

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Isoflurano: desenvolvimento de um método analítico empregando
microextração em fase sólida, incorporação em nanoemulsões e avaliação
biológica das nanoemulsões**

CAROLINA LOPES KRAHN

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Isoflurano: desenvolvimento de um método analítico empregando
microextração em fase sólida, incorporação em nanoemulsões e avaliação
biológica das nanoemulsões**

Dissertação apresentada por **Carolina Lopes
Krahn** para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a Dr. Renata Pereira Limberger
Co-orientadora: Prof^a Dr. Silvia Stanisçuaski Guterres

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.03.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr. Edna Sayuri Suyenaga
Centro Universitário Feevale

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

K89i Krahn, Carolina Lopes
Isoflurano: desenvolvimento de um método analítico empregando microextração em fase sólida, incorporação em nanoemulsões e avaliação biológica das nanoemulsões / Carolina Lopes Krahn. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xxii, 104 p. : il., tab., gráf.

Dissertação(mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Isoflurano. 2. Validação: métodos de análise de fármacos. 3. Nanoemulsões. 4. Microextração em fase sólida. 5. Anestésicos. I. Limberger, Renata Pereira. II. Guterres, Silvia Stanisçuaski. III. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Toxicologia e 405, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os ensaios biológicos foram realizados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob a coordenação do Prof. Dr. Cláudio Corrêa Natalini. A pesquisa foi financiada pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA). A autora recebeu bolsa de mestrado do CNPq.

Dedico este trabalho aos meus pais Sidnei e Sandra.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr. Renata Pereira Limberger pela acolhida, confiança, apoio, amizade e a oportunidade de realizar este trabalho.

À Prof^a. Dr. Silvia Stanisçuaski Guterres pela confiança, incentivo, amizade, ensinamentos e acolhida.

Ao Prof. Dr. Cláudio Corrêa Natalini por ter acreditado no meu trabalho, por sua valiosa ajuda nos experimentos animais, paciência e pelos ensinamentos.

À Prof^a. Dr. Eliane Dallegrove pela amizade, dedicação e pelo apoio incansável. Sem a sua ajuda o caminho teria sido bem mais complicado.

À Prof^a. Dr. Adriana Raffin Pohlmann pelas importantes contribuições no trabalho.

À Prof^a. Dr. Bibiana Araújo por ter me aberto as portas para o mundo científico.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia Gabi, Kris, Paulinha, Débora, Elo, Ana, Rose, Madson, Patrícia, Rachel, Gil, Ângela, Mariele, Marília, Sabrina, Dani, Lu, Mari, Marcelo, Dona Bia, Rafael, Ivo e Prof^a. Dr. Solange pela acolhida amizade, pelos cafés, discussões científicas e por todos os bons momentos.

Aos amigos do Laboratório 405 e K204 pela acolhida, amizade, pela ajuda na realização deste trabalho, em especial à Renata Raffin pelo apoio e participação direta neste trabalho e ao Guilherme pela ajuda nos experimentos.

Aos amigos veterinários Lu, Ruben, Priscila e Nadia por estarem disponíveis durante a realização dos experimentos biológicos, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação pela amizade e bons momentos de descontração em especial a Aline, Rubia, Rê Contri, Luana e Samuel.

Às amigas Lali e Roberta pela amizade e grande incentivo desde o princípio.

Ao Deividi pelo amor, companheirismo e paciência durante esses dois anos.

Aos meus pais, Sidnei e Sandra, meu irmão Mauricio pelo apoio incondicional, confiança e amor.

Às minhas avós Lia e Paula, por estarem sempre presentes e pelo incentivo durante essa caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a UFRGS pela oportunidade de realizar este curso.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte financeiro e estrutural para realização dos experimentos.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método analítico empregando microextração em fase sólida (SPME) para detecção e quantificação de isoflurano (ISO) na forma volátil e incluso em nanoemulsões intravenosas e, ainda, avaliar o efeito biológico destas. A detecção do ISO foi realizada através de cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC). As condições ideais para realização da pré-concentração e extração de ISO através da técnica de SPME foram temperatura ambiente, agitação constante, 30 min de extração e 2 min de dessorção no injetor do CG. O método desenvolvido foi validado avaliando os parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. As nanoemulsões contendo ISO foram desenvolvidas através da homogeneização à alta pressão, e apresentaram diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH de $150 \pm 0,78$ nm, $0,08 \pm 0,01$, $-18 \pm 2,4$ mV e $6,03 \pm 0,04$, respectivamente. O pH foi ajustado para 7,4 (valor fisiológico). O teor de ISO nas formulações foi de 98,4 %. Não houve modificação das características físico-químicas das nanoemulsões após 30 dias de armazenamento a 8 °C. Análises de espalhamento de luz múltiplo não demonstraram tendência a fenômenos de instabilidade física para as formulações. Os estudos do efeito anestésico das nanoemulsões intravenosas contendo ISO em cães evidenciaram uma redução significativa ($p < 0,05$) na dose comparada com a administração de ISO volátil. Não houve alterações no débito cardíaco, saturação de oxigênio na hemoglobina e nos biomarcadores das funções renal, hepática e muscular. Uma queda na pressão arterial dos cães foi observada em todos os tratamentos devido ao efeito hipotensor do ISO. Após administração das nanoemulsões contendo ISO e branca, observou-se taquipnéia, edema, eritema, e baixas concentrações de dióxido de carbono expiradas. Assim, a nanoemulsificação do ISO foi realizada com sucesso e a aplicação na anestesia geral intravenosa foi demonstrada.

UNITERMOS: isoflurano, microextração em fase sólida, validação, nanoemulsão intravenosa, homogeneização à alta pressão, anestesia geral

ABSTRACT

The aims of this work were to develop and validate an analytical method using solid-phase microextraction (SPME) to detect and quantify isoflurane (ISO) inhalation liquid and loaded in intravenous nanoemulsions, and also evaluate the biological effect of the formulations. ISO detection was made by gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID). The ideal conditions setting for the pre concentration and extraction of ISO through SPME were environmental temperature, constant stirring, 30 min for extraction and 2 min for analyte desorption in the GC inlet port. The developed method was validated by means of specificity, linearity, detection and quantification limits, precision, accuracy and robustness. The ISO-loaded nanoemulsions were formulated by high-pressure homogenization, and presented average diameter, polydispersity index, zeta potential and pH of 150 ± 0.78 nm, 0.08 ± 0.01 , -18 ± 2.4 mV and 6.03 ± 0.04 , respectively. The pH was adjusted to 7.4 (physiological value). The drug content on the formulations was 98.4 %. After 30 days of storage at 8 °C no changes on nanoemulsion's physical-chemical characteristics were observed. Multiple light scattering analysis did not demonstrate any physical destabilization phenomena for the formulations. The anesthetic effect study for the intravenous ISO-loaded nanoemulsions in dogs highlighted a significant reduction ($p < 0.05$) in dosage regimen when compared to the volatile ISO administration. There were no alterations on cardiac rate, oxygen hemoglobin saturation and on biomarkers of the renal, hepatic and muscle functionalities. A decrease in dog's arterial blood pressure in all treatments due the hypotensive effect caused by ISO was observed. After the administration of the nanomulsions, ISO-loaded and unloaded, occurred tachypnea, edema, erythema and low end tidal concentrations of carbon dioxide. Taking all above into account, the method was considered easy on execution and suitable for laboratory routines, the ISO nanoemulsification was made successfully and its application on general anesthesia was demonstrated.

UNITERMS: isoflurane, solid-phase microextraction, validation, intravenous nanoemulsion, high-pressure homogenization, general anesthesia

LISTA DE ABREVIATURAS

AI	Anestésicos Inalatórios
ANOVA	Análise de Variância
CAM	Concentração Alveolar Mínima
CG	Cromatografia Em Fase Gasosa
DIC	Detector De Ionização Em Chama
DPR	Desvio Padrão Relativo
EM	Espectrometria De Massas
EtCO ₂	Concentração Expirada de Dióxido de Carbono
FDA	Food And Drug Administration
HS	Headspace
ISO	Isoflurano
PDMS	Polidimetilsiloxano
SPME	Microextração em fase sólida
SpO ₂	Saturação de oxigênio na hemoglobina
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1:	Representação estrutural dos anestésicos halogenados.....	13
Figura 2:	Ilustração do procedimento de extração e dessorção do analito através da técnica de SPME.....	26

CAPÍTULO I. Solid-phase microextraction/gas chromatography determination of an inhalation anaesthetic, isoflurane in bulk and nanoemulsion dosage form

Figure 1.	Structure and mass fragmentation of ISO.....	36
Figure 2:	Optimization of SPME parameters: extraction time, extraction temperature and desorption time.....	43
Figure 3.	Chromatogram obtained containing ISO and acetonitrile respectively.....	44
Figure 4.	Chromatograms of: placebo nanoemulsions and ISO sample spiked with sevoflurano.....	45
Figure 5.	Chromatograms of: basic hydrolysis, acid hydrolysis, degradation with 30 % of H ₂ O ₂ at 80 °C for 1 and 2 h respectively, degradation using UV-A radiation (352 nm) for 72 h and thermal degradation at 80 °C for 2 h.....	46
Figure 6.	Mass spectra of isoflurane and acetonitrile.....	50

CAPÍTULO II. Isoflurane-loaded nanoemulsions prepared by high pressure homogenization: investigation of stability and dose reduction in general anesthesia

Figure 1.	Influence of number of cycles and homogenization pressure on average diameter of nanoemulsions.....	67
Figure 2:	Relative backscattering profile of ISO-loaded nanoemulsion determined by multiple light scattering analysis.....	69
Figure 3.	ISO-loaded nanoemulsion rheogram.....	70
Figure 4.	Expired ISO during 90 anesthesia minutes from individual measures of inhaled ISO and ISO-loaded nanoemulsion. Intra group mean \pm S.E.M of inhaled and nanoemulsion dosage form.....	72
Figure 5.	Variations on MBP for inhaled ISO treatment, ISO-loaded nanoemulsion treatment and unloaded nanoemulsion during anesthesia period.....	75

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1:	Propriedades físico-químicas do isoflurano.....	15
Tabela 2:	Óleos utilizados em formulações parenterais disponíveis comercialmente.....	21
Tabela 3:	Fibras de SPME disponíveis comercialmente.....	26

CAPÍTULO I. Solid-phase microextraction/gas chromatography determination of an inhalation anaesthetic, isoflurane in bulk and nanoemulsion dosage form

Table 1:	Precision results for ISO-loaded nanoemulsions.....	49
Table 2:	Recovery of ISO added to placebo nanoemulsion.....	49

CAPÍTULO II. Isoflurane-loaded nanoemulsions prepared by high pressure homogenization: investigation of stability and dose reduction in general anesthesia

Table 1:	Stability evaluation of ISO-loaded nanoemulsions stored at 8 °C	68
Table 2:	Canine's cardiac rate and respiratory conditions during anesthesia with inhaled ISO, ISO-nano and unloaded nanoemulsions.....	74
Table 3:	Biochemical parameters evaluated for the groups along the anesthesia period.....	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1 Anestésicos Inalatórios.....	13
3.1.1 Isoflurano.....	15
3.2 Emulsões contendo anestésicos.....	18
3.3 Nanoemulsões.....	18
3.4 Cromatografia em fase gasosa.....	23
3.4.1 Microextração em fase sólida.....	24
CAPÍTULO I. Solid-phase microextraction/gas chromatography determination of an inhalation anaesthetic, isoflurane in bulk and nanoemulsion dosage form.....	29
Abstract.....	34
1. Introduction.....	35
2. Materials and Methods.....	36
2.1. Chemical and reagents.....	36
2.2. Instrumentations.....	37
2.3. SPME procedure.....	37
2.4. Chromatographic conditions.....	38
2.5. Preparation of standard and sample solutions.....	38
2.6. Validation of method.....	39
2.6.1. Specificity/forced degradation studies.....	39
2.6.2. Linearity and limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ)...	40
2.6.3. Precision.....	40
2.6.4. Accuracy.....	41
2.6.5. Robustness.....	41
3. Results and Discussion.....	41
3.1. Selection of solid-phase microextraction conditions.....	42
3.2. Selection of chromatographic conditions.....	43
3.3. Specificity.....	44
3.4. Linearity and limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ).....	48
3.5. Precision and Accuracy.....	48
3.6. Robustness.....	49
3.7. GC-MS analysis.....	50
4. Conclusion.....	50
References.....	51

CAPÍTULO II. Isoflurane-loaded nanoemulsion prepared by high-pressure homogenization: investigation of stability and dose reduction in general anesthesia.....	53
Abstract.....	58
1. Introduction.....	59
2. Methods.....	61
2.1. Materials.....	61
2.2 Nanoemulsions preparation.....	61
2.3 Nanoemulsion characterization.....	62
2.3.1 Particle size and polydispersity index.....	62
2.3.2 Zeta potential.....	62
2.3.3 pH.....	62
2.3.4 Drug content.....	62
2.3.5 Turbiscan Lab [®] Expert stability analysis.....	63
2.3.6 Viscosity.....	64
2.4 <i>In vivo</i> anesthetic activity.....	64
2.4.1 Hemodynamic monitoring.....	65
2.4.2 Biochemical assessment.....	65
2.5 Data analysis.....	65
3. Results and discussion.....	65
3.1 Preparation of isoflurane-loaded nanoemulsion.....	66
3.2 Physico-chemical characterization of isoflurano-loaded nanoemulsion	67
3.3 <i>In vivo</i> anesthetic activity.....	70
4. Conclusions.....	77
References.....	78
6. DICUSSÃO GERAL.....	83
7. CONCLUSÕES.....	89
8. REFERÊNCIAS.....	93
9. ANEXO.....	103

1. INTRODUÇÃO

A anestesia foi demonstrada com sucesso pela primeira vez na metade do século XIX, em um hospital de Boston, através do uso do éter via inalação, onde o paciente submeteu-se a um procedimento cirúrgico sem expressar nenhuma dor. A partir desta descoberta, em pouco tempo outros fármacos anestésicos, com estruturas químicas diversas, estavam presentes na prática clínica, como o clorofórmio, o qual mostrou elevada ação hepato- e nefrotóxica, e o óxido nitroso, que permanece nas rotinas cirúrgicas até os dias atuais (MASHOUR *et al.*, 2005).

Por um período de aproximadamente 150 anos, o número de substâncias utilizadas, objetivando um estado anestésico geral, cresceu em conjunto com os avanços da pesquisa de novos fármacos mais seguros e estáveis. O halotano, ao ser sintetizado em 1951, era considerado um dos maiores avanços na tecnologia dos anestésicos voláteis, embora não seja o anestésico ideal, devido a sua alta taxa de biotransformação que leva a um maior número de efeitos adversos. Possuindo uma taxa de biotransformação de apenas 2 a 3 %, o enflurano surgiu como um sucessor do halotano, que além de exibir menores efeitos adversos, mostrava-se estável frente à luz, ao contrario de seu antecessor que é fotossensível (HALPERN, 2002). A fim de se obter um fármaco mais adequado, após inúmeras sínteses, o isoflurano demonstrou ser o éter fluorado com menores índices de formação de produtos de biotransformação, além de possuir elevada estabilidade, excluindo a necessidade de conservantes, sendo, portanto, comercializado sem adição de excipientes. Além destes anestésicos supracitados, são também amplamente utilizados atualmente em procedimentos cirúrgicos, o sevoflurano e o desflurano (HALPERN, 2002; EGER, 2005).

Fatores relacionados com a potência anestésica estão ligados às propriedades físico-químicas dos fármacos, dentre as quais podemos citar a solubilidade lipídica, o coeficiente de partição, a polaridade e ainda, o ponto de ebulição, onde índices mais elevados deste produzem o mesmo grau de depressão do sistema nervoso central a uma menor pressão do sistema de administração (DASTMALCHI e BARZEGAR-JALALI, 2000). O isoflurano, isômero do enflurano, apresenta-se como um líquido não inflamável em contato com o oxigênio, ar e óxido nitroso sob condições normais. É um fármaco com características fotoestáveis frente à radiação ultravioleta (UV) e possui um coeficiente de solubilidade sangue/gás

intermediário de 1,4 lhe conferindo uma potência anestésica média, com rápida indução e recuperação da anestesia (BOVILL, 2008).

O uso de anestésicos voláteis por via intravenosa é normalmente letal para o paciente devido à indução de lesões no sistema respiratório. A veiculação do fármaco em emulsões como alternativa vem despertando interesse há cerca de quatro décadas (MATHIAS, *et al.*, 2004). As principais vantagens atribuídas a esta forma farmacêutica são a eliminação do tempo necessário para atingir o equilíbrio do fármaco entre o circuito anestésico e os pulmões e de problemas na capacidade funcional residual dos pulmões, além da eliminação da necessidade de vaporizadores específicos (EGER, 1995). O uso de Intralipid[®] como emulsão lipídica, frequentemente empregada como veículo para incorporação destes anestésicos, apresenta problemas de estabilidade, sendo que após um dia de preparação já se observa a separação das fases da emulsão (FAST, *et al.*, 2008). A longa estabilidade física, sem sinais de coalescência ou floculação relatada para nanoemulsões, desde que adequadamente formuladas, as tornam uma forma farmacêutica promissora para liberação ou vetorização de fármacos como os anestésicos halogenados (TADROS, *et al.*, 2004).

Para assegurar a eficácia e segurança de um medicamento, a existência de métodos analíticos sensíveis é imprescindível. Há uma ampla variedade de métodos descritos na literatura para detecção e quantificação de isoflurano (ISE *et al.*, 1997), principalmente por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas (YANG *et al.*, 2000; TURNER *et al.*, 2008) e detector de ionização em chama (ISE *et al.*, 1997; KOJIMA *et al.*, 2001). Na etapa de preparação da amostra, a técnica de *headspace* é a mais utilizada, visto que se trata de substâncias com um grau elevado de volatilidade, em contrapartida, esta apresenta algumas desvantagens como complexidade de suas metodologias e problemas em sua reprodutibilidade como já foi previamente demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Toxicologia. Uma alternativa a esse método poderia basear-se em uma preparação da amostra através de microextração em fase sólida (SPME) com ou sem derivação dos analitos.

A SPME, uma alternativa a técnica por *headspace*, permite a concentração prévia da amostra sem o emprego de solventes orgânicos para extração, e a

escolha da fibra extratora mais adequada ao analito depende das características de polaridade desse, e determina uma maior afinidade pela fase sólida em relação à matriz amostral (WILLE e LAMBERT, 2004).

Considerando que não há método empregando SPME com posterior separação, identificação e quantificação por cromatografia em fase gasosa na quantificação do isoflurano líquido inalatório e em formas farmacêuticas este trabalho visa o desenvolvimento e validação de um método analítico através desta técnica de preparação, e ainda, uma vez que não existem dados na literatura de nanoemulsões lipídicas contendo isoflurano e levando-se em consideração as potencialidades das nanoemulsões intravenosas em solubilizar fármacos lipofílicos este trabalho visa à obtenção dessas nanoemulsões.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica empregando microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia em fase gasosa (CG) para identificação e quantificação de isoflurano como líquido inalatório e em uma nanoemulsão intravenosa preparada através de homogeneização a alta pressão e avaliar a aplicabilidade biológica destas em cães.

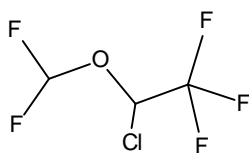
2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método empregando SPME para detecção, identificação e quantificação de isoflurano por CG com detector de ionização em chama (DIC) e verificar a aplicabilidade do método em CG com detector seletivo de massas (EM).
- Preparação de nanoemulsões contendo isoflurano através da técnica de homogeneização a alta pressão;
- Caracterização físico-química das nanoemulsões quanto ao potencial zeta, diâmetro médio, índice de polidispersão, pH, estabilidade física e viscosidade;
- Validação de método analítico para quantificação do isoflurano e determinação do teor do fármaco nas nanoemulsões;
- Avaliação *in vivo* do efeito anestésico em cães das nanoemulsões desenvolvidas.

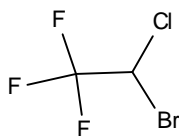
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Anestésicos inalatórios

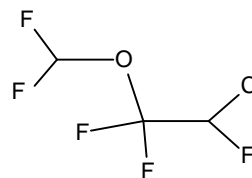
Os anestésicos inalatórios (AI) (Fig. 1) estão inseridos na classe de medicamentos denominada anestésicos gerais. Como o próprio nome indica, os AI possuem a propriedade, reversível, de depressão do sistema nervoso central de maneira que a analgesia atinja um grau onde ocorra a perda da percepção de qualquer estímulo externo, tornando possível a realização de procedimentos cirúrgicos (EVERS *et al.*, 2006).



