tabela 4.3 - Pesos (g), Média de Peso (g), Desvio Padrão e % da Mt das amostras de SNI a 40°C em cada tempo de amostragem(t).

AMOSTRAS DA SNI A 40°C						
	t0 (inicial)	t1 (15 dias)	t2 (30 dias)	t3 (60 dias)	t4 (90 dias)	t5 (180 dias)
41	36,2254	36,2234				
42	37,1357	37,1337				
43	37,5215		37,5210			
44	37,1020		37,1015			
45	37,4174		37,4180			
46	37,12			37,1197		
47	37,0244					
48	36,1241					36,1204
49	36,9075					
50	36,1145			36,1145		
51	36,683			36,6829		
52	36,3856					
53	37,0583					
54	36,7773	36,7770				
55	37,1921					
56	37,6418				37,6280	37,6402
57	36,2356				36,1880	
58	36,5036				36,4940	
59	35,8909					35,8807
60	36,1701					
Média	36,7615	36,7114	37,3468	36,6390	36,7700	36,5471
Desvio Padrão	0,525	0,455	0,219	0,504	0,759	0,954
%Mt	100	99,86	101,59	99,67	100,002	99,42

Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.1 - Variação da média das massas das amostras nos diferentes tempos de amostragem.



Fonte: Autor, 2011.

4.1.2 Variação de pH

O potencial hidrogeniônico das amostras foi mensurado com o intuito de verificar possíveis variações durante o processo de envelhecimento das amostras. O objetivo maior foi avaliar se a SNI apresentava-se com valor de pH dentro da faixa permitida para soluções injetáveis, ou seja, 5,5 a 7,5. Também foram mensurados o pH da Neocaína® e Triancil® em cada momento, conforme discriminado na Tabela 4.4.

Nota-se que nas condições de 20°C e 30°C nenhuma das amostras apresentou variação de pH. No entanto a 40°C, após condições aceleradas de envelhecimento no tempo de 30 dias, constatou-se aumento no valor de pH nas amostras de SNI e diminuição nas amostras comerciais. O pH da SNI manteve-se dentro da faixa permitida para soluções injetáveis.

Apesar da pequena variação de pH que foram de 0,2 para SNI, 0,3 para Neocaína e 0,5 para Triancil, esta suspensão injetável apresenta uma associação de duas substâncias (bupivacaína e triancinolona) que se comporta como base fraca e ácido fraco, respectivamente e que seus processos de ionização/solubilização podem ser modificados em função da variação de pH, o que pode tornar a bupivacaína menos solúvel e a triancinolona mais solúvel em meio aquoso devido ao ligeiro aumento no valor de pH.

Tabela 4.4 - Medidas de pH das amostras de SNI, Neocaína e Triancil pré-incubadas em diferentes temperaturas nos cinco tempos de amostragem(t).

	t0 (inicial)	t1 (15 dias)	t2 (30 dias)	t3 (60 dias)	t4 (90 dias)	t5 (180 dias)
SNI 20°C	6	6	6	6	6	6
SNI 30°C	6	6	6	6	6	6
SNI 40°C	6	6	6,2	6,2	6,2	6,2
Neocaína 20°C	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
Neocaína 30°C	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
Neocaína 40°C	5,7	5,7	5,7	5,4	5,7	5,4
Triancil 20°C	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Triancil 30°C	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Triancil 40°C	6,5	6,5	6,2	6	6	6

Fonte: Autor, 2011.

4.1.3 Tempo de Sedimentação após agitação de suspensões

Em cada momento, sob as três condições de estresse térmico, foi calculado o tempo de sedimentação após agitação da SNI (em segundos) em três amostras, a partir de um tempo de agitação manual de 30 segundos, deixando-se em repouso em bancada até a verificação da sedimentação completa da suspensão. Também se obteve a média do tempo de sedimentação e desvio padrão em cada momento.

Em todas as análises, na avaliação visual macroscópica das amostras após a completa sedimentação, o sobrenadante apresentou-se límpido e o sedimento foi avaliado como parcialmente floculado, o que é considerado como desejável pela ANVISA (2005). Na Tabela 4.5, apresenta-se os valores do tempo de sedimentação pós-agitação em segundos, além da média e desvio padrão.

Observa-se que não houve aumento do tempo de sedimentação das partículas em suspensão demonstrando que a formulação não apresentou alteração física do tipo defloculação em que as partículas retardam o seu tempo de sedimentação, porém irão apresentar um processo sedimentação irreversível (formação de massa endurecida sem redispersão). Como foi comentado anteriormente, o estado parcialmente floculado foi mantido com tempo médio de sedimentação variando entre 18 e 20 minutos, tempo suficiente para o médico

veterinário realizar o procedimento de coleta de volume em seringa e aplicação no animal.

Tabela 4.5 - Tempo de Sedimentação pós-agitação, em segundos, das amostras de SNI, nos diferentes tempos de amostragem, sob as três temperaturas.

TEMPO DE SEDIMENTAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SNI (em segundos)						
Amostras 20 °C	t0 (inicial)	t1 (15 dias)	t2 (30 dias)	t3 (60 dias)	t4 (90 dias)	t5 (180 dias)
1	1144	1152	1137	1139	1145	1140
2	1128	1143	1149	1129	1132	1138
3	1152	1131	1144	1127	1140	1143
Média	1141,33	1142,00	1143,33	1131,67	1139,00	1140,33
DP	12,22	10,53	6,03	6,43	6,56	2,52
Amostras 30°C	t0 (inicial)	t1 (15 dias)	t2 (30 dias)	t3 (60 dias)	t4 (90 dias)	t5 (180 dias)
4	1132	1157	1149	1147	1139	1130
5	1141	1148	1141	1139	1145	1147
6	1149	1139	1150	1142	1156	1138
Média	1140,67	1148,00	1146,67	1142,67	1146,67	1138,33
DP	8,50	9,00	4,93	4,04	8,62	8,50
Amostras 40°C	t0 (inicial)	t1 (15 dias)	t2 (30 dias)	t3 (60 dias)	t4 (90 dias)	t5 (180 dias)
7	1159	1178	1172	1144	1161	1152
8	1163	1152	1159	1152	1156	1167
9	1149	1159	1190	1153	1149	1148
Média	1157,00	1163,00	1173,67	1149,67	1155,33	1155,67
Des.Pad.	7,21	13,45	15,57	4,93	6,03	10,02

Fonte: Autor, 2011.

4.1.4 Desenvolvimento de método cromatográfico para determinação simultânea de Bupivacaína e Triancinolona na SNI

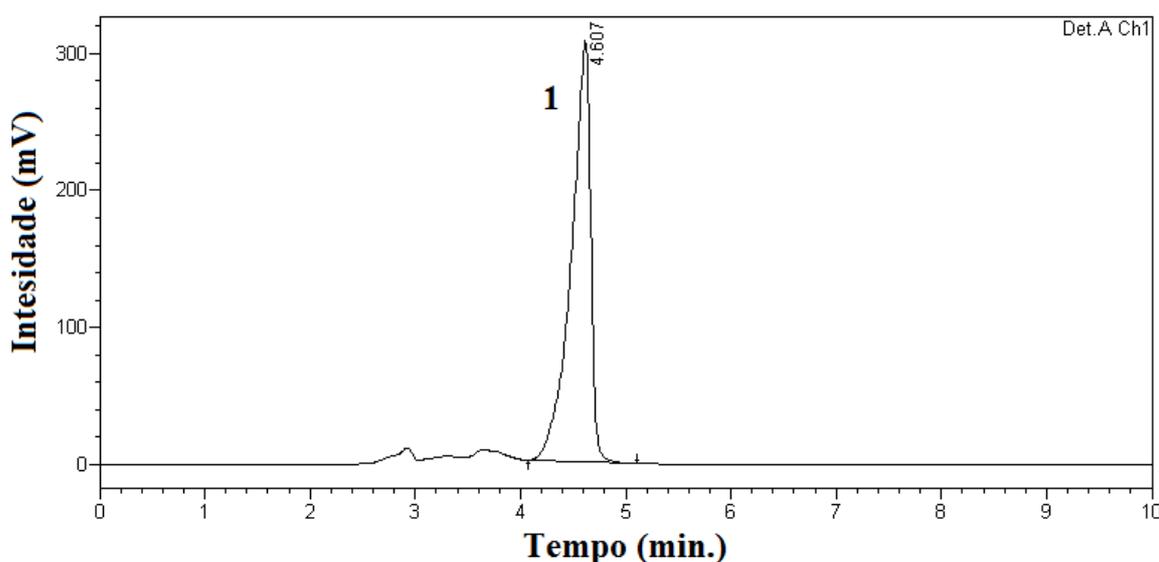
O desenvolvimento do método cromatográfico iniciou-se avaliando a melhor condição do sinal analítico para bupivacaína e triancinolona. Variação no comprimento de onda entre 263 e 230nm foi realizada para verificar a influência deste parâmetro em relação detecção, seletividade e sensibilidade analítica. Em todas as faixas de comprimento de onda foi possível detectar bupivacaína e triancinolona. O comprimento de onda ideal para bupivacaína seria próximo a 257nm já que esta molécula apresenta cromóforo do “benzeno”, enquanto o melhor sinal da triancinolona seria próximo a 240 nm, pois esta molécula apresenta características cromofóricas de uma “enona”.

As Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 mostram que a bupivacaína perde em termos de sensibilidade devido ao deslocamento do comprimento de onda para a região do azul, enquanto triancinolona ganha em termos de sensibilidade com o deslocamento do comprimento de onda. Apesar da baixa sensibilidade para bupivacaína, o desenvolvimento do método cromatográfico com a finalidade de identificação, doseamento e estudo de estabilidade dos fármacos na faixa de micrograma/mililitro não requer sensibilidade extrema, como em casos de determinação de fármacos para ensaios limites de pureza cromatográfica ou em fluidos biológicos.

Todos os cromatogramas apresentaram uma banda mal definida entre 2,5 e 3,5 minutos, correspondente ao sinal de início de análise do material injetado após o tempo morto inicial de circulação pela coluna, particularmente perceptível nas escalas de maior sensibilidade.

O método apresentou seletividade/especificidade adequada, pois apesar das matrizes químico-farmacêutica apresentarem interferentes devido a presença de alguns adjuvantes da formulação, não se observou picos cromatográficos adicionais.

Figura 4.2 - Cromatograma de (1) bupivacaína (200 µg/mL) em acetonitrila:água (60:40, v/v) e comprimento de onda de 263 nm.

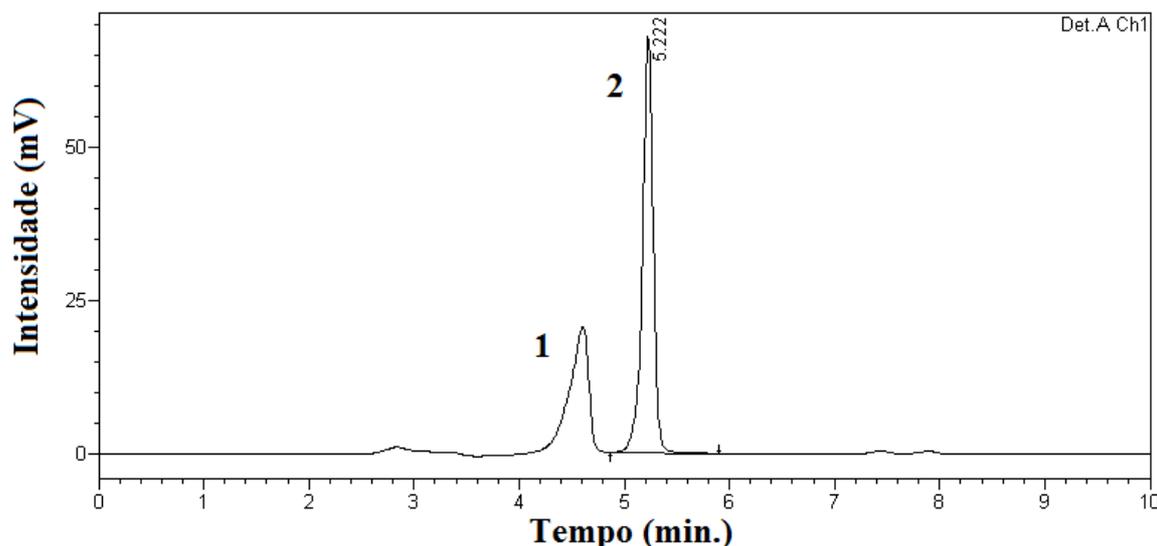


Fonte: Autor, 2011.

A Figura 4.3 mostra o pico cromatográfico da bupivacaína numa proporção de 60% de acetonitrila. Observa-se que a bupivacaína tem um tempo de retenção (4,6 minutos) muito próximo do tempo morto da coluna que é de aproximadamente 2,4 minutos. Essa condição não seria adequada para quantificação da bupivacaína, pois alguns interferentes saem muito próximo deste analito de interesse e o fator de retenção ($K' = 0,92$) seria menor que 1.

A Figura 4.4 mostra o pico cromatográfico de bupivacaína e triancinolona na mesma proporção de fase móvel, porém redução do comprimento de onda para 257 nm. Observa-se resolução moderada (separação moderada) entre bupivacaína e triancinolona, além de pico não-simétrico para bupivacaína. Desta forma, houve a necessidade de reduzir a proporção de acetonitrila na fase móvel para retardar um pouco mais a eluição dos analitos da coluna cromatográfica, além de encontrar um solvente adequado para melhor a simetria do pico cromatográfico da bupivacaína.

Figura 4.3 - Cromatograma de (1) bupivacaína (100 µg/mL) e (2) triancinolona (200 µg/mL) em acetonitrila:água (60:40, v/v) e comprimento de onda de 257 nm.

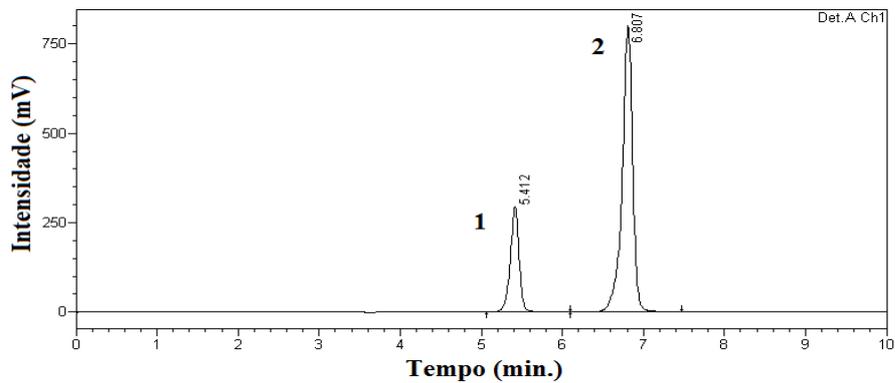


Fonte: Autor, 2011

Com a redução em 10% na proporção de acetonitrila, observou-se um melhor tempo de retenção para bupivacaína (5,4 minutos) e triancinolona (6,8 minutos). Porém insuficiente quando se objetiva determinar a concentração dos fármacos em estudos de estabilidade em que a eluição de produtos de degradação pode

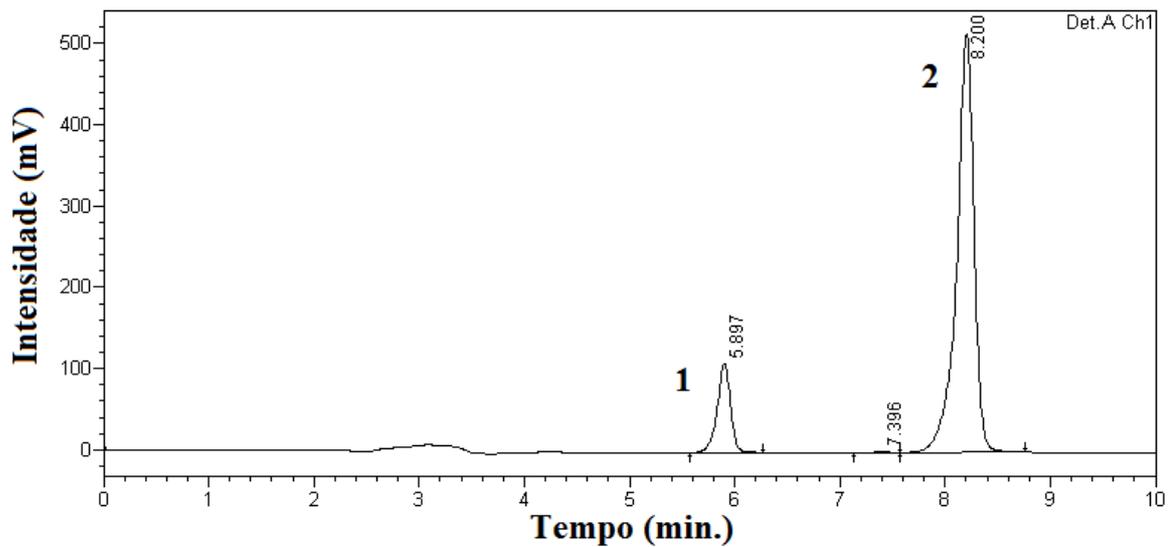
acontecer nos mesmos tempo de retenção do segundo analito de interesse (Figura 4.4). A substituição água pelo tampão fosfato equimolar (pH 6,8) na fase móvel promoveu uma melhor simetria do pico cromatográfico da bupivacaína.

Figura 4.4 - Cromatograma de (1) bupivacaína (100 µg/mL) e (2) triancinolona (200 µg/mL) em acetonitrila:tampão fosfato equimolar (0,01M; pH 6,8),(50:50, v/v) e comprimento de onda de 240 nm.



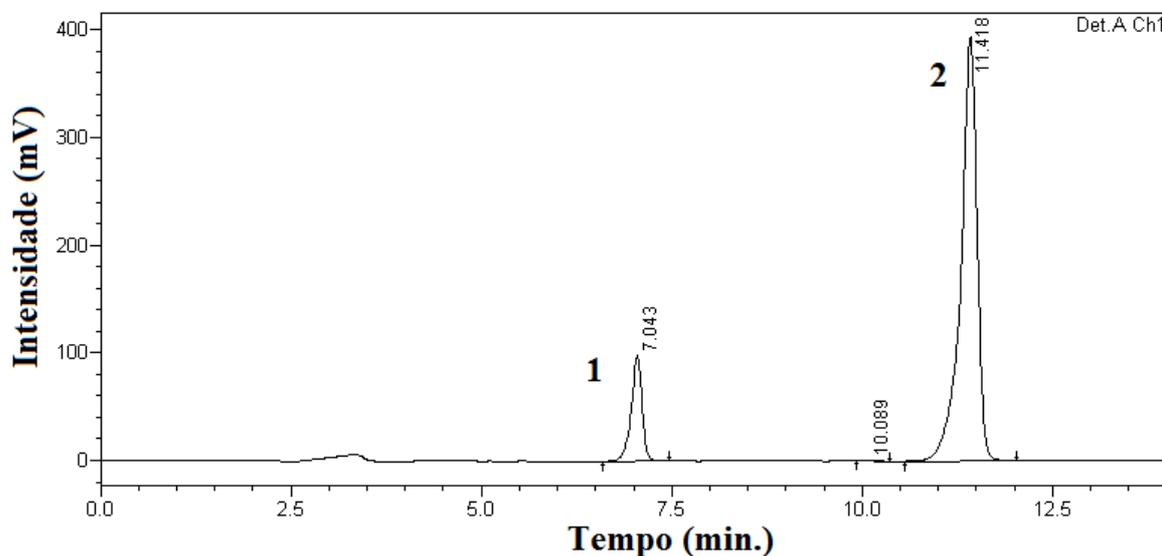
Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.5 - Cromatograma de (1) bupivacaína (100 µg/mL) e (2) triancinolona (200 µg/mL) em acetonitrila:tampão fosfato equimolar (0,01M; pH 6,8), (45:55, v/v) e comprimento de onda de 230 nm.



Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.6 - Cromatograma de (1) bupivacaína (100 µg/mL) e (2) triancinolona (200 µg/mL) em acetonitrila:tampão fosfato equimolar (0,01M; pH 6,8), (40:60, v/v) e comprimento de onda de 230 nm.

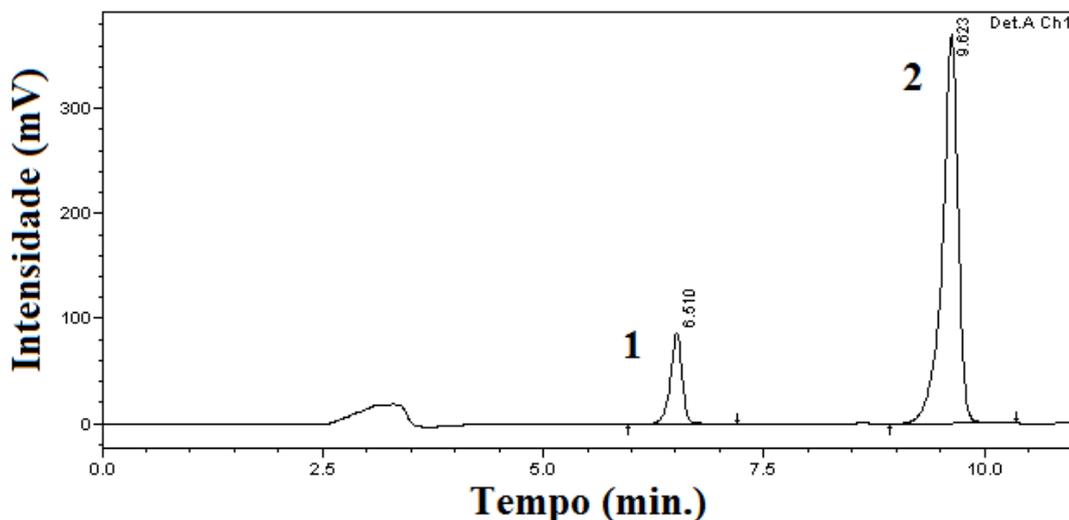


Fonte: Autor, 2011.

A redução na proporção de acetonitrila para 45% e 40% acompanhou o processo de maior retenção dos analitos de interesse observado na figura 4.4. As figuras 4.5 e 4.6 mostraram que a triancinolona apresenta eluição nos tempos de retenção 8,2 e 11,4 minutos, respectivamente. Nesta última condição, observa-se que o tempo de análise de 13 minutos pode se considerado longo.

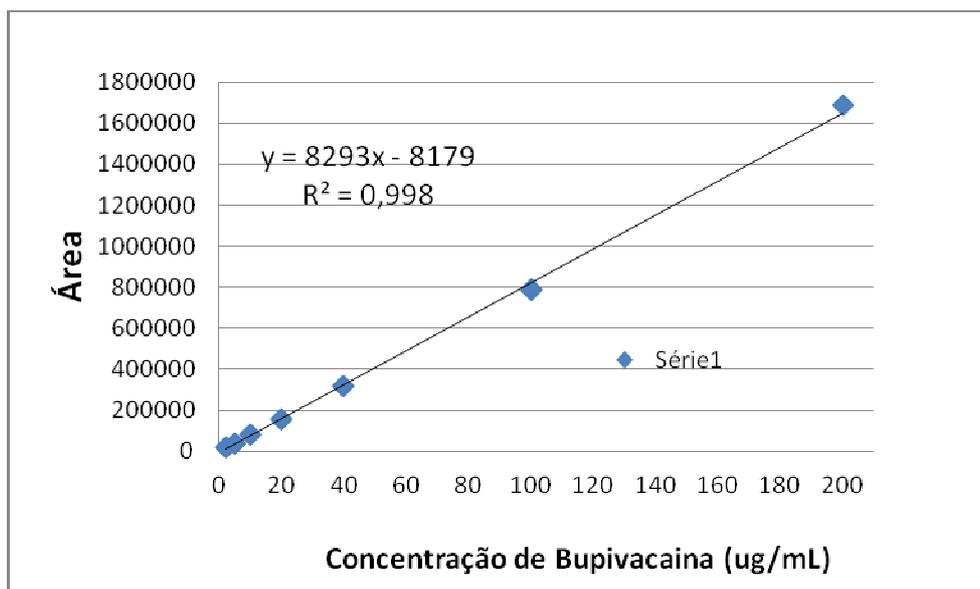
Uma última condição analítica foi testada, com a finalidade de reduzir o tempo total de análise (Figura 4.7). Observando a perfeita simetria dos picos cromatográficos de bupivacaína e triancinolona, requisito de qualidade de picos cromatográficos necessário para quantificação, observando a boa separação entre os analitos de interesse e o adequado tempo de análise (11 minutos), estabeleceu-se esta última condição analítica para determinação de bupivacaína e triancinolona.