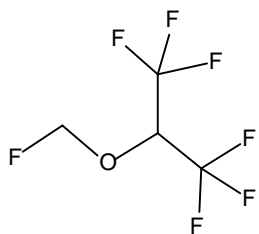
Isoflurano



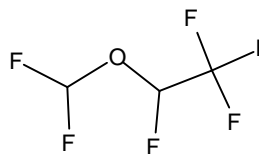
Halotano



Enflurano



Sevoflurano



Desflurano

Figura1. Representação estrutural dos anestésicos halogenados.

Embora o mecanismo molecular de ação exato dos AI, responsável pela perda da sensibilidade do paciente a estímulos nocivos, permaneça desconhecido é descrita a possível interação destes com uma variedade de canais iônicos, como os

de sódio, cálcio e potássio, além de numerosos receptores neuronais como o ácido gama-aminobutírico (GABA), glicina, glutamato, serotonina e nicotina (ISTAPHANOUS e LOEPKE, 2008).

A primeira hipótese proposta para este mecanismo foi relacionado à lipofilia do anestésico, onde os AI agiriam por uma perturbação, não específica, nas membranas das células nervosas. Recentemente, no final do século XX, propôs-se que os AI teriam como alvos diretos ou indiretos uma ampla variedade de proteínas, da albumina aos canais iônicos presentes na membrana celular e, ainda, intracelularmente através da sinalização de moléculas como a proteína quinase C. Contudo, apesar dessa diversidade, os canais iônicos são provavelmente os principais receptores alvo dos AI, uma vez que são mediadores da atividade neural dinâmica, responsável pelo comportamento e consciência. A natureza fraca dessa ligação não-específica as proteínas, é um fator limitante na aplicação de técnicas farmacológicas tradicionais alvo-ligante para identificação dos sítios ativos (PIHLAINEN e OJANPERÄ, 1998; MASHOUR *et al.*, 2005).

A hipnose desencadeada pelos anestésicos gerais, intravenosos e inalatórios, é relacionada à desativação da atividade do tálamo e a perda da conectividade do circuito tálamo-cortical. Através de estudos eletrofisiológicos observa-se a gradativa diminuição da atividade do tálamo-cortical, conforme o paciente perde a consciência (RAMANI e WARDHAN, 2008).

Pode-se citar como propriedades importantes na promoção do efeito analgésico e recuperação do mesmo, o coeficiente de partição sangue:gás, que é determinante na velocidade de indução e o coeficiente de partição óleo:gás do fármaco, esse por sua vez, determinará a potência anestésica e a necessidade de um maior período para o paciente recuperar-se dos efeitos provocados pela anestesia (RANG *et al.*, 2004).

Desvantagens da utilização destes anestésicos incluem depressão dos sistemas respiratório e cardiovascular relacionada à dose de exposição. É descrito na literatura o risco da exposição ocupacional a estes anestésicos, principalmente em profissionais que trabalham em blocos cirúrgicos, clínicas veterinárias e odontológicas, nos quais já foi relatado o aumento do risco da ocorrência de danos

hepáticos (PIHLAINEN e OJANPERÄ, 1998; POLI *et al.*, 1999; EVERS *et al.*, 2006). O Reino Unido estabelece índices máximos de exposição, em pessoas com carga horária de 8 horas de trabalho diário, de 100 ppm do óxido nitroso, 50 ppm para o enflurano e o isoflurano e apenas 10 ppm para o halotano devido a maior probabilidade de dano ao sistema hepático causada por este (HARPER, 2004).

3.1.1 Isoflurano

O isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluorometil éter) (ISO) mostra-se líquido de aspecto límpido e incolor (PIHLAINEN e OJANPERÄ, 1998; YANG *et al.*, 2001). Foi sintetizado, tendo o clorodifluorometano (CF_2HCl), também conhecido como gás Freon 22, e o 2,2,2-trifluoroetanol ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$) como materiais de partida. A rota sintética que mostrou melhores resultados foi a cloração fotoquímica seguida de substituição do cloro pelo fluor, empregando sais fluorados como o fluoreto de potássio, de acordo com o grau de fluorinação do Al (TERREL, 2008). As propriedades físico-químicas do ISO, que estão diretamente relacionadas a sua potência e volatilidade estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do isoflurano

Propriedade	Isoflurano
Fórmula molecular	$\text{CHF}_2\text{-O-CHClCF}_3$
Peso molecular	184,5 g/mol
Ponto de ebulição	48,5 °C
Saturação da pressão de vapor à	
18 °C	219 mmHg
20 °C	240 mmHg
24 °C	286 mmHg
26 °C	312 mmHg
Explosivo	Não
Odor	Pungente
Irritante as vias aéreas	Sim
Densidade	1,502 g/mL

Fonte: EGER, 2005; PRECKEL e BOLTEN, 2005.

O ISO é amplamente utilizado nas fases de indução, juntamente com outros agentes como o propofol, e manutenção do estado anestésico, principalmente por promover uma rápida indução e recuperação pós anestesia (BERNARD, *et al.*, 1990; EVERS *et al.*, 2006).

Produz uma menor vasodilatação cerebral que o enflurano e o halotano, sendo, portanto, de escolha para neurocirurgias (MUSSHOFF *et al.*, 2000; EVERS *et al.*, 2006). Foram observados pacientes submetidos à anestesia geral com ISO, através de tomografia por emissão de pósitrons. Foram observadas modificações no fluxo sanguíneo em determinadas regiões cerebrais, com diminuição da atividade em algumas áreas compensada pelo aumento do fluxo em outras. As regiões da ínsula e cingular anterior tiveram seu fluxo sanguíneo local aumentado, enquanto houve supressão da atividade no tálamo, no giro lingual e no cerebelo, relacionados com a consciência, funções motoras, controle do tônus muscular e o equilíbrio e algumas funções cognitivas, respectivamente (SCHLÜNZEN *et al.*, 2006).

A concentração alveolar mínima (CAM) tem sido definida como a concentração na qual 50 % dos pacientes respondem positivamente ao estímulo nociceptivo, e este valor é empregado para determinar a potência de um anestésico. O ISO possui uma CAM em torno de 1,28 %, embora uma concentração expirada de 2,4 % fora utilizada na modelagem farmacodinâmica do ISO utilizando um modelo bi-sigmoidal, onde os autores concluem que uma taxa constante de primeira ordem determina o equilíbrio entre a fração expirada do anestésico e a concentração no sítio alvo. Através do cálculo da curva dose-resposta foi possível estabelecer que a CAM seja uma representação válida da concentração de efeito do ISO (KREUER *et al.*, 2009).

A farmacocinética do ISO é descrita por um modelo de dois compartimentos. A partir da administração via inalatória de 1143 mL_{vapor}, apresenta um volume de distribuição no compartimento central de 196 mL_{vapor}/kg, no compartimento periférico de 4112 mL_{vapor}/kg e um volume total de distribuição no *steady state* de 4285 mL_{vapor}/kg. A depuração do compartimento central para o periférico é de 30,7 mL_{vapor} kg⁻¹ min⁻¹. A literatura relata ainda que 90 % da dose não é eliminada pelos pulmões no momento da extubação orotraqueal, indicando uma eliminação lenta deste anestésico. Dado similar à excreção do sevoflurano, 91 % (WISSING *et al.*, 2000).

No que se refere ao metabolismo, o ISO possui uma biotransformação hepática mediada pelas enzimas do citocromo P450 2E1, as quais inserem na molécula de ISO um átomo de oxigênio ativo, produzindo ácido clorídrico e um produto de natureza instável que se degrada a ácido trifluoroacético, dióxido de

carbono, íons fluoreto e água (PRECKEL e BOLTEN, 2005). Esta biotransformação é praticamente nula, uma vez que 95 % do ISO administrado é eliminado de maneira inalterada pelos pulmões, sendo de 0 – 0,2 % sua faixa de biotransformação no homem. A metabolização pode ser mensurada através da concentração de fluor inorgânico presente na urina e no sangue do paciente, que já foi demonstrada estar elevada em pacientes submetidos à anestesia com ISO, em comparação ao grupo controle (sem intervenção) (HOLADAY *et al.*, 1975; PRECKEL e BOLTEN, 2005).

Nefrotoxicidade pode ser causada pela formação de fluor inorgânico durante sua biotransformação, onde uma concentração plasmática > 50 µmol/L já é capaz de provocar esse efeito adverso. Contudo, em pacientes com função renal normal esses casos são raros. Danos hepatotóxicos relacionados ao uso de ISO são praticamente inexistentes, devido à baixa metabolização conforme descrito anteriormente, sendo essa chance menor que 1 em 1.000.000 de anestésias. Por outro lado, vômitos e náuseas pós-operatórias são frequentes e comuns a todos os anestésicos gerais. Outro efeito adverso importante é a depressão no sistema respiratório, desencadeada pelo aumento na taxa respiratória com consequente diminuição no volume expirado e um aumento na pressão de dióxido de carbono arterial além da irritabilidade das vias aéreas decorrente do odor pungente característico do ISO (STACHNIK, 2006). Dentre os AI o isoflurano demonstrou possuir uma ação depressora cardíaca inferior aos demais anestésicos, pois promove ativação de barorreceptores aferentes que compensam a hipotensão dose-dependente, atribuída ao ISO (MUZI e THOMAS, 1995).

Considerando as interações com outros medicamentos, o ISO promove um aumento na intensidade e duração da ação de bloqueadores neuromusculares, como o atracúrio e o pancurônio. A dose de ISO é geralmente diminuída quando este é associado ao óxido nitroso, devido à potencialização do efeito de ambos. Benzodiazepínicos e opióides são capazes de reduzir a CAM dos anestésicos inalatórios como um todo, levando também a necessidade de ajuste na dosagem. A recuperação da anestesia neste caso deve ser conduzida a partir da redução simultânea de dose, do anestésico e do opióide, até as respectivas concentrações onde a ventilação espontânea do paciente é adequada e o paciente já é capaz de despertar do estado de inconsciência (GLASS *et al.*, 1997; STACHNIK, 2006).

3.2 Emulsões contendo anestésicos

A liberação do ISO na corrente circulatória após administração via inalação é lenta, devido a limitações desencadeadas pela taxa de ventilação do paciente. Usualmente a indução da anestesia é realizada com um fármaco via endovenosa, como propofol, e a manutenção desta é feita com anestésicos inalatórios. Como alternativa à via inalatória, a administração de anestésicos halogenados, como o ISO, emulsionados via intravenosa vem sendo estudada, o que possibilitaria seu uso para sedação, indução e manutenção da anestesia sem a necessidade de substituição do fármaco durante o procedimento cirúrgico (MECOZZI *et al*, 2008).

A eliminação da necessidade de vaporizadores específicos, rápida indução e recuperação do estado anestésico, redução da exposição ambiental (reduzindo risco ocupacional dos profissionais), redução da toxicidade tecidual oriunda de produtos de biotransformação oxidativos e, ainda, uma menor dose requerida para indução e manutenção da anestesia, cerca de 80 e 20 %, respectivamente, são algumas vantagens apresentadas pelo uso de ISO emulsionado via parenteral (LUCCHINETTI, *et al.*, 2008).

O uso de ISO, e outros AI como halotano e sevoflurano, em emulsão vem sendo extensamente estudado apresentando resultados promissores. Mathias e colaboradores (2004) demonstraram estabilidade hemodinâmica em porcos que receberam ISO em emulsão intravenosa. Por sua vez, Chai e colaboradores (2008) observaram que uma emulsão lipídica de ISO 8 % é capaz de produzir efeito anestésico epidural reversível em coelhos sem alteração do seu nível de consciência. Uma limitação dessas formulações é a sua baixa estabilidade física e a baixa solubilização (cerca de 3 %) do anestésico na emulsão pré-formada Intralipid®, que é relatada como veículo principal utilizado para emulsificação desses agentes (FAST *et al.*, 2008).

3.3 Nanoemulsões

A nanotecnologia é uma ferramenta importante no desenvolvimento de formas farmacêuticas adequadas capazes de carrear fármacos até os seus respectivos sítios alvos, principalmente os que possuem propriedades biofarmacêuticas desfavoráveis a sua administração, além de promover uma farmacocinética

adequada e diminuição da toxicidade atribuída ao fármaco (DEVALAPALLY *et al.*, 2006). A utilização de nanocarreadores para administração de fármacos teve um grande avanço nas últimas décadas. Também chamados de sistemas coloidais, esses carreadores são capazes de adsorver, encapsular ou dispersar o fármaco em partículas com escalas nanométricas (LETCHFORD e BURT, 2007).

Além disso, sistemas nanoestruturados como nanoesferas, nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas, microemulsões, niossomas e nanoemulsões, promovem uma liberação homogênea do fármaco, uma vez que, possuem uma ampla área superficial (GUTERRES *et al.*, 2007; MISHRA *et al.*, 2010). Dentre suas características, está a habilidade de incorporar fármacos hidrofílicos e lipofílicos e também, controlar e vetorizar a liberação da substância (HERTAULT *et al.*, 2003).

Nanoemulsões, também conhecidas como emulsões submicrométricas, apresentam diâmetros que variam entre 100 e 500 nm, o que as torna cineticamente estáveis, com tendência reduzida a fenômenos que estão associados à desestabilização do sistema como cremagem, floculação e coalescência. Neste tipo de carreador, fenômenos de agregação das partículas são inibidos por uma estabilização estérica natural, que é essencialmente correlacionada com o diâmetro médio das partículas (ANTON *et al.*, 2008).

Além do tamanho reduzido, outros fatores influenciam a estabilidade física e química de carreadores coloidais lipídicos. A escolha dos excipientes é de extrema importância, pois estão diretamente relacionados às características físico-químicas do sistema. O processo também requer atenção, principalmente com relação à temperatura e a luz incidente na formulação. Variações no potencial zeta, um importante indicador da carga de superfície da partícula, são usadas para prever e controlar a estabilidade das suspensões e emulsões coloidais. Valores elevados de carga superficial, em módulo, previnem a tendência natural de agregação das partículas, através a repulsão ocasionada pela carga entre elas (HERTAULT *et al.*, 2003).

Dentre as aplicações de grande interesse das nanoemulsões estão seu emprego na área cosmética e farmacêutica. Produtos farmacêuticos destinados a via oral, ocular, tópica e parenteral são descritos na literatura. O uso de uma

nanoemulsão intravenosa mostra-se atraente principalmente por possuir as gotículas com diâmetros inferiores a 1 μm e baixa viscosidade, que são algumas das propriedades exigidas por esta via. Seu emprego é descrito para nutrição parenteral, controle de liberação e vetorização de fármacos em sítios de ação específicos ou como carreadores em terapia gênica (FLOYD, 1999; SOLANS *et al.*, 2005).

Os métodos básicos para a preparação de nanoemulsões podem ser classificados em 2 tipos: de baixa e alta energia sobre o sistema. Emulsificação espontânea, difusão do solvente e temperatura de inversão de fases, são métodos que empregam baixa energia, sendo de escolha para moléculas consideradas lábeis. Por sua vez, microfluidização e homogeneização a alta pressão, aplicam pressões elevadas em uma pré-emulsão, forçando a passagem desta por um pequeno orifício. O diâmetro dessas gotículas está diretamente associado à pressão exercida e ao número de ciclos em que o produto é submetido à câmara de pressão. A vantagem dos métodos de alta energia é a possibilidade de trabalhar em escala laboratorial e industrial (CONSTANTINIDES *et al.*, 2008).

No que tange a homogeneização a alta pressão, estão comercialmente disponíveis equipamentos com diversas capacidades de produção. A formulação dentro do equipamento é acelerada a altas velocidades que podem atingir 1.000 km/h. As taxas elevadas de tensão de cisalhamento e força de cavitação rompem as partículas a uma escala nanométrica. Esta técnica vem sendo usada há anos na produção de nanoemulsões aplicadas a nutrição parenteral (MEHNERT e MÄDER, 2001). Os homogeneizadores convencionais trabalham em pressões que variam de 500 a 1000 bars, embora pressões que chegam até 3500 bars tenham sido alcançadas em equipamentos desenvolvidos mais recentemente. Contudo, pressões extremamente elevadas são consideradas desfavoráveis, uma vez que seu forte fluxo elongacional é capaz de degradar irreversivelmente moléculas de cadeia longa (SOLANS *et al.*, 2005).

O procedimento de homogeneização pode ser conduzido utilizando elevadas temperaturas, condições geralmente utilizadas para a preparação de nanopartículas lipídicas sólidas, onde a temperatura deve estar acima do ponto de fusão do lipídio sólido. Como alternativa, tem-se a realização do processo a baixas temperaturas, superando-se assim, problemas com a degradação térmica de alguns fármacos e a

distribuição do fármaco pela fase aquosa da formulação (MEHNERT e MÄDER, 2001).

Considerando a composição da formulação, os excipientes devem possuir os requisitos mínimos exigidos pela via parenteral. Biocompatibilidade, apirogenicidade, não ser irritante às terminações nervosas e não hemolítico são algumas das propriedades que os componentes das fases oleosas, aquosas e os emulsionantes nas concentrações definidas, devem possuir (DATE e NAGARSENKER, 2008). O pH das nanoemulsões intravenosas deve ser ajustado para o mesmo valor do pH plasmático, entre 7,38 e 7,42, antes da administração no paciente (ATHERTON, 2009).

A escolha do óleo leva em conta principalmente a capacidade deste em solubilizar e/ou estabilizar o fármaco no nanocarreador (FLOYD, 1999). Dentre os óleos que são empregados em nanoemulsões visando à administração parenteral estão o óleo de soja, o esqualeno, óleo de peixe purificado, triglicerídeos de cadeia longa e média, trioleína, óleo de côco, óleo de milho, óleo de algodão e óleo de rícino (FLOYD, 1999; STRICKLEY, 2004; DATE e NAGARSENKER, 2008). Podemos visualizar alguns óleos presentes em emulsões parenterais que já estão no mercado na Tabela 2.

Tabela 2. Óleos utilizados em formulações parenterais disponíveis comercialmente

Óleo	Via de administração	Exemplos
Rícino	Intramuscular	Fulverstrat
Algodão	Intramuscular	Cipionato de testosterona Cipionato de estradiol
Triglicerídeos de cadeia média	Infusão intravenosa	Lipofundin
Gergelim	Intramuscular	Decanoato de halperidol
Soja	Infusão intravenosa e <i>bolus</i>	Propofol Intralipid Lyposin III
Cártamo	Infusão intravenosa	Lyposin II

Fonte: STRICKLEY, 2004.

O tensoativo lipofílico de primeira escolha é a lecitina devido a sua elevada biocompatibilidade (DATE e NAGARSENKER, 2008). São poucos os co-tensoativos que preenchem os requisitos de compatibilidade e segurança desta via, dentre eles estão inseridos o polissorbato 80 e o poloxâmero 188 (STRICKLEY, 2004; FDA,

2010). A combinação de fosfolípídeos e um tensoativo co-polímero não-iônico, como os descritos acima, leva a formação de uma “capa” protetora em torno do óleo, melhorando a estabilidade do sistema, característica relacionada à estabilização estérica promovida pelo emulsionante não-iônico (JUMAA e MÜLLER, 2002).

Para possibilitar a administração intravenosa, a fase aquosa deve possuir um agente isotônico. O glicerol é o mais empregado, mas são utilizados também o sorbitol e o xilitol. Dependendo da estabilidade do fármaco pode-se fazer necessária a utilização de antioxidantes onde o α -tocoferol é o mais comum. No caso de preparações parenterais de pequeno volume a adição de um agente antimicrobiano também é recomendada, sendo permitido o uso de compostos de amônio quaternário e derivados metila e butila do ácido *p*-hidroxibenzoico (FLOYD, 1999).

Kelmann e colaboradores (2007) desenvolveram nanoemulsões contendo carbamazepina, na concentração de 2 mg/mL através do método de emulsificação espontânea, empregando um planejamento experimental fatorial. As formulações exibiram estabilidade durante um período de 3 meses de armazenamento, mantendo o diâmetro médio de partícula de 150 nm, potencial zeta de -40 mV e o teor de fármaco permaneceu em 95 %. Os autores ainda estudaram o perfil de liberação *in vitro* da carbamazepina a partir das nanoemulsões e obtiveram uma cinética de liberação dependente da raiz quadrada do tempo, onde 95 % do fármaco foram liberados em 11 horas.