Figura 4.7 - Cromatograma de (1) bupivacaína (100 µg/mL) e (2) triancinolona (200 µg/mL) em acetonitrila:tampão fosfato equimolar (0,01M; pH 6,8), (47:53, v/v) e comprimento de onda de 230 nm.

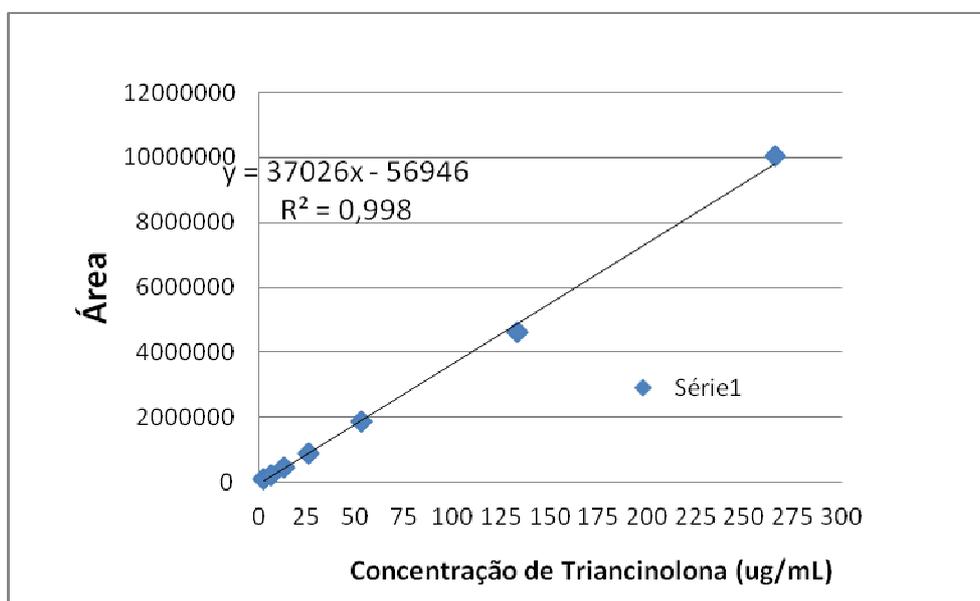


Fonte: Autor, 2011.

As condições cromatográficas utilizadas, a partir das amostras comerciais de Neocaína® e Triancil®, foram consideradas viáveis para determinação simultânea de bupivacaína e triancinolona. A última condição analítica foi testada para avaliar se ocorre discriminação entre as concentrações dos analitos através do ensaio de curva de calibração (Figura 4.8 e 4.9), realizada a partir de três injeções de 7 concentrações analisadas incluindo a faixa de concentração das amostras CQ's, considerando como respectivas concentrações de bupivacaína e triancinolona: 45 µg/mL e 60 µg/mL (CQ1), 90 µg/mL e 120 µg/mL (CQ2) e, 120 µg/mL e 160 µg/mL (CQ3).

Figura 4.8 - Curva de calibração da bupivacaína com método analítico proposto.

Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.9 - Curva de calibração da triancinolona com método analítico proposto.

Fonte: Autor, 2011.

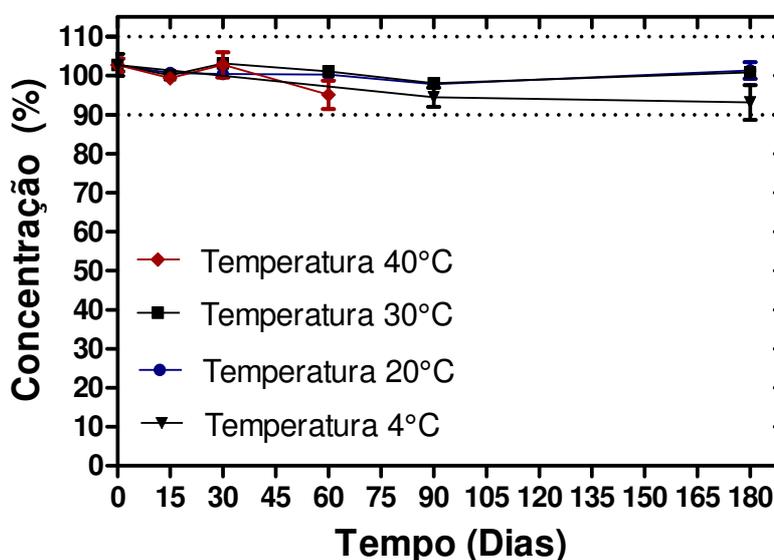
O método proposto apresentou linearidade para a faixa de concentração entre 2,00 e 200 μmL para bupivacaína e 2,66 e 266 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente de correlação de $r^2 = 0,998$ e $0,998$, respectivamente. Desta forma, podemos de maior confiança que o método cromatográfico apresenta discriminação entre as faixas de concentração a serem analisadas no estudo de estabilidade acelerado.

4.1.5 Monitoramento dos analitos durante estudo de estabilidade acelerado

As análises foram realizadas no t0 (inicial), t1 (15 dias), t2 (30 dias), t3 (60 dias), t4 (90 dias) e t5 (180 dias), avaliando comparativamente as áreas cromatográficas entre as amostras envelhecidas em relação às amostras controle e conseqüentemente degradação dos princípios ativos bupivacaína e triancinolona na SNI, sob as diferentes condições ambientais ou situações de estresse térmico (20°C, 30°C e 40°C). Amostras controle estocadas em geladeira (4°C) foram analisadas nos tempos 90 dias e 180 dias.

Considerando as áreas cromatográficas iniciais, no momento inicial (t0), como 100% da concentração teórica (CT) dos princípios ativos na SNI, foram calculadas as porcentagens de bupivacaína nos diferentes tempos, sob as três condições de estresse térmico (Figura 4.10). A concentração da bupivacaína nas amostras de SNI foi mantida nas temperaturas de 20°C e 30°C até t6 (180 dias) sem qualquer tendência a degradação. Contudo, na temperatura de 40°C houve uma perda média de 4,91% quando calculada para as três amostras CQ's. A amostra estocada em geladeira manteve-se estável dentro dos limites de variação de $\pm 5.0\%$ de bupivacaína.

Figura 4.10 - Estudos de estabilidade acelerado de bupivacaína em diferentes temperaturas ao longo de 180 dias. Em cada ponto analisado, observamos os valores e as barras superior e inferior representando o valor médio e desvio padrão relativo das amostras CQ1, CQ2 e CQ3.



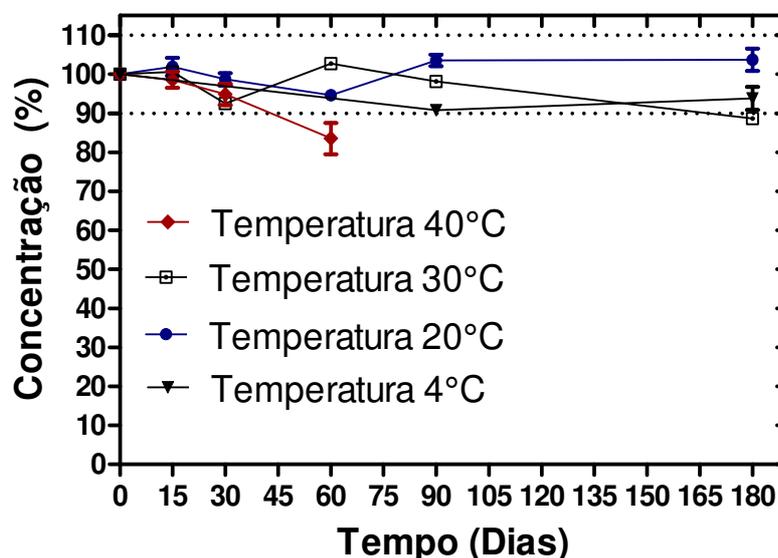
Fonte: Autor, 2011.

A estatística de Bonferroni ($F_{temp.} = 0,159$; valor $P_{temp.} = 0,8542$ e $F_{tempo} = 2,725$; valor $P_{tempo} = 0,092$) mostrou que não houve diferenças significativas para os valores de bupivacaína (% concentração) entre as 3 temperaturas estudadas para o conjunto de valores nos tempos 0, 15 e 30 dias. A análise de variância com 2 fatores (temperatura e tempo) comparou os valores entre as 3 temperaturas estudadas ($F_{temp.} = 1,060$; valor $P_{temp.} = 0,362$ e $F_{tempo} = 3,320$; valor $P_{tempo} = 0,036$) para os tempos 0, 15, 30 e 60 dias. Não houve diferenças significativas entre as concentrações mensuradas nas 3 temperaturas estudadas ao longo dos intervalos de tempo de 60 dias (efeito temperatura), porém houve diferença significativa para o efeito tempo no nível de significância de $\alpha = 0,05$. Apesar da maior perda de massa em relação às demais condições de stress avaliadas (temperatura de 40°C), essa variação menor que 5% ainda não pode ser considerada como degradação da bupivacaína.

Estatística de Bonferroni ($F_{temp.} = 1,12$; valor $P_{temp.} = 0,385$) quando aplicada para avaliar e comparar a perda de teor de bupivacaína nas temperaturas de 4°C, 20°C e 30°C nos tempos 0, 90 e 180 dias não mostrou significativa perda de massa entre as 3 temperaturas estudadas por um período de 180 dias. O valor do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,273$) também mostrou que não há tendências à expressiva degradação para bupivacaína nestas temperaturas estudadas.

A triancinolona não apresentou degradação durante todo o estudo de estabilidade (180 dias) nas temperaturas de 4°C e 20°C, mostrando-se dentro dos limites de variação ($\pm 5,0\%$). A degradação da Triancinolona nas amostras de SNI foi pronunciada para a temperatura 30°C, observando a perda de massa de $11,34\% \pm 0,55$ no tempo de 180 dias. Na temperatura de 40°C foi observada a degradação após o ponto t3 (30dias) correspondente a $94,84\% \pm 3,90$, sendo que em t4 (60 dias) correspondente a $83,51\% \pm 6,90$ com degradação média de 16,5%, conforme mostrado na Figura 4.11.

Figura 4.11 - Estudos de estabilidade acelerado de triancinolona em diferentes temperaturas ao longo de 180 dias. Em cada ponto analisado, observamos os valores e as barras superior e inferior representando o valor médio e desvio padrão relativo das amostras CQ1, CQ2 e CQ3.



Fonte: Autor, 2011.

A análise de variância de 2 fatores (temperatura e tempo) (Estatística de Bonferroni) da triancinolona foram avaliadas entre as 3 temperaturas (20°C, 30°C e 40°C) estudadas para os tempos 0, 15 dias e apresentou valores F e p ($F_{temp.} = 0,199$; valor $P_{temp.} = 0,662$ e $F_{tempo} = 1,386$; valor $P_{tempo} = 0,287$) não significativos para as 3 temperaturas e neste intervalo de tempo analisado. A análise de variância de 2 fatores (temperatura e tempo) (Estatística de Bonferroni) mostrou diferenças significativas para tempo e temperatura ($F_{temp.} = 4,395$; valor $P_{temp.} = 0,030$ e $F_{tempo} = 15,81$; valor $P_{tempo} = 0,0002$) no intervalo do estudo de estabilidade entre os tempos 0 15 e 30 dias. Análise de variância comparativa ($F_{temp.} = 11,01$; valor $P_{temp.} = 0,0005$ e $F_{tempo} = 14,08$; valor $P_{tempo} < 0,0001$) entre as temperaturas de 20°C, 30°C e 40°C para os tempos 0, 15, 30 e 60 dias, também mostrou diferenças significativas entre as temperaturas.

Quando compara-se as temperaturas de 4°C, 20°C e 30°C nos para os pares de dados nos tempos 0, 90 dias e 180 dias pela estatística de Bonferroni (um fator, temperatura), observou-se que não há diferenças significativas entre os valores de perda no teor de triancinolona ($F_{temp.} = 2,442$; valor $P_{temp.} = 0,1675$), porém análise

do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,449$) mostra que já há uma degradação para a temperatura de 30°C, com perda no teor de 11,34%.

4.2 Avaliação da eficácia clínica da Suspensão Neurolítica Injetável

O modelo de indução de claudicação utilizado foi considerado satisfatório, visto que exteriorizou imediata claudicação de apoio nos animais de ambos os grupos experimentais, independentemente do ponto em que foi testado.

A claudicação de apoio tipicamente mostrou os movimentos clássicos e evidentes de elevação e abaixamento de cabeça e pescoço ao passo e trote, encurtamento do passo no membro sede da dor e ruído diferenciado entre os membros, no impacto ao solo (Grau 3). Após a avaliação da claudicação e removida a pressão aplicada na sola pelos parafusos, os animais de ambos os grupos imediatamente voltaram à locomoção normal, classificados com Grau 0 de claudicação.

A intensidade da dor produzida na sola foi diretamente proporcional à pressão aplicada em cada um dos parafusos, podendo ser controlada de acordo com o grau de claudicação desejado. Nesta pesquisa, de acordo com o protocolo estipulado, as dimensões dos parafusos, bem como a pressão neles aplicada, induziram claudicação grau 3 (STASHAK, 2002) em todos os animais, padronizando o grau de claudicação em M1 (pré-infiltração), anteriormente descrita por Escodro (2004) e Nicoletti et al. (2007) com variações de grau 2 e 3 .

Os testes aplicados não causaram nenhum dano temporário ou permanente aos animais. Após a infiltração dos Nervos Palmares com Solução Fisiológica NaCl 0,9% (Grupo Controle) e SNI (GRUPO SNI), os seguintes resultados e discussões provenientes dos testes de sensibilidade aplicados pela ferradura foram determinados :

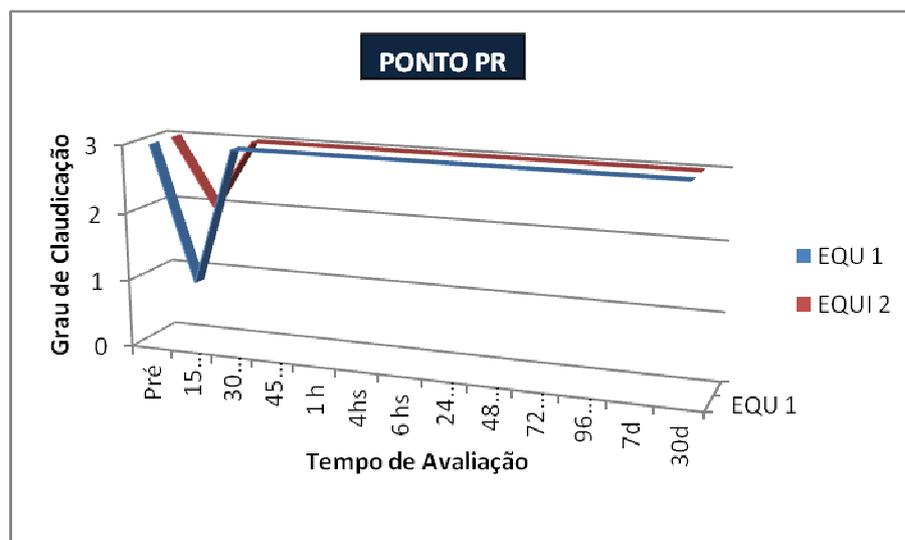
4.2.1 Grupo Controle: infiltração com solução fisiológica nos nervos palmares

Os animais do Grupo Controle apresentaram claudicação de Grau 3 no M1 (Pré infiltração), havendo decréscimo, no momento M2 (15 minutos), para Grau 1 em PR no EQU1 e para Grau 2 em PR no EQU2. Ainda em M2 (15 minutos), avaliando

a claudicação em PC, PM e PL, esta diminuiu para Grau 2 em ambos os animais do Grupo Controle. O retorno à claudicação Grau 3 ocorreu em M3 (30 minutos), mantendo-se padronizada no mesmo grau até M13 (30 dias). As avaliações a partir daí não foram realizadas para evitar desconforto e sofrimento dos animais.

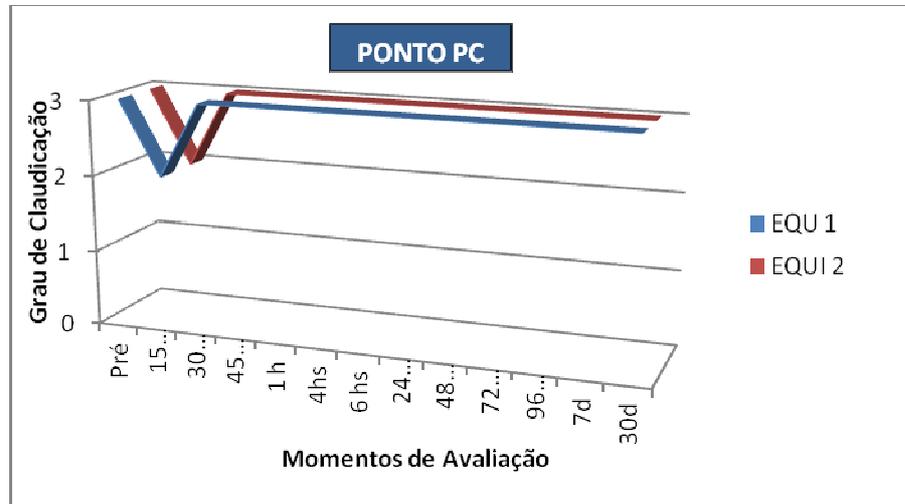
As Figuras 4.12 à 4.15 demonstram os graus de claudicação observados nos animais do Grupo Controle, infiltrados Solução Fisiológica NaCl 0,9 %, respectivamente nos pontos PR, PC, PM e PL, nos momentos de avaliação M1 (Pré Infiltração) até M13, 30 dias após a infiltração com a SNI.

Figura 4.12 - Graus de Claudicação dos Animais do Grupo Controle infiltrados com Soro Fisiológico, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M13 (30 dias), com pressão aplicada no Ponto PR.



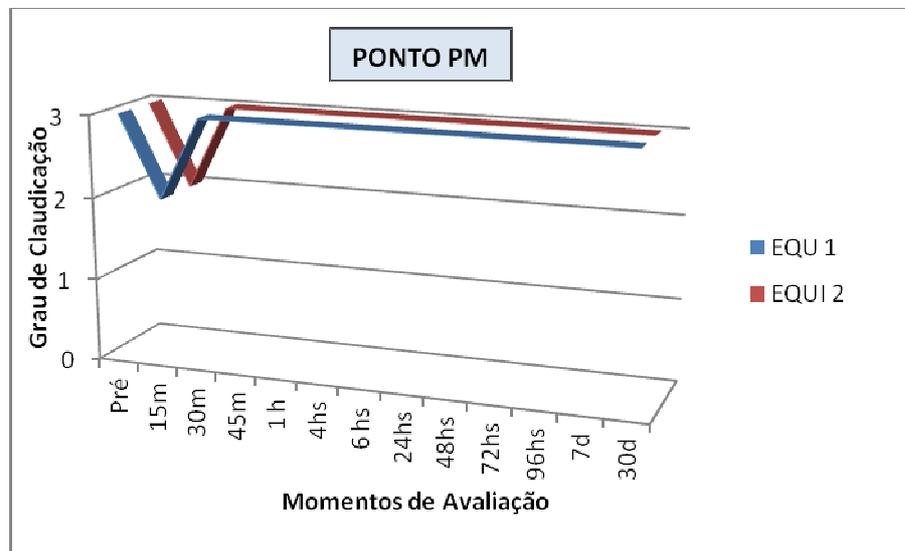
Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.13 - Graus de Claudicação dos Animais do Grupo Controle infiltrados com Soro Fisiológico, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M13 (30 dias), com pressão aplicada no Ponto PC.



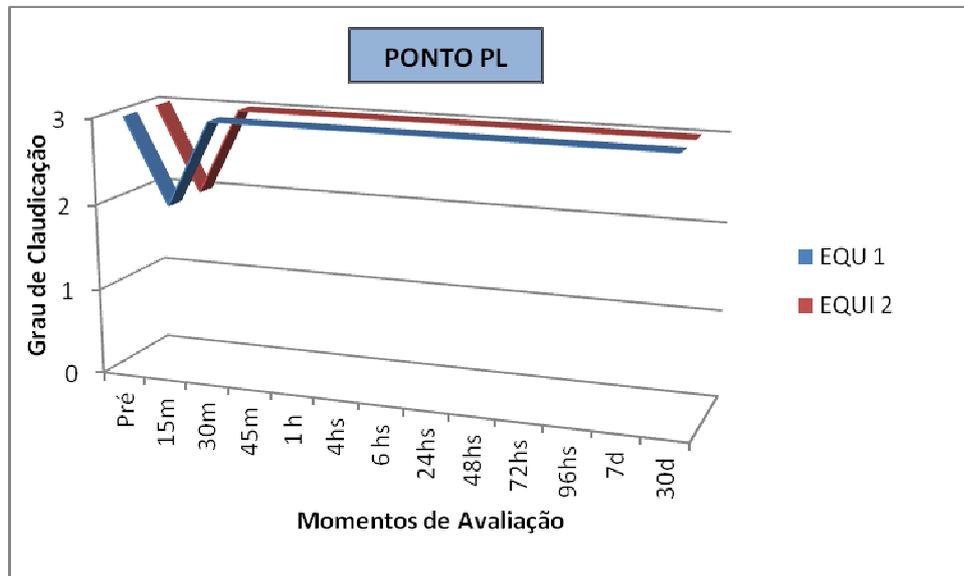
Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.14 - Graus de Claudicação dos Animais do Grupo Controle infiltrados com Soro Fisiológico, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M13 (30 dias), com pressão aplicada no Ponto PM.



Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.15 - Graus de Claudicação dos Animais do Grupo Controle infiltrados com Soro Fisiológico, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M13 (30 dias), com pressão aplicada no Ponto PL.



Fonte: Autor, 2011.

Neste Grupo a claudicação induzida reduziu gradativamente apenas em M2 (15 minutos) para Grau 2 nos pontos da sola (PC, PM e PL) e com variações de Grau 2 ou 1 em PR.

A diminuição do Grau de Claudicação em M2 (15 minutos) pode ser explicada pela infiltração da solução fisiológica próxima ao nervo, devido ao uso do neurolocalizador, o que sugere a ocorrência de neuropraxia transitória por aumento de pressão, até que ocorra a absorção total da solução no local, que já ocorreu sugestivamente em M3 (30 minutos).

A avaliação da claudicação de M4 (45 minutos) a M13 (30 dias) poderia ter sido evitada, ao menos de forma parcial, visto que a cada avaliação os animais, por não apresentarem dessensibilização nervosa, retornavam ao Grau 3 de Claudicação, o que ocasiona dor e sofrimento aos mesmos. Assim optou-se por não submeter os animais deste Grupo às demais avaliações, poupando-os aos estímulos dolorosos dos testes.

4.2.2 GRUPO SNI: Infiltração com SNI nos nervos palmares

Os animais deste grupo comportaram-se da mesma forma em relação ao estímulo doloroso nos pontos testados e graus de claudicação, quais sejam PR, PC, PM e PL.

Assim apresentaram claudicação de Grau 3 no momento M1 (Pré infiltração), havendo decréscimo, no momento M2 (15 minutos) para Grau 2 em três animais (EQU3, EQU6 e EQU7), não havendo diminuição de claudicação em dois animais (EQU4 e EQU5). Já em M3 (30 minutos) a claudicação estava presente em menor intensidade (Grau 1) apenas em dois animais (EQU4 e EQU6), sendo que nos demais foi denominada como Grau 0 (ausência de claudicação). Em M4 (45 minutos) e M5 (60 minutos) todos os animais apresentaram ausência de claudicação (Grau 0). Os graus de claudicação discriminados por animal entre M1(Pré) e M5 (1 hora), estão demonstrados na Tabela 4.6.

Em M6 (4 horas) todos os animais do GRUPO SNI apresentavam claudicação leve, sendo que ao estímulo doloroso nos pontos, quatro animais exteriorizavam claudicação Grau 1 e um animal Grau 2 (EQU7). Em M7 (6 horas) quatro animais já haviam retornado a condição de claudicação de M1 (Pré), ou seja, Grau 3, sendo que apenas o EQU4 apresentava claudicação Grau 2. Nos momentos M8 (24 horas) a M9 (48 horas) todos os animais apresentavam claudicação Grau 3 nos quatro pontos testados.