Nanoemulsões contendo claritromicina visando a aplicação parenteral foram desenvolvidas por Li e colaboradores (2008) com o objetivo de minimizar a dor provocada durante a aplicação da formulação disponível comercialmente. Para isso, através da técnica de inversão de fases, os autores otimizaram uma emulsão contendo tocoferol combinado com ácido oléico, como contra-íons para assim, alcançar a concentração terapêutica da claritromicina na formulação. A nanoemulsão apresentou diâmetro médio, potencial zeta e distribuição da claritromicina na fase oleosa de 138 nm, -32,15 mV e 97,28 %, respectivamente. As formulações demonstraram estabilidade ao longo de 10 meses, tanto em temperatura ambiente como quando mantidas a uma temperatura de 4 °C. Para avaliar se a nanoemulsão efetivamente reduzia a dor durante a aplicação, o teste histopatológico para verificação da irritação em veia da orelha de coelho foi

conduzido e demonstrou que a nanoemulsão contendo tocoferol inibiu a ação irritante da claritromicina.

Empregando a homogeneização a alta pressão, Shi e colaboradores (2009) incorporaram cinarizina, um fármaco muito instável, em nanoemulsões lipídicas destinadas à administração intravenosa. A localização do fármaco na camada de lecitina, ao invés de estar dissolvida no núcleo oleoso, foi uma estratégia adotada pelos autores para minimizar a degradação do fármaco. Para isso, a lecitina e a cinarizina foram dissolvidas em álcool desidratado que, posteriormente, foi evaporado, e o produto resultante foi incorporado normalmente na fase oleosa para preparação da nanoemulsão. Um aumento na meia vida da cinarizina incorporada nas nanoemulsões também foi observado, 1.472 dias a 4 °C, um tempo muito superior aos 20 dias de meia vida da solução aquosa de cinarizina.

3.4 Cromatografia em fase gasosa

A técnica de separação, identificação e quantificação de compostos por cromatografia em fase gasosa (CG), está consolidada há algum tempo, sendo que seus avanços atualmente condizem com o aprimoramento da instrumentação, melhoramento da qualidade dos *softwares* e, ainda, o emprego de novas fases estacionárias visando principalmente uma separação de misturas complexas (BARRI e JÖNSSON, 2008).

São empregados mais de cinquenta tipos de detectores acoplados ao cromatógrafo a gás, sendo que, destes, o detector de ionização em chama (DIC), detector de condutividade térmica e o de captura eletrônica são os mais difundidos e utilizados mundialmente. A escolha do detector está aliada a sua adequação com a análise que está sendo proposta, com o custo e disponibilidade deste pelo laboratório de pesquisa e com as características requeridas para a análise (LANÇAS, 1993).

Como já mencionado, o detector DIC é um dos mais amplamente empregados nas análises por CG, e seu funcionamento está baseado no conceito que a condutividade elétrica de um gás é proporcional ao número de partículas carregadas do mesmo. É um detector extremamente vantajoso na análise de substâncias orgânicas, não sendo aplicável para compostos com características

inorgânicas. Sua sensibilidade está ligada a combustão dos carbonos presentes na molécula do analito, que produz CO₂, água e íons que geram uma corrente iônica medida pelos eletrodos do detector (LANÇAS, 1993; SHOFIELD, 2008).

Uma das maiores vantagens do uso de CG está ligada ao fato de esta ser uma técnica considerada simples, com alta sensibilidade e devido à possibilidade de hifenização com detectores de massas (EM) (UYANIK, 1997). A CG-EM permite a detecção de vários compostos voláteis em uma mesma amostra, fornece resultados exatos, rápidos, precisos e reprodutíveis, sobretudo quando opera no modo de monitorização seletiva de íons (SIM). No que se refere à análise de anestésicos voláteis, CG é a técnica de escolha geralmente associada a *headspace*, em virtude das propriedades físico-químicas, caracterizadas por possuir alta volatilidade. O princípio desta técnica é o estabelecimento, a uma dada temperatura, de um equilíbrio entre a fase gasosa e no caso de anestésicos voláteis, por exemplo, sua concentração na amostra (UYANIK, 1997). Um problema apontado na técnica de *headspace* é a variação na sua reprodutibilidade, uma vez que este parâmetro é fortemente influenciado por variações de pressão no sistema (ACCORSI *et al.*, 2003).

3.4.1 Microextração em fase sólida

Para superar problemas de sensibilidade e reprodutibilidade, uma técnica que tem se mostrado promissora é a microextração em fase sólida (SPME). Esta técnica foi demonstrada pela primeira vez no início dos anos 90 por Pawlizyn (ARTHUR e PAWLIZYN, 1990) para detecção de compostos orgânicos contaminantes da água, como o tricloroetano, por exemplo. Consiste em uma microseringa que contém no interior de sua agulha uma fibra ótica de sílica fundida, revestida de uma camada fina de polímero. Dentre os polímeros mais comumente usados podemos citar o PDMS e o poliacrilato (Tabela 3) (LANÇAS, 2004; SEBBEN, 2007). A técnica se mostrou promissora pelo fato de não utilizar solvente orgânico durante o processo de extração, além de apresentar uma maior sensibilidade, precisão e reprodutibilidade do método (MIEKISCH *et al.*, 2001; DENG e SIMPSON, 2004), principalmente para análises de compostos extremamente voláteis como o isoflurano, o enflurano e o halotano.

Tabela 3. Fibras de SPME disponíveis comercialmente

Revestimento da fibra	Espessura do filme (μm)	Polaridade	Aplicação analítica	Característica do analito
PDMS	100	Apolar	CG/CLAE	Volátil
	30	Apolar	CG/CLAE	Semi-volátil
	7	Apolar	CG/CLAE	Semi-volátil
PDMS/Divinilbenzeno (DVB)	65	Bi-polar	CG	Volátil polar
	60	Bi-polar	CLAE	Analitos em geral
Poliacrilato	85	Polar	CG/CLAE	Semi-volátil polar (fenol)
Carboxen/PDMS	75	Bi-polar	CG	Gasoso e volátil
Carboxen/DVB	65	Polar	CG	Analito polar (alcoóis)
DVB/PDMS/Carboxen	50/30	Bi-polar	CG	Odores e flavorizantes

Fonte: MILLS e WALKER, 2000.

O procedimento de extração pode ser realizado imergindo a fibra diretamente na amostra ou através da técnica de HS. Por ser um método em que a extração não ocorre exaustivamente, um equilíbrio trifásico, entre a amostra, a fibra extratora e a fase gasosa, é considerado ideal. Após ter-se alcançado a condição de equilíbrio, é realizada a dessorção do analito da fibra para o equipamento que será utilizado na análise, caso da utilização de um cromatógrafo gasoso, a fibra é inserida diretamente no injetor (Fig. 2). Para uma otimização do processo deve-se observar o tempo, temperatura, velocidade de agitação da amostra, pH, força iônica e a escolha da fibra ideal de extração como parâmetros críticos à excelência dos resultados, dentre outros fatores (MIEKISCH *et al.*, 2001; SEBBEN, 2007; AKAPO e MCCREA, 2008), uma vez que, a técnica que envolve SPME possui um número maior de parâmetros a serem controlados se comparada a outras técnicas de extração como a extração em fase sólida (LANÇAS, 2004).

Avanços no desenvolvimento e otimização tecnológica das membranas, de maneira geral, empregadas em métodos de extração e preparação da amostra previamente a injeção em um CG têm apresentado resultados cada vez mais interessantes e bem sucedidos para aplicação nos mais diversos analitos, principalmente os de amostras ambientais e biológicas que possuem um alto índice

de contaminação. Em SPME, o aumento da qualidade das membranas, está ligado a uma proteção da fibra através de revestimentos, como polipropileno, por exemplo, tornando possível a extração de amostras protéicas sem o risco de perda destas proteínas (BARRI e JÖNSSON, 2008).

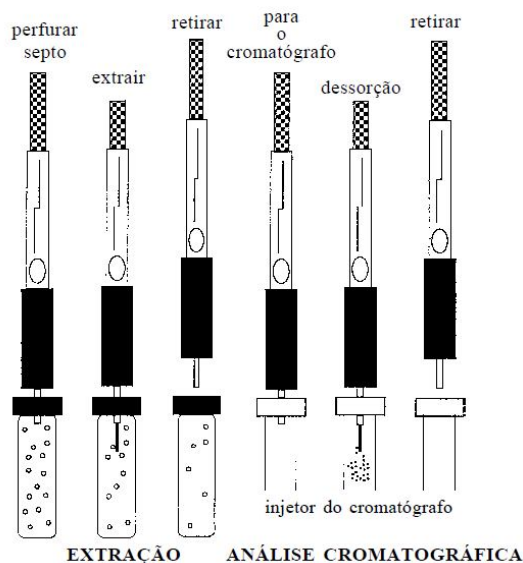


Figura 2. Ilustração do procedimento de extração e dessorção do analito através da técnica de SPME. Fonte: VALENTE e AUGUSTO, 2000.

Inicialmente a SPME foi desenvolvida para análise de micropoluentes orgânicos em água (LANÇAS, 2004), atualmente seu uso tem se expandido para outras áreas, sendo descrito na literatura diversas aplicações, por exemplo, detecção de compostos orgânicos em preparações farmacêuticas (AKAPO e MCCREA, 2008), presença de anti-inflamatórios em amostras de água (ARAUJO *et al.*, 2008), contaminação de alimentos por compostos químicos (JAGER *et al.*, 2008), dentre outras.

Com relação à aplicabilidade desta técnica de extração a anestésicos voláteis halogenados, estudos preliminares têm sido relatados na literatura, para análise em urina de profissionais expostos de maneira ocupacional. As análises foram realizadas em HS, onde duas fibras foram comparadas quanto a sua eficiência extratora, uma com revestimento de divinibenzeno/carboxen/PDMS e outra de carboxen/PDMS. As amostras foram extraídas a temperatura ambiente sem agitação e dessorvidas no injetor do CG. A validação método evidenciou que ambas as fibras

mostraram-se adequadas na determinação de concentrações extremamente baixas de anestésicos halogenados na urina (POLI *et al.*, 1999).

Considerando amostras sanguíneas, MIEKISCH e colaboradores (2001) desenvolveram e validaram um método empregando SPME com posterior separação e identificação por CG-EM, para análise de compostos voláteis que são exalados durante a respiração, incluindo biomarcadores de patologias como o diabetes, dentre os analitos estava incluído o ISO. Os autores utilizaram uma fibra de carboxen/PDMS e as condições de pré-concentração e extração dos analitos foi estabelecida em 5 min a 40 °C. Foram coletadas amostras de sangue venoso e arterial e os valores encontrados foram comparáveis as taxas de excreção pulmonar previamente descrita na literatura.

No que se refere às demais matrizes biológicas como bile e órgãos como o estômago, rins, fígado e cérebro, a detecção de compostos halogenados é de grande valia principalmente em casos forenses. Uma fibra de PDMS com espessura de revestimento de 100 µm foi utilizada na concentração e extração de halotano nas matrizes anteriormente citadas, além da convencional urina e no sangue, através do HS seguida de CG-EM. O método demonstrou uma recuperação de 72 % e um coeficiente de correlação maior que 0,99. O método depois de validado foi aplicado para quantificação de halotano em várias amostras em um caso de homicídio (MUSSHOF *et al.*, 2000).

O método descrito anteriormente para quantificação de halotano foi aplicado também na quantificação de enflurano, onde o ISO foi utilizado como padrão interno, em um caso incomum onde um médico anestesista foi detido após ocasionar um acidente, e foi detectada a presença de enflurano no seu sangue (MUSSHOF *et al.*, 2002). O exposto evidencia a aplicabilidade da SPME em análises cotidianas.

4. CAPÍTULO I:

“Solid-phase microextraction/gas chromatography determination of an inhalation anaesthetic, isoflurane in bulk and nanoemulsion dosage form.”

Submetido para publicação na revista *Chromatographia* em fevereiro/2010

O presente trabalho descreve o desenvolvimento e validação de um método analítico empregando SPME para a concentração e a extração de ISO com posterior separação e quantificação por CG/DIC e confirmação da identidade dos picos por CG-EM.

A validação foi realizada conforme as normas do *International Conference Harmonization* (ICH). O procedimento de SPME foi conduzido em temperatura ambiente empregando uma fibra de PDMS com espessura de 100 µm. Foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu® com detecção por ionização em chama contendo uma coluna capilar GS-Gaspro 30m x 0,32mm (J & W Scientific). A acetonitrila mostrou ser um padrão interno adequado. Parâmetros como especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez foram avaliados. Para confirmação da identidade dos picos (ISO e padrão interno) utilizou-se um CG-EM Shimadzu® system QP5000 CLASS AS.

O método proposto mostrou-se simples e adequado para aplicação na quantificação de ISO em matéria-prima e nanoemulsificado na rotina laboratorial.

**Solid-phase Microextraction/Gas Chromatography Determination of an
Inhalation Anaesthetic, Isoflurane in Bulk and Nanoemulsion Dosage Form**

Carolina L. Krahn ¹, Roberto Debom ², Paulo Mayorga ¹, Silvia S. Guterres ¹, Renata P. Limberger ¹✉

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP: 90610-000 Porto Alegre, RS, Brasil; E-mail: rlrenata@yahoo.com

² Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil

Abstract

A stability-indicating gas chromatographic (GC) method was developed and validated for quantitative determination of a halogenated volatile anesthetic isoflurane (ISO) in the presence of degradation products generated under stress conditions. The sample concentration was carried out by means of solid-phase microextraction (SPME) using a 100- μm polydimethylsiloxane (PDMS) fiber, desorbed inside the GC inlet port and analyzed using a J & W Scientific GS-Gaspro (30 m x 0.32 mm) capillary column with flame ionization detection (FID) and confirmation by GC-mass spectrometry (MS). The response was linear over a range of 3.75 to 30.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r = 0.9996$). The specificity and stability-indicating capability of the method was verified subjecting ISO to hydrolytic, oxidative, photolytic, and thermal stress conditions. The method showed good recovery (99.54 %) with low intra- and inter-day relative standard deviation (RSD) (≤ 2.5 %). A considerable degradation occurred under stress conditions evidenced by an ISO peak area reduction while the degradation product was not detectable. There was no interference of the excipients in the determination of the drug. Thus, the proposed method was found to be stability-indicating and can be used for routine analysis for quantitative determination of ISO liquid anesthetic.

Keywords: isoflurane, gas chromatography, solid-phase microextraction, forced degradation, validation

1. Introduction

Isoflurane (ISO), (1-chloro-2,2,2-trifluoroethyl difluoromethyl ether) (Fig. 1) is an inhalation volatile anesthetic, widely used for keeping anesthetic conditions after induction by others agents. At room temperature, ISO is a colorless, clear and stable liquid administered by vaporizing; it's nonflammable in contact with air and oxygen [1-4]. Intravenous administration of volatile anesthetics has been described as advantageous in comparison with the inhalation form [5]. Taking into account this feature, a novel ISO nanoemulsion is under development by our research group.

Solid-phase microextraction (SPME) is a sample preparation technique firstly developed by Arthur and Pawliszyn [6]. It has gained popularity as a solvent-free, simple and reliable tool for analyzing a large amount of volatile and semi-volatile substances. It has been successfully employed in pharmaceutical analysis such as sampling of drugs in water and biological fluids, volatile flavors compounds and foods contaminants [7-9].

To the best of our knowledge there is no reference in the literature for the determination of ISO in bulk and dosage forms by means of solid-phase microextraction (SPME) followed by GC/FID method. Generally, ISO has been determined in biological fluids using headspace (HS)-GC coupled to mass spectrometer and there are few works using SPME for sample extraction and concentration [1, 4, 10, 11, 12]. Our research group has been validated a HS-GC-MS method for quantification of ISO in a pharmaceutical dosage form and it shown a considerable variability inter-assays (data not published) showing the importance of SPME in this quantification process. To our knowledge, the use of acetonitrile as an internal standard (IS) has not been reported, advantages related are easy acquisition

and cost effectiveness than traditional IS halothane and enflurane [4,10], besides that it is not a common interferent from the routine analyzer.

The International Conference on Harmonization (ICH) requires the stress testing to elucidate the inherent stability characteristics of active substances [13]. The aim of the present study was develop and validate a rapid stability-indicating gas chromatography method, in compliance with ICH guidelines, United States Pharmacopoeia and FDA [14-16].

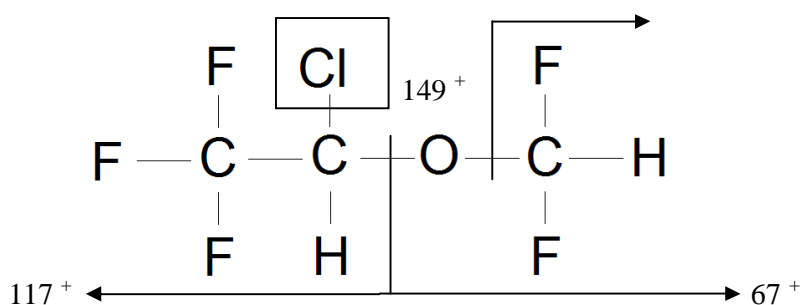


Fig.1. Structure and mass fragmentation of ISO.

2. Materials and Methods

2.1 Chemical and reagents

Isoflurane (CAS 26675-46-7, MW 184.5) (purity 99.9 %) was the gift of Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos[®] (São Paulo, Brazil). HPLC grade acetonitrile was obtained from Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brazil). Purified water was obtained using a Milli-Q Plus[®] (Millipore, Bedford, USA). All other reagents and chemicals were of analytical grade. The excipients used in the preparation of the nanoemulsions were soybean lecithin (Lipoid S75[®]) kindly gifted by Lipoid[®] GmbH (Ludwigshafen, Germany); caprylic/capric triglyceride mixture was acquired from Brasquim (Porto Alegre, Brazil); polysorbate 80 was obtained from Delaware (Porto

Alegre, Brazil). Sorbitol USP 70% was purchased from ALZ (Porto Alegre, Brazil). In parallel, placebo formulations (without ISO) were also prepared in order to study the specificity of the method.

2.2 Instrumentations

SPME devices together with their fiber assemblies were purchased from Supelco (Bellefonte, USA). The analysis was performed in a Shimadzu GC/FID system 2010 (Kyoto, Japan) which consisted of a split/splitless injector port and a flame ionization detector (FID). Data were acquired and processed using Labsolutions GC-Solution[®] software. The chromatographic separation was performed using a J & W Scientific GS-Gaspro column (30 m x 0.32 mm) (Folsom, USA). Photodegradation was carried out in a photostability UV chamber (1.0 x 0.17 x 0.17 m) with mirrors and equipped with an UV-A lamp (Orion[®], 352 nm, 30 W, 130 V) and UV cuvettes (Ultra Vette[®], São Paulo, Brazil) were used as a container for samples. For thermal stability studies, react-vials on dry block sample from Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA) were used. Analyte identity confirmation was performed in a Shimadzu GC/MS system QP5000 CLASS SA – cylinder with quadrupole operating at 70 eV.

2.3 SPME procedure

Before SPME procedure, the 100 µm polydimethylsiloxane (PDMS) fiber was pretreated in the injection port of a gas chromatograph at 250 °C for 30 min. NaCl (15 %) and purified water (1 mL) was drawn into a headspace vial and frozen, this

volume was kept constant. Then, a magnetic stirring bar, internal standard acetone nitrile (IS) and the analyte was added to the vial, which was immediately sealed with parafilm. The vial was put into an aluminum block heater for stirring during 10 min at room temperature (20 ± 3 °C) to reach the equilibrium between sample and headspace. After reaching the equilibrium the syringe needle of the SPME device was inserted into the headspace of the vial for 30 min under constant stirring. The needle containing the SPME fiber was withdrawn and introduced into the port of the GC. Port temperature was set in 200 °C. The SPME device was held in the port during 2 min to complete desorption of the ISO.

2.4 Chromatographic conditions

The chromatographic analysis was performed using nitrogen as carrier gas (1.0 mL min^{-1}). The oven temperature was programmed at 160 °C and increased to 260 °C at 25 °C min^{-1} (holding time 4 min). Injector and detector were set at 200 °C and 270 °C respectively. Split injection mode (20:1) was used. For GC-MS analysis the final holding time was set for 8 min instead 4 min as for GC/FID procedure.

2.5 Preparation of standard and sample solutions

The stock solution was prepared with 100 μL of ISO in methanol to produce a concentration of $150.2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ of analyte. This solution was transferred with appropriate volumes into the SPME vial to yield a final concentration of $15.02 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

An equivalent volume of $15.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ of ISO in the developed nanoemulsion was transferred to a SPME vial and $200 \mu\text{L}$ of methanol was added to the nanoemulsion formulations in order to solubilize all the components. The extraction and chromatographic conditions previously described in this paper were applied.

All the samples were prepared in an ice bath with room temperature established at 20°C to avoid ISO volatilization.

2.6 Validation of method

The developed chromatographic method was validated for specificity, linearity, sensitivity, precision, accuracy, robustness, following in the guidelines [14-16]. Furthermore, stability-indicating capability was determined by forced degradation conditions in accordance with ICH guidelines [13-15].

2.6.1 Specificity/forced degradation studies

The method specificity was assessed by analyzing a placebo nanoemulsion and the possible interference or overlap with ISO response of a structurally similar anesthetic sevoflurane. As ISO anesthetic liquid is used alone without pharmaceutical excipients, their interference was not evaluated on bulk samples.

Forced degradation studies were also performed for ISO to provide an indication of the stability-indicating property and specificity of the proposed method.

To perform the basic hydrolysis ISO was diluted in 0.1 M NaOH ($150.2 \mu\text{g mL}^{-1}$), allowed to react for 2 h at room temperature ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$). The acid hydrolysis was performed in 0.1 M HCl , the reaction was carried out for 2 h at 80°C .

The oxidation was performed preparing ISO stock solution (1.5 mg mL^{-1}) in methanol and diluted with 30% H_2O_2 and kept for 1 and 2 h at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ protected from light.

For thermal degradation studies the ISO stock solution was heated for 2 h at $80 \text{ }^\circ\text{C}$. To perform the stress degradation using UV-A radiation (352 nm for 72 h), ISO solutions were placed into quartz cuvettes, at room temperature ($23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). Control samples protected from light with aluminum foil were also placed in the light chamber concurrently

Following the degradation period, all samples were prepared for analysis as previously described.

2.6.2 Linearity and limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ)

Three calibrations curves were prepared with appropriate volumes of the ISO stock solution into the SPME vials and analyzed at five different concentrations (3.75, 7.51, 15.02, 22.33 and $30.04 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). The results were tested by ANOVA and linear regression analysis was used to obtain the equation and correlation coefficient. The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) values were calculated using the regression line directly, based on the residual standard deviation and the slope.

2.6.3 Precision

The precision was determined using the parameters of repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day), analyzing six sample solutions of ISO

prepared at $15.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ in three different days. They were expressed as relative standard deviation (RSD) of the measurements.

2.6.4 Accuracy

Accuracy was calculated as the percentage of recovery where the nanoemulsion (placebo) was spiked with known amounts of ISO, at 3 different levels to yield final concentrations of 12.01, 15.02 and $18.02 \mu\text{g mL}^{-1}$, corresponding to 80, 100 and 120 % of the nominal analytical concentration.

Accuracy was referred to bulk ISO once specificity, linearity and precision have been determined according to ICH guidelines for drug substance.

2.6.5 Robustness

Robustness testing was performed to evaluate the chromatographic parameters (peak resolution, peak retention time and repeatability), changing flow rate (1.0 to 1.5 mL/min), injection port temperature (200 °C to 190 °C) and time of extraction by SPME (30 to 40 min).

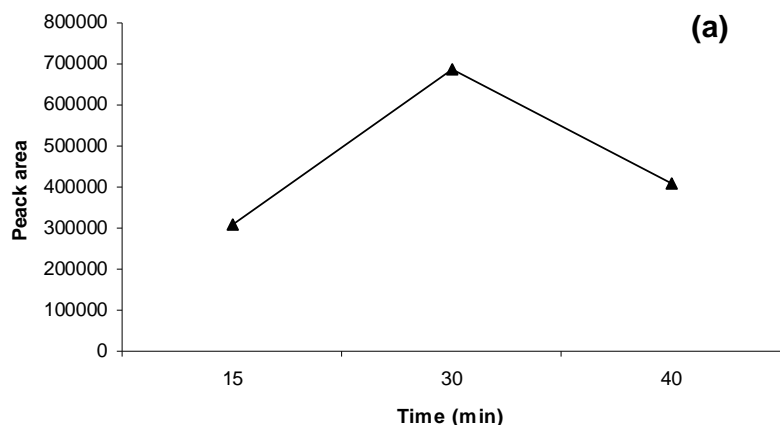
The stability of solutions was also evaluated at room temperature ($20 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) and in the refrigerator ($8 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), during 24 hours. The stability of these solutions was verified by performing the experiment and observing any change in the chromatographic pattern, comparing with freshly prepared solutions. The RSD of the assay was calculated for the study period during solutions stability experiments.

3. Results and Discussion

3.1 Selection of solid-phase microextraction conditions

SPME procedure has been applied to headspace sampling of volatile anesthetics in biological fluids (MIEKISCH *et al*, 2001; MUSSHOF *et al.*, 2000; PIHLAINEN e OJANPERÄ, 1998). In the present study, to quantify ISO drug substance and ISO in the nanoemulsion, the SPME parameters were set with 15% of NaCl to promote the salting-out effect, improving the extraction efficiency. The use of room temperature was suitable, eliminating any heating process during SPME procedure. Various time of extraction were tested and 30 min exhibit the best extraction profile. Magnetic stirring was kept constant during this procedure. The optimal desorption condition was 2 min at 200 °C (Fig. 2).

The PDMS fiber was considered suitable to extract ISO, once it is a non polar and high volatile substance.



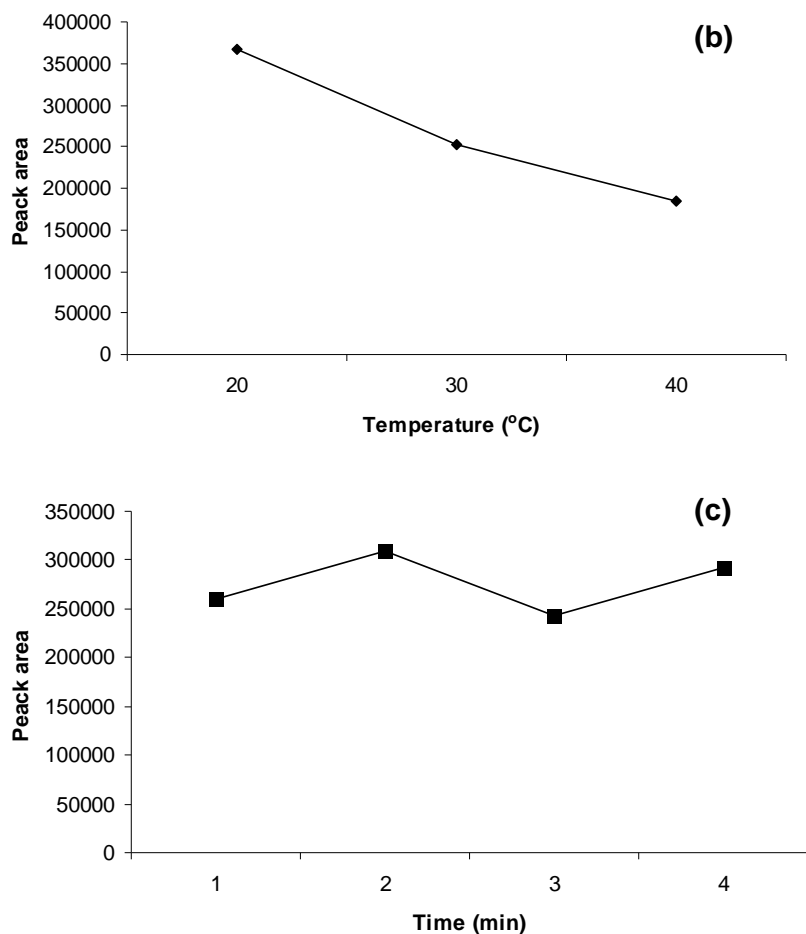


Fig. 2. Optimization of SPME parameters: (a) extraction time, (b) extraction temperature and (c) desorption time.

3.2 Selection of chromatographic conditions

The chromatographic conditions were optimized to develop a stability-indicating method to separate the degradation products from the drug. The chromatographic conditions were chosen after testing different temperatures at injection port, oven program and at detector (FID). The injection on split mode reduced tailing and the peaks showed good symmetry. The retention time of ISO ($R_t \approx 4.2 \pm 0.30$ min) and IS ($R_t \approx 5.9 \pm 0.30$ min) allowed a rapid determination of the drug, which is important for routine analysis. Adequate chromatographic condition

was achieved using split mode (20:1), temperatures of injection port and detector were set at 200 °C and 270 °C respectively and the oven temperature program adopted was 160 °C increasing at 25 °C min⁻¹ to 260 °C and held for 4 min. The flow rate used was 1.0 mL min⁻¹.

A typical chromatogram obtained by the proposed method is shown in Fig. 3.

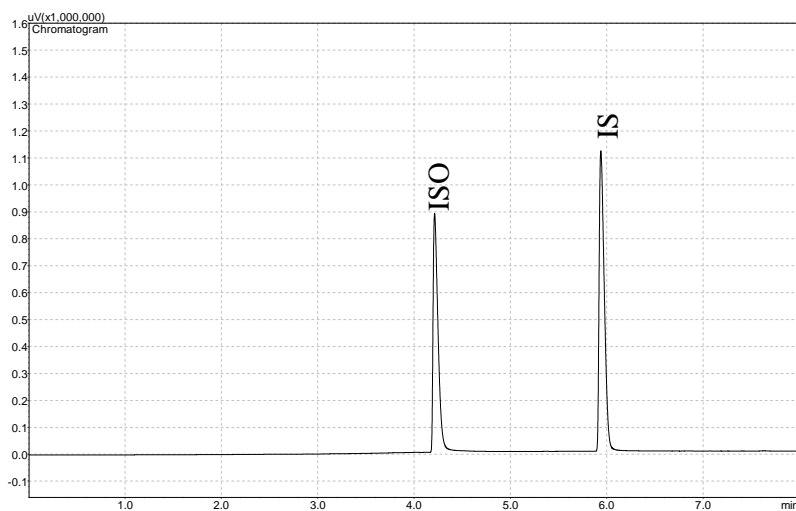


Fig. 3. Chromatogram obtained containing ISO ($R_t \approx 4.2$) and acetonitrile (IS) ($R_t \approx 5.9$) respectively.

3.3 Specificity

The chromatogram shown in Fig. 4a demonstrated that the method is specific and there is no interference from the excipients, and as long as they are non volatile substances. Sevoflurane spiked into the ISO samples showed a different retention time, with complete resolution, and did not interfere in quantification of ISO (Fig. 4b).

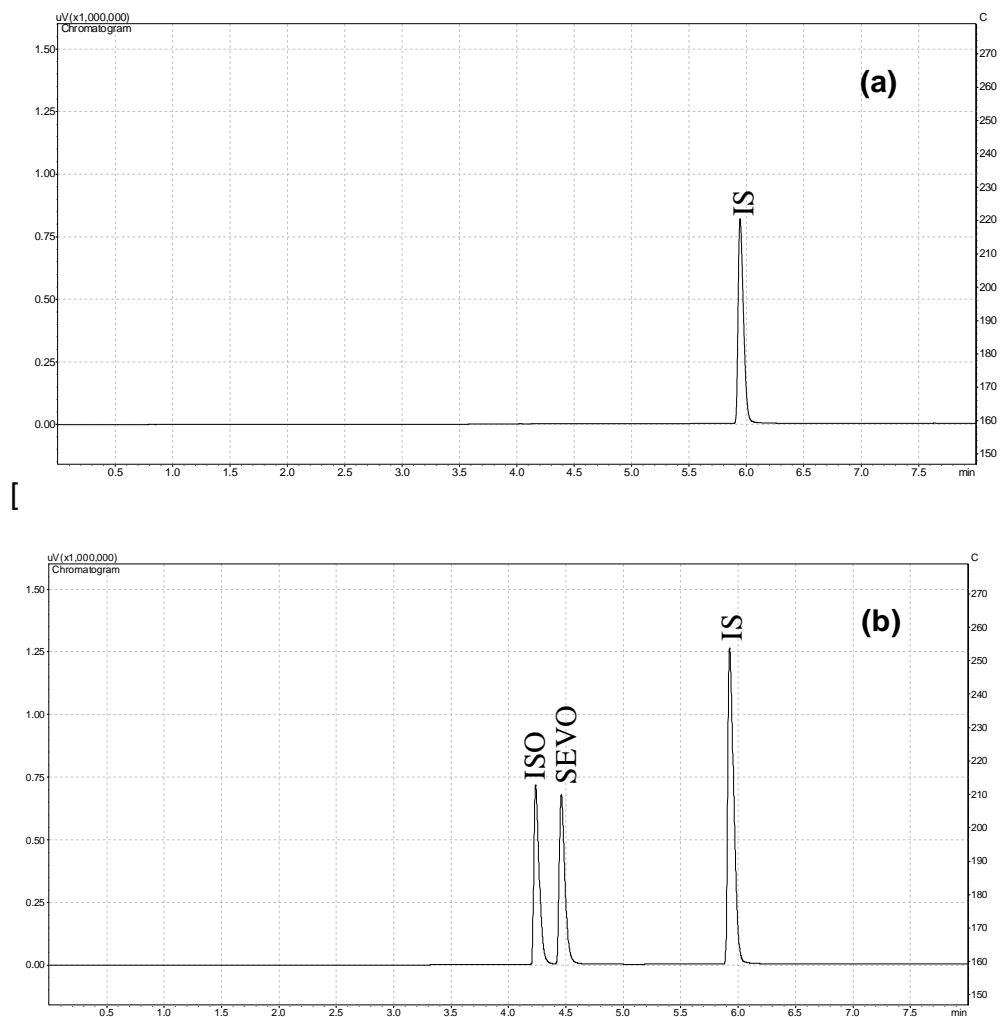


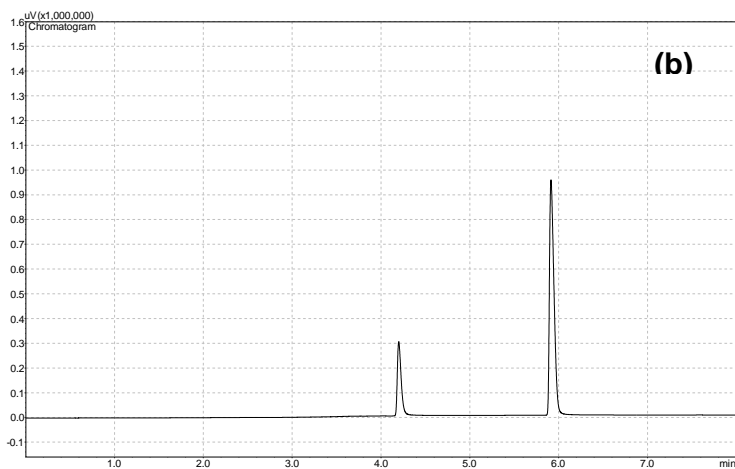
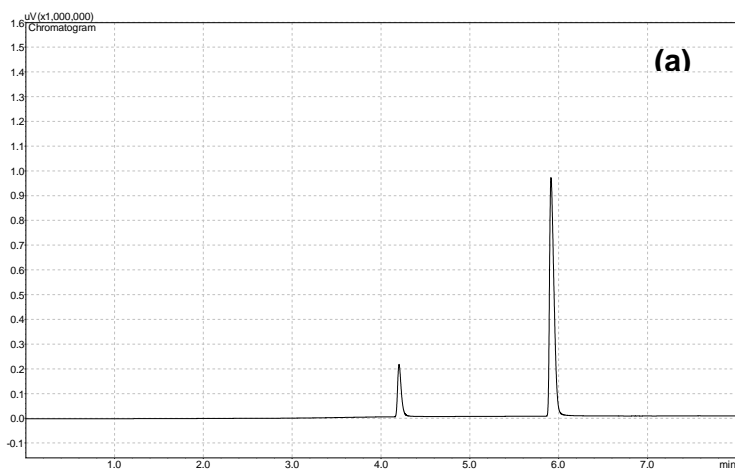
Fig. 4. Chromatograms of: (a) placebo nanoemulsion; and (b) ISO sample spiked with sevoflurane ($R_t \approx 4.4$).

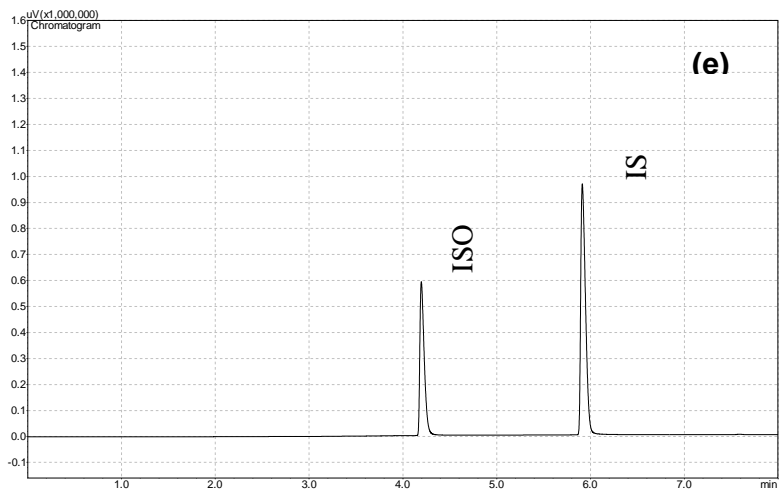
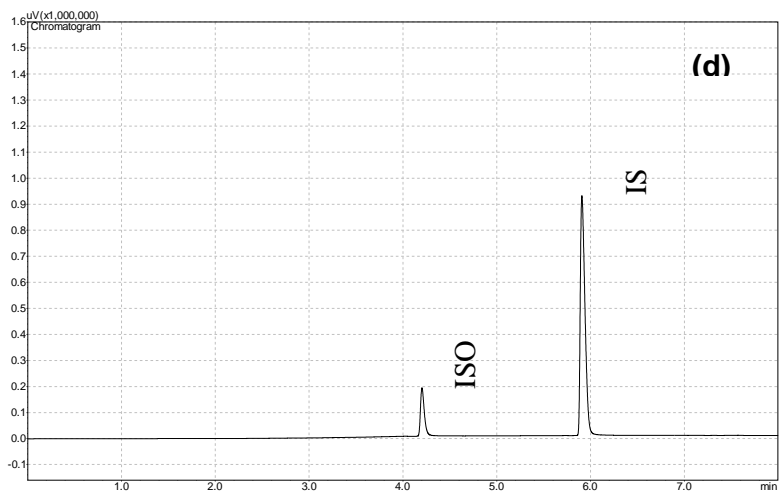
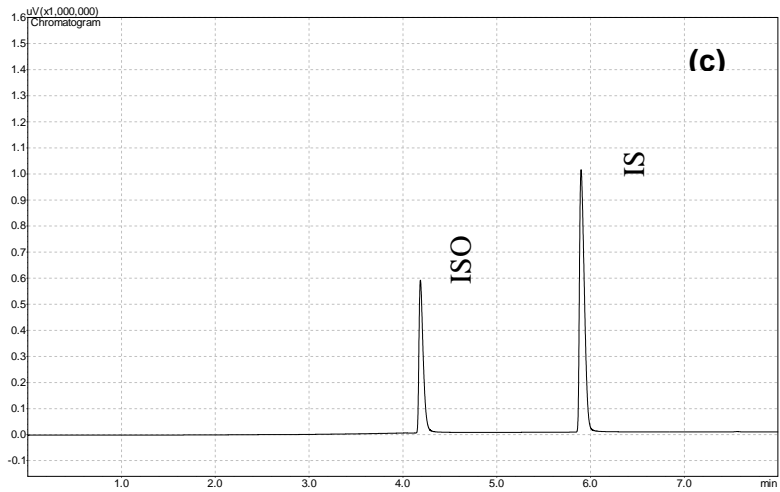
None of the chromatograms from samples submitted to stress conditions revealed any peak of degradation products, which could be assigned to the fact that the SPME method developed is able to extract volatile substances only and such products shouldn't exhibit the required properties to volatilize under fixed conditions.

When ISO was submitted to basic conditions degradation was observed and confirmed by reduction of peak area in approximately 70 %. In the acid hydrolysis experiment, the reduction peak area observed due degradation was approximately 60 % (Fig. 5a-b).

The drug substance was also degraded when treated with 30 % H₂O₂ at 80 °C for 1 and 2 h, highlighted by the reduction of ISO peak area about 26 % and 82 % respectively (Fig. 5c-d). No degradation of ISO was observed until 48 h exposed to UV-A irradiation, even though degradation was observed after 72 h exposed by a peak area 18% lower, in comparison to the protected sample (Fig. 5e).

Under thermolytic condition (80 °C) only after heating during 2 h the peak area decreased about 19 % (Fig. 5f). Since no degradation products were detectable, the method could be considered suitable to stability indication by means of the reduction in peak area. Under forced degradation the method exhibit specificity for ISO.