Tabela 4.6 - Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M5 (1 hora), com pressão aplicada no Ponto PC, PR, PM, PL.

Momento \ Animal	M1 (Pré)	M2 (15 min)	M3 (30 min)	M4 (45 min)	M5 (1 hora)
EQU3	3	2	0	0	0
EQU4	3	3	1	0	0
EQU5	3	3	0	0	0
EQU6	3	2	1	0	0
EQU7	3	2	0	0	0

Fonte: Autor, 2011.

Em M10 (72 horas) quatro animais exteriorizaram claudicação Grau 2, porém o EQU3 apresentou Grau 3. Todos os animais apresentam Claudicação Grau 1 em M11 (72 horas) e ausência de claudicação (Grau 0) em M12 (7 dias). Os graus de claudicação discriminado por animal entre M6 (4 horas) ao M12 (7 dias), estão demonstrados na Tabela 4.7.

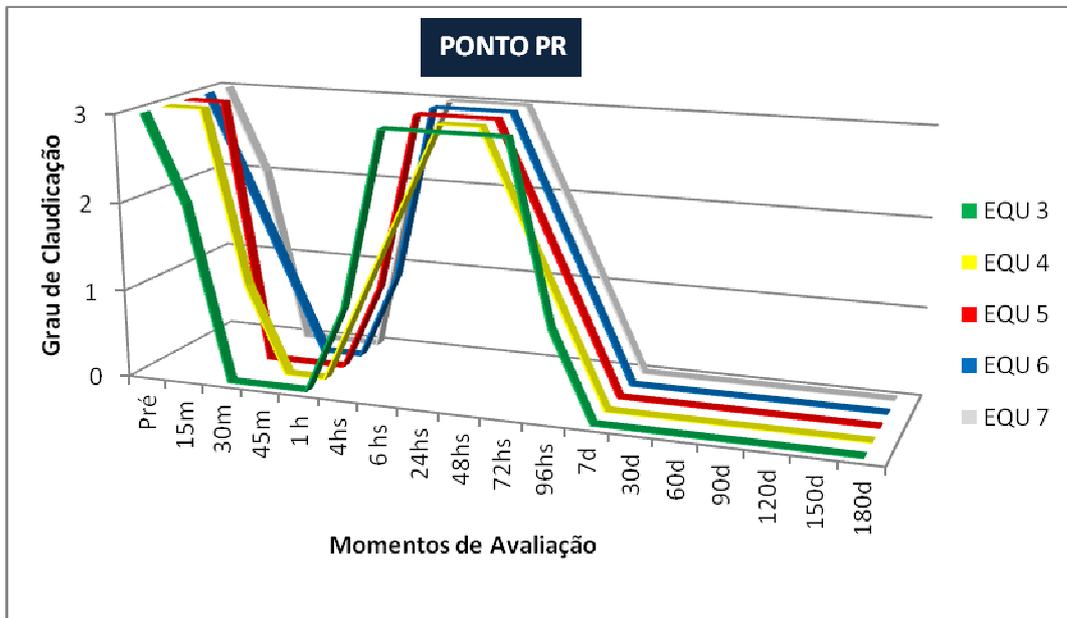
Tabela 4.7 - Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M6 (4 horas) a M12 (7 dias), com pressão aplicada no Ponto PC, PR, PM, PL.

Momento Animal	M6 (4hs.)	M7 (6hs.)	M8 (24hs.)	M9 (48hs.)	M10 (72hs.)	M11 (96hs.)	M12 (7 d.)
EQU3	1	3	3	3	3	1	0
EQU4	1	2	3	3	2	1	0
EQU5	1	3	3	3	2	1	0
EQU6	1	3	3	3	2	1	0
EQU7	2	3	3	3	2	1	0

Fonte: Autor, 2011.

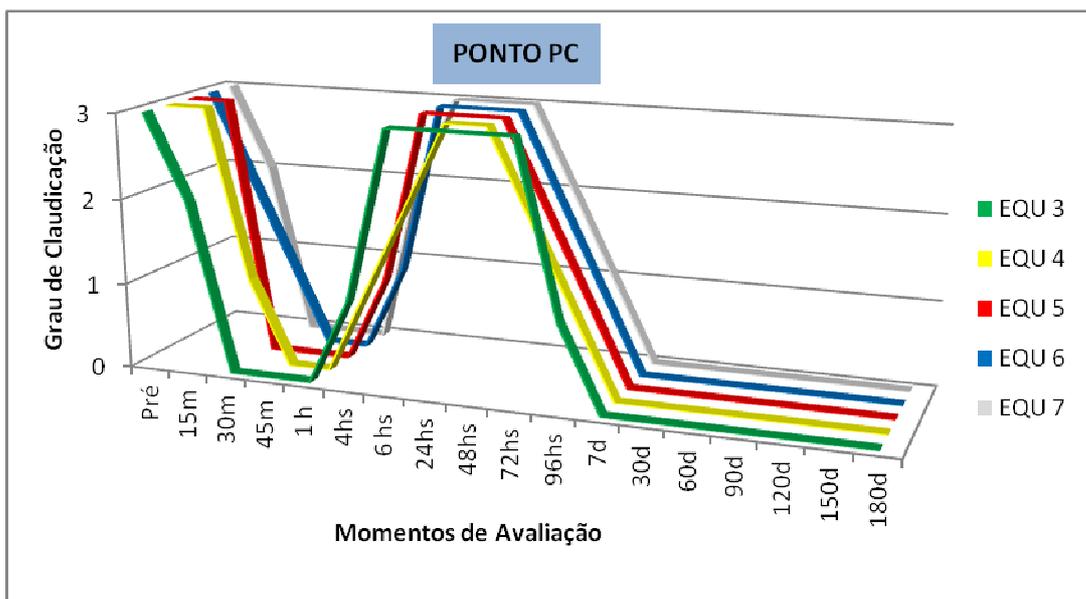
Entre M12 (7dias) e M18 (180 dias) todos os animais do Grupo SNI apresentaram ausência de claudicação. Nas Figuras 4.16 à 4.19, encontram-se os gráficos representativos dos graus de claudicação observados nos animais do Grupo SNI, infiltrados com a SNI, nos momentos de avaliação M1 (Pré infiltração) até M18, ou seja, 180 dias após a infiltração da SNI.

Figura 4.16 - Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M18 (180 dias), com pressão aplicada no Ponto PR.



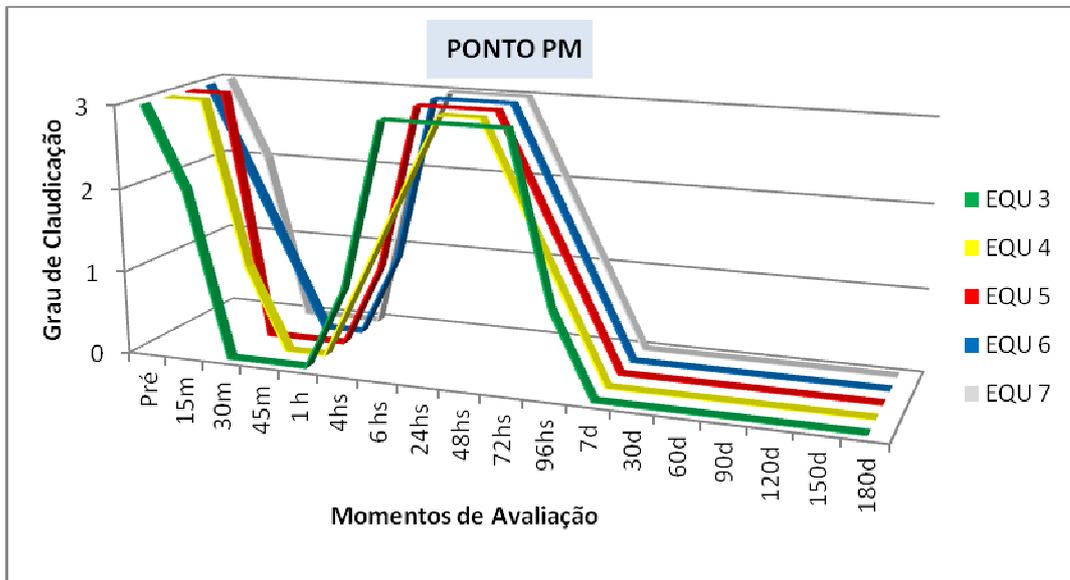
Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.17 - Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M18 (180 dias), com pressão aplicada no Ponto PC.



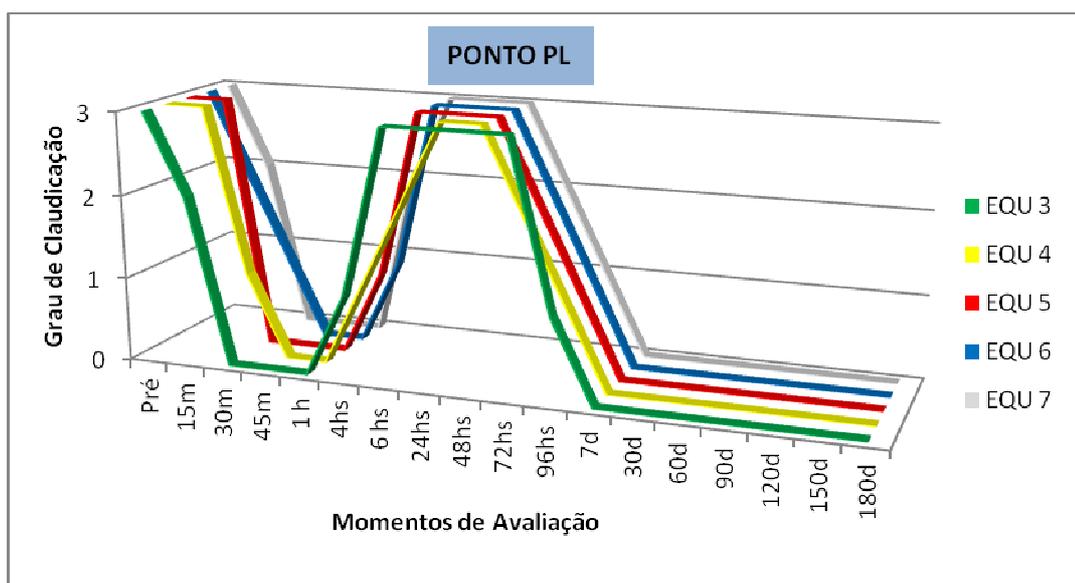
Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.18 - Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M18 (180 dias), com pressão aplicada no Ponto PM.



Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.19 - Graus de Claudicação dos Animais do Grupo SNI, observados nos momentos M1 (Pré-avaliação) a M18 (180 dias), com pressão aplicada no Ponto PL.



Fonte: Autor, 2011.

Um animal do Grupo SNI apresentou celulite transitória no local da infiltração após 6 horas, não exteriorizando claudicação em nenhum momento. A regressão espontânea da celulite ocorreu em 72 horas, não se observando reações secundárias à neurólise química.

Nos animais do Grupo SNI observou-se, em M2, a diminuição da claudicação para grau 2 em 3 animais (60 % da amostragem), sendo que em 2 (40%), a claudicação continuou em grau 3. No Grupo Controle, os dois animais apresentaram diminuição de claudicação neste momento.

O tempo de latência da bupivacaína a 0,3% na SNI foi entre 30 e 45 minutos, visto que em M3 (30 minutos) dois animais apresentavam claudicação leve grau 1.

O efeito terapêutico do anestésico foi menor que quatro horas, visto que em M6 (4horas), todos os animais já apresentavam grau de claudicação parcial em relação a M1, estando em M7 (6 horas), quatro animais (80%) apresentando grau de claudicação 3. Os resultados condizem com o tempo de 180 a 480 minutos, citados por Stoelting (1999) e Lamount (2008).

A ação neurolítica analgésica da SNI iniciou-se levemente com 72 horas em quatro animais, porém com significativa diminuição de grau após 96 horas (M11), momento em que todos os animais apresentaram grau 1, considerando-se esse como tempo latência do efeito neurolítico. O grau 0 (ausência de claudicação) foi constatado em M12 (7 dias).

O tempo de latência de 96 horas, apresentado pela SNI, foi 24 horas maior que do etanol 99,5%, que segundo Nicoletti et al. (2007) é de 72 horas. Porém, bem menor que o atribuído ao Sarapin®, que é de 7 dias (NICOLETTI et al., 2007). A ausência de claudicação se mantém até M18 (180 dias), demonstrando a eficácia clínica da SNI até 180 dias após a infiltração.

A citotoxicidade de um fármaco neurolítico está diretamente relacionada com a concentração utilizada do agente e o local de deposição do mesmo. A infiltração extrafascicular tem efeitos menos drásticos sobre o nervo, porém irritantes nas estruturas adjacentes, caracterizando-se por edema no interior do endoneuro, alterações inflamatórias e lesão na bainha de mielina e células de Schwann; já a

infiltração intrafascicular é muito mais agressiva ao nervo, causando em geral, degeneração walleriana. A ação intrafascicular traz efeitos analgésicos mais duradouros, porém a reação dolorosa e inflamatória nos primeiros dias podem ser agudas e muito intensas, desencadeando uma neurite e até inviabilização da ação neurolítica.

Durante o período de observação desta pesquisa, a celulite transitória no local da infiltração foi observada apenas em um animal, não exteriorizando claudicação e apresentando regressão espontânea em 72 horas.

Os resultados obtidos foram superiores ao de Nicoletti et al. (2007) com uso de etanol 99,5% nos mesmos nervos de eqüinos, quando a ação irritante do etanol prejudicou a avaliação da claudicação nas primeiras 48 horas, devido a reação inflamatória e dolorosa local, precisando ter recorrido aos anti-inflamatórios não esteroidais como terapêutica coadjuvante. Os autores também relatam que o etanol trouxe prejuízos estéticos na canela de todos os animais, ficando com aumento de volume visível, mesmo sem apresentar claudicação com 180 dias após a infiltração.

O menor efeito inflamatório local da SNI pode ser atribuído pela concentração adequada de etanol; ao curto prazo, devido à analgesia obtida pela bupivacaína e conseqüente diminuição de liberação de mediadores inflamatórios locais; e ao médio prazo pela triancinolona, que pode manter a ação anti-inflamatória no local por 18 a 36 horas (LAYTON; YIP; CUNLIFE, 1994; WICKE et al., 2000).

Observou-se um intervalo no tempo de bloqueio de sensibilidade nervosa, já que a bupivacaína bloqueou os canais de sódio no nervo por menos de 4 horas e a analgesia da neurólise iniciou-se com 96 horas. Mesmo com esta janela farmacológica, os animais não apresentaram reação inflamatória local, como ocorria nos animais infiltrados com etanol por Nicoletti et al. (2007), porém continuaram a apresentar sensibilidade nos testes do parafuso.

A indefinição em relação a concentração ideal do etanol em injeções perineurais estava presente entre os pesquisadores, pois ainda não havia se determinado a concentração etanólica que fornece uma neurólise duradoura, sem produzir neurite transitória, dor, edema local ou neuroma doloroso. Além disso,

pouco se conhece sobre o tempo de analgesia proporcionada pelas diversas concentrações, que em humanos variam terapêuticamente de 3 a 99,5%, porém com pouca exploração na espécie eqüina (MYERS; KATZ, 1992; QUAN; BIRD, 1999; GASPARINI; SARAIVA, 2004; NICOLETTI et al., 2007).

As composições neurolíticas comerciais mais utilizadas em eqüinos são o produto Equipin® (Cloreto de amônio a 2%) e o Sarapin®, ambos com curto tempo de recuperação da função nervosa. O Sarapin®, em eqüinos, tem efeito analgésico de 2 a 3 meses até 5 meses, segundo respectivamente Madison e Dyson (2003) e Escodro (2004). Já o Cloreto de amônio apresenta tempo de ação ainda menor, de 20 a 60 dias (KOBAYASHI et al., 1997; HERTL et al., 1998; ARAÚJO; BEZERRA; DORNBUSCH, 2010). A SNI, se comparada com os resultados obtidos com Sarapin e Cloreto de Amônio, através dos trabalhos acima citados, sugere superioridade em relação ao tempo prolongado de efeito terapêutico e menores índices de reação inflamatória local.

O uso de agentes neurolíticos deve ser criterioso e realizado exclusivamente por médico veterinário especialista, visto a média incidência de acidentes associados aos fármacos neurolíticos em equinos de esporte, com conseqüências desastrosas devido a quedas e traumas por falta de propriocepção, inclusive com relatos de danos ao cavaleiro. Dessa forma, deve se considerar seu uso de forma paliativa e sempre levando em conta a evolução clínica da doença degenerativa presente.

Durante os 180 dias, não foram constatadas complicações relacionadas com o procedimento, como: fraturas, exungulação, rupturas tendíneas ou acidentes por diminuição de propriocepção, conforme relata ESCODRO (2006). Também é de relevância que todos os animais obtiveram grau 0 de claudicação, não havendo variações na pesquisa devido a efeito parcial, que pode ocorrer devido a inervações acessórias, artrites interfalângicas, artrites metacarpo-falângicas, aderências fibrosas entre o osso navicular e o tendão flexor digital profundo e aplicação neurolítica/anestésica inadequada ou incompleta (STASHAK, 2002).

Portanto os resultados desta pesquisa indicam uma possível resolução na indefinição da concentração etanólica em soluções/ suspensões neurolíticas, visto

que a SNI mostrou-se eficaz até 180 dias, principalmente quanto a concentração e aplicação única perineural, obtendo os efeitos neurolíticos similares aos citados na literatura com etanol 99,5%, porém sem causar reação inflamatória local e/ou prejuízos estéticos (ESCODRO, 2001, MADISON; DYSON, 2003).

E finalmente, do ponto de vista dos custos das composições, a SNI irá representar custo consideravelmente menor que o Sarapin® (mais duradouro dos neurolíticos comerciais), pois é um produto importado, de difícil aquisição e a custo elevado, aproximadamente US\$ 100/frasco ampola de 50 mL.

4.3 Avaliações Bioquímicas

Os resultados foram obtidos de 91 coletas e 273 amostras de soro sanguíneo, realizadas em 7 equinos sendo 2 do Grupo Controle e 5 do Grupo SNI, em treze tempos de amostragem (T), conforme segue-se: 24 horas antes da infiltração da SNI (T1) e nos momentos após infiltração, sendo 6 horas (T2), 24 horas (T3), 48 horas (T4), 72 horas (T5), 96 horas (T6), 7 dias (T7), 30 dias (T8), 60 dias (T9), 90 dias (T10), 120 dias (T11), 150 dias (T12) e 180 dias (T13).

Foram analisados e quantificados os níveis séricos de Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Gamaglutamiltransferase (GGT), Creatinofosfokinase (CK), Uréia e Creatinina (Creat.). Para efeito comparativo das médias obtidas com os valores de referência, consideraram-se as variações citadas por Kaneko; Harvey; Bruss, (2008); Kerber e Trindade (2002); Thomassian (2005), conforme já descrito na Tabela 1.2.

4.3.1 Grupo Controle: Animais infiltrados com Soro Fisiológico

Nas Tabelas 4.8 e 4.9 estão demonstrados os valores dos níveis séricos de ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina obtidos nos EQU1 e EQU2 (Grupo Controle), bem como as médias e desvios padrão, nos diferentes tempos de amostragem (T).

Tabela 4.8 - Valores de ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina obtidos nas amostras séricas dos animais do Grupo Controle de T1(24hs.Pré) até T7(7dias).

ALANINA AMINOTRANSFERASE-ALT (U/l)								
EQU \ T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d	
EQU 1	34	42	45	42	43	38	43	
EQU 2	48	49	50	39	42	45	39	
Méd. (U/l)	41	45,5	47,5	40,5	42,5	41,5	41	
DP	9,899	4,950	3,535	2,121	0,707	4,950	2,828	
ASPARTATO AMINOTRANSFERASE-AST (U/l)								
EQU \ T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d	
EQU 1	212	210	223	212	201	199	189	
EQU 2	164	194	201	189	192	169	184	
Méd. (U/l)	188	202	212	200,5	196,5	184	186,5	
DP	33,94	11,31	15,56	16,26	6,36	21,21	3,53	
GAMAGLUTAMILTRANSFERASE-GGT (U/l)								
EQU \ T	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d		
EQU 1	16	17	18	20	22	21	19	
EQU 2	19	22	20	21	19	17	21	
Méd.(U/l)	17,5	19,5	19	20,5	20,5	19	20	
DP	2,12	3,53	1,41	0,71	2,12	2,83	1,41	
CREATINOFOSFOKINASE-CK (U/L)								
EQU \ T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d	
EQU1	84	132	145	132	106	104	105	
EQU2	96	152	116	96	105	98	102	
Méd. (U/l)	90	142	130,5	114	105,5	101	103,5	
DP	8,49	14,14	20,51	25,46	0,71	4,24	2,12	
URÉIA (mg/dL)								
EQU \ T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d	
EQU 1	108	134	87	62	41	32,6	32,53	
EQU 2	115	146	78,4	45,89	33,4	36,2	37,04	
Méd.(mg/dL)	111,5	140	82,7	53,945	37,2	34,4	34,785	
DP	4,95	8,48	6,08	11,39	5,37	2,54	3,19	
CREATININA –Creat. (mg/dL)								
EQU \ T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d	
EQU 1	1,52	1,45	1,39	1,42	1,46	1,34	1,42	
EQU 2	1,78	1,8	1,63	1,62	1,73	1,52	1,46	
Méd.(mg/dL)	1,65	1,625	1,51	1,52	1,595	1,43	1,44	
DP	0,18	0,25	0,17	0,14	0,19	0,13	0,03	

Fonte: Autor, 2011.

Nota: Legenda: Méd.: Média dos valores da Enzima ou Substância analisada / tempo de amostragem; DP: Desvio Padrão.

Tabela 4.9 - Valores de ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina obtidos nas amostras séricas dos animais do Grupo Controle de T8(30 dias) até T13(180 dias).

ALANINA AMINOTRANSFERASE-ALT (U/l)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU 1	40	37	39	36	37	35
EQU 2	44	49	46	44	46	47
Méd. (U/l)	42	43	42,5	40	41,5	41
DP	2,83	8,48	4,95	5,66	6,36	8,48
ASPARTATO AMINOTRANSFERASE-AST (U/l)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU 1	201	201	198	186	192	184
EQU 2	182	172	169	172	167	171
Méd. (U/l)	191,5	186,5	183,5	179	179,5	177,5
	13,43	20,51	20,51	9,90	17,68	9,19
GAMAGLUTAMILTRANSFERASE-GGT (U/l)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU 1	17	16	17	18	18	16
EQU 2	19	17	18	17	16	17
Méd.(U/l)	18	16,5	17,5	17,5	17	16,5
DP	1,41	0,71	0,71	0,71	1,41	0,71
CREATINOFOSFOKINASE-CK (U/L)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU1	98	94	82	84	88	85
EQU2	89	92	85	87	90	86
Méd. (U/l)	93,5	93	83,5	85,5	89	85,5
DP	6,36	1,41	2,12	2,12	1,41	0,71
URÉIA (mg/dL)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU 1	30,87	32,02	34,08	32,2	33,04	31,9
EQU 2	34,22	37,92	38,31	37,6	35,78	34,46
Méd. (mg/dL)	32,54	34,97	36,19	34,90	34,41	33,18
DP	2,37	4,18	2,99	3,82	1,94	1,81
CREATININA –Creat. (mg/dL)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU 1	1,32	1,18	1,64	1,59	1,62	1,54
EQU 2	1,28	1,43	1,56	1,56	1,46	1,38
Méd. (mg/dL)	1,3	1,305	1,6	1,575	1,54	1,46
DP	0,03	0,18	0,06	0,02	0,11	0,11

Fonte: Autor, 2011.

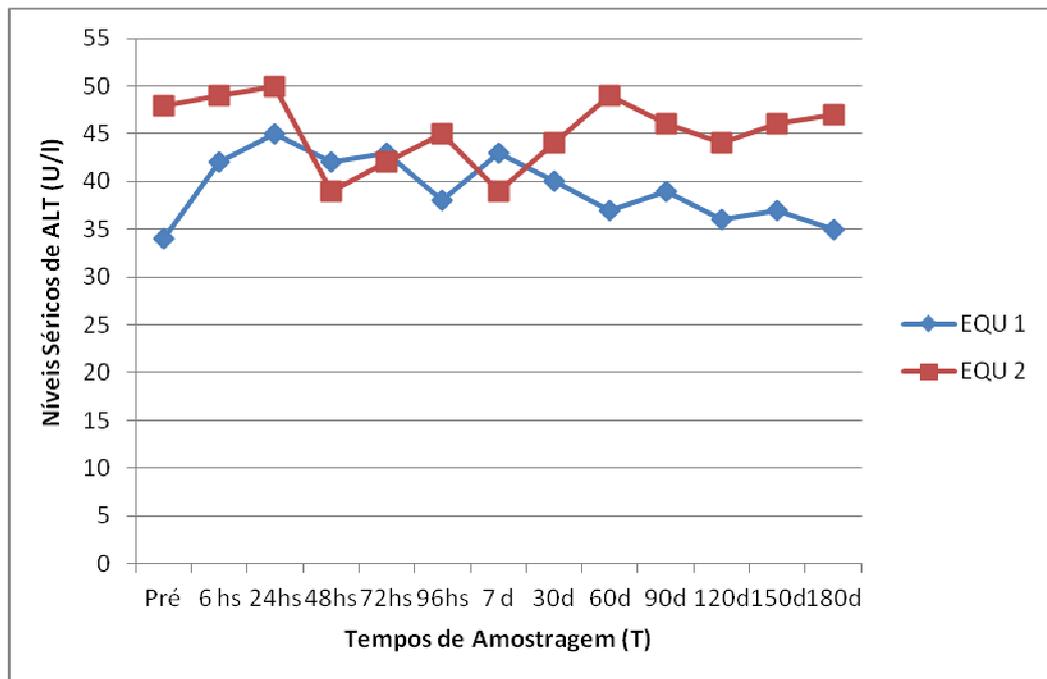
Nota: Legenda: Méd.: Média dos valores da Enzima ou Substância analisada / tempo de amostragem; DP: Desvio Padrão.

4.3.1.1 Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)

Os níveis séricos de ALT e AST, obtidos no EQU1 e EQU2, e suas respectivas variações entre os tempos de amostragem T1 (Pré) e T13 (180 dias), estão demonstrados respectivamente nas Figuras 4.20 e 4.21.

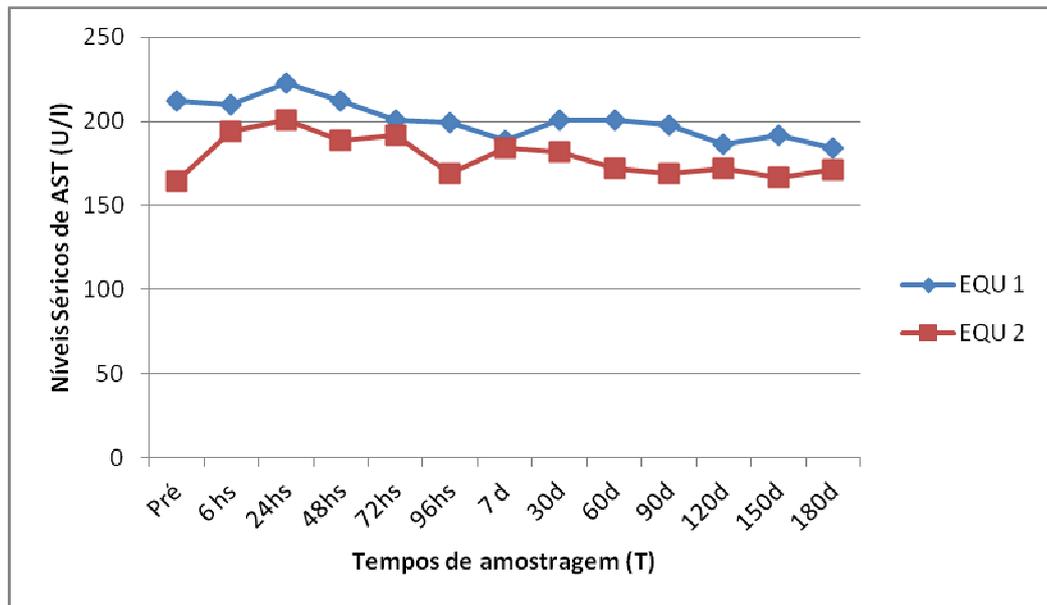
As Figuras 4.22 e 4.23 identificam a variação das médias de ALT e AST nos dois animais do Grupo Controle (EQU1 e EQU2), nos dez tempos de amostragem (T) avaliados nesta pesquisa.

Figura 4.20 - Níveis séricos de ALT nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



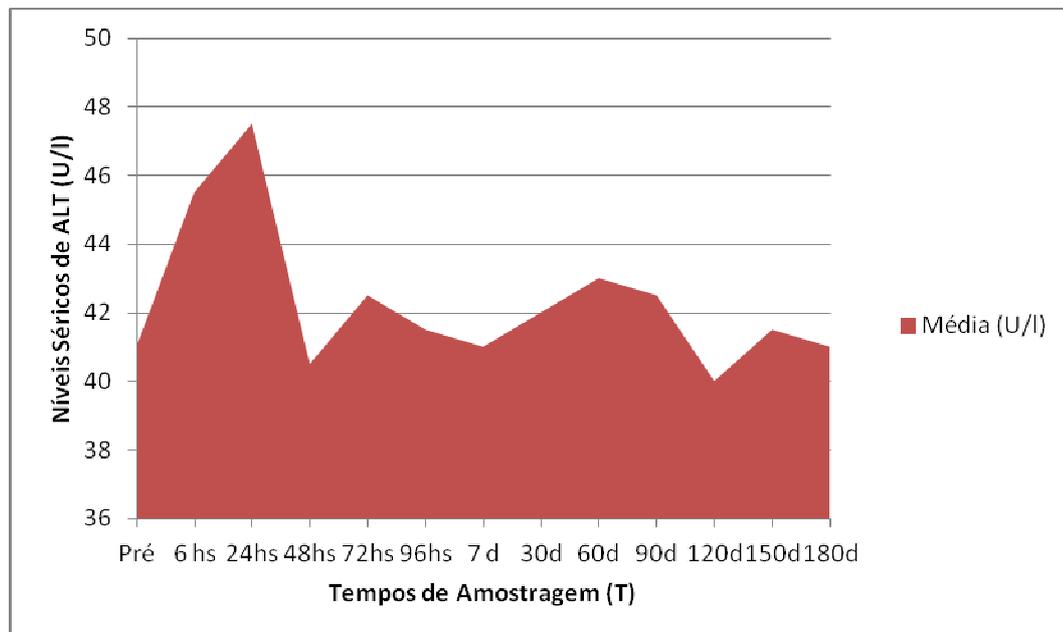
Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.21 - Níveis séricos de AST nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.22 - Variação das médias de ALT séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



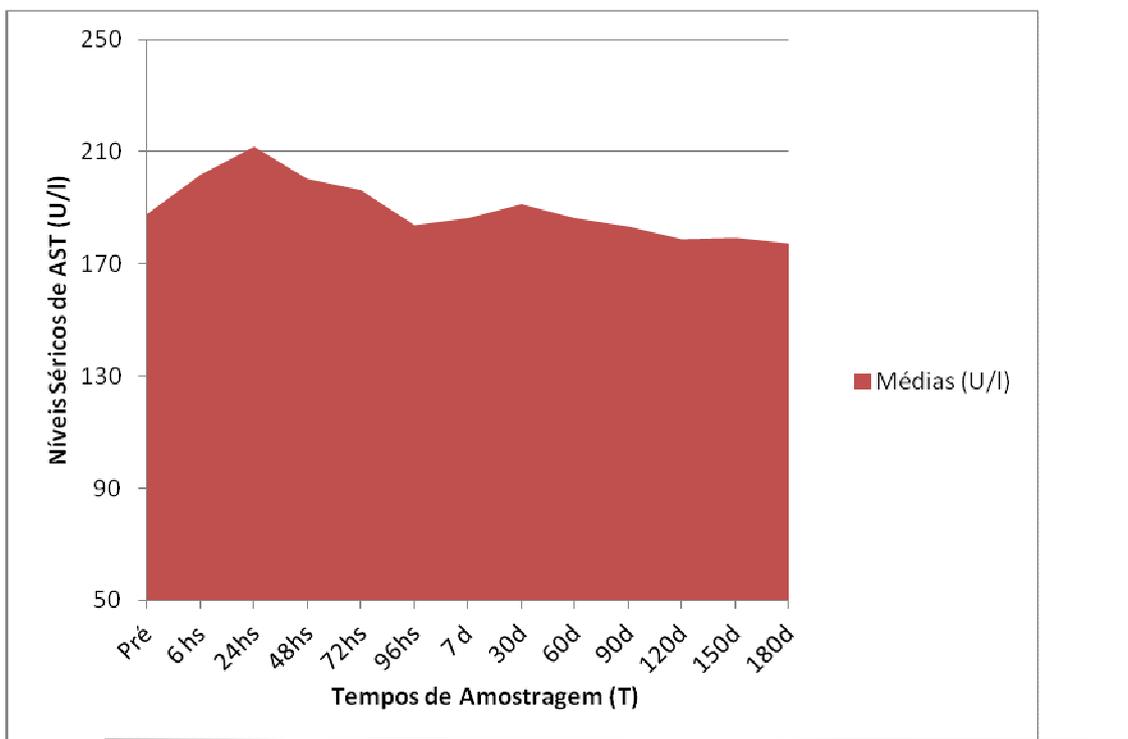
Fonte: Autor, 2011.

Através do Gráfico 4.22, foi observado a elevação da média dos níveis séricos de ALT de 6 até 24 horas, que segundo Meyer; Harvey, 2004 é considerado normal após a administração de fármacos, continuando por tempo variável, dependendo da hepatotoxicidade e frequência de administração da substância. O aumento pode ser indicado devido à atividade enzimática referente aos fragmentos da membrana liberados na circulação, resultado do dano celular pela agulha e infiltração da Solução Fisiológica. Com 48 horas os níveis retornam a faixa de normalidade.

A média e desvio padrão de ALT no EQU1 e EQU2 foram de respectivamente $39,3 \pm 3,47$ e $45,2 \pm 3,58$ U/l. Na análise de variância individual constatou-se nível de significância menor que 1%.

Observa-se que os dois animais do Grupo Controle, mesmo não apresentando alterações significativas entre os momentos, exteriorizaram médias dos níveis séricos de ALT maiores que os referenciados na Tabela 1.1, cujo valor máximo varia de 23 a 25 U/l (KERBER; TRINDADE, 2002; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Figura 4.23 - Variação das médias de AST séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

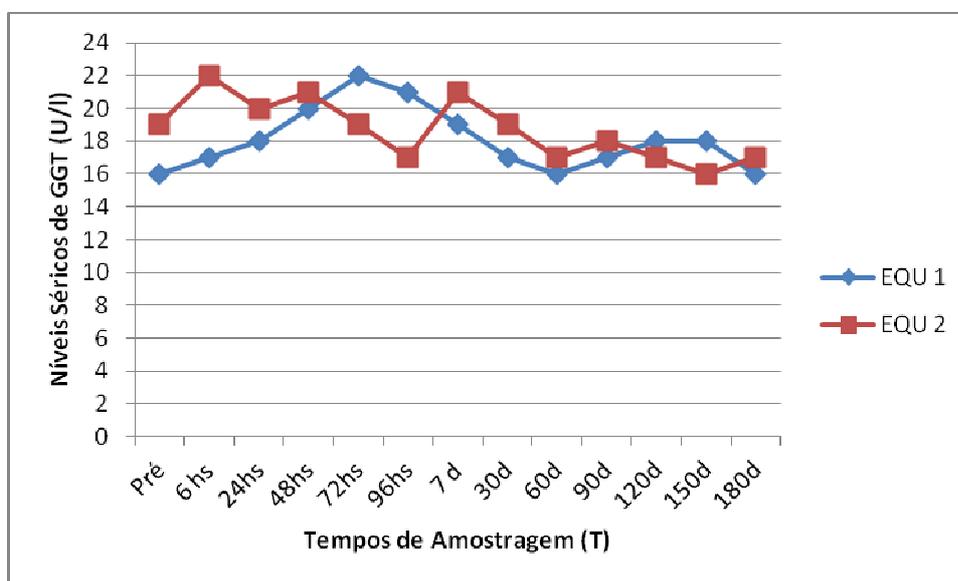
Através do Gráfico 4.23, visualiza-se uma linha de normalidade referente a AST, variando levemente nas primeiras 24 horas, obtendo média e desvio padrão no EQU1 e EQU2, respectivamente de: $200,6 \pm 11,39$ U/l e $178,92 \pm 12,05$ U/l. Na análise de variância individual constatou-se nível de significância menor que 1%.

Observa-se que os dois animais do Grupo Controle, apresentaram médias dos níveis séricos de AST dentro dos valores de referência da Tabela 1.2, que varia de 200 a 500 U/l para Kerber e Trindade (2002); e 226 a 336 U/l para Thomassian (2005); Kaneko; Harvey; Bruss. (2008).

4.3.1.2 Gamaglutamiltransferase (GGT)

Os níveis séricos de GGT obtidos no EQU1 e EQU2, e suas respectivas variações entre os tempos de amostragem T1 (Pré) e T13 (180 dias), estão demonstrados na Figura 4.24.

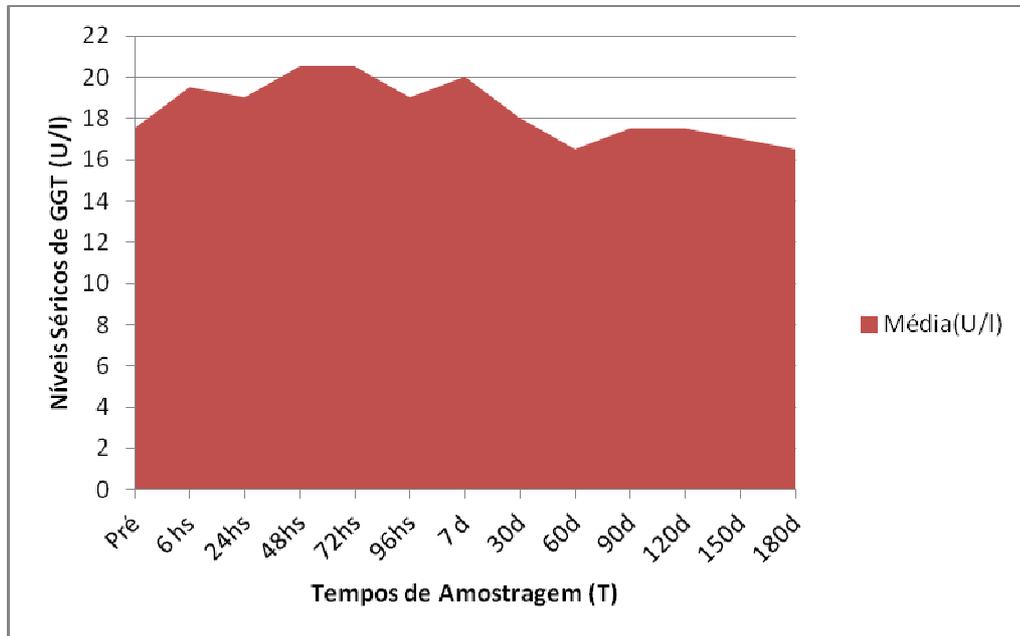
Figura 4.24 - Níveis séricos de GGT nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

A Figura 4.25 identifica a variação das médias de GGT nos dois animais do Grupo Controle (EQU1 e EQU2), nos dez tempos de amostragem (T) avaliados nesta pesquisa.

Figura 4.25 - Variação das médias de GGT séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011

Através do Gráfico 4.25 foi observado que não ocorreu variação significativa entre os valores médios dos níveis séricos de GGT.

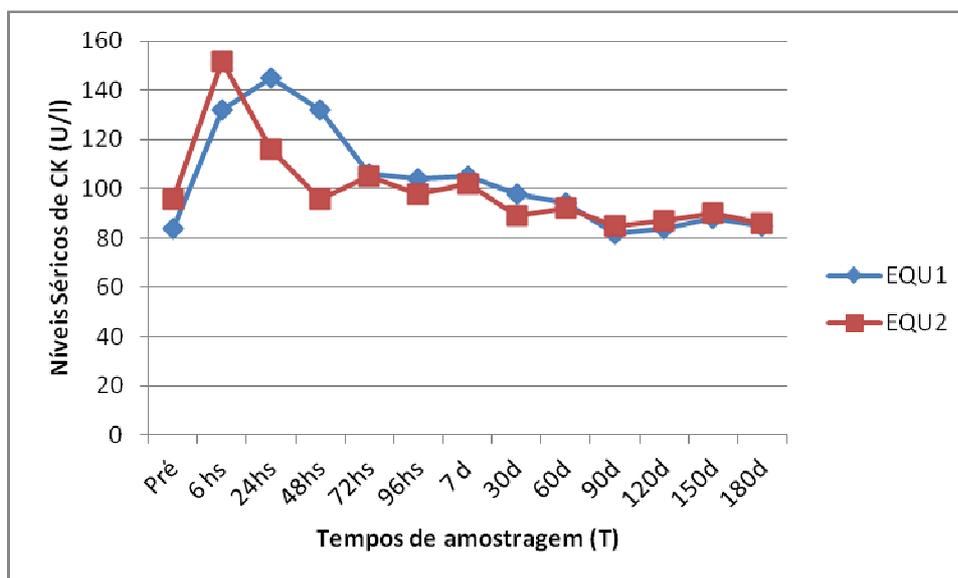
A média e desvio padrão de GGT no EQU1 e EQU2 foram de respectivamente: $18,07 \pm 1,93$ U/l e $18,69 \pm 1,88$ U/l. Na análise de variância individual constatou-se nível de significância menor que 1%.

Observa-se que os dois animais do Grupo Controle apresentaram médias dos níveis séricos de GGT dentro dos valores de referência para Kerber e Trindade (2002) que é de 12 a 45 U/l.

4.3.1.3 Creatinofosfokinase (CK)

Os níveis séricos de CK obtidos no EQU1 e EQU2, e suas respectivas variações entre os tempos de amostragem T1 (Pré) e T13 (180 dias), estão demonstrados na Figura 4.26.

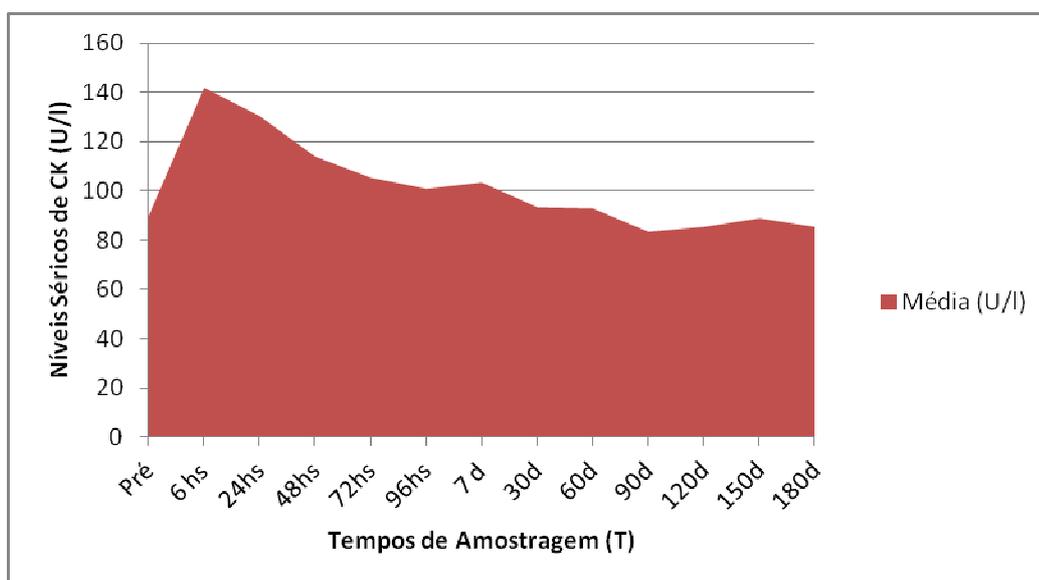
Figura 4.26- Níveis séricos de CK nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

A Figura 4.27 identifica a variação das médias de CK nos dois animais do Grupo Controle (EQU1 e EQU2), nos dez tempos de amostragem (T) avaliados nesta pesquisa.

Figura 4.27 - Variação das médias de CK séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011

Através do gráfico 4.27. foi observado um pico de CK em 6 horas, podendo o aumento ser justificado pelos exercícios durante as avaliações da sensibilidade do casco nas primeiras seis horas, visto que foram sete avaliações para 4 parafusos, totalizando 28 corridas. Segundo Kerber e Trindade (2002), o aumento de CK é detectado rapidamente em qualquer esforço ou exercício muscular, sendo um importante marcador para a espécie eqüina. A partir de 24 horas a faixa de normalidade se restabelece.

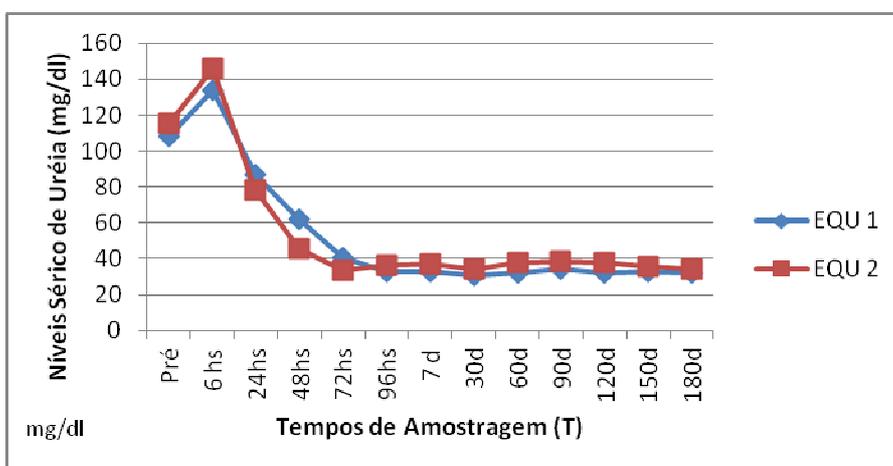
A média e desvio padrão de CK no EQU1 e EQU2 foram de respectivamente $103 \pm 20,9$ e $99,53 \pm 18,02$ U/l. Na análise de variância individual constatou-se nível de significância menor que 5%.

Observa-se que os dois animais do Grupo Controle, apresentaram médias dos níveis séricos de CK dentro dos valores de referência para Kerber e Trindade (2002), que é de 90 a 500 U/l.

4.3.1.4 Uréia

Os níveis séricos de Uréia obtidos no EQU1 e EQU2, e suas respectivas variações entre os tempos de amostragem T1 (Pré) e T13 (180 dias), estão demonstrados na Figura 4.28.

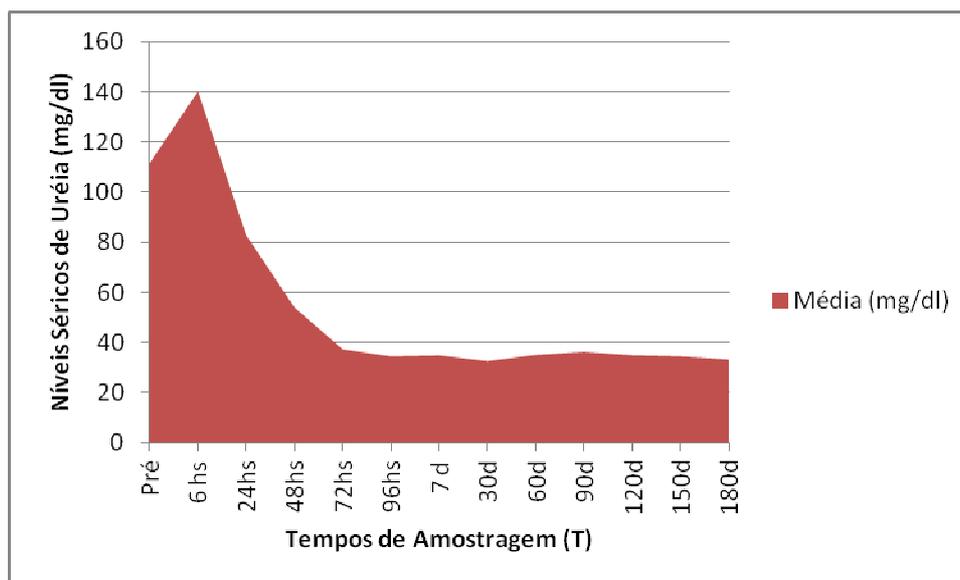
Figura 4.28 - Níveis séricos de Uréia (mg/dL) nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

A Figura 4.29 identifica a variação das médias de Uréia nos dois animais do Grupo Controle (EQU1 e EQU2), nos dez tempos de amostragem (T) avaliados nesta pesquisa.