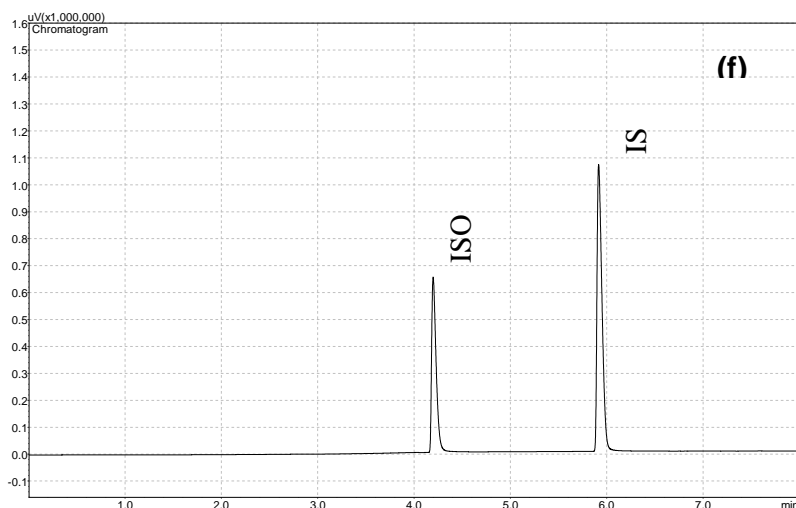


Fig. 5. Chromatograms of: (a) basic hydrolysis; (b) acid hydrolysis; (c-d) degradation with 30% H₂O₂ at 80 °C for 1 and 2h respectively; (e) degradation using UV-A radiation (352 nm) for 72 h; and (f) thermal degradation at 80 °C for 2 hours.

3.4 Linearity and Limits of Detection (LOD) and Quantitation (LOQ)

The method demonstrated to be linear in the concentration ranged studied, with a correlation coefficient of 0.9996. The slope and intercept obtained were 0.0663 and 0.033 respectively. Data was validated by means of analysis of variance (ANOVA), that showed linearity with no deviations from linearity ($p < 0.05$).

The LOD and LOQ were 0.24 and 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

3.5 Precision and Accuracy

The variability assessed as repeatability (intra-day precision) and reproducibility (inter-day precision) were low, as demonstrated by RSD (%) values, less than 2.5 and 1.9 respectively for bulk ISO. For the ISO-loaded nanoemulsion developed, the variability of the results was low, with RSD (%) values less than 2.53 to intra-day and 2.57 for inter-day results. (Table 1).

Table 1. Precision results for ISO-loaded nanoemulsions.

	Theoretical amount ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Experimental amount ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{SD}$)	RSD (%)
Intra-day			
Day 1 ($n = 6$)	15.02	15.37 \pm 0.32	2.14
Day 2 ($n = 6$)	15.02	15.67 \pm 0.24	1.53
Day 3 ($n = 6$)	15.02	15.02 \pm 0.11	1.16
Inter-day ($n = 18$)			
	15.02	15.35 \pm 0.35	2.31

The accuracy was inferred to bulk ISO as the method showed to be specific, linear and precise, according to ICH guidelines. Mean recovery of ISO at each level of the concentration performed for ISO from nanoemulsion demonstrated good accuracy of the method (Table 2).

Table 2. Recovery of ISO added to placebo nanoemulsion

Sample	Amount of ISO		Recovery (%)
	Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
Placebo nanoemulsion ($n = 9$)	12.01 ($n = 3$)	12.04	100.22
	15.02 ($n = 3$)	14.95	99.54
	18.02 ($n = 3$)	17.02	94.50

3.6 Robustness

Variations of the flow rate (from 1 to 1.5 mL min^{-1}) yielded the expected results: peaks eluted earlier with the faster flow rate. Relative retention times of ISO were affected by these changes. Variations on injection port temperature and extraction time didn't affect retention time of ISO and IS nor peak resolution and

repeatability regarding quantitation of ISO. The solutions can be considered stable up to 24 h in both temperatures tested, time more than required to analyte procedure.

3.7 GC-MS Analysis

The confirmation of the identity of ISO and IS by mass spectrometry was successfully made. The retention time suffer a little deviation to 6.2 min for ISO and to 8.25 min for IS (Fig. 6). It is expected as for GC-MS analysis different GC apparatus was employed. The qualifier ions monitored for ISO were 51, 67, 117 and 149 m/z .

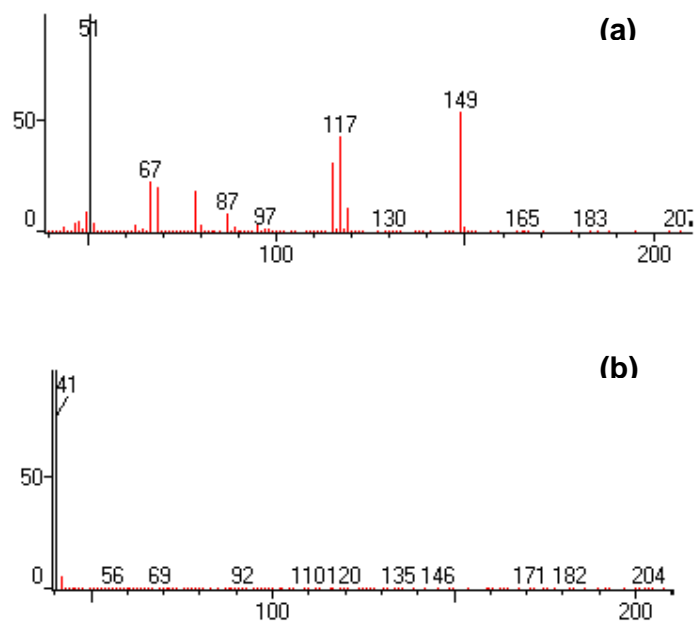


Fig. 6. Mass spectra of: (a) Isoflurane and (b) acetonitrile.

4. Conclusion

A SPME/GC/FID method was developed and validated for quantitative determination of ISO drug substance and ISO-loaded nanoemulsion was simple, sensitive, specific, precise, accurate and reproducible. The internal standard acetonitrile was considered appropriated, viable and reproducible for the quantitation purposes. Based on these results the method can be applied in stability testing of ISO commercially available.

Acknowledgements

The authors would like to thank CNPq (Brazil) for the financial support and to Cristália for the work support.

References

1. Deng X, Simpson V (2004) *J Pharmacol Toxicol Methods* 49:131-36
doi:10.1016/j.vascn.2003.11.002
2. Musshoff F; Junker H; Madea B (2000) *J Anal Toxicol* 24: 372-76
3. Yang NC; Hwang KL; Shen CH; Wang HF; Ho WM (2001) *J Chromatogr B* 759: 307-318 doi:10.1016/S0378-4347(01)00239-0
4. Pihlainen K ; Ojanperä I (1998) *Forensic Sci Int* 97:117-133 doi:10.1016/S0379-0738(98)00148-0
5. Fast JP, Perkins MG, Pearce RA, Mecozzi S (2008) *Anesthesiology* 109:651-56
6. Arthur CL, Pawliszyn J (1990) *Anal Chem*, 62: 2145-48 doi:10.1021/ac00218a019
7. Jager LSD, Perfetti GA, Diachenko GW (2008) *J Chromatogr A* 1192:36-40
doi:10.1016/j.chroma.2008.03.042
8. Wang LF, Lee JY, Chung JO, Baik JA, So S, Park SK (2008) *Food Chem* 109: 196-206 doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.054

9. Araujo L, Wild J, Villa N, Camargo N, Cubillan D, Prieto A (2008) *Talanta* 75:111-15 doi:10.1016/j.talanta.2007.10.035
10. Accorsi A, Valenti S, Barbieri A, Raffi GB, Violante S (2003) *J Chromatogr A* 985:259-264 doi:10.1016/S0021-9673(02)01223-2
11. Miekisch W, Schubert JK, Vagts DA, Geiger K (2001) *Clin Chem* 47: 1053-1060
12. Musshoff F, Junker H, Madea B (2000) *J Anal Toxicol* 24: 372-76
13. ICH (2003) In: International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Stability Testing of New Drug Substance and Products: methodology Q1A (R2), Switzerland
14. ICH (2005) In: International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1), Switzerland
15. The United States Pharmacopoeia 30th (2007) Rockville, MD
16. FDA (1994) Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, Rockville, MD

5. CAPÍTULO II:

“Isoflurane-loaded nanoemulsion prepared by high-pressure homogenization: investigation of stability and dose reduction in general anesthesia.”

A ser submetido à revista *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*

A emulsificação de AI vem sendo amplamente descrita na literatura, porém a incorporação destes em emulsões disponíveis comercialmente apresenta problemas como baixa estabilidade e baixo teor de anestésico. Nesta etapa do trabalho, avaliou-se a possibilidade de nanoemulsificação do ISO através da técnica de homogeneização a alta pressão. Os parâmetros para a nanoemulsificação do ISO foram otimizados, sendo possível a incorporação de 15 % de ISO em nanoemulsões que se mantiveram estáveis por um período de 30 dias. As características físico-químicas e físicas das formulações foram avaliadas.

Após o desenvolvimento das nanoemulsões contendo ISO, foi avaliada a aplicabilidade biológica destas em cães, onde pôde-se observar uma redução significativa da dose necessária para manutenção da anestesia geral, após a indução com propofol quando comparada a administração do ISO via inalação.

**Isoflurane-loaded nanoemulsion prepared by high-pressure homogenization:
investigation of stability and dose reduction in general anesthesia**

Carolina L. Krahn^a, Renata P. Raffin^a, Guilherme S. Santos^a, Luciana B. Queiroga^b,
Ruben L. Cavalcanti^b, Priscila Serpa^c, Eliane Dallegrave^d, Paulo E. Mayorga^a,
Adriana R. Pohlmann^{a,e}, Cláudio C. Natalini^f, Silvia S. Guterres^a, Renata P.
Limberger^{a*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, Porto Alegre, Brazil

^c Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Brazil

^d Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, Fundação Estadual de
Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, Brazil

^e Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^f Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

* Corresponding author

Av. Ipiranga 2752/605, Porto Alegre, RS, CEP 90610-000, Brazil. Tel.: +55 51
33085297; Fax: +55 51 33085437

E-mail: rlrenata@yahoo.com

Abstract

Isoflurane is an halogenated ether and it is used for general anesthesia. To stabilize a new formulation in order to evaluate the potentiality of reducing the dose in anesthesia, isoflurane-loaded nanoemulsion was proposed. High-pressure homogenization technique was used to develop drug-loaded nanoemulsions which presented droplet size of 150 nm with narrow size distribution and low polydispersity index (0.08). Zeta potential was -18 mV and pH was 6.03. Rheological analysis showed Newtonian behavior for the formulations, which physical stability was confirmed by multiple light scattering. Formulations were capable of avoiding isoflurane volatilization. The anesthetic evaluation, monitored by the end tidal isoflurane concentration, showed that the required dose for the anesthetic state significantly decreased when the nanostructured formulation was administered compared to inhaled isoflurane. There was no significant difference ($p < 0.05$) between experimental groups (inhaled isoflurane and intravenous isoflurane-loaded nanoemulsion) on the cardiac rate, oxygen hemoglobin saturation, arterial blood pressure, and on the biomarkers of renal, hepatic and skeletal muscle system functionalities. Slight tachypnea, edema, erythema, low level of end tidal carbon dioxide concentration were observed after dosing isoflurane-loaded or unloaded-nanoemulsion. The good stability and significantly dose reduction observed for drug-loaded nanoemulsion render this formulation a promising carrier for intravenous delivery of isoflurane.

Keywords: nanoemulsion; isoflurane; high-pressure homogenization; general anesthesia; intravenous; stability

1. Introduction

Isoflurane (ISO) is an inhalation anesthetic widely used during surgical procedures alone or in association with others anesthetic agents such as fentanyl [1]. ISO has lower blood solubility than other halogenated anesthetics such as halothane and enflurane, thus enabling rapid induction and recovery from anesthesia [2]. As a member of halogenated ethers used for general anesthesia, isoflurane, depresses the central nervous system promoting the loss of consciousness in patients allowing surgical interventions [3]. Furthermore, some receptors or channels, including those which are the most though to be the major contributors to anesthesia, including GABA_A, acetylcholine, opioid, some serotontin and glycine receptors and some potassium channel could be making an important role on ISO anesthesia [4]. ISO biotransformation is practically inexistent. Only 0.2% of the drug is biotransformed in humans by cytochrome 450 2E1 enzymes witch mediate reactions to chloride acid, carbon dioxide, trifluoroacetic acid, ions fluoride and water, which could be detected by inorganic fluoride in urine and blood [5-6].

Intravenous administration of volatile anesthetics has been gained attention for the past four decades, because it reduces the time necessary to reach the equilibrium between the drug and lungs establishing the anesthetic condition quickly [7]. Besides, the need of specific ventilatory circuits is eliminated, the amount of volatile anesthetics is significantly reduced for the required anesthetic effect, and the environmental pollution is also minimized, promoting a safer working place for surgical room personnel. Furthermore, emulsification of halogenated ethers could also allow intrathecal, subcutaneous and intraperitoneal administration [8]. Intralipid[®], a commercial lipid emulsion, is the vehicle employed for ISO parenteral

administration. However this emulsion shows limited stability, since in one day after ISO incorporation, phase separation can be observed [9].

The long term physical stability, with no signs of coalescence or flocculation related for nanoemulsions makes them promising pharmaceutical dosage forms for drug release or targeting [10]. For poor-water soluble drugs, nanoemulsions are a good alternative as dosage form for different routes of administration [11], since the apparent solubility of those lipophilic drugs in aqueous media can be enabled. There are several reports in current literature regarding many applications of nanoemulsions on the pharmaceutical field for intravenous, dermal and oral purposes, such as carbamazepine [12], oligonucleotides [13], octyl methoxycinnamate [14], prednicarbate with phytosphingosine as additive [15], ramipril [16] and ezetimibe [17].

The preparation of submicrometric emulsion formulations could involve low and high-energy methods. Droplets in the nanometer range are achieved using high shear stirring, high-pressure homogenizers and ultrasound generators, all these techniques employ high-energy input and yields homogeneous nanoemulsions and small droplet sizes [18]. Moreover, the possibility of scaling up makes the high-pressure homogenization advantageous in comparison with others methods [19].

In this work, we hypothesized that ISO-loaded nanoemulsions could be developed in order to have a new formulation able to reduce drug dosing after intravenous administration. To reach our objective nanoemulsions containing ISO were prepared by high-pressure homogenization technique and characterized by light scattering techniques, electrophoretic mobility, potentiometry, viscosimetry and gas chromatography. To evaluate the potentiality of the new formulation, ISO-loaded

nanoemulsions were evaluated in dogs for *in vivo* anesthetic activity, hemodynamic monitoring and biochemical assessment.

2. Methods

2.1 Materials

Isoflurane (ISO) (CAS: 26675-46-7) was obtained from Cristália (São Paulo, Brazil). Soybean lecithin (Lipoid S75[®]) was kindly given by Lipoid[®] GmbH (Ludwigshafen, Germany), containing 69.9% phosphatidylcholine, 8.4% phosphatidylethanolamine, 2.2% lysophosphatidylcholine according to manufacture specifications. Medium chain triglycerides were acquired from Brasquim (Porto Alegre, Brazil) and polysorbate 80 was obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Sorbitol 70% USP grade was purchased from ALZ (Porto Alegre, Brazil). Purified water was prepared using a Milli-Q Plus[®] (Millipore, Bedford, USA). All other chemical were of HPLC or analytical grade.

2.2 Nanoemulsions preparation

Aqueous and oily phases were prepared separately. After dissolving Lipoid S75[®] (1%) in medium chain triglycerides (15 mL) at 30 °C under magnetic stirring, the solution was cooled until 18 °C and ISO (15 mL) was added just before the emulsification. The aqueous phase containing polysorbate 80 (2%), sorbitol (2.5%) and water (64.5 mL) was prepared under magnetic stirring at 30 °C and also cooled until 18 °C before emulsification. The oily phase was poured into the aqueous phase and emulsified using high-shear mixer (Ultraturrax[®], Ika labor technik) at 16,000 rpm for 1 min. Then this coarse emulsion was homogenized by high-pressure homogenizer (Panda 2K, Niro Soavi) using the output cooler at 10 °C. To optimize

the homogenization conditions placebo nanoemulsions, obtained as described above with no drug, were prepared using different numbers of cycles and homogenization pressures.

2.3 Nanoemulsion characterization

2.3.1 Particle size and polydispersity index

Mean particle size (z-average), particle size distribution and polydispersity index were determined by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) at 25 °C after appropriate dilution in ultrapure water. The analyses were performed after 1, 15 and 30 days of preparation and storage at 8 °C.

2.3.2 Zeta potential

Zeta potential was determined by electrophoretic mobility using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) at 25 °C after appropriate dilution in a sodium chloride aqueous solution (1mmol L⁻¹). The analyses were also performed after 1, 15 and 30 days of preparation and storage at 8 °C.

2.3.3 pH

The pH values were measured directly in nanoemulsions without dilution using a potentiometer (Micronal B-474) after 1, 15 and 30 days of preparation and storage at 8 °C.

2.3.4 Drug content

The amount of ISO in the formulations was assayed by the gas chromatography (GC) using a previously validated method submitted to publication. An equivalent

volume of 10 μL of ISO was diluted in methanol into a vial containing NaCl (15%) and 1 mL of freeze water. For analyte extraction a solid-phase microextraction (SPME) syringe was used and then the SPME needle was inserted in GC (Shimadzu GC/FID system 2010, Kyoto, Japan) inlet port for ISO desorption.

2.3.5 Turbiscan Lab[®] Expert stability analysis

Formulations were placed into cylindrical glass cells without dilution and submitted to stability analysis by multiple light scattering using a Turbiscan Lab[®] Expert (Formulation, France). The apparatus is equipped with a detection head which moves up and down along a flat bottomed cylindrical cell (25 mm diameter, 55 mm height). The detection head is composed of a pulsed near infrared light source ($\lambda = 880 \text{ nm}$) and two synchronous detectors. The detection head scans the entire height of the sample simultaneously acquiring transmission and backscattering data every 40 μm . Transmittance and backscattering were detected at 180° and at 45° from the incident beam, respectively. Maximal transmission and backscattering are set using silicon oil and polystyrene latex as standards.

The analysis was carried out to access the physical stability of the nanoemulsions by determining the kinetic parameters of sedimentation, creaming, flocculation and/or coalescence. A pattern of the light flux as a function of the cell height was obtained within 5 hours with records each 5 min at 25°C . Relative backscattering is directly correlated to the particle volume fraction (ϕ) and to the droplet size (d) Equations (1) and (2).

$$Bs \sim \frac{1}{(l^*)^{0.5}} \quad (1)$$

$$l^*(d, \phi) = \frac{2d}{[3\phi(1-g)Q_s]} \quad (2)$$

where l^* is the photon transport length in the considered medium (m), Q_s the scattering efficiency factor (dimensionless), and g is the asymmetry factor (dimensionless).

2.3.6 Viscosity

Nanoemulsion viscosity and rheological behavior were accomplished in a rotational viscosimeter (Brookfield LVDV-II+ Pro model) providing with an ULA spindle. For the determinations, samples were conditioned in a Brookfield device coupled to a thermostatically circulating water bath (25 ± 2 °C).

2.4 *In vivo* anesthetic activity

The protocol was approved by the Ethical Committee in Research (deliberation number 09-208, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil).

Seven adults mongrel dogs of either sex weighing 11.5 ± 1.5 kg, 12 h fasted, were studied. Briefly, the animals received intravenous propofol for anesthesia induction and animal instrumentation. All dogs were submitted to two treatments, the first anesthetic procedure was obtained with inhaled ISO, and, then, on the second treatment for the maintenance of anesthesia intravenous ISO-loaded nanoemulsion was administered under continuous infusion. In both treatments the administration rate was established to less than 50 % of animal react positively to nociceptive stimulus. Unloaded nanoemulsion was also administered during inhalation ISO anesthesia for the same period for four dogs and the effects produced by the formulation without the drug were evaluated on the animals. Anesthesia period lasted 90 min. So, animals received Lactated Ringer's solution ($10 \text{ ml kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) during the procedure.

2.4.1 Hemodynamic monitoring

Cardiac and respiratory frequencies, systolic, diastolic and mean blood pressure, end tidal carbon dioxide concentration, pulse oximetry and expired gas concentration were monitored by a multiparametric monitor (S/5TM Datex-Ohmeda, GE Medical Systems) and recorded at zero moment and each 30 min.