Figura 4.29 -Variação das médias de Uréia séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

Através do Gráfico 4.29 foi observado níveis séricos de Uréia altos no início das avaliações até 6 horas, podendo o aumento ser justificado pelos jejum dos animais durante as avaliações (Meyer; Harvey, 2004; NELSON; COUTO, 2006b).

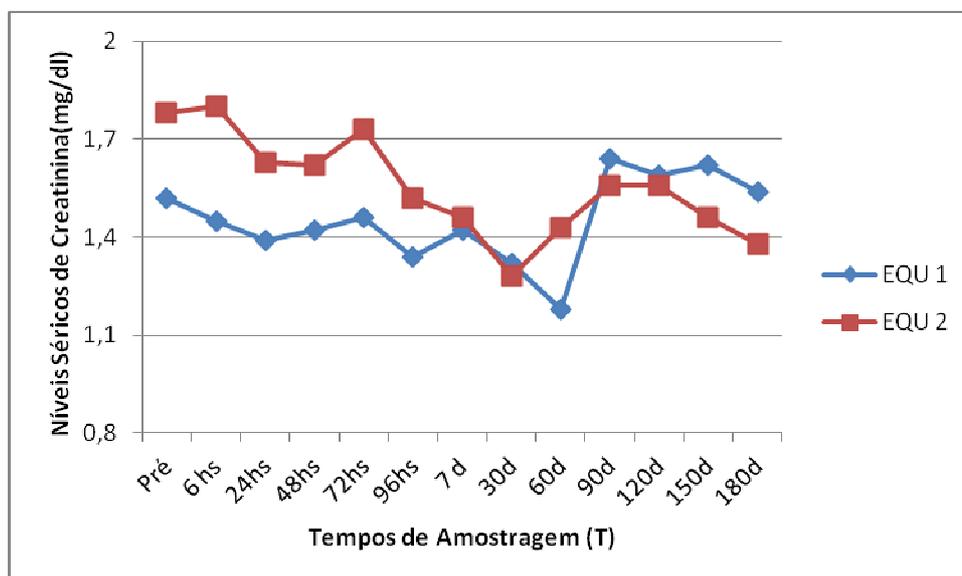
A média e desvio padrão de Uréia no Animal 1 e Animal 2 foram de respectivamente $53,17 \pm 34,59$ mg/dL e $54,63 \pm 36,22$ mg/dL. Na análise de variância individual constatou-se nível de significância menor que 5%.

Observa-se que os dois animais do Grupo Controle apresentaram médias superiores dos níveis séricos de Uréia de referência que variam de 8 mg/dL (KERBER; TRINDADE, 2002) a 47 mg/dL (THOMASSIAN, 2005).

4.3.1.5 Creatinina

Os níveis séricos de Creatinina obtidos no EQU1 e EQU2, e suas respectivas variações entre os tempos de amostragem T1 (Pré) e T13 (180 dias), estão demonstrados na Figura 4.30.

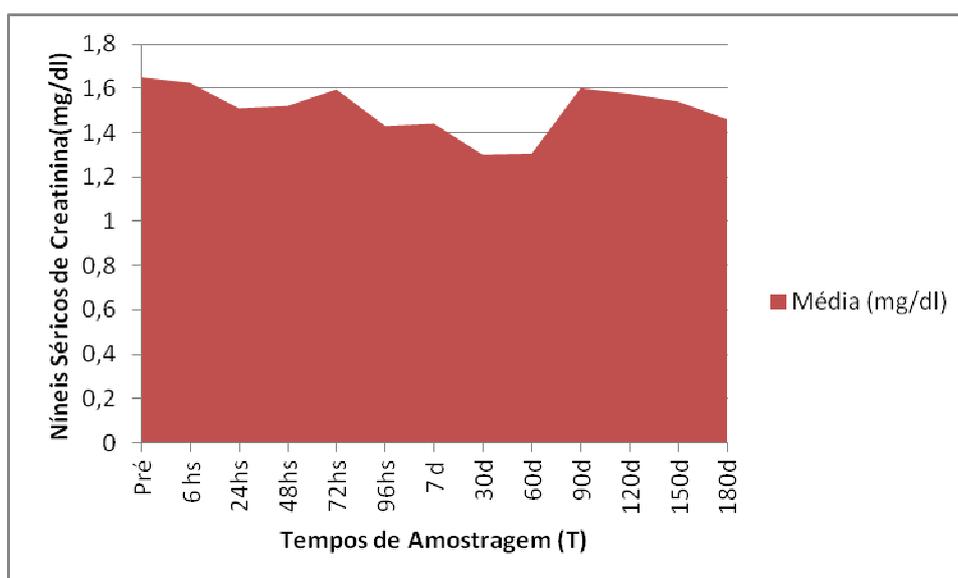
Figura 4.30 - Níveis séricos de Creatinina (mg/dL) nos equinos do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

A Figura 4.31 identifica a variação das médias de Creatinina nos dois animais do Grupo Controle (EQU1 e EQU2), nos dez tempos de amostragem (T) avaliados nesta pesquisa.

Figura 4.31 - Variação das médias de Creatinina séricas nos animais do Grupo Controle entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

A média e desvio padrão de Creatinina no Animal 1 e Animal 2 foram de respectivamente $1,45 \pm 0,13$ mg/dL e $1,55 \pm 0,15$ mg/dL. Na análise de variância individual constatou-se nível de significância menor que 1%.

Observa-se que os dois animais do Grupo Controle apresentaram médias dos níveis séricos de Uréia dentro dos valores de referência, que varia de 0,6 a 1,9 mg/dL (KERBER; TRINDADE, 2002; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

4.3.2 Grupo SNI: Animais infiltrados com a SNI

Nas Tabelas 4.10 e 4.11 estão demonstrados os valores dos níveis séricos de ALT,AST,GGT,CK, Uréia e Creatinina obtidos nos cinco animais do Grupo SNI, bem como as médias e desvios padrão, nos diferentes tempos de amostragem (T).

Tabela 4.10 - Valores de ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina obtidos nas amostras séricas dos animais do Grupo SNI de T1(24hs.Pré) até T7(7dias).

(continua)

		ALANINA AMINOTRANSFERASE-ALT (U/I)						
QUE	T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d
	EQU 3	38	42	41	37	42	36	43
	EQU 4	48	45	49	46	42	45	49
	EQU 5	18	19	16	18	20	19	21
	EQU 6	24	26	24	25	24	24	23
	EQU 7	45	47	44	46	45	42	49
	Med.(U/I)	34,6	35,8	34,8	34,4	34,6	33,2	37
	DP	13,56	12,52	15,15	12,45	11,66	11,75	14,09
		ASPARTATO AMINOTRANSFERASE-AST (U/I)						
QUE	T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d
	EQU 3	184	213	234	204	197	186	190
	EQU 4	158	198	199	187	199	180	192
	EQU 5	136	146	197	146	159	145	156
	EQU 6	235	251	291	271	273	205	239
	EQU 7	235	234	276	280	281	278	287
	Méd. (U/I)	189,6	208,4	239,4	217,6	221,8	198,8	212,8
	DP	44,79	40,29	43,19	56,99	52,93	49,30	50,92
		GAMAGLUTAMILTRANSFERASE-GGT (U/I)						
QUE	T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d
	EQU 3	18	20	20	19	24	20	18
	EQU 4	19	21	21	22	20	19	21
	EQU 5	21	19	20	18	19	19	21
	EQU 6	19	18	21	20	19	17	18

(Conclusão)							
EQU 7	14	12	15	13	11	15	13
Méd. (U/l)	18,2	18	19,4	18,4	18,6	18	18,2
DP	2,59	3,53	2,51	3,36	4,72	2,00	3,27
CREATINOFOSFOKINASE-CK (U/L)							
T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d
QUE							
EQU3	83	123	102	98	106	102	110
EQU4	102	142	119	94	102	104	104
EQU5	123	202	190	163	130	110	106
EQU6	81	109	134	116	96	102	97
EQU7	94	124	119	102	100	98	96
Méd. (U/l)	96,6	140	132,8	114,6	106,8	103,2	102,6
DP	17,04	36,58	33,92	28,30	13,46	4,38	5,98
URÉIA (mg/dL)							
T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d
QUE							
EQU 3	109	125	68,17	43,41	32,12	31,23	32,04
EQU 4	123,3	105,8	58,29	42,21	33,4	29,9	31,04
EQU 5	119,21	121,02	59,12	48,54	39,08	38,02	35,24
EQU 6	98,9	104,08	64,22	44,82	32,02	32,72	32,42
EQU 7	117,48	118,04	58,62	49,02	46,78	39,02	36,8
Méd. (mg/l)	113,58	114,79	61,68	45,60	36,68	34,18	33,51
DP	9,72	9,34	4,36	3,05	6,34	4,10	2,41
CREATININA –Creat. (mg/dL)							
T	Pré	6 hs	24hs	48hs	72hs	96hs	7 d
QUE							
EQU 3	1,28	1,24	1,45	1,38	1,46	1,2	1,4
EQU 4	1,85	1,7	1,45	1,38	1,52	1,34	1,44
EQU 5	2,06	1,97	1,82	1,74	1,72	1,64	1,82
EQU 6	1,88	2,04	1,76	1,68	1,48	1,42	1,68
EQU 7	1,8	1,78	1,64	1,58	1,32	1,3	1,18
Méd. (mg/dL)	1,77	1,75	1,62	1,55	1,50	1,38	1,50
DP	0,29	0,31	0,17	0,17	0,14	0,16	0,25

Fonte: Autor, 2011.

Nota: Legenda: Méd.: Média dos valores da Enzima ou Substância analisada / tempo de amostragem;
DP: Desvio Padrão.

**Tabela 4.11 - Valores de ALT, AST, GGT, CK, Uréia e Creatinina obtidos nas amostras séricas dos animais do Grupo SNI de T8(30 dias) até T13(180 dias).
(continua)**

ALANINA AMINOTRANSFERASE-ALT (U/l)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU 3	41	37	41	39	38	40
EQU 4	47	44	47	45	46	43
EQU 5	23	19	20	23	20	19
EQU 6	26	24	26	23	27	25
EQU 7	45	48	47	45	43	49
Med.(U/l)	36,4	34,4	36,2	35,0	34,8	35,2
DP	11,59	11,51	12,61	11,24	11,53	11,59
ASPARTATO AMINOTRANSFERASE-AST (U/l)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU 3	189	204	199	197	195	193
EQU 4	176	201	192	189	191	187
EQU 5	161	189	172	181	173	175
EQU 6	249	212	230	219	225	218
EQU 7	260	240	272	254	281	273
Med.(U/l)	207	209,2	213	208	213	209,2
DP	44,65	19,10	39,01	29,36	42,36	38,96
GAMAGLUTAMILTRANSFERASE-GGT (U/l)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU 3	19	19	18	19	17	18
EQU 4	19	18	21	18	19	20
EQU 5	19	19	19	20	19	19
EQU 6	20	21	19	21	20	22
EQU 7	12	13	12	13	14	13
Med.(U/l)	17,8	18	17,8	18,2	17,8	18,4
DP	3,27	3,00	3,42	3,11	2,39	3,36
CREATINOFOSFOKINASE-CK (U/L)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU3	98	92	80	88	92	83
EQU4	94	92	84	80	82	92
EQU5	123	118	116	104	112	106
EQU6	88	85	84	92	88	94
EQU7	94	102	92	102	98	92
Med.(U/l)	99,4	97,8	91,2	93,2	94,4	93,4
DP	13,67	12,81	14,53	9,96	11,44	8,23
URÉIA (mg/dL)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU 3	30,98	31,72	30,94	30,87	31,23	30,92
EQU 4	32,02	30,08	29,96	29,64	28,9	30,1

(Conclusão)						
EQU 5	35,2	34,88	35,12	36,01	36,2	34,1
EQU 6	29,82	30,46	29,22	29,45	29,9	28,76
EQU 7	35,42	34,22	35,36	35,4	35,18	35,22
Med.(mg/dL)	32,688	32,272	32,12	32,274	32,282	31,82
DP	2,52	2,18	2,91	3,19	3,24	2,73
CREATININA –Creat. (mg/dL)						
T	30d	60d	90d	120d	150d	180d
EQU						
EQU 3	1,28	1,22	1,1	1,18	1,24	1,32
EQU 4	1,3	1,32	1,4	1,5	1,32	1,43
EQU 5	1,72	1,68	1,7	1,72	1,63	1,58
EQU 6	1,38	1,28	1,2	1,3	1,18	1,24
EQU 7	1,1	1,16	1,1	1,114	1,22	1,32
Med.(mg/dL)	1,356	1,332	1,3	1,3628	1,318	1,378
DP	0,23	0,20	0,25	0,25	0,18	0,13

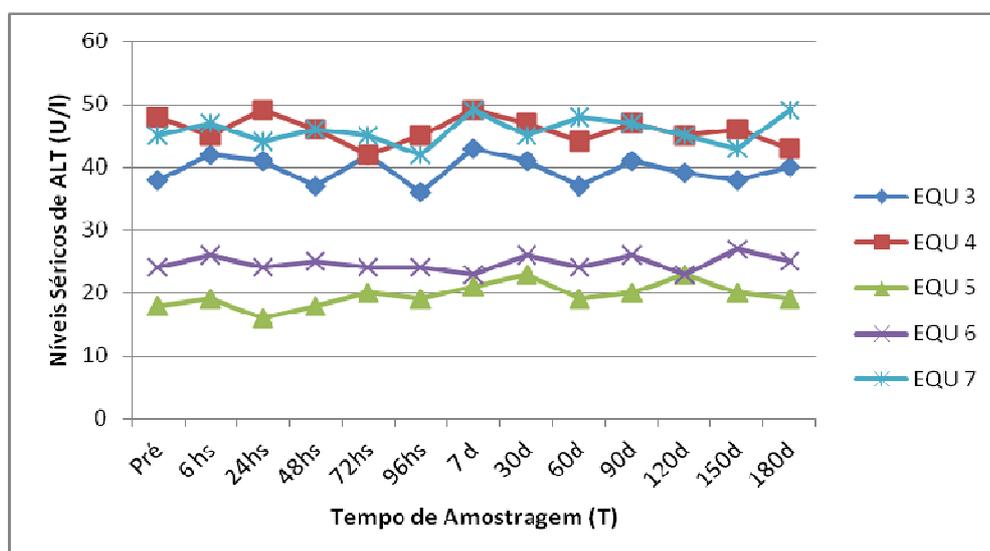
Fonte: Autor, 2011.

Nota: Legenda: Méd.: Média dos valores da Enzima ou Substância analisada / tempo de amostragem; DP: Desvio Padrão.

4.3.2.1 Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)

Os níveis séricos de ALT e AST, obtidos nos animais do Grupo SNI (EQU3 a EQU7), e suas respectivas variações entre os tempos de amostragem T1 (Pré) e T13 (180 dias), estão demonstrados respectivamente nas Figuras 4.32 e 4.33.

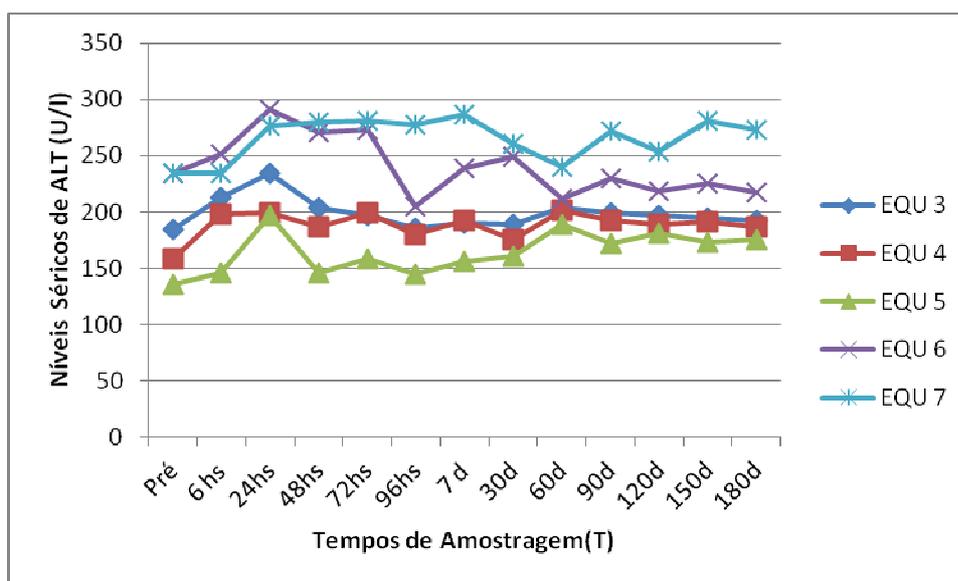
Figura 4.32 - Níveis séricos de ALT nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

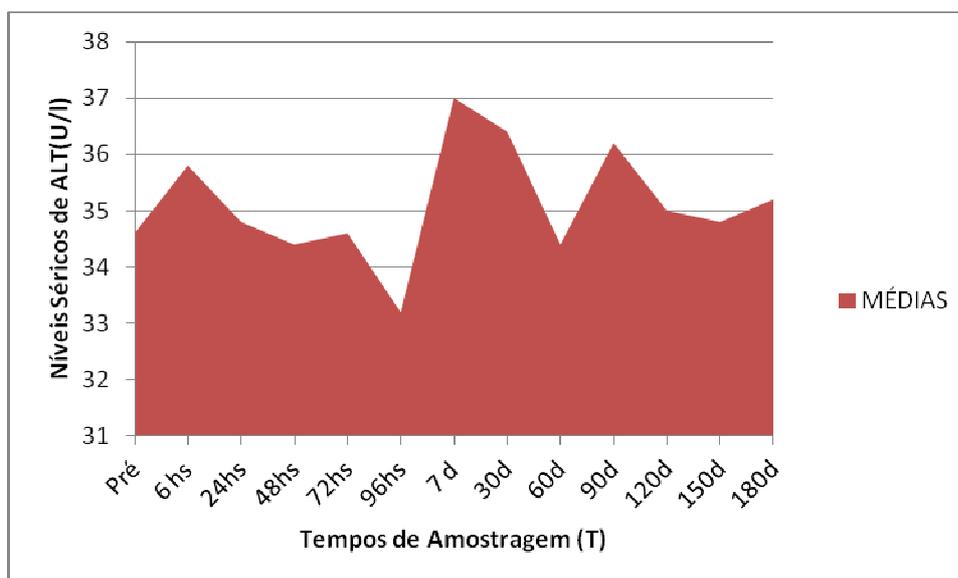
As Figuras 4.34 e 4.35 identificam a variação das médias de ALT e AST nos dois animais do Grupo SNI, nos dez tempos de amostragem (T) avaliados nesta pesquisa

Figura 4.33 - Níveis séricos de AST nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.34 - Variação das médias de ALT séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

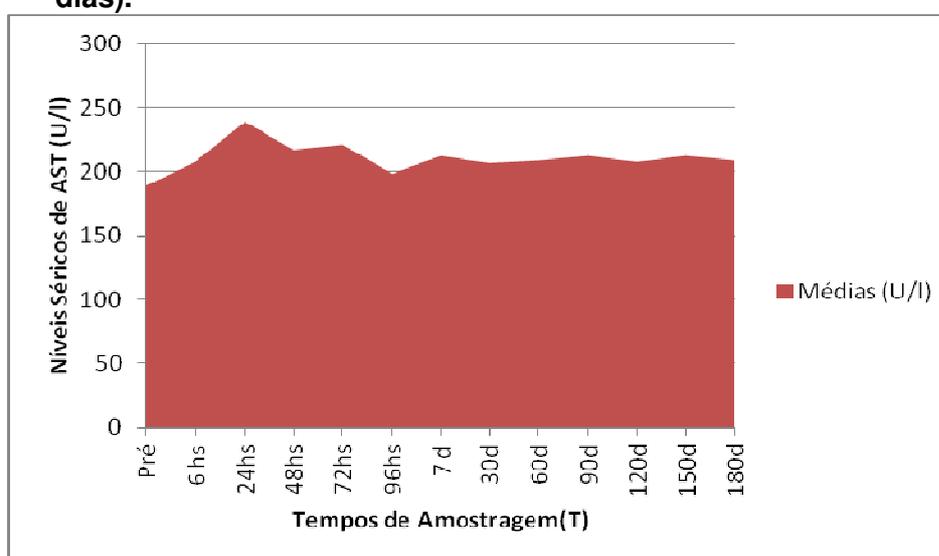
A média e desvio padrão de ALT nos animais do Grupo SNI foi de $35,1 \pm 11,1$ U/l, obtendo-se nível de significância menor que 1%. Desta forma a SNI não apresentou alterações significativas nos níveis de ALT.

Observa-se que os animais do Grupo SNI apresentaram médias dos níveis séricos de ALT aumentadas em relação aos de referência (Tabela 1.2.), que tem como limite máximo 25 U/l, citado por Kerber e Trindade (2002).

Realizando estudo comparativo entre o Grupo Controle e o Grupo SNI, analisa-se que no primeiro houve elevação da média dos níveis séricos de ALT de 6 até 24 horas, que provavelmente ocasionou-se devido a atividade enzimática resultado do dano celular da infiltração da Solução Fisiológica. Nos animais do Grupo SNI não foi observado tal fato, podendo indicar a justificativa de que a presença de bupivacaína e triancinolona na sua formulação, proporciona diminuição dos mediadores inflamatórios locais e lesões de injúria celular, com conseqüente manutenção da ALT sérica.

A média e desvio padrão de AST nos animais do Grupo SNI foi de $211,3 \pm 40,8$ U/l, obtendo-se nível de significância menor que 1%. e apresentando médias dos níveis séricos de AST dentro dos valores de referência de Kerber e Trindade (2002), que são de 200 a 500 U/l..

Figura 4.35 - Variação das médias de AST séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



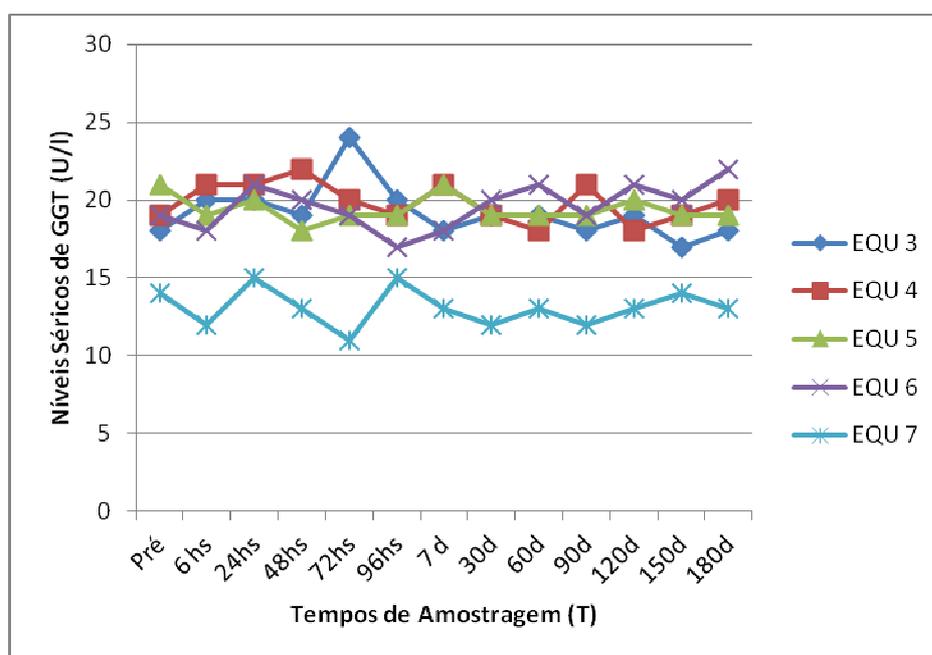
Fonte: Autor, 2011.