2.4.2 Biochemical assessment

Venous blood samples were collected at the times established to obtain serum concentrations of urea and creatine kinases (CK) (measured by Ultraviolet (UV) Enzymatic method in a Modular P. Roche[®] apparatus), creatinine (evaluated by Jaffe without deproteinization method in a Modular P. Roche[®] apparatus), alanine aminotransferase (ALT) (measured by a UV-Kinetic method in a Modular P. Roche[®] apparatus). Arterial blood was also collected for hemogasometry analysis, which was determined on a RapidLab 865 Chiron[®] apparatus. After the experiments, all dogs were designated to donation.

2.5 Data analysis

All the results were expressed as mean value \pm S.E.M (standard error of mean). Statistical analysis for formulations stability was performed using the analysis of variance (ANOVA) one way. The statistical data of the *in vivo* study were evaluated by ANOVA of repeated measurements; Student-Newman-Keuls (SNK) post-hoc test for multiple comparisons was applied for the anesthetic evaluation results. The significant level was set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Preparation of isoflurane-loaded nanoemulsion

Formulations for parenteral use have advantages as bloodstream direct access and therefore the target tissue is reached faster. Such preparations include triglyceride emulsions, liposomes and micellar solutions. The main problem for this application is the limited amount of excipients approved for intravenous use or another parenteral route of administration [20]. Taking this into account, for this work, the excipients were chosen in agreement with Food and Drug Administration (FDA) approved inactive ingredient list [21].

For the preparation, when a 500 bar pressure was applied in high-pressure homogenization we note that greater the number of cycles to pass the product through the homogenizer, smaller particles were produced. When 3 homogenization cycles were tested, the droplet size significantly reduced ($p < 0.001$) from 223 to 162 nm (one homogenization step). Otherwise, using 6 homogenization cycles, no additional reduction was observed compared to the formulation prepared with 3 homogenization cycles. In case of homogenization pressure, increasing it from 500 to 1000 bars the droplet sizes significantly decreased ($p < 0.05$) from 162 to 150 nm respectively (Fig. 1). Similar effects of pressure and number of cycles of homogenization were also reported for topical nanoemulsions [22].

Then, the selected operational conditions to prepare the isoflurane-loaded nanoemulsion were 3 homogenization cycles at 500 bars. Despite the 1000 bars pressure generated smaller diameters, the formulation in this case exhibited a higher viscosity (data not shown), being inappropriate for intravenous administration. Operational conditions as low temperature and low number of homogenization cycles lead to the location of the drug mainly in the inner oil phase. With increasing the number of cycles the drug start to diffuse to the stabilizer layer, then preventing from

chemical degradation [15]. Concerning our process, environmental temperature (25 °C) with output cooling, ISO could be mainly located at the inner core and slightly distributed at the lecithin layer. Hence, is tightly encapsulated within the nanocarrier.

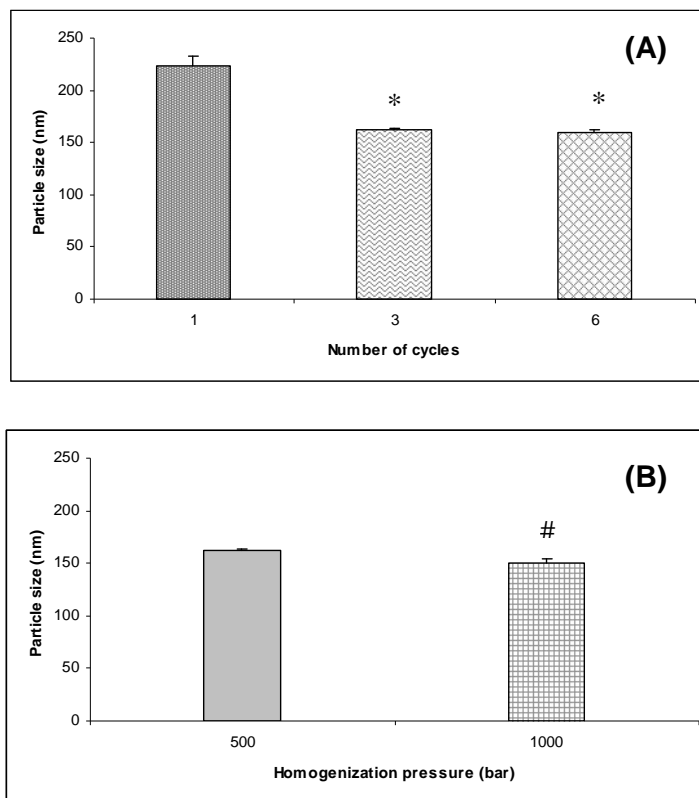


Figure 1. Influence of (A) number of cycles and (B) homogenization pressure on average diameter of nanoemulsions. Values represent mean \pm S.E.M of average droplet size ($n = 3$). * Significantly different from 1 cycle and # significant different from 500 bar (ANOVA/SNK; $p < 0.05$).

3.2 Physico-chemical characterization of isoflurane-loaded nanoemulsion

After preparation, the formulation presented a fluid milky white bluish opalescent aspect corroborating the system granulometry [23]. The pH value obtained for ISO-loaded nanoemulsion was 6.03 ± 0.04 . The low acid value is probably due the presence of acid impurities in the oil core that reach the oil/water interface [24]. Subsequently, pH adjustment to 7.4 was carried out with NaOH 0.01 M to allow

intravenous administration. The average diameters and the polydispersity index were 150 ± 0.78 nm and 0.08 ± 0.01 , respectively. These results are in agreement with the high-pressure homogenization preparation technique as previously described [11]. The low polydispersity index indicates homogeneous droplets and unimodal distribution in the nanoemulsions. Zeta potential showed a negative value (-18 ± 2.4 mV) attributed to the negative charged phospholipids present as impurities in Lipoid S75[®] which is a mixture of phospholipids from soybean sources. The small zeta potential value also indicates that the stability of the formulation is related to the strong steric repulse mechanism due to the use of non-ionic surfactants, as polysorbate 80 [25].

Droplet diameter, polydispersity index and zeta potential are considered the most representative aspects to evaluate the stability of colloids over a period range [12]. These parameters were evaluated over 30 days to access if the requirements for intravenous administration remained suitable (Table 1).

Table 1. Stability evaluation of ISO-loaded nanoemulsions stored at 8 °C (mean \pm S.E.M.).

Storage time (days)	Characterization			
	Droplet size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	pH
1	150 ± 1	0.08 ± 0.01	-18 ± 2.4	6.03 ± 0.04
15	148 ± 2	0.05 ± 0.01	-14 ± 1.3	6.15 ± 0.18
30	147 ± 2	0.07 ± 0.02	-18 ± 2.3	6.21 ± 0.05

After 30 days of storage in a freeze environment (8 °C), droplet size, polydispersity index, zeta potential and pH of the formulations were practically unchanged ($p > 0.05$), and the isoflurane-loaded nanoemulsion was considerable suitable for intravenous injection with further pH adjustment to physiological values.

ISO content in the formulation was about 98.4 %, indicating the high pressure homogenization was able to minimize losses due to ISO volatilization. The

formulation had an ISO loading capacity of 15 %. When kept at 8°C for 30 days no decrease in the drug content was observed, making evident the good stability of nanoemulsion prepared with soybean lecithin, polysorbate 80, medium chain triglycerides, sorbitol and water which use is permitted at adequate concentrations for parenteral route administration according to FDA approved inactive ingredient list [21].

Regarding the light multiple light scattering analysis (Turbiscan Lab[®]), according to Celia and co-workers (2009) [26] a formulation is considered physically stable when the relative backscattering variation is lower than ± 2 %. Opposing this, when the relative backscattering variation is greater than ± 10 % the system is considered unstable. So, this analysis is an important tool to the determine migration phenomena (reversible) and particle size variations, like flocculation (reversible) and coalescence (irreversible), providing information about physical destabilization before its appearance in a macroscopic scale, visible on naked eye. Transmission signal was nil for the formulation, leading to interpret the relative backscattering (Fig. 2). ISO-loaded nanoemulsion showed a slight variation at the top lower than 2 %. This result indicated that the droplet present density lower than the continuous phase corroborating the model of structure proposed above. No irreversible destabilization phenomenum was observed, as coalescence (irreversible fusion of separate droplets). The analysis demonstrated that the ISO-loaded nanoemulsion is physically stable.

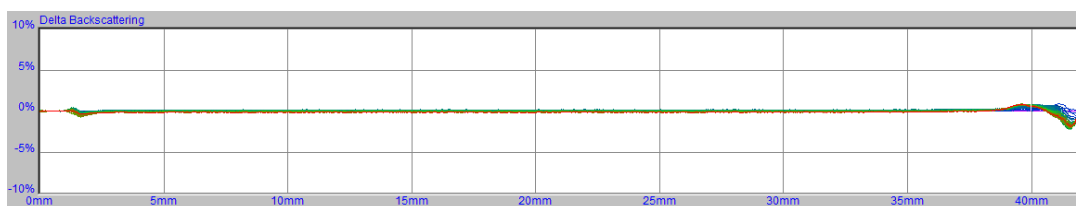


Figure 2. Relative backscattering profile of ISO-loaded nanoemulsion determined by multiple light scattering analysis.

ISO-loaded nanoemulsions showed a low viscosity of 4.53 ± 0.15 cP. In addition, a Newtonian rheological behavior was demonstrated for the formulations (Fig. 3), since the preparations exhibited constant viscosity, in other words the shear stress was directly proportional to the shear rate [27]. The Newtonian behavior of nanoemulsions formulated at high-pressures was briefly considered, since the homogenization process is capable to disrupt all droplet clusters, which tend to exhibit shear thinning behavior. We can also consider that the clusters formation, in Newtonian formulations, is equal to its disruption. The homogenizer valve possesses high energy density and shear stress promoting the hindered of the flock formation [28].

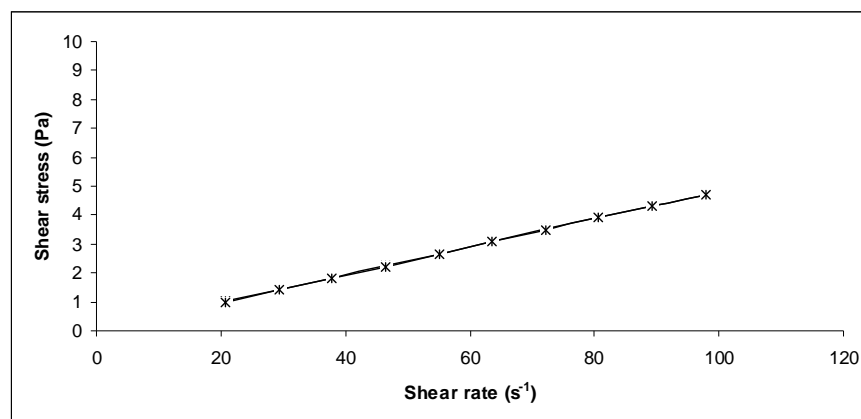


Figure 3. ISO-loaded nanoemulsion rheogram.

3.3 *In vivo* anesthetic activity

In this work ISO-loaded nanoemulsion administered intravenously was compared with an inhaled ISO (Isoforine[®]) in dogs. The anesthesia maintenance was possible, in both cases, and the spontaneous respiration remained. End tidal ISO concentration was monitored during 90 minutes and kept around 1.5 – 2.0 % when the animals received inhaled ISO adjusted in accordance with the loss of palpebral reflex. For the ISO-loaded nanoemulsion, the end tidal ISO concentration was also

observed, since its elimination occurs through the expired air [7]. The same procedure was done, with ISO-loaded nanoemulsion group, although the dosage rate was adjusted by continuous infusion pump, and the expired ISO concentration presented lower values ($p < 0.01$) than those observed for the group receiving inhaled ISO highlighting that much less quantity of ISO in the first case was necessary to produce the same level of anesthesia and consciousness. The infusion rate established for ISO-loaded nanoemulsion ranged between 0.02 to $0.05 \text{ mL kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Individual differences were observed mainly for the nanoemulsion dosage form, whereas animals with a fatty body structure exhibited loss of consciousness with less end tidal ISO which in certain moments was not measurable by the equipment (Fig. 4). It is known that obesity changes halogenated anesthetic's kinetic, mainly by the tissue uptake and distribution. This effect is due to anesthetic solubility dependent, since the excess of fat tissue increases the depots available for anesthetic storage. Based on this mechanism, individuals with a high body mass index ($> 25 \text{ kg m}^{-2}$ in humans) have a prolonged recovery, thereby, adding a risk to the anesthesia [29]. Also, individual responses from animals to the inhalation anesthetic agent, requiring less or higher doses, was previously described [30].

When the nociceptive stimulus was applied, the differences verified for the two treatments corroborated with the diminishing of end tidal ISO concentration, once 70 % of the dogs when receiving inhaled ISO answered positively to the noxious stimulation applied. Moreover, on the ISO-loaded nanoemulsion group, none of the dogs showed a positive response when they were stimulated at less than a half expired ISO concentration compared to the inhaled maintenance. This could be attributed to the deeper unconsciousness with intravenous anesthesia. Since if the

end tidal ISO, in the inhaled procedure, was higher, this could decrease the arterial blood pressure to dangerous levels [4].

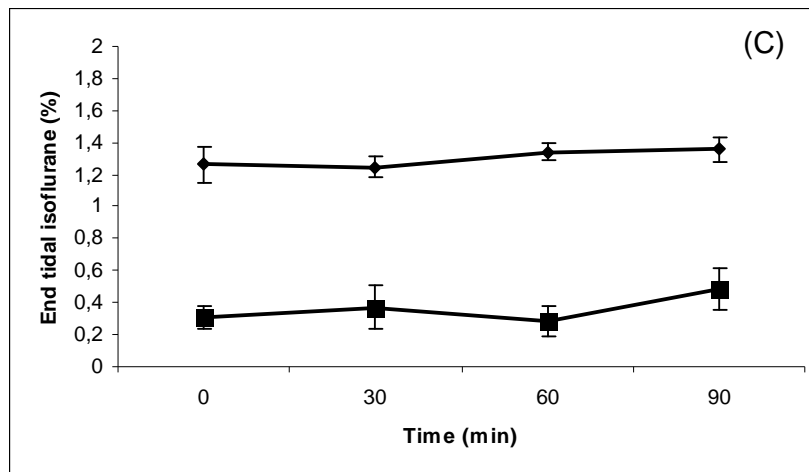
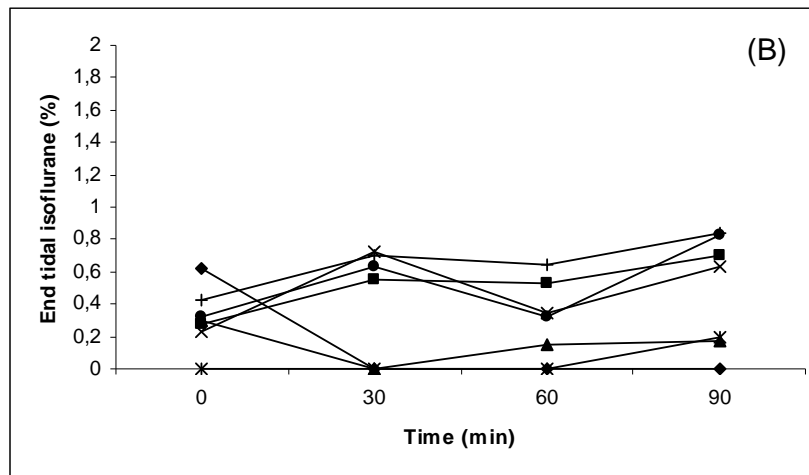
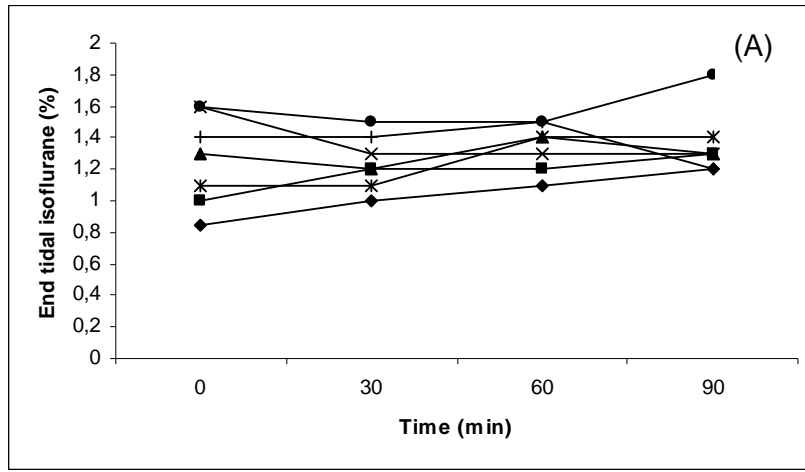


Figure 4. Expired ISO during 90 anesthesia minutes from individual measures of (A) inhaled ISO and (B) ISO-loaded nanoemulsion. (C) Intra group mean \pm S.E.M of (◆) inhaled and (■) nanoemulsion dosage form. The difference between groups was statistically significant (ANOVA, $p < 0.01$).

The differences observed in the cardiac rate were not statistically significant between the groups ($p = 0.357$) and the values were in agreement with normality, which is around 70 to 120 beats per minute (bpm) for awake and anesthetized animals [31]. Oxygen hemoglobin peripheral saturation (SpO_2) in certain dogs at specific moments presented values below from 95 %, which is not expected in patients receiving an inspired oxygen concentration of 100 %, for both groups with no disparity among them ($p = 0.083$). The end tidal carbon dioxide ($EtCO_2$) demonstrated lower values for dogs when they received ISO-loaded nanoemulsion and unloaded nanoemulsion ($p < 0.01$) compared to the inhaled anesthesia and on the two last moments of the data collection the $EtCO_2$ value presented under the inferior limit established for awake canines (35 to 45 mmHg) and also for anesthetized ones (45 ± 8 mmHg). A lower $EtCO_2$ could lead to arrhythmias, hypoxemia and myocardial depression [32]. Considering the respiratory rate the differences among inhaled *versus* the ISO-loaded nanoemulsion and unloaded nanoemulsion were significant ($p < 0.01$). This result is attributed to the tachypnea presented on half of the group which received ISO-loaded nanoemulsion and in one animal in the unloaded nanoemulsion group. Considering that we analyze the results in terms of the medium value for all the treatments, the values are practically inside to the normality window, from 10 to 30 respiratory movements per minute [31]. The respiratory conditions and the cardiac rate at the four moments of anesthesia for each treatment are described on Table 2.

Table 2. Canine's cardiac and respiratory conditions (mean \pm S.E.M) during anesthesia with ISO-I (inhaled isoflurane), ISO-NANO (ISO-loaded nanoemulsion) and B-NANO (blank nanoemulsion).

Variables	Treatment	Baseline	30 min	60 min	90 min
CR (bpm)	ISO-I	114 \pm 7.51	114 \pm 6.45	114 \pm 7.86	114 \pm 6.65
	ISO-NANO	96 \pm 9.43	97 \pm 8.89	100 \pm 6.53	118 \pm 11.32
	B-NANO	104 \pm 7.23	94 \pm 5.06	110 \pm 8.31	113 \pm 7.53
SpO ₂ (%)	ISO-I	96 \pm 0.83	96 \pm 0.59	97 \pm 1.13	96 \pm 1.29
	ISO-NANO	92 \pm 3.62	87 \pm 3.94	95 \pm 2.48	96 \pm 0.75
	B-NANO	96 \pm 0.96	98 \pm 0.85	98 \pm 1.04	97 \pm 0.85
EtCO ₂ (mmHg)	ISO-I	46 \pm 2.13	45 \pm 1.70	45 \pm 1.81	45 \pm 1.75
	ISO-NANO	36 \pm 3.94	38 \pm 7.78	26 \pm 4.46	28 \pm 3.16
	B-NANO	45 \pm 1.93	34 \pm 1.49	31 \pm 2.21	32 \pm 1.47
RR (mpm)	ISO-I	15 \pm 2.30	20 \pm 3.95	18 \pm 3.03	21 \pm 4.07
	ISO-NANO	28 \pm 9.53	23 \pm 6.74	50 \pm 4.51	41 \pm 2.87
	B-NANO	11 \pm 1.78	43 \pm 6.42	36 \pm 7.42	45 \pm 7.15

CR: Cardiac rate; SpO₂: Oxygen hemoglobin peripheral saturation; EtCO₂: End tidal carbon dioxide; RR: respiratory rate.