4.3.2.2 Gamaglutamiltransferase (GGT)

Os níveis séricos de GGT obtidos nos animais do Grupo SNI, e suas respectivas variações entre os tempos de amostragem T1 (Pré) e T13 (180 dias), estão demonstrados na Figura 4.36.

A Figura 4.37 identifica a variação das médias de GGT cinco animais do Grupo SNI (EQU3 e EQU7), nos dez tempos de amostragem (T) avaliados nesta pesquisa.

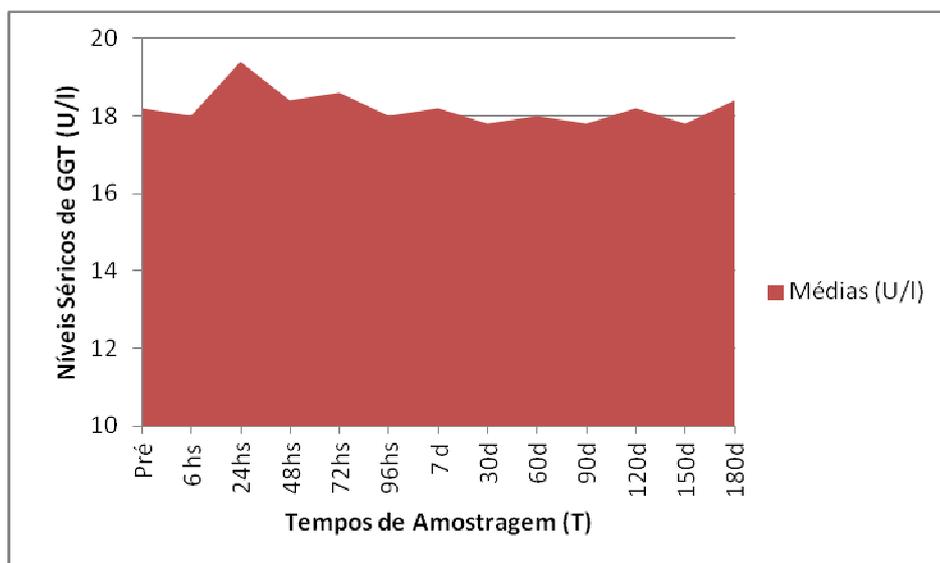
Figura 4.36 - Níveis séricos de GGT nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

A média e desvio padrão de GGT nos animais do Grupo SNI foi de $18,21 \pm 2,9$ U/l. Na análise de variância individual constatou-se nível de significância menor que 1%. Observa-se que os animais do Grupo SNI apresentaram médias dos níveis séricos de GGT dentro dos valores de referência para Kerber e Trindade (2002), que é de 12 a 45 U/l.

Figura 4.37 - Variação das médias de GGT séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).

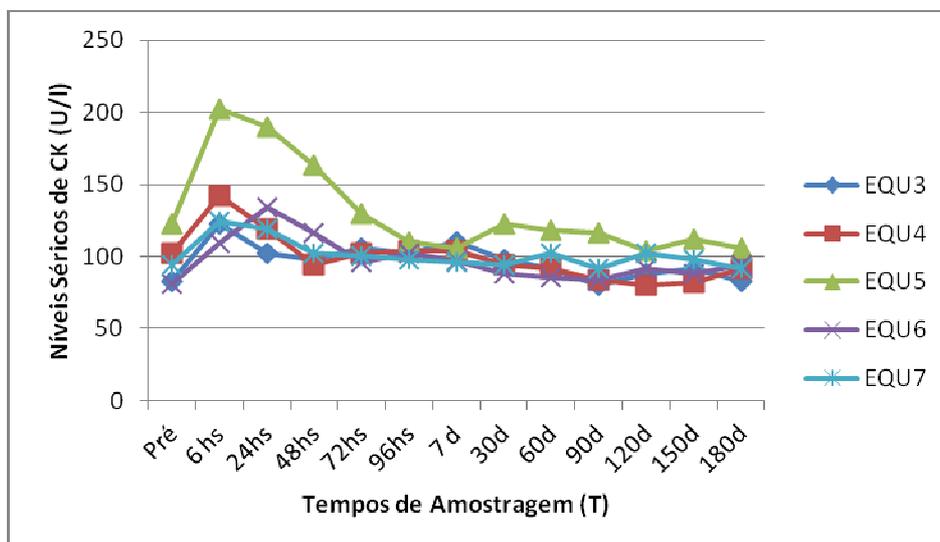


Fonte: Autor, 2011.

4.3.2.3 Creatinofosfokinase (CK)

Os níveis séricos de CK obtidos nos animais do Grupo SNI, e suas respectivas variações entre os tempos de amostragem T1 (Pré) e T13 (180 dias), estão demonstrados na Figura 4.38.

Figura 4.38 - Níveis séricos de CK nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

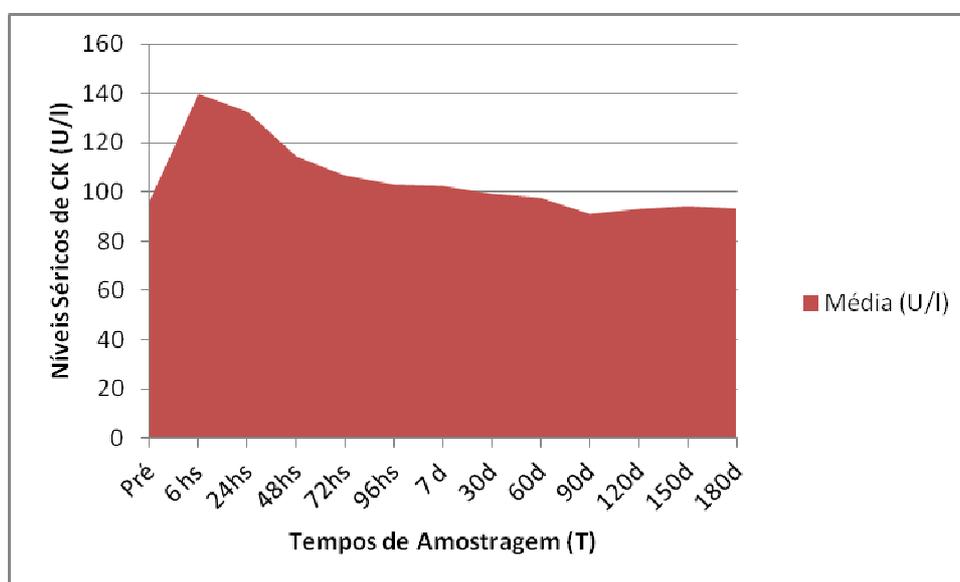
A Figura 4.39 identifica a variação das médias de CK nos dois animais do Grupo SNI, nos dez tempos de amostragem (T) avaliados nesta pesquisa.

Através do Gráfico 4.39, foi observado um pico de CK em 6 horas, como no Grupo Controle, reafirmando que o aumento pode ser justificado pelos exercícios durante as avaliações nas primeiras seis horas.

A média e desvio padrão de CK nos animais do GRUPO B foram de $105,03 \pm 22,77$ U/l. Na análise de variância individual constatou-se nível de significância menor que 1%.

Observa-se que os animais do Grupo SNI apresentaram médias dos níveis séricos de CK dentro dos valores de referência para Kerber e Trindade (2002), que variam de 90 a 500 U/l.

Figura 4.39 - Variação das médias de CK séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



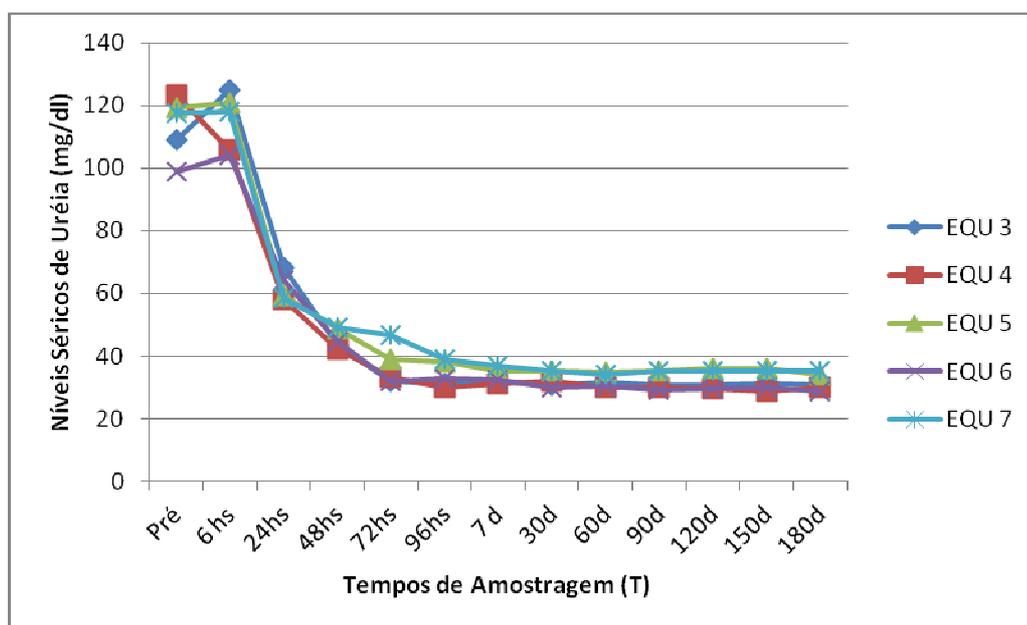
Fonte: Autor, 2011.

4.3.2.4 Uréia

Os níveis séricos de Uréia (mg/dL) obtidos nos animais do Grupo SNI, e suas respectivas variações entre os tempos de amostragem T1 (Pré) e T13 (180 dias), estão demonstrados na Figura 4.40.

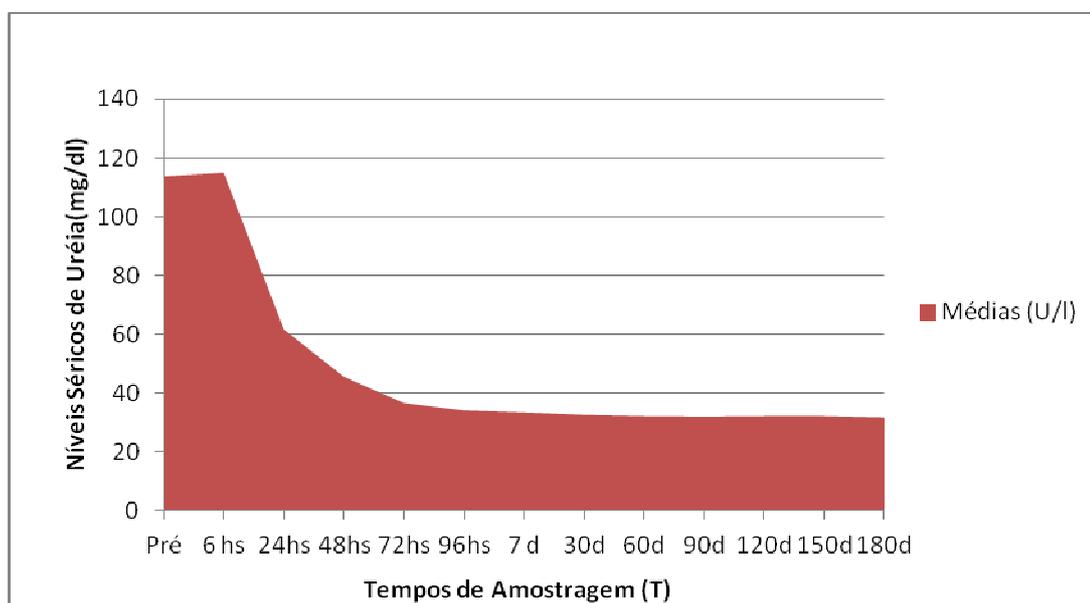
A Figura 4.41 identifica a variação das médias de Uréia nos cinco animais do Grupo SNI (EQU3 a EQU7), nos dez tempos de amostragem (T) avaliados nesta pesquisa.

Figura 4.40 - Níveis séricos de Uréia nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

Figura 4.41 - Variação das médias de Uréia séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

Através do Gráfico 4.41, foi observado níveis séricos de Uréia altos no início das avaliações até 6 horas, conforme já constatado no Grupo Controle, podendo o aumento ser justificado pelos jejum dos animais durante as avaliações (Meyer; Harvey, 2004; NELSON; COUTO, 2006b).

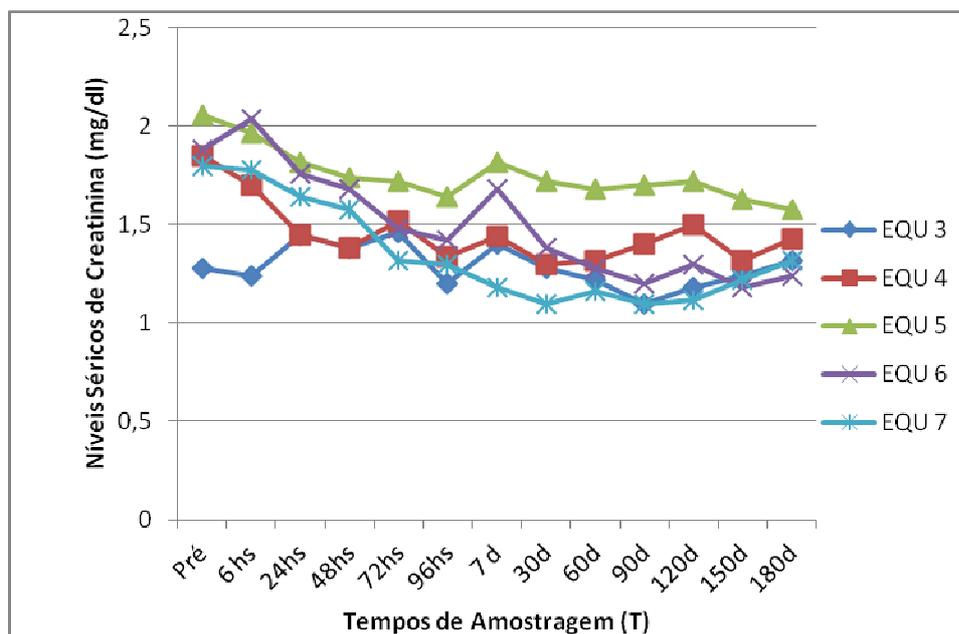
A média e desvio padrão de Uréia nos animais do Grupo SNI foi de $48,87 \pm 29,52$ U/l. Na análise de variância individual constatou-se nível de significância menor que 1%.

Observa-se que os animais do Grupo SNI apresentaram médias dos níveis séricos de Uréia perto do valor de referência máximo citado por Thomassian (2005), que é de 47 mg/dL.

4.3.2.5 Creatinina

Os níveis séricos de Creatinina obtidos nos animais do Grupo SNI, e suas respectivas variações entre os tempos de amostragem T1 (Pré) e T13 (180 dias), estão demonstrados na Figura 4.42.

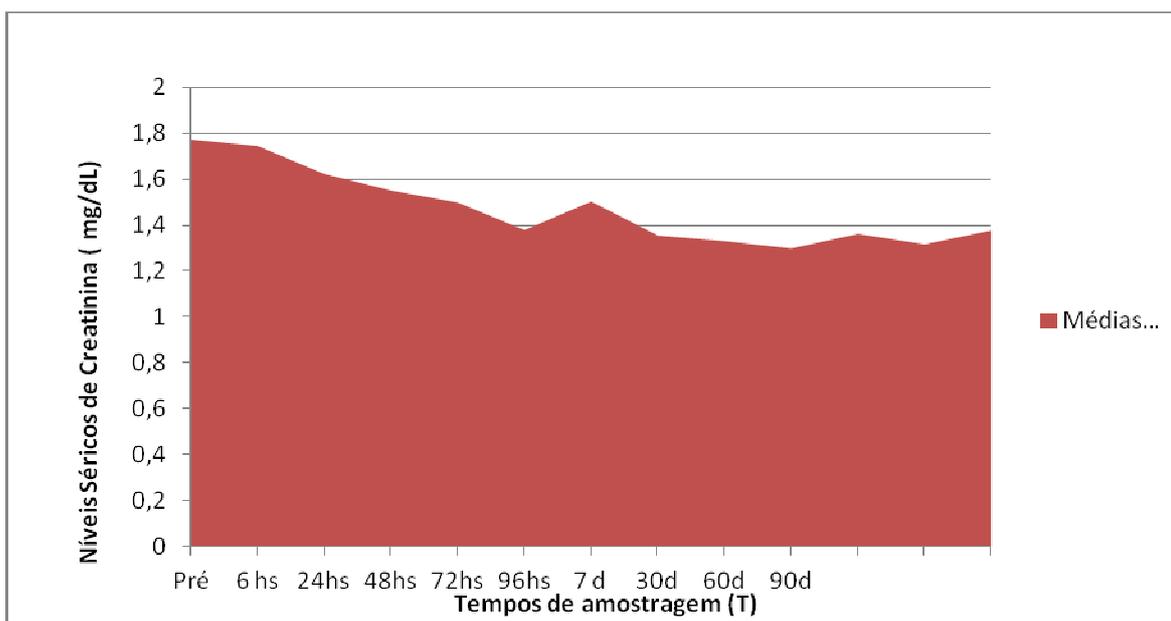
Figura 4.42 - Níveis séricos de Creatinina nos equinos do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

A Figura 4.43 identifica a variação das médias de Creatinina nos cinco animais do Grupo Controle (EQU3 a EQU7), nos dez tempos de amostragem (T) avaliados nesta pesquisa.

Figura 4.43 - Variação das médias de Creatinina séricas nos animais do Grupo SNI entre os tempos de amostragem T1 (24 horas antes da infiltração) e T13 (180 dias).



Fonte: Autor, 2011.

A média e desvio padrão de Creatinina para os animais do Grupo SNI foram de $1,46 \pm 0,26$ U/l. Na análise de variância individual constatou-se nível de significância menor que 1%.

Observa-se que os animais do Grupo SNI apresentaram médias dos níveis séricos de Creatinina dentro dos valores de referência de 0,6 a 1,9 mg/dL (KERBER; TRINDADE, 2002; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

5 CONCLUSÕES

Levando em conta os dados experimentais aqui obtidos, pode-se concluir:

- Sobre a estabilidade química da composição desenvolvida: a bupivacaína apresentou-se estável na suspensão até 180 dias, mesmo em condições extremas (40°C e 75% de UR). A SNI apresentou perda de triancinolona acima de 10% em 180 dias em condições de temperatura de 30°C, e acima de 10 % em 60 dias a 40°C. Por outro lado, nas temperaturas de 4°C e 20°C não ocorreu perda de material, indicando estabilidade plena no período investigado. A partir dos dados obtidos pode-se sugerir que o armazenamento e transporte da SNI devem ocorrer sob condição de refrigeração branda ou ser preparada no momento do uso (forma extemporânea);
- Sobre o fármaco desenvolvido: a SNI apresentou efeito analgésico durante 180 dias, apresentando baixos índices de reação inflamatória e dor no local da infiltração;
- Sobre a toxicidade do fármaco desenvolvido: no período analisado (180 dias) a invenção não causou alterações significativas nos níveis séricos de AST, ALT, GGT, CK, Uréia e Creatinina, isentando a SNI de toxicidade hepática, renal e muscular, quando em aplicação única perineural;
- Sobre o método de indução de dor: a metodologia utilizada nesta pesquisa, através de ferradura com parafusos, foi eficiente para induzir claudicação, sem causar seqüela nos animais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 Tópicos Promissores

- Primeiramente deve ser destacado, como fator relevante da pesquisa, a interação entre a Química, Farmácia, Bioquímica e Medicina Veterinária, que conjuntamente possibilitou a realização da pesquisa, propondo futuras parcerias e linhas de pesquisas interdisciplinares;
- A parceria supracitada possibilitou a pesquisa da avaliação clínica, toxicidade e estabilidade química da composição neurolítica proposta, fruto de anos de experiência clínica do doutorando, alicerçada aqui de maneira científica interdisciplinar;
- A pesquisa possibilitará a criação de um método de validação de mensuração simultânea de Triancinolona e Bupivacaína por HPLC-UV, com publicações futuras;
- O desenvolvimento da metodologia que agrega eletroestimulação localizada para identificação nervosa, associada à administração de fármacos, permitirá abertura de novas frentes de pesquisa;
- A metodologia de indução de dor podal em eqüinos pode ser aproveitado no ensino de claudicação e estudo dos bloqueios anestésicos em eqüinos;
- A partir do método cromatográfico desenvolvido, o Grupo de Pesquisa vislumbra pesquisas de mensurações de bupivacaína e triancinolona em fluidos biológicos de eqüinos, entre eles: líquido sinovial e líquido cefalorraquidiano;
- Através da pesquisa houve o fortalecimento do Grupo de Pesquisa em Equídeos da Universidade Federal de Alagoas (GRUPEQUI-UFAL), que conseguiu estruturar uma improvisada sede e montar uma tropa de 10

cavalos, que permitirão alavancar atividades de pesquisa com animais, inclusive a partir das demandas do IQB e ESENFAR/UFAL;

- Em consequência desta pesquisa e da estruturação do GRUPEQUI-UFAL, dois novos projetos já foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa - UFAL e estão em andamento pelo GRUPEQUI-UFAL: Estudo comparativo entre ropivacaína 0,5% e bupivacaína 0,5% em Nervos palmares de Equinos e Plasmaféreses em Equinos;
- A composição neurolítica já está sendo testada em eqüinos de utilidade vaquejada, marcha, pólo e trabalho em todo país, com resultados a serem publicados em 2012-2013;
- Indicações do uso da SNI estão sendo testados clinicamente em cães com doenças degenerativas, como a displasia coxo-femural;
- O refinamento do conhecimento da composição desenvolvida permitirá a transferência de tecnologia para laboratórios farmacêuticos especializados em produtos veterinários.

6.2 Oportunidades de Mercado e Negócios Gerados

Neste tópico devem ser destacados:

- Depósito de patente da Composição Neurolítica proposta, oportunizando a transferência de conhecimento gerado na Universidade para a aplicação prática (ANEXOS I).
- Produção e comercialização da Composição Neurolítica proposta, para atendimento de demanda imediata do mercado de clínica e cirurgia veterinária.
- Disponibilização de um produto com amplitude de mercado nacional e internacional, com substituição de importação.

REFERÊNCIAS

- ADAIR, H. S.; ANDREWS, F. M. Diseases of the peripheral nerves. In: KOBLUK, A. G. **The horse: diseases and clinical management**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. v. 1, cap. 26, p. 473-485.
- AKAYA, A. et al. Neurolytic phenol blockade of the obturator nerve for severe adductor spasticity. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, Copenhagen, v. 54, p. 79–85, 2010. ISSN 0001-5172.
- ALLEN JR, L. V. Compounding for the management of pain. **Secundum Artem.**, v. 8, n. 4, p. 1-5, 2003.
- ALMEIDA, T. P. et al. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. **Vet. em Foco**, São Paulo, v. 3, n. 2, p.107-118, 2006.
- ALVAREZ, J. et al. Avances em el tratamiento del dolor.aplicaciones clínicas. **Medicine**, v. 10, n. 46, p. 3065-3071, 2009.
- ALVES, A. L. G. et al. Effects of beta-aminopropionitrila fumarate and exercise on equine tendon healing: gross and histological aspects. **J. Equine Vet. Sci.**, California, v. 21, n. 5, p. 17-23, 2001.
- ALVES, A. L. et al. Lombalgia em equinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 191-199, 2007. ISSN 1413-9596.
- ANDREAE-JONES, S. **Invasive treatment**. ASAMS, 2000. Disponível em: <<http://www.aboutarachnoiditis.org/content/invasive-treatment/invasive-treatment.ht>>. Acesso em: 15 set. 2011.
- ARAUJO, I. G. R.; BEZERRA, K. B.; DORNBUSCH, P. T. Uso de neurolítico em deformidade flexural cárpica em potro . In: SIMPÓSIO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO MÉDICOS VETERINÁRIOS DE EQUÍDEOS – NORDESTE, 4., Ipojuca. 2010. **Anais...** Ipojuca: ABRAVEQ, 2010.
- AUER, J. A, et al. Effect of hyaluronic acid in naturally occurring and experimentally induced osteoarthritis. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 41, p. 568-574, 1980. ISSN 0002-9645.
- BERG, R. Regiones del miembro torácico, regiones membri thoracici. In: BERG, R. **Anatomía topográfica y aplicada de los animales domésticos**. Madrid: Editorial AC. 1978. p. 295-346.
- BERNARDO, J. O. et al. Uso de solução neurolítica concomitante a desmectomia do ligamento acessório do tendão flexor digital profundo em potro com deformidade flexural. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO MÉDICOS VETERINÁRIOS DE EQUÍDEOS, 12, Campinas, 2011. **Anais...** Campinas: ABRAVEQ, 2011.