Regarding the arterial blood pressure, hypotension was observed for all the treatments, as expected, since ISO is an effective hypotensive agent [33] producing the decrease of peripheral vascular resistance and a depressant effect on baroreflex activity, although the cardiac output is preserved even at severe hypotension with a dose-dependent mechanism [34-35]. Comparing the mean arterial blood pressure (MBP) for both groups the differences in the hypotensive levels were not significant ($p = 0.515$). Variations in MBP at the four moments of experiment (Fig. 5), as the pressure restore after 30 min of anesthesia, could be explained due to an increase on baroreceptor afferent activity on deeper anesthetic levels, although most components of baroreflex were suppressed by the ISO [35]. Administration of Lactated Ringer's solution could also contributed to the increase on MBP along the experiment. The more severe hypotension caused in dogs was observed when they received treatment with nanoemulsion (ISO-loaded and unloaded) and can be attributed to histamine release at this specie, caused by the presence of polysorbate 80 (which is approved for intravenous use in humans by the FDA), as non-ionic

surfactant at formulations, with consequent edema, erythema, systemic hypotension and bronchospasm [36-37].

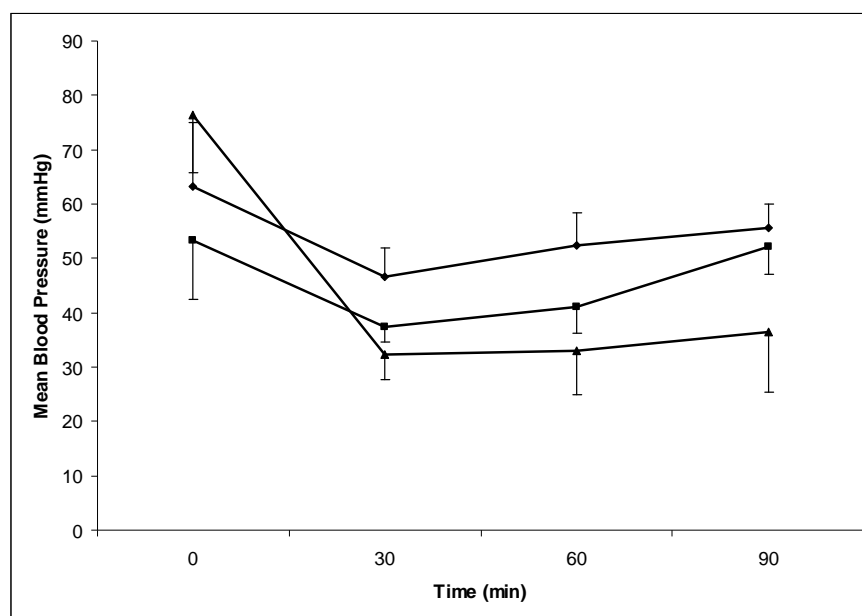


Figure 5. Variations on MBP (mean \pm S.E.M) for (◆) inhaled ISO treatment, (■) ISO-loaded nanoemulsion treatment and (▲) unloaded nanoemulsion during anesthesia period. The differences were not statistically significant (ANOVA/SNK, $p = 0.515$).

The hypotensive effect of ISO and histamine release taken together explain the most pronounced hypotension verified when the ISO-loaded nanoemulsion and unloaded nanoemulsion were administered to the dogs. When both nanoemulsion, ISO-loaded and unloaded, were administered, the dogs exhibited vomit during recovery from anesthesia and diarrhea during the experiment and after recovery; this symptoms were already reported in the literature being associated to the histamine release [2]. Since tachypnea was also observed in this study, its occurrence could be correlated to the bronchospasm occasioned by the histamine release corroborating with EtCO₂ data for the animals receiving nanoemulsion, which was lower, once the tachypnea prevented the CO₂ elimination, making its concentrations higher at blood. SpO₂ less than 95% for some dogs could be a consequence of this mechanism as well. The

decrease in the EtCO₂ levels with the hypoventilation, triggered by the tachypnea, led to a respiratory acidosis which is characterized by diminishing blood pH due higher concentrations of CO₂ accumulated in blood since it could not be eliminated [38]. This hypothesis was confirmed through the hemogasometry results. Animals, with respiratory conditions described above, who were anesthetized with the ISO-loaded nanoemulsion and when they received the unloaded one, presented low blood pH which values were under the physiological limit (7.3 – 7.4). Also a significant ($p < 0.01$) increase in basis deficit index along the experiment was observed, when compared to the blood pH values and basis deficit index for inhaled treatment. The bicarbonate (HCO₃) levels were considered similar for all the anesthetics ($p > 0.05$) eliminating the possibility of a metabolic acidosis.

Biochemical parameters, as urea, creatinine, ALT and CK, were also measured. The mean values for all the monitored time are shown in Table 3. The differences among the treatments were not significant for none of the enzymes or the metabolites ($p > 0.05$) for all the experimental moments. Such results highlighted that renal normal function was not affected (urea and creatinine levels), the liver remained with no sign of lesion (ALT values), which was expected since the ISO is practically no metabolized. This result also ensures the safety of the nanoemulsion for this tissue, and muscles which presented normal functions evaluated by the CK levels [39]. Some mean values are above or under the normal limits, this could be explained by the inter-individual variation, as a few number of animals showed higher or low levels of these biomarkers. The highest CK levels for ISO-loaded nanoemulsion and unloaded nanoemulsion is attributed to myocardial depression which could be related to the histamine release occasioned by the polysorbate 80 in dogs as previously described [36].

Table 3. Biochemical parameters (mean \pm S.E.M.) evaluated for the groups along the anesthesia period.

Variables	Treatment	Baseline	30 min	60 min	90 min
Urea (mg/dL)	Inhaled ISO	28 \pm 3.29	28 \pm 3.30	24 \pm 2.97	26 \pm 3.40
	ISO-nano	24 \pm 2.90	30 \pm 3.73	30 \pm 3.90	32 \pm 4.18
	Unloaded nano	24 \pm 2.86	26 \pm 2.94	27 \pm 2.27	26 \pm 4.30
Creatinine (mg/dL)	Inhaled ISO	0.58 \pm 0.04	0.55 \pm 0.05	0.49 \pm 0.05	0.47 \pm 0.04
	ISO-nano	0.67 \pm 0.04	0.71 \pm 0.05	0.75 \pm 0.04	0.76 \pm 0.03
	Unloaded nano	0.62 \pm 0.08	0.72 \pm 0.08	0.78 \pm 0.09	0.72 \pm 0.16
ALT (U/L)	Inhaled ISO	26 \pm 2.97	24 \pm 4.23	21 \pm 4.05	22 \pm 3.51
	ISO-nano	23 \pm 6.55	28 \pm 5.64	39 \pm 6.34	43 \pm 10.25
	Unloaded nano	45 \pm 14.18	37 \pm 8.31	34 \pm 8.81	29 \pm 3.48
CK (U/L)	Inhaled ISO	75 \pm 5.64	74 \pm 7.30	64 \pm 11.30	75 \pm 6.12
	ISO-nano	102 \pm 12.73	112 \pm 17.63	159 \pm 34.36	207 \pm 49.05
	Unloaded nano	114 \pm 36.77	100 \pm 19.09	118 \pm 7.42	139 \pm 3.89

Normal levels for canines are: urea (10 - 28 mg/dL); creatinine (0.5 - 1.5 mg/dL); ALT (21 - 102 U/L); and CK (< 125 U/L) according to Kaneko and co-workers [40].

4. Conclusions

Isoflurane-loaded nanoemulsion was successfully obtained by the high-pressure homogenization technique. The nanoemulsion presented a single particle population, with narrow size distribution, low polydispersity index and negative zeta potential values. On the evaluation of its stability no tendency to destabilization phenomena was observed. Formulations which presented high fluidity with low viscosity and Newtonian rheological behavior were considered suitable for intravenous administration. *In vivo* anesthetic evaluation in dogs showed that the dose to promote the same level of unconsciousness and anesthesia as the inhaled form of isoflurane is significantly reduced by means of nanoemulsification. Differences observed in EtCO₂, respiratory rate, blood pH and basis deficit were consequences of histamine release occasioned by the polysorbate 80, which is also responsible by the occurrence of erythema and edema in canines, despite this excipient is widely used and it is considered safe for intravenous route in humans. The cardiac rate, SpO₂, MBP, and biomarkers of renal, hepatic and skeletal muscle system kept at normal levels during both treatments.

Acknowledgments

The authors thank Hospital de Clínicas de Porto Alegre and its Animal Experimental Unity for financial and infrastructure support mainly on the biological experiments. Furthermore, the authors thank CNPq/MCT/Brazil, FINEP/MCT and Rede Nanocosméticos CNPq for financial support.

References

- [1] C. Sorbara, D. Pittarello, G. Rizzoli, L. Pasini, G. Armellin, R. Bonato, G.P. Giron, Propofol-Fentanyl Versus Isoflurane-Fentanyl Anesthesia for Coronary Artery Bypass Grafting: Effect on Myocardial Contractility and Peripheral Hemodynamics, *J Cardiothorac Vasc Anesth.*, **9** (1995) 18-23.
- [2] A.S. Evers, C.M. Crowder, J.R. Balsler, General Anesthetics. In: L. Brunton, J. Lazo, K. Parker, GOODMAN & GILMAN'S The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11^a ed, McGraw-Hill Professional, 2005. Chap. 13. pp. 305-329.
- [3] S. Floate, C.E. Hahn, Electrochemical studies of the anaesthetic agent isoflurane (1-chloro-2,2,2-trifluoroethyl difluoromethyl ether) in binary gas mixtures with oxygen and nitrous oxide, *Sensors and Actuators B*, **96** (2003) 6–23.
- [4] E.I. Eger, The pharmacology of inhaled anesthetics, *Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain*, **24** (2005) 89-100.
- [5] D.A. Holaday, V. Fisarova-Bergerova, P.I. Latta, M. Zumbiel, Resistance of Isoflurane to Biotransformation in Man, *Anesthesiology*, **43** (1975) 325-332.
- [6] B. Preckel, Pharmacology of modern volatile anesthetics, *Best Practice & Research Clinical Anesthesiology*, **19** (2005) 331-348.
- [7] R.P. Eger, B.A. McLeod, Anaesthesia by intravenous emulsified isoflurane in mice, *Canadian Journal of Anesthesia*, **42** (1995) 173-176.

- [8] E. Lucchinetti, M.C. Schaub, M. Zaugg, Emulsified Intravenous Versus Evaporated Inhaled Isoflurane for Heart Protection: Old Wine in a New Bottle or True Innovation?, *Anesthesia & Analgesia*, **106** (2008) 1346-1349.
- [9] J.P. Fast, M.G. Perkins, R.A. Pearce, S. Mecozzi, Fluoropolymer-based emulsions for the intravenous delivery of sevoflurane, *Anesthesiology*, **109** (2008) 651-656.
- [10] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, Formation and stability of nano-emulsions, *Advances in colloid and interface science*, **108-109** (2004) 303-318.
- [11] S. Hoeller, A. Sperger, C. Valenta, Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactant and the cationic phytosphingosine on physicochemical behavior and skin permeation, *International Journal of Pharmaceutics*, **370** (2009) 181–186.
- [12] R.G. Kelmann, G. Kuminek, H.F. Teixeira, L.S. Koester, Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process, *International Journal of Pharmaceutics*, **342** (2007) 231–239.
- [13] T. Hagigit, T. Nassar, F. Behar-Cohen, G. Lambert, S. Benita, The influence of cationic lipid type on in-vitro release kinetic profiles of antisense oligonucleotide from cationic nanoemulsions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **70** (2008) 248–259.
- [14] S.B. Calderilla-Fajardo, J. Cazares-Delgadillo, R. Villalobos-Garcia, D. Quintanar-Guerrero, A. Ganem-Quintanar, Influence of sucrose esters on the in vivo percutaneous penetration of octyl methoxycinnamate formulated in nanocapsules, nanoemulsion and emulsion, *Drug Dev. Ind. Pharm*, **32** (2006) 107-113.

- [15] Y. Baspinar, C.M. Keck, H. Borchert, Development of a positively charged prednicarbate nanoemulsion, *International Journal of Pharmaceutics*, **383** (2010) 201–208.
- [16] S. Shafiq, F. Shakeel, S. Talegaonkar, F.J. Ahmad, R.K. Khar, M. Ali, Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **66** (2007) 227–243.
- [17] V. Bali, M. Ali, J. Ali, Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **76** (2009) 410-420.
- [18] C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, M.J. Garcia-Celma, Nano-emulsions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **10** (2005) 102-110.
- [19] F. Donsì, G. Ferrari, E. Lenza, P. Maresca, Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: Operating parameters and scale of operation, *Chemical Engineering Science*, **64** (2009) 520 – 532.
- [20] P.P. Constantinides, M.V. Chaubal, R. Shorr, Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60** (2008) 757-767.
- [21] FDA, Food and Drug Administration, 2009a. Inactive Ingredients Database. Available at < <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>>, accessed on jan10th, 2010.
- [22] D. Mou, H. Chen, D. Du, C. Mao, J. Wan, H. Xu, X. Yang, Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, **353** (2008) 270–276.
- [23] M.C. Ansel, N.G. Popovich, L.V.J. Allen, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 6^a ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2000, pp. 281-316.

- [24] A. Jäger, V. Stefani, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes, *International Journal of Pharmaceutics*, **338** (2007) 297–305.
- [25] M.P.Y. Piemi, D. Korner, S. Benita, J. Marty, Positively and negatively charged submicron emulsions for enhanced topical delivery of antifungal drugs, *Journal of Controlled Release*, **58** (1999) 177–187.
- [26] C. Celia, E. Trapasso, D. Cosco, D. Paolino, M. Fresta, Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **72** (2009) 155–160.
- [27] I.F. Almeida, M.F. Bahia, Reologia: Interesse e Aplicações na Área Cosmético-Farmacêutica, *Cosmetics & Toiletries*, **15** (2003) 96-100.
- [28] J. Flourey, A. Desrumaux, J. Lardières, Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **1** (2000) 127-134.
- [29] E.I. Eger II, L.J. Saidman, Illustrations of Inhaled Anesthetic Uptake, Including Intertissue Diffusion to and from Fat, *Anesth Analg*, **100** (2005) pp. 1020–1033.
- [30] L. S. Barter, J. E. Ilkiw, E. P. Steffey, B. H. Pypendop, A. Imai, Animal dependence of inhaled anaesthetic requirements in cats, *Br J Anaesth.*, **92** (2004) 275-277.
- [31] S.C. Hakins, Monitoring Anesthetized Patients. In: W.J. Tranquilli, J.C. Thurmon, K.A. Grimm, Lumb & Jones: Veterinary Anesthesia and Analgesia, (2007) 4th edition, Blackwell Publishing, Iowa, USA. p. 533- 558.
- [32] A. Kopka, E. Wallace, G. Reilly and A. Binning, Observational study of perioperative PtcCO₂ and SpO₂ in nonventilated patients receiving epidural infusion

or patient-controlled analgesia using a single earlobe monitor (TOSCA), *Br J Anaesth.*, **99** (2007) 567–571.

[33] J.F. Nicholas; A.M. Lam, Isoflurane-induced hypotension does not cause impairment in pulmonary gas exchange, *Can Anaesth Soc J*, **31** (1984) 352-358.

[34] E.S. Hysing, J.E. Chelly, M-F. Doursout, R.G. Merin, Comparative effects of halothane, enflurane and isoflurane at equihypotensive doses on cardiac performance and coronary and renal blood flows in chronically instrumented dogs, *Anesthesiology*, **76** (1992) 979-984.

[35] M. Muzi, T.J Ebert, A Comparison of Baroreflex Sensitivity during Isoflurane and Desflurane Anesthesia in Humans, *Anesthesiology*, **82** (1995) 919-925.

[36] R.E. Cober, K.E. Schober, N. Hildebrandt, E. Sikorska, and S.C. Riesen, Adverse Effects of Intravenous Amiodarone in 5 Dogs, *J Vet Intern Med*, **23** (2009) 657–661.

[37] D.J. Cushing, P.R. Kowey, W.D. Cooper, B.W. Massey, M.R. Gralinski, R.J. Lipicky, PM101: A cyclodextrin-based intravenous formulation of amiodarone devoid of adverse hemodynamic effects, *Eur J Pharmacol.*, **607** (2009) 167–172.

[38] J.C. Atherton, Acid-base balance: maintenance of plasma pH, *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, **10** (2009) 557-561.

[39] González, F. H. D. Introdução à bioquímica clínica veterinária (2006). 2nd Ed Porto Alegre: Editora da UFRGS, Brazil, 364p.

[40] J.J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss, Clinical biochemistry of domestic animals, 5th edition, New York: Academic Press, 1997, 932p.

6. DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho objetivou desenvolver e validar um método empregando SPME para quantificação de ISO líquido inalatório. Foram desenvolvidas e caracterizadas nanoemulsões contendo ISO uma vez que a administração intravenosa deste oferece vantagens comparadas a sua forma vaporizada. A atividade anestésica *in vivo* foi avaliada.

Foram otimizados os parâmetros de pré-concentração e extração para o ISO empregando a SPME. Estabeleceu-se que uma concentração de NaCl de 15 % era adequada na promoção do efeito *salting out*, melhorando assim, a eficiência da extração. Um tempo de extração de 30 min à temperatura ambiente (20 ± 3 °C) promoveu as condições ótimas de extração do ISO, eliminando, assim, a necessidade de um processo de aquecimento comumente empregado nesta técnica. A agitação magnética foi mantida constante durante o procedimento. O tempo de dessorção do analito da fibra para o cromatógrafo foi estabelecido em 2 min de exposição no injetor com temperatura de 200 °C. A escolha da fibra utilizada durante a SPME, PDMS – 100 µm, levou em consideração a apolaridade e a alta volatilidade característica do ISO.

Para seleção das condições cromatográficas foram testadas diferentes temperaturas no injetor, modos de injeção, programação de forno e temperatura do detector. As condições adequadas foram uma injeção no modo *split* (1:20), este modo de injeção foi utilizado uma vez que reduz a formação de cauda nos picos e estes demonstram boa simetria. As temperaturas do detector e do injetor foram 200 e 270 °C respectivamente. A programação do forno utilizada foi 160 °C aumentando a uma taxa de 25 °C/min e a temperatura atingida foi mantida durante 4 min. O fluxo de gás foi de 1 ml/min. Como padrão interno foi utilizada a acetoneitrila. Os tempos de retenção do ISO e da acetoneitrila, 4,2 e 5,9, respectivamente, evidenciaram a rápida determinação do fármaco pelo método proposto, importante em análises rotineiras.

Na validação do método, a especificidade demonstrou que não houve interferência dos excipientes empregados na nanoemulsão no mesmo tempo de retenção do ISO. Quando adicionado um fármaco de estrutura semelhante na amostra, o sevoflurano, observa-se um tempo de retenção anterior ao ISO com resolução completa de ambos os picos, sem interferência na quantificação. Quando o ISO foi submetido aos testes de degradação forçada, hidrólise ácida e básica,

oxidação, termólise e fotólise, nota-se a degradação do fármaco, apenas pela redução da área do pico. Este resultado pode ser explicado, uma vez que o método desenvolvido é capaz de extrair apenas substâncias com um alto grau de volatilidade, e estes produtos de degradação provavelmente não possuem esta propriedade.

O método foi linear com um coeficiente de correlação de 0,9996. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e demonstraram uma regressão linear significativa ($p < 0,05$) sem desvios de linearidade. Foram encontrados limites de detecção e quantificação de 0,16 e 0,50 $\mu\text{l/ml}$ de ISO respectivamente.

Considerando a precisão do método, quando avaliado para o ISO matéria-prima, encontrou-se valores de desvio padrão relativo (DPR) menores que 2,5 % para precisão intra-dia e 1,9 % para precisão inter-dia. De acordo com as guias do ICH (2005) se o método demonstrou ser específico, linear e preciso, a exatidão pode ser inferida no caso de matérias-primas. No que se refere a nanoemulsão contendo ISO, o DPR foi menor que 2,57 % (intra e inter-dia) e os valores de recuperação situaram-se entre 94,5 e 100,2 %, evidenciando a boa exatidão do método.

Foram avaliados cromatogramas a partir de pequenas variações nas condições cromatográficas, como fluxo e temperatura de injeção, para determinação da robustez. Os picos eluíram mais rapidamente com um fluxo de gás maior, diminuindo seu tempo de retenção, embora, quando se variou a temperatura do injetor nenhuma modificação foi observada. Quando as soluções foram armazenadas durante 24 h, a temperatura ambiente e a 8 °C, estas foram estáveis.

Os parâmetros de validação avaliados atenderam as normas especificadas para validação de métodos analíticos (ANVISA, 2003; ICH, 2005). A confirmação da identidade do pico de ISO e do seu padrão interno, realizada em CG-EM, foi realizada com sucesso.