BESSION, J. M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs**, New York, v. 53, Suppl. 2, p. 1-9, 1997. ISSN 0012-6667.

BIRCH, H. L.; GOODSHIP, A. E. Can appropriate training regimes reduce the incidence of skeletal injury and loss of horses from training? **J. Equine Vet. Educ.**, Washington, v. 11, n. 6, p. 310-313, 1999. ISSN 0748-321X.

BITTAR, M. J.; FERRAZ, G. C.; ESCODRO, P. B. **Diagnóstica: bloqueios perineurais e articulares em equinos**. Indaiatuba, 2007. Apostila do Curso Analgesia.

BOLT, D. Lipopolysaccharide-induced lameness in horses. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 69, n. 12, p. 1646-1654, Dec. 2008. ISSN 0002-9645.

BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. Quimioterapia de doenças microbianas, fúngicas e virais. In: BOOTH, N. H., McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, p. 617- 632.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 1 ago. 2005. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>>. Acesso em: 19 abr. 2011.

BUFFENOIR, K.; DECQ, P.; LEFAUCHEUR, J. P. Interest of peripheral anesthetic blocks as a diagnosis and prognosis tool in patients with spastic equinus foot. **Clin. Neurophysiol.**, Limerick, v. 116, p. 1596–600, 2005. ISSN 1388-2457.

CLARK, C. **Horse lameness on the block-specially designed horseshoe becomes teaching tool**. Disponível em : <http://uoguelph.ca/researchqpublication/assets/HTML_MAGS/equine/p.14.html>. Acesso em: 25 out. 2011.

CLARKE, E. G. C.; MOFFAT, A. C. **Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals: body fluids and post-mortem material**. 2nd ed., London: Pharmaceutical Press, 1986. p. 474-475, 917-918, 1036-1037.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984.

COLES, P.; THOMPSON, G. The role of neurolytic blocks in the treatment of cancer pain. **Int. Anesthesiol. Clin.**, Boston, v. 29, n. 1, p. 93-104, 1991. ISSN 0020-5907.

CREDILE, L. F. G. A. et al. Comparison of current techniques for palmar digital neurectomy in horses. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, Lexington, v. 43, p. 231-32, 1997.

DAMIANI, D. et al. Análise crítica da altura final de crianças em uso de glicocorticóides. **Pediatria**, São Paulo, v. 1, p. 71-82, 2001.

DECHANT, J. E. et al. Effects of dosage titration of methylprednisolone acetate and triamcinolone acetonide on interleukin-1-conditioned equine articular cartilage explants in vitro. **Equine Vet. J.**, London, v. 35, n. 5, p. 444–450, Jul. 2003. ISSN 0425-1644.

DEVOR, M. The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In: **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994, p. 79-100.

DOCKERY, G. L. **Alcohol injection targets intermetatarsal pain: bio mechanics. painmanagement**. Disponível em: <<http://journals.iranscience.net:800/Default/www.biomech.com/current/pain.shtml>>. Acesso em: em 15 ago. 2011.

DOERTHY, T.; VALVERDE, A. **Manual de anestesia & analgesia em equinos**. São Paulo: Roca, 2008.

DREWES, A. M. The physiology of pain. **Ugeskr. Laeg.**, Copenhagen v. 168, n. 20, p.1941-1943, 2006. ISSN 0041-5782.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in neurophathic pain: diagnosis, mechanisms and treatment recommendations. **Arch. Neurol.**, London, v. 60, n.11, p. 1524-1534, 2003. ISSN 0003-9942.

DYSON, S. J. Forelimb lameness in horse 1: an approach to diagnosis. **Equine Pract.**, London, v. 8, p. 176-186, 1986.

ESCODRO, P.B. Ação neurolítica de solução etanólica a 49,75% em eqüinos: Relato de oito casos. **Rev.Vet. Zootec. em Minas**, Belo Horizonte, p. 54-55, abr./jun., 2011b. Suplemento. Especial.

_____. Dessensibilização dos nervos digitais em equinos. **Rev. Bras. Med. Equina**, São Paulo, a. 2, n. 7, p. 18-26, 2006.

_____. **Dessensibilização dos nervos palmares em equinos: estudo comparativo experimental do álcool benzílico 0,75% e álcool etílico absoluto**. 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

_____. **Técnicas de dessensibilização dos nervos digitais em eqüinos**. 2001, 25 f. Monografia (Especialização em Cirurgia e Anestesiologia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

ESCODRO, P. B.; GIANINI, C.; LOPES, P. F. R. Considerações sobre as fraturas dos ossos metacárpicos (metatársicos) acessórios nas desmites do suspensório do boleto. **Rev. Bras. Med. Equina**, São Paulo, ano 2, p. 24-28, 2007.

ESCODRO, P. B. et al. Considerações acerca dos fármacos neurolíticos na medicina eqüina. **Rev. Bras. Med. Equina**, São Paulo, a. 6, n. 35, p. 26-31, 2011a.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo no Brasil**. Piracicaba, 2006.

FALEIROS, R. R.; MATOS, J. J. R. T; ALVES, G. E. S. Comparação de duas técnicas de neurectomia digital em equinos: aspectos clínicos e cirúrgicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4., 2000, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2000. p. 166.

FALEIROS, R. R. et al. Neurectomia digital em eqüinos: comparação das técnicas guilhotina e stripping. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 335-340, 2008. ISSN 0102-0935.

FANTONI, D.T.; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia e controle da dor. In: FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Rocca, 2002. p. 323-334.

FERRANTE, M. F. **The anesthesia pain management program**. University of Pennsylvania health system, 2000. Disponível em: <<http://www.med.upenn.edu/cancer.htm>> Acesso em: 2 ago. 2011.

FIRTH, E. C.; SEUREN, F.; WENSING, T. H. E. Induced synovitis diseases model in ponies. **Corn.Vet.**, v. 77, p. 107-118, 1987.

GASPARINI, J. R.; SARAIVA, R. A. Management of pain in patient with inoperable sacral tumor: case report. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 2, p. 252-260, 2004. ISSN 0034-7094.

GAYNOR, J. S.; HUBLELL, A. E. Perineural and spinal anesthesia. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, Philadelphia, v. 7, n. 3, p. 501-520, 1991. ISSN 0749-0739.

GILBSON, K. T.; STASHAK, T. S. Using perineural anesthesia to localize equine lameness. **Vet. Med.**, Praha, v. 84, n. 11, p. 1082-1086, 1989. ISSN 0375-8427.

GIORDANO, J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. **Pain. Physician.**, Paducah, v. 8, n. 3, p. 277-290, 2005. ISSN 1533-3159.

GOODSHIP, A. E. et al. A quantitative force plate assessment in equine locomotor performance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EQUINE EXERCISE PHYSIOLOGY, 1., 1982. Oxford. **Proceedings...** Oxford, 1982. p. 263-270.

GRACEY, R.H.; LYNCH, S.A.; BENNETT, G.J. Painful neuropathy: altered altered central processing maintained dynamically by peripheral input. **Pain**, v. 51, n. 2, p. 175-194, 1992.

GRANT, G. A.; GOODKIN, R.; KLIOT, M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. **Neurosurgery.**, Baltimore, v. 44, n. 4, p. 825-39, 1999. ISSN 0148-396X.

GUIMARÃES, Z. A. C. P. et al. Uso de álcool benzílico como neurolítico para tratamento de exostose decorrente de ressecção de habronemose cutânea em equino-relato de caso. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CAVALO ATLETA, 5., 2011. Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte: ABRAVEQ, 2011.

GUNDU, Z. S.; KALYON T. A. Dursun H. Peripheral nerve block with phenol to treat spasticity in spinal cord injured patients. **Paraplegia**, v. 30, p. 808–811, 1992.

GUTIÉRREZ, M. S. A. Tratamiento del dolor: técnicas locorreregionales. **Bloqueos. Oncol.**, v. 28, n. 3, p.144-146, 2005.

HADZIC, A. Peripheral nerve stimulators:cracking the code-one at a time. **Reg. Anesth. Pain Med.**, Secaucus, v. 29, n. 3, p.185-188, 2004. ISSN 1098-7339.

HAGIWARA, M. K. Bioquímica clínica. In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária.** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p.89-130.

HARDY, J. Surgical procedures involving the peripheral nerves. In: AUER, J. A. **Equine surgery.** Philadelphia: W.B. Saunders,1992, p. 580- 585.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; MYCEK, M. J. **Farmacologia ilustrada.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed,1998.

HELLEBREKERS. L. J. **Dor em animais.** São Paulo: Manole, 2002. p. 69-79.

HERTL, M. C. et al. Intrafascicular injection of ammonium sulfate and bupivacaine in peripheral nerves of neonatal and juvenile rats. **Reg. Anesth. Pain Med.**, Secaucus, v. 23, n. 2, p.152-158, Mar./Apr. 1998. ISSN 1098-7339.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Ann. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, v. 17, n. p. 31-108, 1994. ISSN 0147-006X.

HONNAS, C. M. The foot. In: AUER, J. A.; STICK, J. A. **Equine surgery.** 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders,1999, p.779-791.

IDA, K. K. et al. Manejo da dor em equinos. **Rev. Bras. Med. Equina**, São Paulo, ano 7, n. 37, p. 24-36, set./out. 2011.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. **Fibromialgia.** Tradução Faíbola Peixoto Minson e Liege Mentz. 2009. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/AM/AMTemplate.cfm?Section=Home&CONTENTID=10582&SECTION=Home&TEMPLATE=/CM/ContentDisplay.cfm>>. Acesso em: 22 set. 2011.

JACKMAN, B. R. et al. Palmar digital neurectomy in horses: 57 cases (1984-1990). **Vet. Surg.**, Philadelphia, v. 22, p. 285-88, 1993. ISSN 0161-3499.

JACOBSON, K; WITT-SULLIVAN, H. B. Interpreting abnormalities in routine liver biochemistry. **Can. Fam. Physician.**, Willowdale, v. 38, p.561-566,1992. ISSN 0008-350X.

JI, R. R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol. Dis.**, v. 8, n. 1, p.1-10, 2001.

JONES, W. E. **Genética e criação de cavalos**. São Paulo: Roca,1987.

KAINER, R. A. Anatomia clínica del pie equino. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, Philadelphia, v. 5, n. 1, p. 1-30, 1990. ISSN 0749-0739.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J.; BRUSS M. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. San Diego: Academic Press, 2008.

KAY, A. T. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of intra-articular injection of triamcinolone acetonide, mepivacaine hydrochloride, or both on lipopolysaccharide-induced lameness in horses. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 69, n.12, p.1646-1654, Dec. 2008. ISSN 0002-9645.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1994.

KEG, P. R. et al. The effect of regional nerve blocks on the lameness caused by collagenase induced tendinitis in the medimetacarpal region of the horse: a study using gait analysis and ultrasonography to determine tendon healing. **J. Vet. Med.**, v. 39, n. 5, p. 349-363, 1992.

KERBER, C.; TRINDADE, A. A. **Manual prático para Interpretação de exames laboratoriais: hematologia e bioquímica**. São Paulo: Laboratório Paddock de Análises Clínicas Veterinárias, 2002.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F. ; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Arch. Vet. Sci.**, Curitiba, v. 13, n. 1, p.1-12, 2008. ISSN 1517-784x.

KOBAYASHI, J. et al. The effect of ammonium sulfate injection on peripheral nerve. **J. Reconstr. Microsurg.**, New York, v. 13, n. 6, p. 389-96, Aug.1997. ISSN 0743-684X.

KRAMES, E .S . Controle interventivo da dor. **Clín. Méd. Am. Norte**, v. 83, n. 3, p. 739-757, maio, 1999.

KRYGER, G. S. et al. Nerve growth factor inhibition prevents traumatic neuroma formation in the rat. **J. Am. Soc. Surg. Hand.**, Philadelphia, v. 26, n. 4, p. 635-644, 2001. ISSN 1531-0914.

LAMOUNT, L. Anestésicos locais. In: DOHERTY T., VALVERDE, A. **Manual de anestesia e analgesia em equinos**. São Paulo: Roca, 2008, p.144-153.

LASSEN, E. D.; THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica veterinária: avaliação laboratorial da função renal**. São Paulo: Roca, 2006. cap. 21, p. 285-310.

_____.; _____. **Hematologia e bioquímica veterinária : avaliação laboratorial do fígado**. São Paulo: Roca, 2006. cap. 23, p. 335-354.

LAYTON, A. M.; YIP, J.; CUNLIFEE, W. J. A comparison of intralesional triancinolone and cryosurgery in the treatment of acne keloids. **Brit. J. Dermatol.**, v.130, p. 498-501, 1994.

LEE, Y.; LEE, C. H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Mol. Cells.**, v. 20, n. 3, p. 315-324, 2005.

LIPTON, S. Neurolysis: pharmacology and drug selection. In: CARE, J. B. **Lippincott**. 1993. p. 343-358.

LUNA, S. P. L. Anestésias perineurais e regionais de equinos. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 24-30, 1998.

_____. Dor, analgesia e bem estar animal. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE CONCEITOS EM BEM-ESTAR ANIMAL,1., 2006, Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de Janeiro, 2006. p. 16-18.

MADISON, J. B.; DYSON, S. J. Treatment and prognosis of horses with navi cular disease. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and managment of lameness in the horse**. Saunders, 2003. cap. 31, p. 299-303.

MÁRQUEZ, J. O. Bases de anatomia e fisiopatologia. **Dor Diag. Tratamento**, v. 1, n. 1, 2004.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

MATOS, J. J. R. T.; FALEIROS, R. R.; ALVES, G. E. S. Comparação de duas técnicas de neurectomia digital em equinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4., 2000, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2000. p. 167.

McMAHON, S. B.; KOLTZENBURG, M. **Textbook of pain**. 5th ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.

MERKENS, H. W., SCHAMHARDT, H. C. Evaluation of equine locomotion during different degrees of experimentally induced lameness 1: Lameness model and qualification of ground reaction force patterns of the limbs. **Equine Vet. J.**, London, supl. 6, p. 99-106, 1983. ISSN 0425-1644.

MESSLINGER, K. What's is a nociceptor? **Anaesthesist.**, Berlin, v. 46, n. 2, p. 142-153, 1997. ISSN 0003-2417.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis**. 3rd ed. Missouri: Saunders, 2004.

MILLAN, M. J. The indication of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, Oxford, v. 57, p. 1-164, 1999. ISSN 0301-0082.

MORAES, I. A. **Sistema nervoso**. Rio de Janeiro: Fisiovet-UFF, 2011. Disponível em: < http://www.proac.uff.br/fisiovet/index.php?option=com_content&task=view&id=197&Itemid=152>. Acesso em: 3 dez. 2011.

MORENO, R.; MATOS, R.; FEVEREIRO, T. Outcome predictiona in intensive care: solving the paradox. **Eur. J. Intensive Care Med.**, Berlin, v.6, p.1432-1438, 2001. ISSN 0340-0964.

MORGAN, E. G. J.; MIKAIL, M. S.; MURRAY, M. J. **Clinical anesthesiology**. 3rd ed. 2002. p. 233-240.

MYERS, R.; KATZ, J. Agentes neurolíticos. In: RAJ, P. R. **Tratamiento práctico del dolor**. Mosby, 1992, p. 689-700.

NEIRA, F.; ORTEGA, J. L.; CARRASCO, M. S. Bloqueos neurolíticos: farmacologia y neurolisis de los nervios craneales. **Rev. Soc. Esp. Dolor.**, Madrid, v. 3, p. 191-201, 1996. ISSN 1134-8046.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Testes diagnósticos para o sistema hepatobiliar. In: _____; _____. (Ed.). **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006^a. p. 455-480.

_____.; _____. Testes diagnósticos para o sistema urinário. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G (Ed.). **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006^b. p.547-572.

NICOLETTI, J. L. M. et. al. Estudo comparativo experimental da injeção perineural do álcool benzílico 0,75% e do álcool etílico absoluto nos nervos palmares de equinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 401-407, 2007. ISSN 1413-9596.

NYROP, K. A.; COFFMAN, J. R.; DEBOWES, R. M. The role of diagnostic nerve blocks in the equine lameness examination. **Compend. Contin. Educ.** Jamesburg, v. 5, n. 12, p. 5669-5676, 1983. ISSN 1548-8578.

OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Challenges in the development of novel treatment strategies for neuropathic pain. **NeuroRx.**, Milwaukee, v. 2, n. 4, p. 650-661, 2005. ISSN 1545-5343.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: OTERO, P. E. **Dor, avaliação e tratamento em pequenos animais**. São Paulo: Interbook, 2005, p. 30-74.

PLONER, M. et. al. Pain processing is faster than tactile process in the human brain. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 26, n. 42, p. 1079-1082, 2006. ISSN 0270-6474.

PORRECA, F. et al. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. **Proc Natl Acad Sci U.S. A.**, v. 96, n. 14, p. 7640-7644, 1999.

PORTER, B. R. Neurolysis. In: **University of Iowa Health Care**. Disponível em: <<http://www.uiowa.edu/~c116006/neurolysis>>. Acesso em: 2 ago. 2011.

QUAN, D.; BIRD, S. J. Nerve conduction studies and electromyography in the evaluation of peripheral nerve injuries. **Univ. Pa. Orthop. J.**, v.12, p.45-51, 1999.

RICHEIMER, S. H.; MACRES, S. M. **Procedural and medical complications of chronic pain management**. 2000. Disponível em: <<http://www.helpforpain.com/articles/complications/complications.htm>>. Acesso em: 16 set. 2011.

RIVERÓN, A. A. P. et. al. Comparación clínica de ropivacaína y bupivacaína para bloqueo de plexo braquial por abordaje axilar mediante neuroestimulación, **Rev. Mex. Anestesiol.**, v. 32, n. 1, p. 7-13, 2009.

ROWE, D. S. **Neurolytic techniques for pain management**. 1998. Disponível em: <<http://www.dcmsonline.org/jax-medicine/1998journals/october98/neurolytic.htm>>. Acesso em: 16 out. 2011.

RYKOWSKI, J. J.; HILGIER, M. Efficacy of neurolytic celiac plexus block in varying locations of pancreatic cancer. **Reg. Anesth.**, New York, v. 2, p. 347-354, 2000. ISSN 0146-521X.

SARDARI, K.; KAZEMI, H.; MOHRI, M. Effects of analgesia of the distal interphalangeal joint and navicular bursa on experimental lameness caused by solar pain in horses. **J. Vet. Med. Physiol. Clin. Med.**, Berlin, v. 9, n. 9, p. 478-81, 2002. ISSN 0931-184X.

SCHNEIDER, R. K.; MAYHEW, I. G.; CLARKE, G. L. Effects of cryotherapy on the palmar and plantar digital nerves in the horse. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 46, p. 7-12, 1985. ISSN 0002-9645.

SCHUMACHER, J.; CASTRO, F. A. Anestesia dos membros. In: DOHERTY, T.; VALVERDE, A. **Manual de anestesia e analgesia em equinos**. São Paulo: ROCCA, 2008. cap.16, p. 241-254.

SCHUMACHER, J. et al. Abolition of lameness caused by experimentally induced solar pain in horses after analgesia of the distal interphalangeal joint. **N. Mexico**, v. 45, p. 193-194, 1999.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: WORLD CONGRESS ON

COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Reno-NV-USA. **Proceedings...**
Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE
ANIMAL Disponível em: <<http://www.sindan.com.br>> Acesso em: 1 jun. 2011.

SPROAT, J. E. et al. Hypertrophic sterna scar: silicone gel sheet versus kenalog injection treatment. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 90, n. 6, p. 988-992, Dec. 1992. ISSN 0032-1052.

STASHAK, T. S. Adam's lameness in horses. 5th ed. Wiley-Blackwell, 2002.

STEDMAN, T. L. Dicionário médico ilustrado. 25. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

STOELTING R. K. S. Pharmacology and physiology in anesthetic practice. 3rd ed. 1999. p. 158-180.

TEIXEIRA, M. J. Dor fantasma no coto de amputação. **Rev. Med. USP.** São Paulo v. 78, n. p. 192-196, 1999.

UNITED STATES PHARMACOPEIA THE NATIONAL FORMULARY-USP. **The United States Pharmacopeial Convection, Rockville, MD.** 28th ed. 2005. p.1961-1962.

_____. _____. 31st ed. 2008. p.1569-1570.

THOMASSIAN, A. Farmácia do haras e Valores normais fisiológicos e de patologia clínica. In: THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos cavalos.** 5. ed. São Paulo: Varela, 2005. p. 483-491.

TORTORA, G. J. O Tecido nervoso. In: TORTORA, G. **Corpo humano:** fundamentos de anatomia e fisiologia. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap.9, p. 205-218.

TRANQUILLI, W. J. Fisiologia da dor aguda. In: GREENE,S. A. **Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor.** Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 399-402.

TRESCOT, A. M. Cryoanalgesia in interventional pain management. **Pain Physician**, v. 6, n. 3, p. 345-369, 2003.

TROTTER, G. W. Aspects of palmar heel pain. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, Lexington, v. 45, p.195-197, 1999.

TURNER, A. S, McILWRAITH, C. W. Neurectomia digital palmar. In: TURNER, A. S., McILWRAITH, C. W. **Técnicas cirúrgicas de grandes animais.** São Paulo: Roca, 1985. p.141-144.

TURNER, T. A. Management of navicular disease in horses: an update. **Modern. Vet. Pract.**, Goleta, p. 24-27, Jan.1986. ISSN 0362-8140.

VALDEZ, H., ADAMS, R., PEYTON, L. C. Navicular disease in the hindlimbs of the horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Chicago, v. 172, n. 3, p. 291-292, 1978. ISSN 0003-1488.

VIEL, E. et al. Peripheral neurolytic blocks and spasticity. **Ann. Fr. Anesth. Reanim.** v. 24, p. 667–672, 2005.

VIÑUELA-FERNÁNDEZ, I. et al. Pain mechanisms and their implication for the management of pain in farm and companion animals. **Vet. J.**, London, v. 174, n. 2, p. 227-239, 2007. ISSN 1090-0233.

WICKE, C. et al. Effects of steroids and retinoids on wound healing. **Arch. Surg.**, v. 135, n. 11, p. 1265-1270, Nov. 2000.

WILSON, D. V. Reconhecimento da dor. In: DOERTHY, T.; VALVERDE, A. **Manual de anestesia & analgesia em equinos**. São Paulo: Roca, 2008, p.278-282.

WOLKER, R. R. E. et al. Evaluation of ethyl alcohol for use in a minimally invasive technique for equine proximal interphalangeal joint arthrodesis. **Vet. Surg.**, Philadelphia, v. 40, n. 3, p. 291-298, Apr. 2011. ISSN 0161-3499.

WOOD, K. M. The use of phenol as a neurolytic agent: a review. **Pain**, Amsterdam, v. 5, p. 205–219, 1978. ISSN 0304-3959.

XIE, H.; OTT, E. A.; COLAHAN, P. Influence of acupuncture on experimental lameness in horses. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, Lexington, v. 47, p.3 47-356, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A

RESUMO

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA TRATAR DORES NEUROPÁTICAS, DORES ASSOCIADAS ÀS DOENÇAS DEGENERATIVAS CRÔNICAS E EM PÓS-OPERATÓRIOS DOLOROSOS DE ANIMAIS”

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de Composição Farmacêutica caracterizada por compreender triancinolona, bupivacaína e etanol na forma de suspensão, com uso caracterizado por ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos e grandes animais. A suspensão neurolítica proposta, através de infiltração perineural, promove neurólise de ação potente e duradoura, sem reações adversas locais, o que resulta em efeito terapêutico de abolição da dor, indicada em dores neuropáticas, síndromes degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes e pequenos animais.

APÊNDICE B

Relatório descritivo para a patente de invenção: **“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA TRATAR DORES NEUROPÁTICAS, DORES ASSOCIADAS ÀS DOENÇAS DEGENERATIVAS CRÔNICAS E EM PÓS-OPERATÓRIOS DOLOROSOS DE ANIMAIS”**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de Composição Farmacêutica, compreendendo Triancinolona, Bupivacaína e Etanol em veículo aquoso, na forma de suspensão, com indicação de uso injetável perineural, em pequenos e grandes animais. A referida composição tem como efeito terapêutico a redução ou abolição da sensação de dor em síndromes degenerativas crônicas, dores neuropáticas e em pós-operatórios dolorosos de animais, através da ação de neurólise química do etanol.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO E TÉCNICA ANTERIOR

A terapia antiálgica é utilizada para interromper intencionalmente as vias de transmissão nervosa, para aliviar a dor de diferentes tipos, origens e intensidades, entre elas a dor crônica ou neuropática, que por si própria torna-se uma enfermidade grave, às vezes responsiva apenas aos psicotrópicos e tranquilizantes.

Dessa forma, fazem-se necessários procedimentos paliativos no controle da dor crônica, entre eles a infiltração ou injeção perineural de soluções neurolíticas, que vão interromper as vias de nocicepção na transmissão do estímulo nervoso, abolindo paliativamente a dor. Princípios ativos como alcoóis, fenóis e cloreto de amônio, entre outros, já são amplamente utilizados na analgesia em pacientes humanos portadores de câncer em fases terminais e em eqüinos com lombalgia e síndromes degenerativas crônicas podais (relacionadas ao casco e articulações interfalângicas) (PI0317667-3 A2, PI0509720-7 A2, PI0411290-3 A2).

A injeção perineural de solução neurolítica visa à obtenção de Neurólise, ou seja, a destruição de um tecido nervoso para promover analgesia, neste caso, realizada quimicamente. A lesão em um nervo periférico pode causar desde um déficit físico leve e transitório, até perda total da função sensitiva e/ou motora, sendo classificada em três categorias, em ordem crescente de acordo com a gravidade: neuropraxia, axoniotemese e neurotemese. Na neuropraxia, ocorre perda da condução dos impulsos nervosos, porém sem degeneração estrutural do nervo, o que permite o retorno da função; na axoniotemese, a lesão é mais grave que a anterior e mesmo que não haja perda da continuidade anatômica do nervo, existe degeneração walleriana, porém ainda há possibilidade de regeneração; finalmente a neurotemese é a lesão mais grave, com descontinuidade e destruição dos elementos neurais. Em casos de síndromes degenerativas crônicas visa-se axoniotemese ou neurotemese, devido ao tempo prolongado de analgesia.

Porém, existem contra-indicações na aplicação dos fármacos neurolíticos, dependentes de concentração e reação individual, podendo causar neurites e intensificar mais ainda a dor, até que a neurólise seja estabelecida.

Em humanos, as substâncias mais utilizadas para bloqueios periféricos são o álcool e o fenol. O agente ideal deveria ser capaz de interromper seletivamente somente as fibras nervosas, entretanto, os agentes comumente utilizados, freqüentemente causam uma destruição indiscriminada do tecido nervoso, podendo causar muita dor no momento da injeção, com inflamação de vários dias pós-infiltração.

O etanol é o neurolítico de efeito mais intenso e duradouro, porém os índices de neurites são maiores em relação ao uso dos fenóis, o que desencoraja os anestesiólogos e médicos veterinários a usá-lo.

Uma das mais conhecidas soluções neurolíticas é a "Pitcher Plant" no veículo de Álcool Benzílico 0,75 %, conhecido comercialmente como Sarapin®. É um neurolítico alcalóide de uso humano, indicado na síndrome dolorosa do nervo ciático, neuralgia intercostal, neurites, neuralgia lombar e do nervo trigêmeo, entre outras. Em animais, seu uso mais comum tem sido para ablação química do nervo

digital palmar em eqüinos com enfermidades crônicas do pé, porém, existem divergências quanto ao tempo de ação da droga.

Em equinos, o Sarapin® e o Cloreto de Amônio a 2% são as composições farmacêuticas mais utilizadas para infiltrar nervos periféricos dos membros e nervos vertebrais, com duração do efeito de dois a três meses. O etanol e fenol são utilizados em diversas faixas de concentração, porém quando a ação neurolítica é satisfatória, a reação inflamatória local é intensa e dolorosa.

Nicoletti et al. (Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 44, n. 6, p. 401-407, 2007), em estudo comparativo da infiltração de Sarapin® (Grupo A) e solução etanólica a 99,5% (Grupo B), no Nervo Palmar de eqüinos, notaram que com 150 dias a sensibilidade havia voltado no grupo A e com 180 dias era ausente no Grupo B. Porém todos os animais do Grupo B tiveram reação inflamatória local no local de aplicação, que estendeu-se por três a quatro semanas. Desta forma os autores comprovaram a ação duradoura do etanol, porém com a indesejável e restritiva reação inflamatória local.

Visto os problemas relacionados ao etanol como agente neurolítico e buscando as ótimas propriedades neurolíticas do princípio ativo, faz-se necessário uma composição farmacêutica neurolítica etanólica eficaz, que permita a sinergia dos efeitos individuais. A presente patente visa a formulação de uma composição farmacêutica caracterizada por compreender triancinolona, bupivacaína e etanol na forma de suspensão, com componentes caracterizados por ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos e grandes animais, configurando uma invenção de caráter inovador no mercado de Saúde Animal, buscando atender a espécie eqüina e outros mamíferos de pequeno a grande porte, que sofrem com a dor crônica ou neuropática.

DESCRIÇÃO DA FIGURA

O gráfico apresenta o resultado da aplicação da composição proposta nessa patente, comparado ao resultado do uso do etanol e do Sarapin®.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica singular e eficaz de Triancinolona, Bupivacaína e Etanol, em veículo aquoso, para uso injetável perineural em espécies de pequenos a grandes animais (uso veterinário). O objetivo é causar neurólise em nervos periféricos, buscando a abolição da transmissão nervosa e conseqüente analgesia, nos casos de síndromes que causam dor crônica na Medicina Veterinária.

O tratamento paliativo da dor crônica ou neuropática em pacientes com câncer terminal, síndromes degenerativas (como as síndromes podais de eqüinos e de displasia coxo-femural em cães) e dores idiopáticas diversas é de suma importância na Medicina Veterinária, principalmente tendo em vista o trato cordial de pequenos animais e exigências esportivas dos eqüinos, o que propicia incremento no bem estar animal. Além disso, indica-se a invenção em pós-operatórios ou clínicos de condução dolorosa, onde o controle da dor auxiliará positivamente no prognóstico e bem estar do paciente.

A invenção fornece uma formulação farmacêutica em suspensão, onde os componentes oferecem o efeito neurolítico mais adequado do que cada um dos componentes isoladamente. Assim, a composição compreende Etanol, Bupivacaína e a Triancinolona, em veículo aquoso, sendo que estes últimos componentes atenuarão a ação deletéria do etanol, porém aproveitando o seu potencial e duradouro efeito neurolítico. A modalidade preferida da presente invenção, indicando as variações de concentrações de ingredientes ativos é a seguinte:

Cloridrato de Bupivacaína-----	1 a 5 mg/mL
Hexacetonido de Triancinolona-----	2 a 6 mg/ mL
Etanol-----	99,5 a 497,5 mg/mL
Veículo Aquoso-----	q.s.p.

A composição da presente invenção compreende Bupivacaína na faixa entre 0,1 a 0,5 % p/ v; Triancinolona na faixa entre 0,2 a 0,6 % p/v e Etanol na faixa de 9,95 a 49,75 % p/v. Deve-se tomar o cuidado de trabalhar em temperaturas amenas, pois pode haver degradação em temperaturas acima de 40°C.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O uso de agentes farmacêuticos causadores de neurólise é relativamente comum em pacientes humanos com câncer terminal e em amputações de membros, onde a utilização destas substâncias alivia a dor crônica e evita o “efeito fantasma”, paliativamente incrementando a qualidade de vida do paciente. Em medicina veterinária, o uso de soluções neurolíticas, em portadores de neoplasias terminais, ainda é pouco explorado, porém indica-se o uso no caso de amputações de membros, principalmente quando estas são distais.

Em contrapartida, as soluções neurolíticas são amplamente utilizadas na medicina eqüina, em síndromes degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos. Na Medicina Veterinária, a espécie eqüina apresenta dor crônica resultante de processos degenerativos na extremidade dos membros, especialmente nos pés, constituindo um dos problemas enfrentados pelo clínico. Mais de um terço das claudicações crônicas no cavalo são causadas por lesões localizadas na metade palmar do pé, e melhoram temporariamente ou são eliminadas com bloqueio do nervo Digital Palmar. Dentre as enfermidades podais que muitas vezes não respondem satisfatoriamente ao tratamento conservativo ou cirúrgico e resultam em claudicação crônica, destaca-se a podoesamoidite ou enfermidade do navicular, fratura do navicular, ossificação das cartilagens colaterais da falange distal, fratura angular ou do processo palmar da falange distal e osteíte podal. Assim, um dos procedimentos paliativos de eleição, na tentativa de manter em atividade cavalos acometidos de dor crônica, é a utilização de agentes químicos farmacêuticos neurolíticos.

Em pequenos animais, muito pouco é relatado em relação ao uso de neurolíticos, porém há resultados positivos em casos de displasia coxo-femural, através da denervação de fibras sensitivas, responsáveis pela inervação da cápsula articular coxo-femural. Estes resultados também já são obtidos através da neurólise química dessas fibras sensitivas, o que também indicam o uso da suspensão pretendida.

Diferentes substâncias químicas têm sido utilizadas para interromper intencionalmente as vias nociceptivas, como álcool, fenol, glicerol, sais de amônio, clorocresol, nitrato de prata e solução salina hipertônica.

Quando se produz uma lesão na fibra nervosa, um dos principais achados histopatológicos é a degeneração walleriana, importante para se obter o efeito clínico desejado de longa duração. A persistência da lâmina basal ao redor da célula de Schwann, permite a regeneração adequada das fibras nervosas, evitando a formação de neuromas. Em humanos, as substâncias mais utilizadas para bloqueios periféricos são o álcool e o fenol. O agente ideal deveria ser capaz de interromper seletivamente somente as fibras nervosas, entretanto, os agentes comumente utilizados, freqüentemente causam uma destruição indiscriminada do tecido nervoso, o que pode inviabilizar o uso pelos profissionais.

O etanol é um dos mais conhecidos neurolíticos, atua extraíndo os fosfolipídeos e colesterol do tecido nervoso, além de provocar a precipitação das lipoproteínas e mucoproteínas, e quando injetados diretamente em concentração e volume determinados, provoca bloqueio da condução nervosa, podendo causar anestesia ou hipoestesia, além de paralisia, se afetar os nervos motores. Ainda, é conhecido que o álcool tem seu efeito neurolítico decorrente da precipitação de lipoproteínas e mucoproteínas em nervos periféricos, produzindo degeneração e prejuízos tanto nas células de Schwann quanto nos axônios e histologicamente pode ser observado degeneração da mielina, além de pontos de inflamação focal no nervo bloqueado.

A grande desvantagem do uso do etanol é sua propriedade irritante, que provoca dor no local da injeção e apresenta ampla difusão através dos tecidos. Assim os fenóis são preferidos em bloqueios periféricos, em humanos, por causar uma menor incidência de neurites em relação aos alcoóis. No entanto, o efeito dos fenóis tem menor duração e menor intensidade em comparação aos alcoóis.

Na medicina veterinária de eqüinos utiliza-se com freqüência o Sarapin® e o Cloreto de Amônio a 2% para infiltrar nervos periféricos dos membros e nervos vertebrais. Como a duração do efeito não passa de dois a três meses, faz-se a infiltração muitas vezes, o que causa fibroses e neuromas dolorosos. O Sarapin® é

um neurolítico alcalóide (álcool benzílico a 0,75%), de uso humano, indicado principalmente nas síndromes dolorosas relacionadas ao nervo ciático, neuralgia intercostal, neurites, neuralgia lombar e do trigêmio, entre outras, que tem seu uso. Em Medicina Veterinária, um dos seus usos mais comuns, tem sido para ablação química do nervo digital palmar em eqüinos com enfermidade do navicular, quando injetado diretamente no nervo. A melhora clínica pode durar de 2 a 3 meses. O etanol e o fenol são utilizados em diversas faixas de concentração, porém quando a ação neurolítica é satisfatória, a reação inflamatória local é intensa e dolorosa.

Nicoletti et al. (Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 44, n. 6, p. 401-407, 2007), em estudo comparativo da infiltração de Sarapin® (Grupo A) e Solução Etanólica a 99,5% (Grupo B), no Nervo Palmar de eqüinos, notaram que com 150 dias a sensibilidade havia voltado no grupo A e com 180 dias era ausente no Grupo B. Porém todos os animais do Grupo B tiveram reação inflamatória local no local de aplicação, que estendeu-se por três a quatro semanas. Desta forma os autores comprovaram a ação duradoura do etanol, porém com a indesejável e restritiva reação inflamatória.

Os autores dessa patente realizaram infiltração perineural de etanol a 49,75% em 8 animais com enfermidades crônicas distintas, que resultam em dor neuropática intensa. Todos os animais apresentaram hipoestesia ou analgesia durante 120 dias, porém cinco (62,5 %) dos animais infiltrados apresentaram reação inflamatória e dolorosa intensa (Revista Veterinária e Zootecnia em Minas-Suplemento Especial V Simpósio Internacional do Cavalo Atleta, Belo Horizonte, Abr /Mai /Jun, ano XXI, v.109, p.54-55, 2011).

Desta forma, a utilização do etanol é restrita, pois mesmo sendo um potente e duradouro neurolítico, as reações locais de neurite e inflamação dolorosa desabonam seu uso, principalmente em médias e altas concentrações.

Buscando utilizar as propriedades neurolíticas do etanol e observando a não existência de composição neurolítica patenteada no Brasil, após anos de pesquisa, desenvolveu-se a invenção aqui descrita, onde o etanol é componente de uma composição em veículo aquoso, na forma de suspensão, que conta ainda com Bupivacaína e Triancinolona.

A invenção tem como principal vantagem não apresentar a ação irritante da maioria das composições do mercado, além de ter efeito terapêutico mais duradouro em relação às aquelas que apresentam reações inflamatórias mais amenas, como é o caso do Sarapin®. A invenção torna a composição mais eficaz no tratamento das dores neuropáticas, dores resultantes de síndromes degenerativas crônicas e para pós-operatórios dolorosos de pequenos e grandes animais.

O Anestésico local bupivacaína é uma amida derivada de xilidina, encontrada comercialmente na forma de cloridrato, altamente lipossolúvel, que é de três a quatro vezes mais potente que a lidocaína, assim apresentando analgesia de 2 a 6 horas. Esta propriedade fez com que a bupivacaína compusesse a suspensão neurolítica, principalmente por abolir a dor local que o etanol causa após a infiltração. O uso do anestésico local objetiva manter os pacientes com média de quatro horas de analgesia após a infiltração.

A triancinolona é um corticosteróide sintético (anti-inflamatório esteroideal) bastante utilizado em Oftalmologia e Dermatologia, introduzido nas duas últimas décadas na Ortopedia, com indicações para bursites, tenossinovites e artrites. A via de administração pode ser intramuscular ou através de infiltrações intra-articulares, intra-tendíneas ou intra-bursites. O hexacetonido de Triancinolona é amplamente utilizado em medicina veterinária nas infiltrações intra-articulares, com doses variando entre 6 a 18 mg por articulação (dimensão articular dependente), sendo que causa menor incidência de lesões morfológicas na cartilagem articular, comparado com os resultados obtidos da infiltração de acetato de metilprednisolona.

O hexacetonido de triancinolona constitui o terceiro ingrediente da Suspensão Neurolítica Perineural para Uso Veterinário, pois é um corticosteróide com cinco vezes mais potência anti-inflamatória que a hidrocortisona, assim inibindo mediadores inflamatórios locais, edema, deposição de fibrina, migração fagocítica, proliferação capilar, deposição de colágeno e tecido cicatricial. A ação do fármaco será de suma importância para evitar edemas locais e reações inflamatórias em curto prazo, comuns nas infiltrações perineurais concentradas de etanol.

Desta forma, a bupivacaína fornecerá analgesia em curto prazo e a triancinolona agirá em médio prazo, já que a latência do fármaco é de 3 a 6 horas,

com efeito terapêutico de 18 a 36 horas. A idéia da composição é anular a ação deletéria do etanol na região infiltrada, viabilizando o uso deste agente neurolítico potente e duradouro, caracterizando a invenção como inédita e eficaz.

A modalidade preferida da presente invenção, indicando as variações de concentrações de ingredientes ativos á a seguinte:

Cloridrato de Bupivacaína- -----	1 a 5 mg/ml
Hexacetono de Triancinolona-----	2 a 6 mg/ ml
Etanol-----	99,5 a 497,5 mg/ml
Veículo Aquoso-----	q.s.p.

A composição da presente invenção contém Bupivacaína na faixa entre 0,1 a 0,5 % p/ v; Triancinolona na faixa entre 0,2 a 0,6 % p/v e de Etanol na faixa de 9,95 a 49,75 % p/v.

A Composição Farmacêutica caracterizada por compreender triancinolona, bupivacaína e etanol na forma de suspensão, com componentes caracterizados por ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos e grandes animais é indicada para tratamento paliativo da dor crônica ou neuropática em pequenos e grandes animais com câncer terminal, síndromes degenerativas (como as síndromes podais de eqüinos e de displasia coxo-femural em cães), dores idiopáticas diversas e em pós-operatórios ou clínicos de condução dolorosa, onde o controle da dor auxiliará positivamente no prognóstico e bem estar do paciente.

EXEMPLO

Em pesquisa realizada pelos autores intitulada: Estudo Comparativo dos Graus de claudicação em Equinos infiltrados com Etanol a 99,5 %, Sarapin® e Composição Farmacêutica neurolítica nos Nervos Palmares de Equinos, observados dos momentos M1 -pré-infiltração a M10 - 180 dias, com pressão aplicada no Ponto Central da Sola, buscou-se analisar e comparar os resultados clínicos de analgesia entre a invenção, o etanol a 99,5% e o Sarapin®, induzindo a reação dolorosa na sola através de ferradura experimental indutora de claudicação (modificada de

Merkens e Schamhardt, *Equine Veterinary Journal*, Suppl 6, p.99-106, 1983), avaliando os graus de claudicação entre 1 e 4 segundo o livro: *Adam's Lameness in Horses*, da Ed. Wiley-Blackwell (2002). Os resultados estão na tabela 1, podendo-se concluir a partir da pesquisa:

1- A invenção, chamada de SNE, igualou-se aos resultados analgésicos do etanol, com tempo de início de analgesia entre 72 (3 dias) e 96 horas (4 dias) e duração analgésica persistente após 180 dias da infiltração (Figura 1 e Tabela 1).

Tabela 1- Grau de claudicação com aplicação de diferentes soluções neurolíticas

Solução aplicada	Tempo após aplicação									
	Pré	72h	96h	7d	30d	60d	90d	120d	150d	180d
Sarapin	3	3	3	2	0	0	0	0	0	0
Etanol	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
SNE	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0

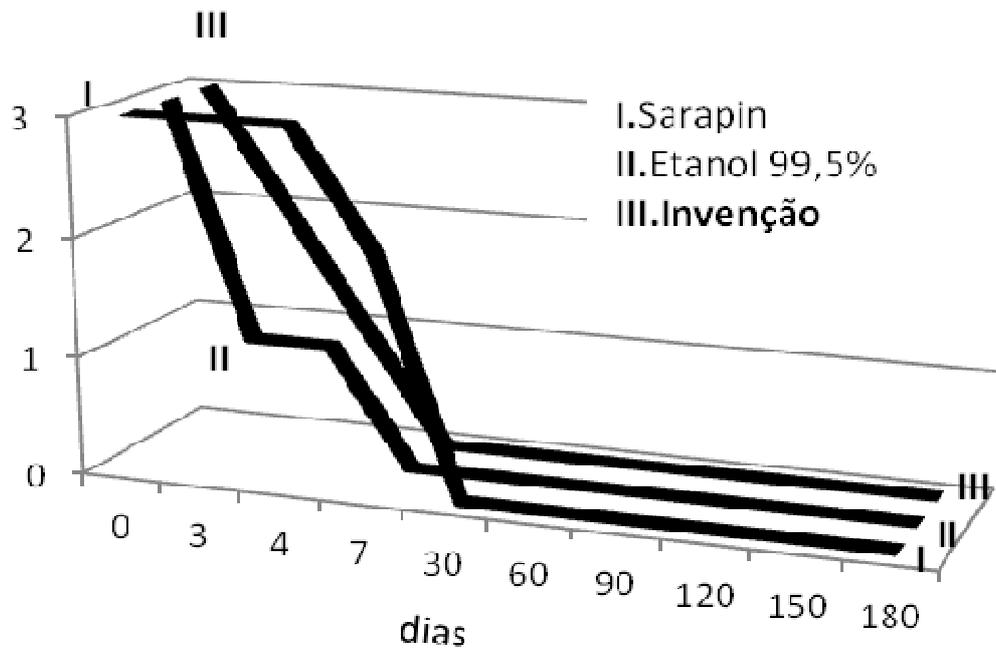
2- A invenção superou a ação do Etanol em relação a reação inflamatória local, que foi presente em 100% dos animais, esteticamente apresentando aumento de volume da canela durante os 180 dias do experimento (Nicoletti et al., 2007). Na administração da invenção só foi observada, de maneira leve, reação local em um animal do Grupo da invenção, recuperando-se espontaneamente em 72 horas.

3- A invenção é superior em relação ao início de ação e duração da analgesia na comparação ao Sarapin (Figura 1 e Tabela 1).

4- A eficácia clínica e a segurança da invenção foram comprovadas, inclusive superando os agentes disponíveis no mercado, principalmente em relação ao tempo de analgesia e ausência de reação inflamatória local.

APÊNDICE C

FIGURA 1



APÊNDICE D

REIVINDICAÇÕES

- 1- **Composição farmacêutica caracterizada por** compreender de 4,0 % a 90 % de etanol e um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos.
- 2- **Composição farmacêutica caracterizada por** compreender de 9,95 % a 39,80 % de etanol e um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos.
- 3- **Composição de acordo com a Reivindicação 1 caracterizada por** compreender 0,1 a 2 % de Hexacetonido de Triancinolona e um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos.
- 4- **Composição de acordo com a Reivindicação 2 caracterizada por** compreender 0,1 a 2 % de Hexacetonido de Triancinolona e um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos.
- 5- **Composição de acordo com a Reivindicação 1 caracterizada por** compreender 0,2 a 0,6 % de Hexacetonido de Triancinolona e um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos.
- 6- **Composição de acordo com a Reivindicação 2 caracterizada por** compreender 0,2 a 0,6 % de Hexacetonido de Triancinolona e um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos.
- 7- **Composição de acordo com a Reivindicação 1 caracterizada por** compreender 0,1 a 1% de Cloridrato de Bupivacaína e um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos.
- 8- **Composição de acordo com a Reivindicação 2 caracterizada por** compreender 0,1 a 1 % de Cloridrato de Bupivacaína e um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos.
- 9- **Composição de acordo com a Reivindicação 1 caracterizada por** compreender 0,1 a 0,5% de Cloridrato de Bupivacaína e um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos.
- 10- **Composição de acordo com a Reivindicação 2 caracterizada por** compreender 0,1 a 0,5 % de Cloridrato de Bupivacaína e um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos.
- 11- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 1 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às

doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos animais.

12- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 2 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos animais.

13- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 3 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos animais.

14- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 4 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos animais.

15- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 5 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos animais.

16- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 6 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos animais.

17- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 7 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos animais.

18- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 8 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos animais.

19- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 9 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às

doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos animais.

20- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 10 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de pequenos animais.

21- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 1 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes animais.

22- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 2 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes animais.

23- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 3 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes animais.

24- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 4 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes animais.

25- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 5 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes animais.

26- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 6 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes animais.

27- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 7 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes animais.

28- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 8 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes animais.

29- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 9 caracterizada por ser** na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes animais.

30- **Uso da Composição descrita na Reivindicação 10 caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar dores neuropáticas, dores associadas às doenças degenerativas crônicas e em pós-operatórios dolorosos de grandes animais.