Para o desenvolvimento da nanoemulsão contendo ISO, através da técnica de homogeneização a alta pressão, foram avaliados diferentes ciclos e pressões de homogeneização. Utilizando uma pressão de 500 bars e 3 ciclos de homogeneização, a formulação apresentou diâmetro médio de partículas de 162 nm, significativamente reduzido ($p < 0,05$) em relação a formulação que foi submetida a 1

ciclo apenas (223 nm). O aumento para 6 ciclos durante o processo não promoveu alterações significativas no tamanho das partículas comparado ao de 3 ciclos. Um aumento na pressão de homogeneização de 500 para 1.000 bar também é capaz de diminuir o tamanho de partícula (162 para 150 nm). Efeitos similares foram previamente observados na literatura (MOU *et al.* 2008). Os parâmetros do processo de homogeneização selecionados foram pressão de 500 bar e 3 ciclos de homogeneização, considerando que houve um aumento na viscosidade da nanoemulsão homogeneizada a 1.000 bars, inviabilizando sua aplicação pela via intravenosa.

As nanoemulsões contendo ISO apresentaram diâmetro médio de partícula e índice de polidispersão de $150 \pm 0,78$ nm e $0,08 \pm 0,01$ respectivamente. Estes resultados estão de acordo com a técnica de homogeneização a alta pressão (HOELLER *et al.*, 2009). O potencial zeta negativo, $-18 \pm 2,4$ mV, foi atribuído aos fosfolipídeos negativamente carregados presentes como impurezas da lecitina. O valor baixo do potencial zeta reforça a hipótese de que a formulação está sendo estabilizada através do impedimento estérico das cadeias de polissorbato 80 (PIEMI *et al.*, 1999). Foi necessário realizar o ajuste do pH das nanoemulsões, anteriormente aos experimentos *in vivo*, para o pH fisiológico, uma vez que este exibiu valores levemente ácidos, $6,03 \pm 0,04$, provavelmente devido a impurezas do núcleo oleoso (triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico) das gotículas que atingiram a interface óleo/água (JÄGER *et al.*, 2007). Após um período de 30 dias de armazenamento a 8 °C não foi observado nenhuma alteração significativa nestes resultados evidenciando a estabilidade das nanoemulsões.

A incorporação do ISO nas nanoemulsões foi de 98,4 %, indicando que o processo foi capaz de minimizar as perdas decorrentes da volatilização do anestésico. Este valor manteve-se por um período de 30 dias de armazenamento a 8 °C.

Considerando a estabilidade física da formulação, nas análises de espalhamento múltiplo de luz, a avaliação através do retroespalhamento de luz demonstrou uma leve variação no topo da cubeta. Como esta foi abaixo de 2 % (CÉLIA *et al.*, 2009), nenhum fenômeno de desestabilização foi observado. A pequena variação deve-se a menor densidade das gotas em relação à fase

dispersante. Ainda, a análise reológica das nanoemulsões evidenciou um comportamento Newtoniano, com viscosidade média de $6,4 \pm 1,5$ cP.

Na avaliação do efeito anestésico em cães, a concentração necessária de ISO para manutenção do efeito, foi monitorada através da fração expirada de ISO, correlacionada com a perda do reflexo pálpebra e estímulo nociceptivo. Quando os animais receberam ISO na nanoemulsão via intravenosa, a concentração expirada de ISO, foi significativamente reduzida ($p < 0,001$), e em alguns animais essa concentração foi tão baixa sendo não mensurável pelo equipamento. Em animais com uma estrutura corpórea obesa, o efeito foi mais pronunciado, devido ao aumento de depósitos do anestésico no tecido adiposo (EGER e SAIDMAN, 2005).

Quando os animais foram submetidos ao estímulo de dor, ao serem anestesiados com ISO inalado, 70 % deles reagiram positivamente ao estímulo doloroso. Já quando receberam a nanoemulsão contendo ISO essa porcentagem foi nula, corroborando os dados de concentração de ISO expirada e evidenciando que uma dose bem inferior de ISO, é capaz de produzir um estado mais profundo de anestesia. A taxa de infusão assim estabelecida variou de 0,02 – 0,05 ml/kg/min.

Além da avaliação do efeito, foram monitoradas as variações hemodinâmicas e bioquímicas durante o procedimento. Para avaliar o efeito da nanoemulsão sobre estes parâmetros, os animais receberam, ainda, a nanoemulsão branca (placebo) via intravenosa. Comparando os três tratamentos, não houve diferença ($p < 0,05$) no débito cardíaco, na saturação de oxigênio na hemoglobina (SpO_2), pressão arterial e nos biomarcadores da função renal, hepática e musculatura esquelética.

Houve hipotensão arterial em todos os tratamentos, sem diferença estatística entre eles ($p = 0,515$), este fato é considerado esperado, uma vez que o ISO é um potente hipotensor dose dependente, através da diminuição da resistência vascular, além de um efeito depressor na atividade dos barorreceptores (HYSING *et al.*, 1992; MUZY e EBERT, 1995). Adicionalmente, as nanoemulsões, contendo ou não ISO, promoveram uma hipotensão mais pronunciada, decorrente da liberação de histamina, ocasionada pelo polisorbato 80 nesta espécie animal (COBER *et al.*, 2009; CUSHING *et al.*, 2009).

7. CONCLUSÕES

- A microextração em fase sólida apresentou boa sensibilidade e adequabilidade na pré-concentração e extração de isoflurano líquido inalatório e incluso em nanoemulsões;
- Pode-se suprimir o aquecimento da técnica de SPME, sendo a análise realizada à temperatura ambiente em torno de 20 °C, simplificando o procedimento;
- O método analítico desenvolvido e validado por CG/DIC se mostrou sensível, linear, preciso, exato e robusto para quantificação de ISO matéria-prima e nas nanoemulsões desenvolvidas;
- O uso de acetonitrila como padrão interno foi considerado apropriado, viável e reproduzível para quantificação de ISO;
- O método analítico pode ser aplicado para detectar instabilidades do ISO disponível comercialmente pela redução da área do pico;
- Foi possível desenvolver adequadamente nanoemulsões contendo ISO através da técnica de homogeneização a alta pressão e as condições ótimas de processo estabelecidas foram 500 bar de pressão e 3 ciclos de homogeneização;
- As nanoemulsões apresentaram diâmetro médio inferior a 170 nm, índices de polidispersão abaixo de 0,1 e teores próximos a 100% e estes parâmetros não apresentaram alterações após 30 dias de armazenamento a uma temperatura de 8 °C;
- O estudo da estabilidade física das nanoemulsões através de espalhamento múltiplo de luz não evidenciou nenhuma tendência a fenômenos de desestabilização;
- As formulações apresentaram um comportamento reológico Newtoniano com baixa viscosidade e foram consideradas adequadas para administração intravenosa;

- A avaliação do efeito *in vivo* demonstrou que a dose necessária para produzir o mesmo nível de inconsciência e anestesia foi significativamente reduzida pelo processo de nanoemulsificação do ISO;
- As diferenças observadas nos valores de taxa respiratória, concentração expirada de CO₂, pH sanguíneo e no déficit de base foram relacionadas a liberação de histamina decorrente da administração de polissorbato 80 na espécie canina;
- O débito cardíaco, a SpO₂, a pressão arterial média e os biomarcadores dos sistemas renal, hepático e musculatura esquelética permaneceram normais em todos os tratamentos;

A avaliação do conjunto de resultados obtidos demonstra que as nanoemulsões contendo ISO são sistemas promissores, uma vez que, foram capazes de promover a estabilidade da formulação e ainda reduziram significativamente a dose requerida para o estado anestésico geral do paciente. Além disso, o método desenvolvido e validado, utilizando a acetonitrila como padrão interno, pode ser uma ferramenta eficaz para futuras aplicações em metodologias bioanalíticas.

8. REFERÊNCIAS

ACCORSI, A.; VALENTI S.; BARBIERI, A.; RAFFI, G.B.; VIOLANTE, S. Enflurane as an internal standard in monitoring halogenated volatile anaesthetics by headspace gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 259-264, 2003.

AKAPO, S.O. e MCCREA, A.M. SPME-GC determination of potential volatile organic leachables in aqueous-based pharmaceutical formulations packaged in overwrapped LDPE vials. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** (2008), doi: 10.1016/j.jpba.2008.02.004.

ANTON, N.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.

ARAUJO, L.; WILD, J.; VILLA, N.; CAMARGO, N.; CUBILLAN, D.; PRIETO, A. Determination of anti-inflammatory drugs in water samples, by in situ derivatization, solid phase microextraction and gas-chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 75, p. 111-115, 2008.

ARTHUR, C.L. e PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v.62, p. 2145-2148, 1990.

ATHERTON, J.C. Acid-base balance: maintenance of plasma pH. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 10, p. 557-561, 2009.

BARRI, T. e JÖNSSON, J.A. Advances and developments in membrane extraction for gas chromatography. Techniques and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 16-38, 2008.

BERNARD, J.M.; WOUTERS, P.F.; DOURSOUT, M.F.; FLORENCE, B.; CHELLY, J.E.; MERIN, R.G. Effects of Sevoflurane and Isoflurane on Cardiac and Coronary Dynamics in Chronically Instrumented Dogs. **Anesthesiology**, v. 72, p. 659-662, 1990.

BOVILL, J.G. Inhalation Anaesthesia: From Diethyl Ether to Xenon. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 182, p. 121-142, 2008.

BRASIL. **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Publicado no Diário Oficial da União em 02 de junho de 2003.

CELIA, C.; TRAPASSO, E.; COSCO, D.; PAOLINO, D.; FRESTA, M. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, p. 155-160, 2009.

CHAI, Y.F.; YANG, J.; SONG, H.B.; YANG, J.W.; LIU, S.L.; ZHANG, W.S.; WANG, Q.W. Epidural anaesthetic effect of the 8% emulsified isoflurane: a study in rabbits. **British Journal of Anaesthesia**, v. 100, p. 109-115, 2008.

COBER, R.E.; SCHOBBER, K.E.; HILDEBRANDT, N.; SIKORSKA, E.; RIESEN, S.C. Adverse Effects of Intravenous Amiodarone in 5 Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 657-661, 2009.

CONSTANTINIDES, P.P.; CHAUBAL, M.V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 757-767, 2008.

CUSHING, D.J.; KOWEY, P.R.; COOPER, W.D.; MASSEY, B.W.; GRALINSKI, M.R.; LIPICKY, R.J. PM 101: A cyclodextrin-based intravenous formulation of amiodarone devoid of adverse hemodynamic effect. **European Journal of Pharmacology**, v. 607, p. 167-172, 2009.

DASTMALCHI, S. e BARZEGAR-JALALI, M. Relationship between potency and boiling point of general anesthetics: a thermodynamic consideration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 202, p. 41-45, 2000.

DATE, A.A.; NAGARSENKER M.S. Parenteral microemulsions: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, p. 19-30, 2008.

DENG, X. e SIMPSON, V.J. Determination of volatile anesthetics isoflurane and enflurane in mouse brain tissues using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 49, p. 131-136, 2004.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M.M. Role of Nanotechnology in Pharmaceutical Product Development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 2547-2565, 2006.

EGER, E.I. The pharmacology of inhaled anesthetics. **Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain**, v. 24, p. 89-100, 2005.

EGER, E.I.; SAIDMAN, L.J. Illustrations of Inhaled Anesthetic Uptake, Including Intertissue Diffusion to and from Fat. **Anesthesia & Analgesia**, v. 100, p. 1020-1033, 2005.

EGER, R.P. Anaesthesia by intravenous isoflurane in mice. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 42, p. 173-176, 1995.

EVERS, A.S.; CROWDER, C.M.; BALSER, J.R. Anestésicos Gerais. In: GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. Cap. 13. p. 305-329.

FAST, J.P.; PERKINS, M.G.; PEARCE, R.A.; MECOZZI, S. Fluoropolymer-based emulsions for the intravenous delivery of sevoflurane. **Anesthesiology**, v. 109, p. 651-656, 2008.

FDA, Food and Drug Administration, 2009a. Inactive Ingredients Database. Disponível em < <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>>, acesso em janeiro-2010.

GLASS, P.S.A.; GAN, T.J.; HOWELL, S.; GINSBERG, B. Drug Interactions: Volatile Anesthetics and Opioids. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 9, p. 18S-22S, 1997.
GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HALPERN, D. Fluorinated anesthetics show how advances in technology control pharmaceutical development. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 118, p. 47-53, 2002.

HOLADAY, D.; FISEROVA-BERGEROVA, V.; LATTO, P.; ZUMBIEL, M.A. Resistance of Isoflurane to Biotransformation in Man. **Anesthesiology**, v. 43, p.325-332, 1975.

HARPER, N. Inhalation anaesthetics. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 5, p. 278-282, 2004.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HOELLER, S.; SPERGER, C.; VALENTA C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactant and the cationic phytosphingosine on physicochemical behavior and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, p. 181–186, 2009.

HYSING, E.S.; CHELLY, J.E.; DOURSOUT, M.F.; MERIN, R.G. Comparative Effects of Halothane, Enflurane, and Isoflurane at Equihypotensive Doses on Cardiac Performance and Coronary and Renal Blood Flows in Chronically Instrumented Dogs. **Anesthesiology**, v. 76, p. 979-984, 1992.

ICH (2005) Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1)

ISE, H.; KUDO, K.; JITSUFUCHI, N.; IMAMURA, T.; IKEDA, N. Simple and rapid determination of enflurane in human tissues using gas chromatography and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 698, p. 97-102, 1997.

ISTAPHANOUS, G.K.; LOEPKE, A.W. General anesthetics and developing brain. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 22, p. 368-373, 2008.

JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 297-305, 2007.

JAGER, L.S.D.; PERFETTI, G.A.; DIACHENKO, G.W. Analysis of tetramethylene disulfotetramine in foods using solid-phase microextraction -gas chromatography - mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** (2007), doi: 10.1016/j.chroma.2008.03.042.

JUMAA, M.; MÜLLER, B.W. Parenteral emulsions stabilized with a mixture of phospholipids and PEG-660-12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 54, p. 207-212, 2002.

KELMANN, R.G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H.F.; KOESTER, L.S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, p. 231-139, 2007.

KOJIMA, T.; ISHII, A.; WATANABE-SUZUKI, K.; KURIHARA, R.; SENO, H.; KUMAZAWA, T.; SUZUKI, O.; KATSUMATA, Y. Sensitive determination of four

general anaesthetics in human whole blood by capillary gas chromatography with cryogenic oven trapping. **Journal of Chromatography B**, v. 762, p. 103-108, 2001.

KREUER, S.; BRUHN, J.; WILHELM, W.; GRUNDMANN, U.; RENSING, H.; ZIEGELER, S. Comparative pharmacodynamic modeling of desflurane, sevoflurane and isoflurane. **Journal of Clinical Monitoring and Computing**, v. 23, p. 299-305, 2009.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254 p.

LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE). Métodos cromatográficos de análise 4**. São Carlos: RiMa, 2004. 96 p.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 259-269, 2007.

LI, J.; NIE, S.; YANG, X.; WANG, C.; CUI, S.; PAN, W. Optimization of tocol emulsions for the intravenous delivery of clarithromycin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 282-290, 2008.

LUCCHINETTI, E.; SCHAUB, M.C.; ZAUGG, M. Emulsified intravenous versus evaporated inhaled isoflurane for heart protection: old wine in a new bottle or true innovation. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, p. 1346 - 1349, 2008.

MASHOUR, G.A.; FORMAN, S.A.; CAMPAGNA, J.A. Mechanism of general anesthesia: from molecules to mind. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 19, p. 349-364, 2005.

MATHIAS, L.A.; FILHO, L.P.; RITTER, J.C.; SOUZA, F.S.; PEDRO, J.R.; CIRILLO, W.; VIEIRA, J.E. Isoflurano em emulsão lipídica por via venosa promove estabilidade cardiovascular respiratória em modelo experimental. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, p. 650-662, 2004.

MECOZZI, S.; PEARCE, R.A.; FAST, J.P. Fluoropolymer-based emulsions for the intravenous delivery of fluorinated volatile anesthetics. Patent nº WO2008070490.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V 47, p. 165-196. 2001.

MIEKISCH W.; SCHUBERT, J.K.; VAGTS, D.A.; GEIGER, K. Analysis of volatile disease markers in blood. **Clinical Chemistry**, v. 47, p. 1053-1060, 2001.

MILLS, G.A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 267-287, 2000.

MISHRA, B.; PATEL, B.B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward target drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, p. 9-24, 2010.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, p. 270-276, 2008.

MUSSHOFF, F.; JUNKER, H.; MADEA, B. Rapid analysis of halothane in biological samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry – A case of a double homicide. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, p. 372-376, 2000.

MUSSHOFF, F.; JUNKER, H.; MADEA, B. An unusual case of driving under the influence of enflurane. **Forensic Science International**, v. 128, p. 187-189, 2002.

MUZI, M.; EBERT, T.J. A Comparison of Baroreflex Sensitivity during Isoflurane and Desflurane Anesthesia in Humans. **Anesthesiology**, v. 82, p. 919-925, 1995.

PIEMI, M.P.Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J.P. Positively and negatively charged submicron emulsions for topical delivery of antifungal drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 58, p. 177-187, 1999.

PIHLAINEN, K. e OJANPERÄ, I. Analytical toxicology of fluorinated inhalation anaesthetics. **Forensic Science International**, v. 97, p. 117-133, 1998.

POLI, D.; BERGAMASCHI, E.; MANINI, P.; ANDREOLI, R.; MUTTI, A. Solid-phase microextraction gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of inhalation anesthetics in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 732, p. 115-125, 1999.

PRECKEL, B.; BOLTEN, J.; Pharmacology of modern volatile anaesthetics. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 19, p. 331-348, 2005.

RAMANI, R.; WHARDAN, R. Understanding anesthesia through functional imaging. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 21, p. 530-536, 2008.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

SCHLÜNZEN, L.; COLD, G.E.; RAMUSSEN, M.; VAFAGEE, M.S. Effects of dose-dependent levels of isoflurane on cerebral blood flow in healthy subjects studied using positron emission tomography. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 50, p. 306-312, 2006.

SCHOFIELD, K. The enigmatic mechanism of the flame ionization detector: Its overlooked implications for fossil fuel combustion model. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 330-350, 2008.

SEBEN, V.C. Análise de efedrinas e anfetamina em urina empregando SPE e SPME por CG/EM/EM. 2007. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

SHI, S.; CHEN, H.; CUI, Y.; TANG, X. Formulation, stability and degradation kinetics of intravenous cinnarizine lipid emulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, p. 147-155, 2009.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nano-emulsions. **Current opinion in colloid and interface science**, v. 10, p. 102-110, 2005.

STACHNIK, J. Inhaled anesthetic agents. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, p. 623-634, 2006.

STRICKLEY, R.G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 201-230, 2004.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TERRELL, R.C. The Invention and Development of Enflurane, Isoflurane, Sevoflurane, and Desflurane. **Anesthesiology**, v. 108, p. 531-533, 2008.

TURNER, P.G.; DUGDALE, A.; YOUNG, I.S.; TAYLOR, S. Portable mass spectrometry for measurement of anaesthetic agents and methane in respiratory gases. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 36-44, 2008.

UYANIK, A. Gás chromatography in anaesthesia I, A brief review of analytical methods and gas chromatographic detector and column systems. **Journal of Chromatography B**, v. 693, p. 1-9, 1997.

VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.

YANG, N.C.; HWANG, K.L; HUNG, D.Z.; WUHH, H.H.; HO, W.M. Reliable gas chromatographic – mass spectrometric method combined with a headspace autosampler for isoflurane determination in blood. **Journal of Chromatography B**, v. 742, p. 277-282, 2000.

WILLE, S.M.R e LAMBERT, W.E.E. Volatile abuse substances – post mortem diagnosis. **Forensic Science International**, v. 142, p. 135-156, 2004.

WISSING, H.; KUHN, I.; RIETBROCK, S.; FUHR, U. Pharmacokinetics of inhaled anaesthetics in a clinical setting: comparison of desflurane, isoflurane and sevoflurane. **British Journal of Anaesthesia**, v. 84, p. 443-449, 2000.

9. ANEXO

Comitê de Ética

HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 09-208

Versão do Projeto: 14/05/2009

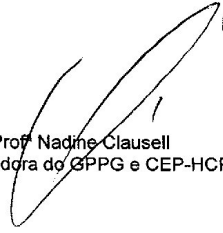
Pesquisadores:

CLAUDIO CORREA NATALINI
RENATA PEREIRA LIMBERGER
CAROLINA LOPES KRAHN
ELIANE DALLEGRAVE
NADIA CROSIGNANI OUTEDA
GILCEIA GUADAGNIN DORNELES

Título: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ISOFLURANO LÍQUIDO INALATÓRIO E INCLUSO EM NANOEMULSÕES E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DAS NANOEMULSÕES

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 15 de junho de 2009.


Prof. Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA