

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Daniele Ribeiro de Araujo

**FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO CONTROLADA COM
ANESTÉSICOS LOCAIS – BUPIVACAÍNA E
MEPIVACAÍNA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Daniele Ribeiro de Araujo</i>	e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>[Signature]</i>
---	---

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

**Campinas
2002**

UNIDADE	BB
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Ar 15f
OMBO BCI	48943
ROC.	16-837/02
C	☐ ☒
REÇO	R\$ 11,00
DATA	10/05/02
Nº CPD	

CM00167262-0

18 ID 239966

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Ar15f

Araujo, Daniele Ribeiro de

Formulações de liberação controlada com anestésicos locais – bupivacaína e mepivacaína: preparação, caracterização e ensaios farmacológicos/Daniele Ribeiro de Araujo. –
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Eneida de Paula

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1.Anestésicos locais. 2.Lipossomos. 3.Ciclodextrinas. 4.Anestesia.
5.Analgesia. I. Paula, Eneida de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

**A Deus, pois ter fé sempre é preciso
A meus pais e irmã, minha segurança
À tia Glaucia, confiança
À tia Gorete (*in memoriam*), serenidade**

“ Navegadores antigos tinham uma frase gloriosa: ‘Navegar é preciso; viver não é preciso’. Quero para mim o espírito desta frase, transformada a forma para a casar com o que eu sou: Viver não é necessário; o que é necessário é criar”.

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas pelos dois anos de experiência e conhecimento que adquiri.

À CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) pelo auxílio financeiro durante o curso.

À Profa. Dra. Eneida de Paula pela orientação, aprendizado, amizade e, especialmente, por acreditar neste trabalho.

À Profa. Dra. Alba Regina Brito, Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana e Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles pelos esclarecimentos durante a realização deste trabalho e por estarem dispostas a contribuir em todos os momentos.

À Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo pela cooperação, amizade e auxílio indispensáveis neste trabalho.

Ao Biomembranas:

- à “Tia” Nilce (outra vez) pelo carinho;
- ao Paulinho (Pô), a alegria em pessoa, obrigada pela atenção e grande amizade (pelo apelido que ganhei também!);
- ao Léo (Draceninha) por proporcionar momentos tão divertidos, pela amizade, troca de idéias, informações, favores;
- à Nonô por nossas conversas no laboratório (momentos nos quais eu sempre queria saber onde estava alguma coisa...) e tantas risadas...durante minhas perguntas farmacêuticas ...
- à Luciana (Lu) por ter me apresentado o mundo dos lipossomas e ciclodextrinas, pelos congressos e viagens super divertidos;
- à Sônia pelo incentivo durante a realização deste trabalho;
- ao Cleyton, o mais novo integrante do grupo, pela curta mas agradável convivência;
- ao “mininu” Bispo (sempre ajudando durante os momentos em que os computadores não queriam me atender) Haydalina (Hayda) e Ju, por serem tão importantes para a alegria daquele laboratório;

- à Dani Lodetti (“Viu”), à Maribel, Paulo Baldasso, Juliana e Daniel pelo auxílio dispensado durante este trabalho.

À Marina e Andréa pela amizade, por nossas conversas organizando papéis e principalmente pela disposição de vocês respondendo todas as minhas milhares de perguntas burocráticas.

À Dani (Japa, Japinha, Neuza...ou qualquer outro nome relacionado!) por ter se tornado uma amiga muito especial, pela bondade, sinceridade, por saber ouvir, entender, acreditar e ter me ajudado a superar as dificuldades...muito obrigada!

Ao “Tio” Du pela amizade, momentos de diversão e de trabalho nos quais aprendi bastante.

Ao Zeca, meu grande amigo, alegre, cheio de vida e de frases inesquecíveis...uma das pessoas com quem mais gostei de trabalhar.

Aos amigos Márcio e Telma pela alegria da convivência com vocês, pelos papos de corredor e auxílio durante a realização dos experimentos.

Ao Juliano e ao Walber, da Fisiologia, pela paciência ao responderem minhas perguntas.

Às “chicas” da Química e Engenharia Química: Débora, Neife, Rita, Elaine, Giuliana, Carla, Maria Helena pela paciência, informações importantes e por nossas viagens inesquecíveis!

Às amigas e conselheiras Maria Helena (a mãe de plantão) e Maria Tereza, muito obrigada por vocês fazerem parte de momentos tão importantes. À Tainá e Aruã por entenderem meu “stress”

Às pessoas que, mesmo não citadas aqui, não foram esquecidas...e fazem parte de uma história que sempre vou lembrar.

Dani “Morango”.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIACÕES	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
I. INTRODUÇÃO	1
1. DOR	1
1.1. NEUROFISIOLOGIA DA DOR	2
2. ANESTESIA E ANALGESIA	4
3. ANESTÉSICOS LOCAIS	6
3.1. ESTRUTURA QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	7
3.2. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS	11
3.3. BUPIVACAÍNA E MEPIVACAÍNA	14
3.4. ANESTÉSICOS LOCAIS NA TERAPIA DA DOR	17
4. FORMULAÇÕES ANESTÉSICAS LOCAIS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	18
4.1. LIPOSSOMAS	18
4.2. CICLODEXTRINAS	20
5. MODELOS ANIMAIS EM ANESTESIA E ANALGESIA	23
II. OBJETIVOS	27
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
III. MATERIAL & MÉTODOS	28
1. ANIMAIS	28
2. DROGAS, SAIS E SOLVENTES	28
3. EQUIPAMENTOS	29
4. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	29
4.1. LIPOSSOMAS	29
4.2. CICLODEXTRINAS	30
5. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	31
5.1. LIPOSSOMAS	31
5.1.1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO: ESPALHAMENTO QUASI-ELÁSTICO DE LUZ	31
5.1.2. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO: ESPECTROSCOPIA UV	32
5.2. CICLODEXTRINAS	33
5.2.1. EFICIÊNCIA DA COMPLEXAÇÃO: CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	33

5.2.2. MORFOLOGIA DA COMPLEXAÇÃO: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)	34
6. TESTES FARMACOLÓGICOS	34
6.1. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO MOTOR	35
6.2. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO SENSORIAL	37
6.3. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA SISTÊMICA	39
6.3.1. CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO	39
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
IV. RESULTADOS & DISCUSSÃO	41
1. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	41
1.1. LIPOSSOMAS	41
1.1.1. DIÂMETRO MÉDIO DOS LIPOSSOMAS E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	41
1.2. COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM β -CICLODEXTRINAS	44
1.2.1. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	44
1.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)	48
2. TESTES FARMACOLÓGICOS	51
2.1. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO MOTOR	51
2.2. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO SENSORIAL	53
2.3. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA SISTÊMICA	61
2.3.1. CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO	61
V. CONCLUSÕES	64
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS	67
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
VIII. COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS	76
IX. ANEXO	77
DIÂMETRO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS VESÍCULAS LIPÍDICAS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Representação esquemática das vias de transmissão e percepção da dor (adaptado de: Cleveland Clinical Foundation - Pain Management Center. http://medstat.med.utah.edu/pain_center/education/outlines/noci_transduc.html, 2001)</i>	4
Figura 2	<i>Estrutura química de alguns AL do tipo éster.</i>	7
Figura 3	<i>Estrutura química de alguns AL do tipo amino-amida.</i>	8
Figura 4	<i>Representação esquemática da partição dos AL em água e membrana. Onde: AL – NH⁺, molécula de AL com grupamento amino protonado (forma ionizada); ALN⁻, AL com grupamento amino desprotonado (forma neutra); P, coeficiente de partição; K_a, constante de dissociação em água; K_m, constante de dissociação em membrana.</i>	9
Figura 5	<i>Organização estrutural do canal de sódio (A, B) e suas conformações durante a propagação do potencial de ação (C) (adaptado de Nelson & Cox, 2000).</i>	12
Figura 6	<i>Biotransformação da BVC e MVC a pipecolilxilidida (adaptado de: de Jong, 1994).</i>	16
Figura 7	<i>Representação esquemática dos lipossomas: unilamelar (A) e multilamelar (B) (adaptado de Nelson & Cox, 2000, B).</i>	19
Figura 8	<i>Estrutura da β-CD apresentando sete monômeros de glicose.</i>	22
Figura 9	<i>Visualização do bloqueio motor induzido pelos AL.</i>	36
Figura 10	<i>Procedimento realizado durante o teste PWTP.</i>	38
Figura 11	<i>Comportamento observado durante o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.</i>	39
Figura 12	<i>Termogramas de DSC para os sistemas de BVC e MVC com β-CD. (A) BVC, (B) β-CD, (C) mistura física BVC/β-CD, (D) complexo sólido BVC: β-CD, (E) MVC, (F) mistura física MVC/β-CD e (G) complexo sólido MVC: β-CD. Os complexos sólidos foram preparados na razão molar de 1:1 (AL : β-CD).</i>	46
Figura 13	<i>Análise por SEM dos cristais de β-CD (A), BVC (B) e MVC (C). Aumento de 1500X.</i>	49

- Figura 14** *Análise por SEM das misturas físicas de BVC/ β -CD (A), MVC/ β -CD (B) e dos complexos sólidos BVC β -CD (C) e MVC β -CD (D). Aumento de 1500X.* 50
- Figura 15** *Curvas efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os veículos (LUV / β -CD), BVC, BVC_{LUV} e BVC β -CD nas concentrações de 0,125 (A) , 0,25 (B) e 0,5 % (C). Valores expressos em média $\pm$ SD (n = 10). a, BVC e LUV / β -CD; b, BVC_{LUV} e LUV / β -CD; c, BVC β -CD e LUV / β -CD; d, BVC_{LUV} e BVC; e BVC β -CD e BVC; f, BVC β -CD e BVC_{LUV}. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ANOVA).* 56
- Figura 16** *Curvas efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os veículos (LUV / β -CD), BVC, MVC_{LUV} e MVC β -CD nas concentrações de 0,5 (A) , 1 (B) e 2 % (C). Valores expressos em média $\pm$ SD (n = 10). a, MVC e LUV / β -CD; b, MVC_{LUV} e LUV / β -CD; c, MVC β -CD e LUV / β -CD; d, MVC_{LUV} e MVC; e MVC_{LUV} e MVC β -CD; f, MVC e MVC β -CD. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ANOVA).* 57
- Figura 17** *Redução do número de contorções abdominais (média $\pm$ SD) após tratamento com AL (s.c.). As contorções foram registradas durante 20 min. após a administração (i.p.) de ácido acético 0,6 %. Os gráficos mostram os tratamentos com veículos (salina e β -CD) BVC, BVC β -CD (A) e veículos, MVC, MVC_{LUV} (B) (n = 10). a, BVC e salina/ β -CD; b, BVC β -CD e salina/ β -CD ; c, BVC β -CD e BVC (A). a, MVC e salina/ β -CD; b, MVC_{LUV} e salina/ β -CD (B). *** p < 0,001.* 63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	<i>Propriedades físico-químicas e farmacológicas da BVC e MVC</i>	15
Tabela 2	<i>Propriedades físico-químicas e farmacológicas da BVC e MVC</i>	42
Tabela 3	<i>Diâmetro médio das LUV duas semanas após estocagem a diferentes temperaturas (n = 9 - 10).</i>	42
Tabela 4	<i>Temperatura de transição de fases e ΔH dos AL, β-CD, misturas físicas e complexos sólidos determinados através de DSC.</i>	47
Tabela 5	<i>Latência, T_{máx}, tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (AUC) induzido pelas formulações de AL livres, lipossomais e complexadas. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 8 / grupo). a BVC 0,5 % e BVC 0,125 %; b BVC_{LUV} 0,5 % e BVC_{LUV} 0,125 %; c BVC_{β-CD} 0,5 % e BVC_{β-CD} 0,125%; d MVC 0,5 % e MVC 2 %; e MVC_{LUV} 0,5 % e MVC_{LUV} 2 %. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 (Teste de Kruskal – Wallis).</i>	52

LISTA DE ABREVIATÖES

AL: anestésico (s) local (is)

AUC: área sobre a curva efeito x tempo

BVC: bupivacaína

β -CD: β -ciclodextrina (s)

BVC $_{\beta$ -CD: bupivacaína complexada com β -ciclodextrina

BVC/ β -CD: mistura física de bupivacaína e β -ciclodextrina

BVC_{LUV}: bupivacaína lipossomal

CD: ciclodextrina (s)

DSC: calorimetria diferencial de varredura

LUV: lipossomas unilamelares

MLV: lipossomas multilamelares

MVC: mepivacaína

MVC $_{\beta$ -CD: mepivacaína complexada com β -ciclodextrina

MVC/ β -CD: mistura física de mepivacaína e β -ciclodextrina

MVC_{LUV}: mepivacaína lipossomal

PWTP: *paw withdrawal threshold to pressure*

SEM: microscopia eletrônica de varredura

T_{máx}: tempo para o efeito máximo

RESUMO

Entre as várias classes de fármacos utilizados no tratamento da dor encontram-se os anestésicos locais (AL). Com a finalidade de prolongar a duração de ação e reduzir a toxicidade sistêmica desses fármacos, pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando diferentes carreadores como lipossomas e ciclodextrinas que possibilitam a liberação controlada (prolongando o efeito anestésico) e evitam picos plasmáticos das drogas (reduzindo a toxicidade). Assim, este trabalho teve por finalidades preparar, caracterizar e avaliar *in vivo* a eficácia de formulações contendo os AL bupivacaína (BVC) e mepivacaína (MVC) encapsulados em lipossomas ou complexados com ciclodextrinas para, posteriormente, compará-las com as preparações disponíveis na clínica.

Análises do diâmetro médio dos lipossomas revelaram a presença de duas populações de vesículas distintas (400 nm e 150 nm) sendo observada uma maior percentagem de encapsulação para BVC do que para MVC. Com relação aos sistemas de AL em ciclodextrinas, foram observadas diferenças nas temperaturas de transição de fases e na morfologia dos cristais dos compostos puros (AL e ciclodextrinas) evidenciando a complexação.

A avaliação do bloqueio motor em camundongos mostrou que os AL livres, as formulações lipossomais e as complexadas induziram um aumento dose – dependente na intensidade e na duração do mesmo. Porém, esses parâmetros não foram alterados quando comparou-se as preparações entre si, nas mesmas concentrações. Também, os efeitos antinociceptivos sistêmicos foram similares para todas as formulações testadas. Já a potência e a duração do bloqueio sensorial foram aumentadas pela complexação de BVC com ciclodextrinas e pela encapsulação de MVC em lipossomas, em relação às drogas livres ($p < 0,001$).

Esses resultados podem ser explicados pela liberação controlada das drogas e pelo aumento da disponibilidade das mesmas no sítio de injeção. A encapsulação de MVC em lipossomas possibilitou o transporte da fração da droga disponível no interior da bicamada lipídica e a complexação de BVC com ciclodextrinas aumentou a quantidade de droga solubilizada (na fase aquosa) conferindo-lhes maior potência anestésica em relação às preparações comerciais. Desta forma, as formulações de MVC em lipossomas e BVC em ciclodextrinas apresentam-se como novas alternativas no tratamento da dor aguda e crônica.

ABSTRACT

Local anesthetics (LA) belong to the class of drugs used for the treatment of pain. In order to prolong the duration of action and to reduce their systemic toxicity of LA, many studies have been developed using carriers such as liposomes and cyclodextrins; these vehicles allow controlled release (improving anesthetic effect) and avoid high plasmatic levels of the anesthetics to be reached (reducing the toxicity).

This work aimed to prepare, to characterize and to evaluate *in vivo* drug – delivery systems for bupivacaine (BVC) and mepivacaine (MVC) in liposomes or cyclodextrins, comparing them with the clinically used LA solutions.

Mean size diameter analysis showed that the liposomes have diameters of 400 nm and 150 nm, with encapsulation efficiencies higher for BVC than MVC. Regarding to LA systems in cyclodextrins, differences on phase transition temperature and structural changes in the crystal's patterns evidenced LA : β -CD complexation.

Liposomal and ciclodextrin formulations increased the intensity and duration of the motor blockade showing dose–dependent relationships although these parameters did not change, if compared at the same concentrations. Also the systemic antinociceptive effects were similar for all the formulations tested. Potency and duration of sensory blockade were improved after injection of complexed BVC and liposomal MVC in relation to the free drug injection ($p < 0.001$).

These results can be explained by the controlled release of the LA and increased availability of the LA in their site of injection. Encapsulation of MVC in liposomes increased the amount of available drug for membrane partition while complexation into cyclodextrin increased BVC concentration in the aqueous phase, improving their anesthetic potency in relation to the commercial solutions and these LA. These drug–delivery systems offer a potential new therapeutic option for the treatments of acute and chronic pain using LA.

I. INTRODUÇÃO

1. DOR

Há muito existe uma preocupação em compreender o fenômeno da dor e, conseqüentemente, conceituá-lo. Segundo a *Associação Internacional para o Estudo da Dor*, esse fenômeno é uma experiência sensitiva e emocional desagradável onde há percepção de um estímulo nocivo associado à lesão tecidual real ou potencial (Lemonica & Pereira, 1992).

Sabe-se, atualmente, que a dor possui dois componentes principais: o perceptivo-discriminativo e o afetivo-reacional ("reação à dor"). O componente perceptivo-discriminativo é constituído pela capacidade do organismo de identificar o estímulo como doloroso, sua origem e propriedades físicas (localização no espaço e no tempo e intensidade). Já o componente afetivo-reacional é a experiência emocional propriamente dita, reconhecida como aversiva, incentivando reações de fuga ou ataque acompanhadas de sensações subjetivas de desconforto intenso e de forte motivação para aliviar a dor; é constituído de respostas somáticas e emocionais que são influenciadas por fatores como: estado psicológico, experiências anteriores, níveis cultural e social etc (Graeff, 1989; Lemonica & Pereira, 1992).

Baseando-se na duração da lesão tecidual pode-se classificar a dor em aguda ou de curta duração, que persiste apenas enquanto durar o dano representando uma reação fisiológica normal; e a dor crônica ou lenta, associada às lesões mais profundas evidenciando-se quando cessa a função dos mecanismos normais de cicatrização e estados patológicos que podem persistir por um longo período, como câncer, artrite reumatóide, pinçamentos nervosos... (Siddall & Cousins, 1995).

1.1. NEUROFISIOLOGIA DA DOR

Para que os estímulos nocivos (térmicos, mecânicos, químicos) sejam detectados é necessária a estimulação de receptores sensoriais específicos denominados nociceptores. Estes são terminações nervosas livres distribuídas através da pele, músculos, vísceras profundas, paredes arteriais, superfícies articulares e caixa craniana. Em oposição a outros receptores sensoriais (mecanorreceptores e receptores eletromagnéticos, por exemplo) os nociceptores quase ou não se adaptam a certas situações de estresse, o que possibilita manter o organismo sempre alerta a um estímulo lesivo persistente (Guyton & Hall, 1998).

Dois tipos de fibras aferentes estão primariamente envolvidas na percepção da dor: as fibras mielinizadas do tipo A δ , (que podem ser ativadas por estímulos de baixa ou moderada intensidade) e as fibras não mielinizadas do tipo C (com receptores de alto limiar, sendo ativadas por estímulos intensos e repetitivos). Aproximadamente 25% das fibras A δ respondem somente a estímulos mecânicos (fibras unimodais) ao passo que, boa parte das fibras C são menos específicas e respondem a estímulos térmicos, mecânicos ou químicos portanto, denominadas polimodais (Besson & Caouch, 1987).

No processo de sensibilização dos nociceptores estão envolvidos eventos como a liberação de cininas, síntese de prostaglandinas e, principalmente, a deflagração do potencial de ação nas fibras: com a ativação da membrana neuronal por qualquer estímulo físico, químico ou elétrico, há um aumento considerável no influxo de sódio para o axoplasma, através de canais voltagem-dependentes, específicos para o transporte desse íon. Essa entrada brusca de sódio inverte o potencial membranar e deflagra um potencial de ação que percorre toda a extensão do axônio, propagando os estímulos nervosos. Após cada potencial, a membrana axonal inicia de modo subsequente a restauração da polaridade celular (potencial de repouso), promovendo a abertura dos canais de

potássio que levarão ao efluxo desses cátions e restabelecendo as concentrações iônicas por ação da bomba de sódio e potássio (Carvalho, 1994; Guyton & Hall, 1998).

Mesmo sendo terminações nervosas livres, os nociceptores utilizam duas vias distintas para transmissão dos sinais nervosos até o sistema nervoso central. Essas vias correspondem aos dois tipos de dor; a via da dor rápida-aguda e a via da dor lenta-crônica. Os impulsos da dor aguda são transmitidos dos nervos periféricos para a medula espinhal pelas fibras do tipo A δ , de condução rápida; já os sinais da dor crônica são transmitidos pelas fibras C, com velocidade extremamente lenta. Chegando à medula espinhal, os sinais dolorosos percorrem dois caminhos distintos até o cérebro, através dos feixes neoespinotalâmicos e paleoespinotalâmicos. As fibras A δ que transmitem principalmente a dor oriunda de estímulos mecânicos e térmicos agudos fazem sinapses com as células de transmissão da medula que, uma vez ativadas, excitam os neurônios do feixe neoespinotalâmico (cujas fibras seguem até o tálamo) que transmitem os sinais para outras áreas cerebrais. Esta é a via responsável pela localização topográfica e discriminativa do estímulo doloroso. Já a via paleoespinotalâmica transmite os sinais conduzidos pelas fibras aferentes do tipo C. Esta via projeta-se no hipotálamo e zonas específicas do tálamo irradiando-se para o córtex cerebral, sendo responsável pela percepção da intensidade do estímulo e pelas reações à dor (Figura 1) (Guyton & Hall, 1998; Butterworth & Strichartz, 1990).

Portanto, a via neoespinotalâmica é um sistema de condução rápida e discriminativa, sendo responsável pela percepção da dor aguda e bem localizada, enquanto que a via paleoespinotalâmica conduz a dor lenta, pouco definida, influenciada por fatores afetivos e que motiva reações comportamentais de defesa (Graeff, 1989).

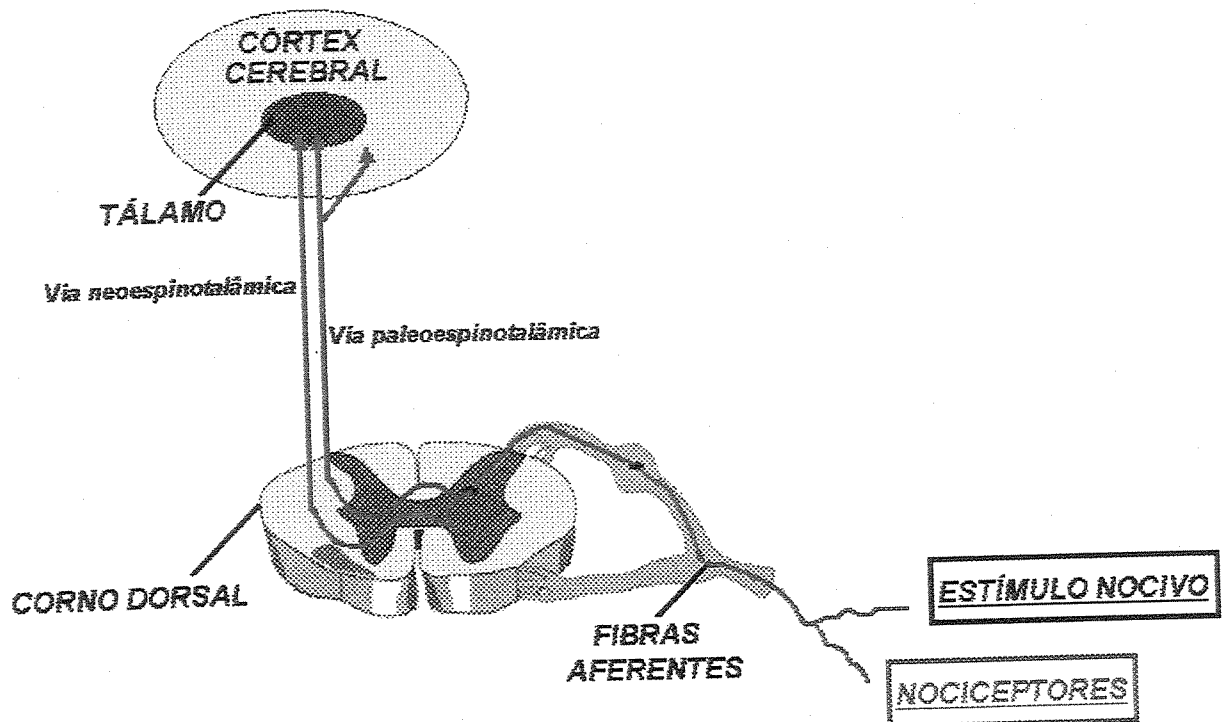
PERCEPÇÃO DA DOR

Figura 1. Representação esquemática das vias de transmissão e percepção da dor (adaptado de: Cleveland Clínica Foundation - Pain Management Center. http://medstat.med.utah.edu/pain_center/education/outlines/noci_transduc.html, 2001).

2. ANESTESIA E ANALGESIA

Apesar de incômoda, a dor desempenha uma função biológica essencial. É a resposta do organismo a um determinado ou potencial trauma. Porém, em algumas situações, o sofrimento doloroso perde sua função biológica e começa a representar uma consequência insuportável às desordens refratárias ao tratamento. Por isso, a capacidade de instituir novos métodos de tratamento com o objetivo de produzir analgesia, isto é, aliviar ou eliminar a dor é um desafio atual (Stevens, 1992).

Existem alguns métodos que induzem analgesia, sendo o tratamento farmacológico o mais utilizado. Substâncias químicas ao serem introduzidas no organismo alteram mecanismos nervosos periféricos ou centrais de detecção e elaboração da informação dolorosa reduzindo a reação emocional à dor ou ainda interferindo no estado de consciência necessário à percepção dolorosa. Os medicamentos responsáveis por esses efeitos são denominados analgésicos/antiinflamatórios (como a aspirina), analgésicos opióides (morfina e derivados), anestésicos gerais e locais. Os analgésicos/antiinflamatórios reduzem a dor por atuarem essencialmente na diminuição da hiperalgesia conseqüente à liberação de interleucinas, interferons e prostaglandinas. Esses fármacos são bastante úteis no controle da dor de intensidade baixa ou moderada, associada à inflamação ou lesão tecidual (artrite, bursite, cefaléias, dismenorréias) (Sudo-Havashi & Bersani-Amado, 2001). Já os analgésicos opióides, são úteis contra dores viscerais intensas (cólicas renais, infarto do miocárdio, câncer) e agem através da ligação a receptores específicos na medula espinhal, em neurônios aferentes e eferentes primários (Way *et al.*, 1998).

Os anestésicos gerais também têm a propriedade analgésica, mas a esta são adicionadas a inconsciência, amnésia e a perda da motricidade, mantendo-se apenas as funções vitais como circulação sangüínea e respiração. Já os anestésicos locais (AL), objeto desse estudo, evitam ou aliviam a dor por bloquearem reversivelmente o processo de excitação-condução em nervos periféricos, podendo abolir a motricidade e sensações como tato e temperatura, mas sem a perda de consciência inerente aos anestésicos gerais (Collins, 1993; Catteral & Mackie, 1996).

3. ANESTÉSICOS LOCAIS

Os AL são compostos químicos cuja atividade farmacológica primária envolve o bloqueio reversível da condução nervosa. Essa propriedade é uma consequência da inibição do processo de excitação-condução em nervos periféricos, quando aplicados localmente e em concentrações adequadas. Um AL exerce sua ação reversível em qualquer tecido nervoso podendo bloquear a passagem de impulsos tanto em fibras sensoriais quanto motoras aliviando ou evitando a dor, o que contribui para a grande utilização desses fármacos na prática médica (Covino, 1986).

O primeiro composto a ser utilizado como AL foi a cocaína, um alcalóide isolado das folhas de *Erithroxylon coca*, que teve sua ação demonstrada por Köller (1884) ao utilizá-la como anestésico oftálmico. Apesar de ter sido empregada na clínica durante um longo tempo, a cocaína foi substituída por outros compostos devido aos seus efeitos tóxicos como dependência física e psíquica (Vianna, 1992).

Já o primeiro AL sintético efetiva e largamente utilizado foi a procaína, um amino-éster produzido por Einhorn, em 1905, a partir do ácido benzóico. Um outro composto denominado lidocaína, sintetizado na década de 40, iniciou a era dos AL tipo amino-amida sendo praticamente isenta das reações alérgicas tão comuns aos derivados do ácido para-aminobenzóico (Collins, 1993). Muitas substituições moleculares foram testadas possibilitando o surgimento de vários outros compostos sintéticos que, atualmente, integram a grande classe dos fármacos AL (Strichartz, 1987; Malamed, 2001).

3.1. ESTRUTURA QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Os compostos AL possuem, em geral, três características distintas em sua estrutura: um grupo aromático, uma cadeia intermediária e um grupo amino ionizável.

Os AL podem ser classificados de acordo com o tipo de ligação entre o grupo aromático e a cadeia intermediária. Os agentes que possuem uma ligação éster entre o grupo aromático e a cadeia intermediária são denominados amino-ésteres e incluem compostos como a procaína e a tetracaína.

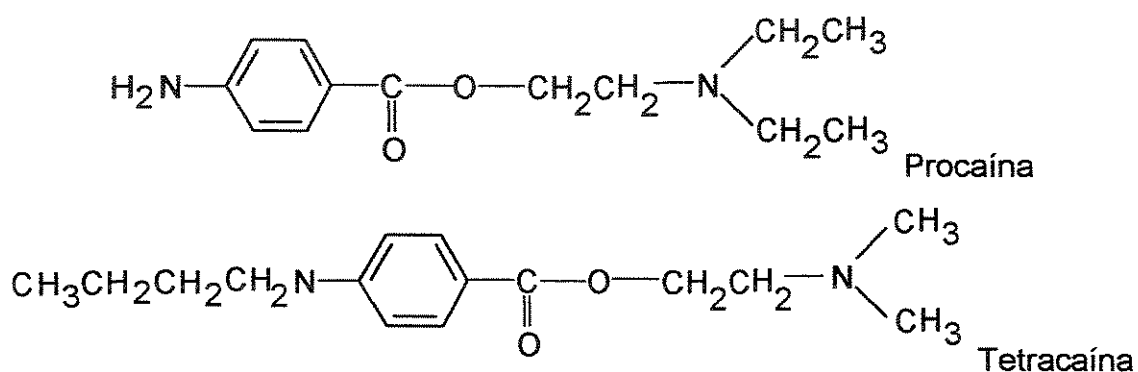


Figura 2. Estrutura química de alguns AL do tipo éster.

Já os AL com uma ligação amida entre a cadeia intermediária e o grupamento aromático são conhecidos como amino-amidas. Como exemplo dessa família tem-se a lidocaína, mepivacaína, bupivacaína, ropivacaína, prilocaína, etidocaína, dibucaína etc. É interessante notar que o grupo amino, ionizável em pH próximo ao fisiológico, pode fazer parte de um anel piperidínico, na sub-família dos anestésicos amino-amida cíclicos (Figura 3) (Strichartz, 1987).

A diferença marcante entre ésteres e amidas está relacionada à estabilidade química. Os ésteres são facilmente hidrolizados pela colinesterase plasmática enquanto as amidas sofrem degradação enzimática hepática, sendo muito mais estáveis (Covino, 1986).

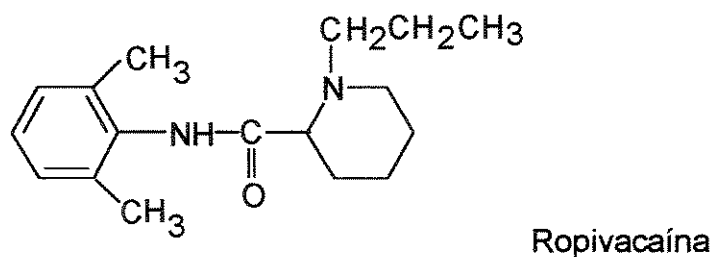
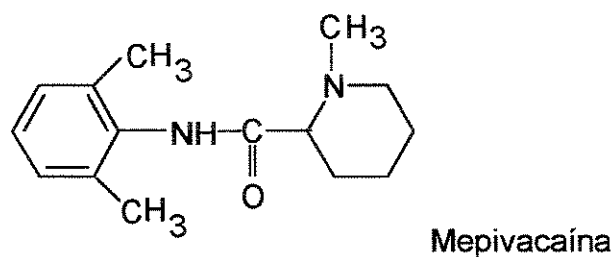
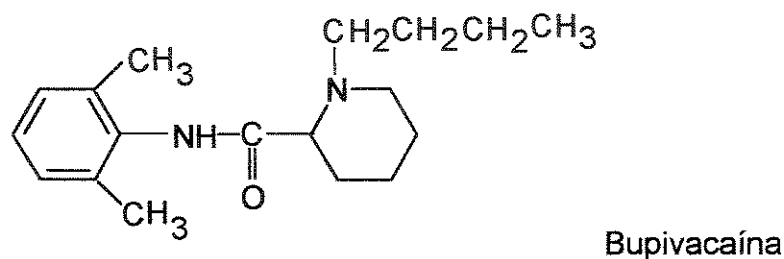
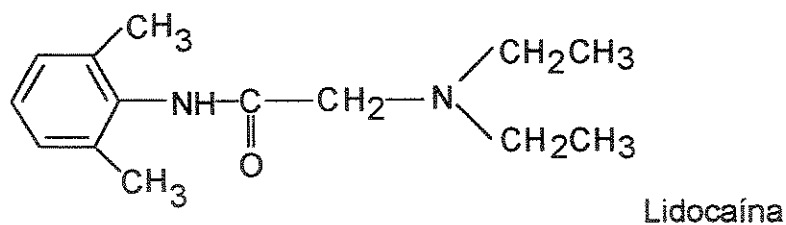


Figura 3. Estrutura química de alguns AL do tipo amino-amida.

A presença dos grupos amino e aromático na molécula dos AL são essenciais na definição de características intrínsecas desses fármacos como hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade.

O grupamento amino é a porção ionizável da molécula sendo influenciado pelo pH do meio. Para a maioria dos AL os valores das constantes de dissociação, K_a , estão na faixa de pH entre 7,8 e 8,2. A desprotonação deste grupo amino (em pH acima de pK_a) também aumenta a hidrofobicidade da molécula uma vez que a forma neutra (ou não carregada) tem maior partição, P , em membranas biológicas (Figura 4) (Wildsmith *et al.*, 1987; Gupta, 1991; de Paula & Schreier, 1996).

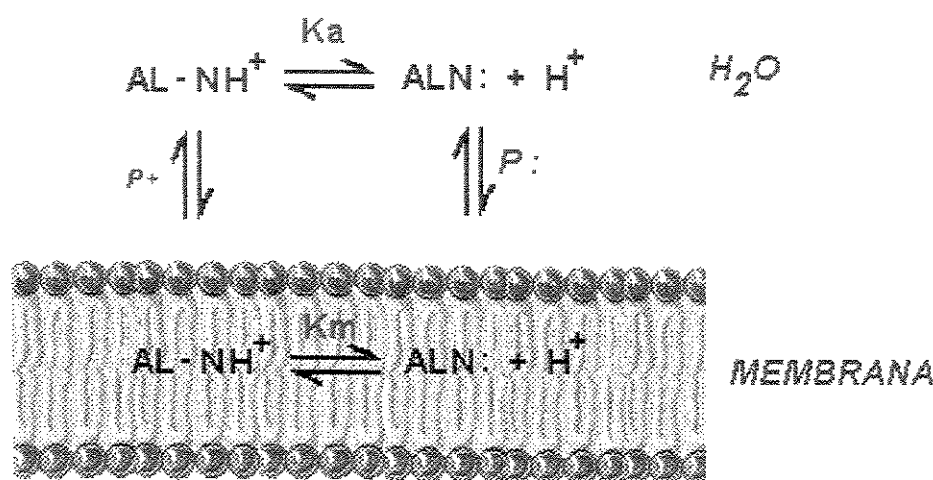


Figura 4. Representação esquemática da partição dos AL em água e membrana. Onde: AL-NH^+ , molécula de AL com grupamento amino protonado (forma ionizada); ALN: , AL com grupamento amino desprotonado (forma neutra); P , coeficiente de partição; K_a , constante de dissociação em água; K_m , constante de dissociação em membrana.

O grupo aromático é a unidade estrutural responsável pelas propriedades lipofílicas do anestésico e facilita a partição deste em membranas neurais. Adições de átomos de carbono nos grupamentos aromático e amino ou aumento no

comprimento da cadeia intermediária também interferem na natureza lipofílica do composto (Strichartz, 1987; Gupta, 1991; de Jong, 1994).

O perfil clínico dos agentes AL é determinado por três características importantes: potência, velocidade de ação e duração da atividade anestésica.

A propriedade dessa classe de fármacos que é intrínseca à atividade anestésica e relacionada à potência é a lipossolubilidade. Alguns estudos mostram que há uma clara correlação entre o coeficiente de partição do AL e a concentração mínima necessária para o bloqueio da condução nervosa. Mas é preciso salientar que a solubilidade em água é essencial para o transporte da droga até as fibras nervosas, enquanto a solubilidade lipídica é necessária para a penetração na membrana sendo a existência de um balanço entre essas duas propriedades (caráter anfifílico) um fator essencial para a atividade dos AL (Gupta, 1991; de Paula & Schreier, 1995,1996).

O mecanismo determinante para a ação de um AL é a interação do fármaco com a proteína canal de sódio, que será discutido posteriormente.

A velocidade de ação é relacionada primariamente à constante de ionização da droga (pK_a). Como citado anteriormente, a forma desprotonada ou neutra (base) do AL é a responsável pela difusão através da membrana e a forma ionizada (cátion) pela difusão em meio aquoso. É o número de moléculas na forma ionizada que determina a velocidade de ação do agente anestésico, indicando que a solubilidade em água (maior para a forma ionizada que para a forma neutra) pode ser um fator limitante para o efeito anestésico (de Paula & Schreier, 1995; 1996; Pinto *et al.*, 2000). A percentagem da droga na forma básica quando injetada em um tecido de pH 7,4 é inversamente proporcional ao pK_a do fármaco (Covino, 1986; Collins, 1993; Bianconi, 1998) sendo que os AL amino-amidas têm pK_a ligeiramente menor (7-8) que os amino-ésteres (8-9) (Gupta, 1991).

3.2. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Os AL têm como seu local de ação a membrana celular onde bloqueiam a condução nervosa. Entre os agentes responsáveis pela formação e propagação do potencial de ação estão os canais de sódio (Figura 5) e potássio voltagem-dependentes, que fornecem bases para o entendimento do mecanismo de ação desses fármacos.

A transmissão dos impulsos nervosos é detectada por variações no potencial de membrana neuronal. Quando essa membrana é ativada por um estímulo que alcança um certo limiar, cria-se nesse ponto um aumento considerável do influxo de sódio através de canais voltagem e tempo-dependentes. Essa entrada brusca inverte o potencial de repouso (*overshoot*) ficando o meio intracelular com potencial positivo em relação ao meio extracelular, caracterizando o processo de despolarização. Haverá então, entre a região despolarizada e a adjacente, a formação de um dipolo e a corrente de sódio percorrerá toda a extensão do axônio. Onde houve a despolarização, a membrana inicia de modo subsequente a repolarização com a saída de íons potássio por seus canais específicos. Complementando o processo, há a ação da bomba de sódio e potássio ATP-ase que promove o restabelecimento das concentrações iônicas de repouso (Carvalho, 1994; Anger *et al.*, 2001).

Os AL produzem seus efeitos por impedirem o rápido influxo de íons sódio para o interior do axônio. Essa ação interrompe a formação e deflagração do potencial de ação. Acredita-se que a diminuição da permeabilidade da membrana aos íons sódio ocorra por dois mecanismos: alterações gerais na fluidez da membrana (levando a modificações conformacionais na proteína-canal de sódio voltagem-dependente) e/ou a interação específica dos compostos AL com os canais de sódio.

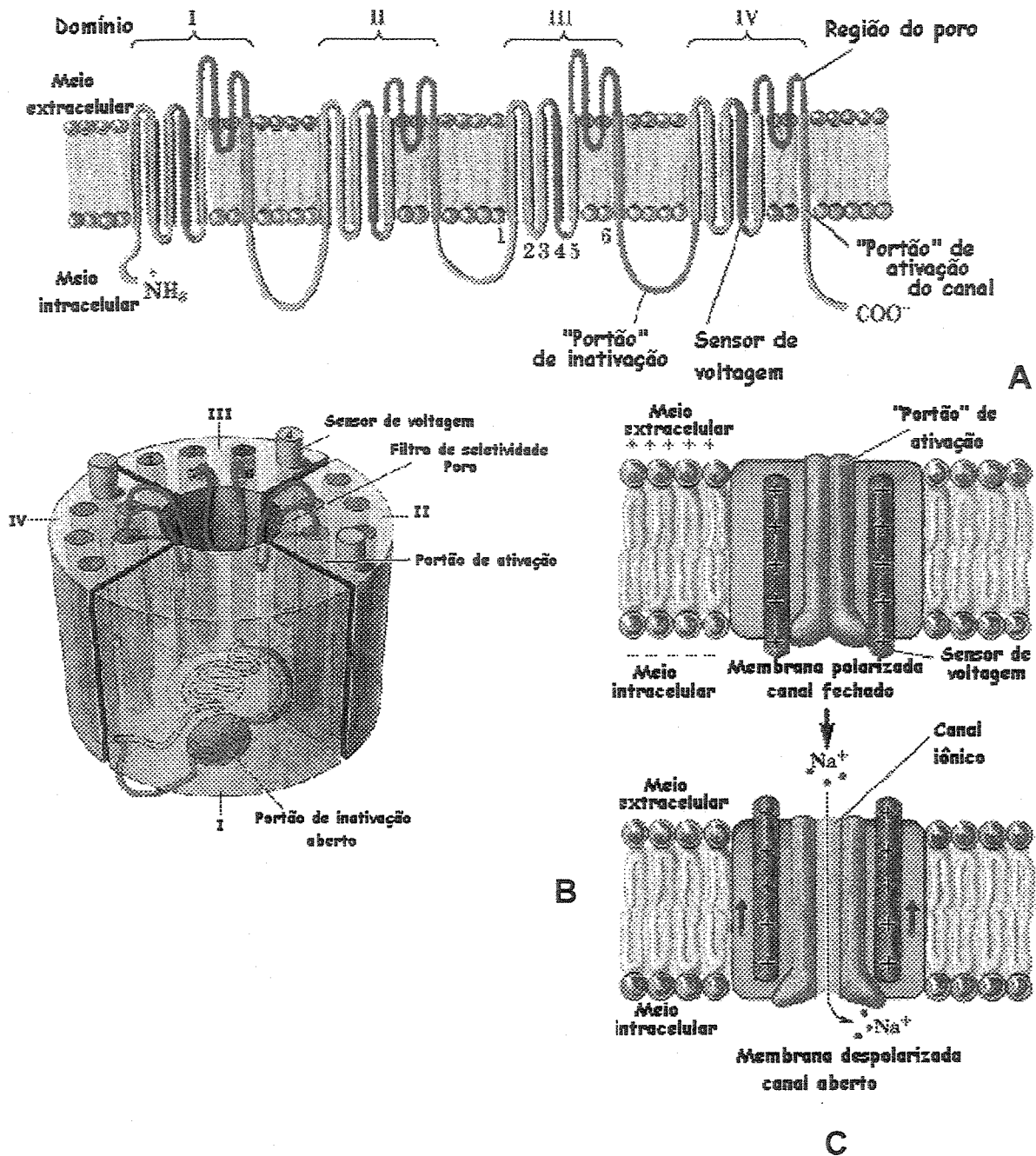


Figura 5. Organização estrutural do canal de sódio (A, B) e suas conformações durante a propagação do potencial de ação (C) (adaptado de Nelson & Cox, 2000).

A teoria dos lipídios propõe que o AL, por sua atividade na superfície da membrana, produza uma alteração no empacotamento da bicamada fosfolipídica causando uma modificação conformacional nos canais de sódio, o que leva à inativação temporária do mesmo. Também é interessante notar que essa teoria prevê a ligação inespecífica de grande quantidade de AL na fase lipídica, para atingir a alteração da fluidez (Skidmore *et al.*, 1996). É a lipofilicidade dos AL que permite a concentração de grandes quantidades do composto nas membranas, o que facilitaria seu acesso aos sítios de ação na proteína-canal (de Paula & Schreier, 1996).

Já em relação à interação específica dos AL com os canais de sódio, sabe-se que a ligação desses fármacos depende da conformação dos canais e que isso ocorre, preferencialmente, no estado inativado do canal estabilizando-o na forma não condutora de íons à membrana. Quanto maior o número de canais na forma inativada, mais fácil é a instalação do bloqueio, tal que o aumento na frequência de estimulação de uma fibra possibilita que mais canais se abram, se fechem e se inativem aumentando a afinidade pelos AL. Este fenômeno é denominado bloqueio dependente de frequência, bloqueio uso-dependente ou inibição fásica (Butterworth & Strichartz, 1990).

Na década de 70 experimentos feitos com análogos quaternários (sempre protonados) de AL detectaram bloqueio da propagação do impulso nervoso somente quando o anestésico era aplicado internamente (na face citossólica) de axônios gigantes de lula. Esses resultados foram interpretados como a demonstração clara da existência de sítios de ação para a forma protonada dos AL na face citossólica do canal. Dessa forma, acreditou-se por muitos anos que a molécula anestésica deveria atravessar a membrana e dissociar-se no interior celular onde, sob a forma ionizada, impediria a entrada de íons sódio após ocupação de sítios específicos no interior do canal de sódio (Frazier *et al.*, 1970; Narahashi *et al.*, 1970). Somente na metade da década de 90, foi demonstrada a

existência de um sítio hidrofóbico (localizado na hélice transmembranar S6 do domínio IV, Figura 5, da subunidade α dos canais de sódio) para a forma neutra dos AL. Isso foi evidenciado através de substituições de aminoácidos da proteína-canal mostrando que essas mutações - como a troca da fenilalanina 1710 por alanina - reduzem a afinidade dos AL pelos canais de sódio em até cem vezes (Ragsdale *et al.*, 1994; 1996).

Dessa forma, propõe-se atualmente que os AL atuam como reguladores alostéricos da proteína-canal de sódio, podendo ligar-se a uma ou mais regiões diferentes do mesmo e bloquear o transporte de sódio (Ragsdale *et al.*, 1994, 1996; Ragsdale & Avoli, 1998; Li *et al.*, 1999). Por outro lado, a correlação direta entre hidrofobicidade e potência anestésica revela que a partição inespecífica de grande quantidade do AL na bicamada lipídica é importante para facilitar o acesso da molécula ao(s) sítio(s) de ligação no canal de sódio voltagem-dependente (de Paula & Schreier, 1996).

3.3. BUPIVACAÍNA E MEPIVACAÍNA

A bupivacaína (BVC) é um AL pertencente à classe das amino-amidas cíclicas que possui um substituinte butila no anel piperidínico (Figura 2). É bastante utilizada em procedimentos cirúrgicos, principalmente para bloqueios regionais prolongados e foi o primeiro AL que combinou propriedades como início de ação moderada, longa duração e separação significativa entre bloqueio sensorial e motor. Já a mepivacaína (MVC), um análogo da BVC com substituinte metila (Figura 2), produz anestesia de início relativamente rápido mas, com moderada duração. É um fármaco utilizado para infiltrações, bloqueios de nervos periféricos e anestesia extradural, sendo cerca de duas vezes mais potente que a procaína, um AL pertencente à classe dos ésteres. A BVC é aproximadamente três a quatro vezes mais potente que a MVC, sendo a duração de ação pelo

menos duas ou até três vezes maior, como mostrado na Tabela 1 (Covino, 1986; Collins, 1993; Malamed, 2001).

Como observado na Tabela 1, as propriedades físico-químicas desses dois análogos também são relativamente diferentes. A presença do radical butil na estrutura química da BVC, confere-lhe um alto coeficiente de partição em lipídios e maior capacidade de ligação às proteínas plasmáticas quando comparada à MVC (de Jong, 1994).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e farmacológicas da BVC e MVC

ANESTÉSICO LOCAL	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS							PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS		
	MM	pKa (25°C)	Coeficiente de Partição*				PP (%)	Potência (em relação à procaína = 1)	Início de ação	Duração da anestesia (min)
			λ_a	λ_b	λ_c	λ_d				
BVC	324	8,16	130	314	1,30	798	96	8	Moderado	300
MVC	282	7,8	12	17	0,55	98	78	2	Rápido	180

(Onde, MM = massa molecular; *determinado entre as fases: λ_a = óleo/H₂O; λ_b = álcool oleico/H₂O; λ_c = octanol/H₂O; λ_d = fosfatidilcolina de ovo/H₂O; PP (%) = percentagem de ligação às proteínas plasmáticas. Adaptado de Covino, 1986 e de Jong, 1994). Os valores de λ_c foram determinados em pH 7,4 e os de λ_d foram obtidos em pH 10,5 (de Paula & Schreier, 1995).

Com relação à farmacocinética, tanto a BVC quanto a MVC distribuem-se da corrente sangüínea para os órgãos mais perfundidos como cérebro, coração, rins e fígado, neste último, sofrem ação da enzimas microsossomais do sistema P450 sendo o 2-6-pipecolilxilidida (PPX), o principal produto de biotransformação. A MVC sofre uma hidroxilação nas posições meta e para do anel aromático. O núcleo piperidina dos dois anestésicos sofre n-desalquilação transformando-se em PPX (Figura 6), sendo esse um processo de detoxificação já que o PPX é menos

tóxico que os AL em questão (Boyas, 1975; de Jong, 1994). Os rins constituem a principal via de eliminação e somente cerca de 1 a 2% dessas drogas são excretadas na forma inalterada (Strichartz, 1987).

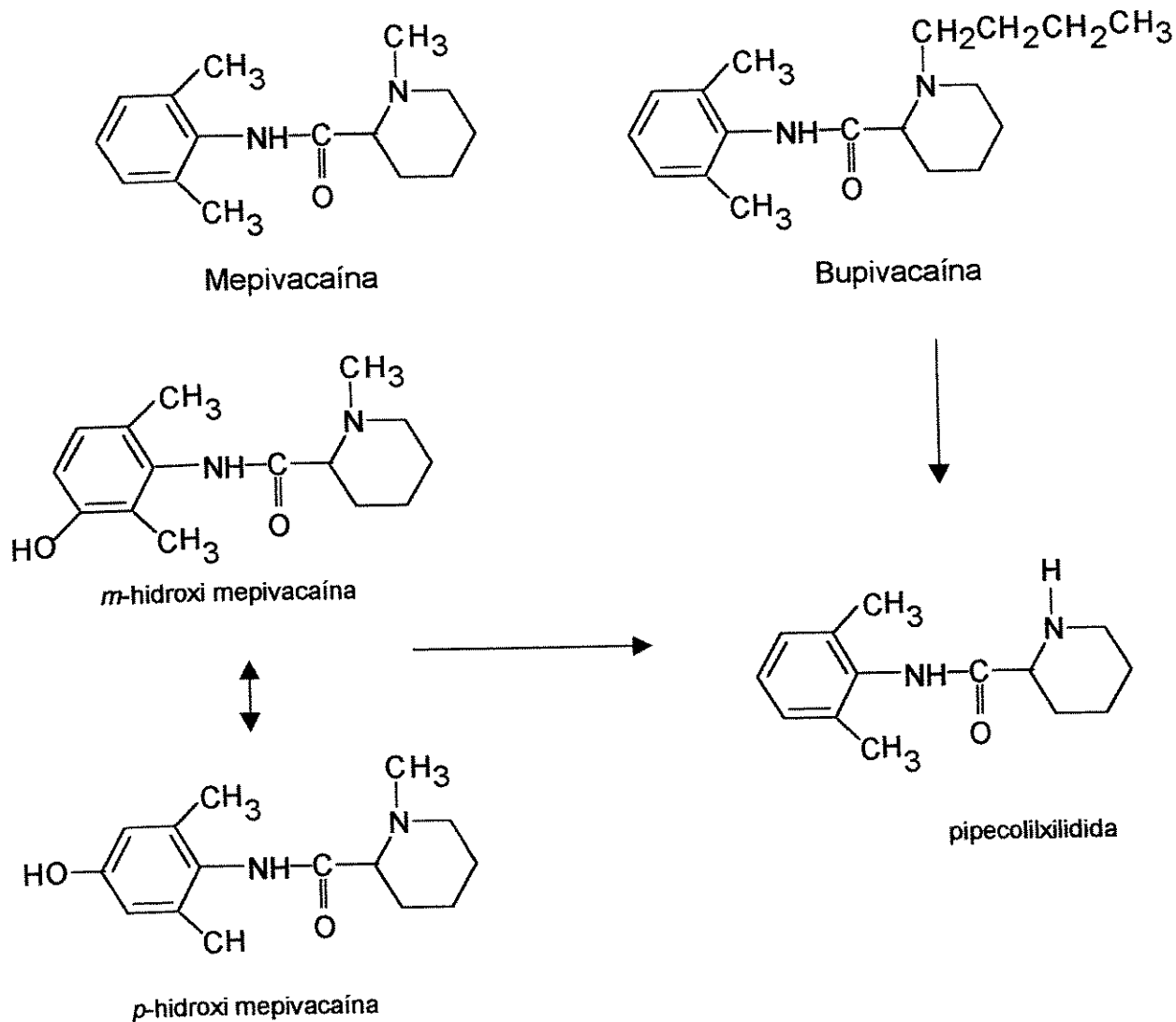


Figura 6. Biotransformação da BVC e MVC a pipecolixilidida (adaptado de: de Jong, 1994).

3.4. ANESTÉSICOS LOCAIS NA TERAPIA DA DOR

Os avanços nas pesquisas básica e clínica têm expandido as opções na farmacoterapia da dor.

Para pacientes com câncer ou dor neuropática por exemplo, a farmacoterapia é a principal ou senão a única saída para mantê-la sob controle. Hoje, muitos fármacos têm sido utilizados como: anticonvulsivantes, agonistas GABAérgicos, neurolépticos, e AL (Bennett *et al.*, 2000a).

A combinação de AL e analgésicos opióides (BVC-morfina) tem sido sugerida tanto para o tratamento da dor pós operatória quanto para a dor neuropática em pacientes que não respondem ao tratamento somente com opióides, pois a liberação intratecal da combinação (AL/opióide) resulta em um ritmo mais lento no aparecimento da tolerância aos opióides. Mas, pesquisas ainda são necessárias para a determinação dos limites de toxicidade dessa associação (Åkerman *et al.*, 1988; Ossipov *et al.*, 1988; Bennett *et al.*, 2000a,b).

A dor também pode ser controlada pelo uso de AL para o bloqueio de nervos periféricos específicos embora, esses fármacos apresentem limitações devido a sua duração de ação relativamente curta (2 a 4 horas). Nas últimas décadas, alguns AL (como a lidocaína, bupivacaína e, mais recentemente, a ropivacaína) têm sido introduzidos na terapia da dor aguda e crônica na tentativa de melhorar a ação daqueles já utilizados. As características desejáveis para uma molécula anestésica são: a longa duração de ação, diminuição da toxicidade local e/ou sistêmica e aumento da seletividade para o bloqueio sensorial, em relação ao bloqueio motor (de Jong, 1994).

Com a alteração de propriedades físicas e químicas na molécula dos AL (síntese direcionada por estudos de correlação estrutura-função, QSAR), alguns

desses objetivos têm sido atingidos. Mas uma outra alternativa, que atualmente vem promovendo os efeitos desejáveis, é a liberação controlada desses fármacos através da encapsulação em lipossomas e/ou outros veículos. Pacientes submetidos à cirurgias (no alívio da dor pós-operatória) ou com dor crônica (que freqüentemente necessitam de administrações repetidas de AL, seja para bloqueio de nervos periféricos, centrais ou autonômicos) seriam os principais beneficiados pelo desenvolvimento dessas formulações, denominadas de longa duração ou de liberação controlada, possibilitando um aumento na duração da anestesia, diminuindo a freqüência de administrações diárias e reduzindo a toxicidade (Kuzma *et al.*, 1997).

4. FORMULAÇÕES ANESTÉSICAS LOCAIS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

4.1. LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram descobertos por Bangham, em 1963, ao demonstrar que fosfolipídios sob agitação em meio aquoso, formariam vesículas. Lipossomas consistem de esferas microscópicas com uma ou mais bicamadas lipídicas onde as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior e as cabeças polares para o exterior da bicamada, em contato com a fase aquosa (Ranade, 1989).

A natureza da interação entre os lipídios, a composição dos mesmos e o método de preparação determinam o padrão, tamanho e o número de bicamadas formadas, sendo os lipossomas (quanto ao número de bicamadas) classificados em vesículas multi (MLV) ou unilamelares (LUV) (Figura 7A) e também afetam diretamente a absorção das drogas, distribuição, metabolismo, eliminação e perfil de toxicidade. O tamanho do lipossoma afeta a sua biodistribuição, pois após administração subcutânea, lipossomas menores que 120nm atravessam

rapidamente os capilares enquanto que lipossomas maiores (como as LUV) tendem a permanecer no sítio de injeção (Grant & Bansinath, 2001). Além disso, a encapsulação de drogas é orientada pela hidro ou lipofilicidade das mesmas; já que drogas hidrofílicas têm tendência a permanecer no compartimento central aquoso e drogas hidrofóbicas na bicamada lipídica (Figura 7B) (Sharata & Katz, 1996).

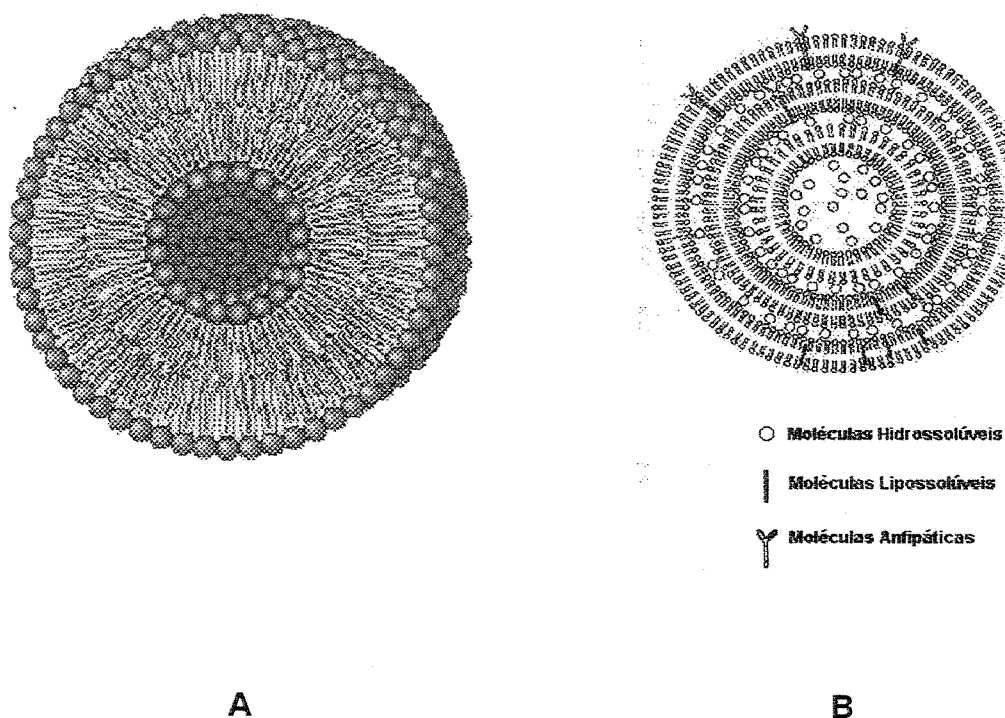


Figura 7. Representação esquemática dos lipossomas: unilamelar (A) e multilamelar (B) (adaptado de Nelson & Cox, 2000, B).

A similaridade dos monômeros constituintes dos lipossomas (fosfatidilcolina e colesterol, em geral) com o das membranas biológicas elimina o risco de antigenicidade ou lesões histológicas (Malinovsky *et al.*, 1997b) após a administração desses veículos.

A função dos lipossomas como veículos é liberar determinadas concentrações de drogas em alvos específicos evitando a toxicidade sistêmica, já que somente uma fração da droga está disponível para o local de ação (Grant & Banssinath, 2001).

Lipossomas têm sido extensivamente utilizados em imunoensaios (Rongen *et al.*, 1997; Zanin, 2001) e como sistemas de liberação controlada para várias drogas incluindo antineoplásicos, antibióticos, antifúngicos e também para melhorar as propriedades terapêuticas de AL. O uso de AL encapsulados em lipossomas tem como vantagens a liberação lenta da droga prolongando a duração da anestesia e a redução da toxicidade para os sistema cardiovascular e sistema nervoso central (Gesztos & Mezei, 1988; Langerman *et al.*, 1992a,b; Boogaerts *et al.*, 1993a,b; Mowat *et al.*, 1996; Bucalo *et al.*, 1998).

Trabalhos realizados com animais de laboratório (Boogaerts *et al.*, 1993a,b; Yu & Hou, 1998; Malinovsky *et al.*, 1997a,b; 1999) e em humanos (Boogaerts *et al.*, 1994) vêm utilizando BVC em MLV obtendo resultados satisfatórios com relação ao aumento na duração da anestesia, potencialização do bloqueio nervoso além de permitir o controle dos níveis sistêmicos da droga.

4.2. CICLODEXTRINAS

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

As três CD naturais são a alfa (α -CD), beta (β -CD) e gama (γ -CD) compostas de seis, sete ou oito unidades de D-(+)-glicopirranose, respectivamente.

Esses agentes têm em sua estrutura grupos hidroxil primários e secundários orientados para o exterior. Portanto, possuem um exterior hidrofílico e uma cavidade interna relativamente hidrofóbica que, por sua vez, permite às CD complexarem-se com moléculas que apresentam dimensões compatíveis com a cavidade. A complexação altera as propriedades físico-químicas como a solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade de drogas complexadas (McCormack & Gregoriadis, 1998).

A habilidade das CD de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e da polaridade existentes com a droga. Além disso, as forças que dirigem a complexação têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água na cavidade das CD, às interações de van der Waals, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Bibby *et al.*, 2000). As moléculas complexadas permanecem normalmente orientadas em uma posição onde há máximo contato entre sua porção hidrofóbica e a cavidade apolar, estando sua porção hidrofílica em contato com os grupos hidroxil da ciclodextrina (Frömming & Szejtli, 1994).

As β -CD (Figura 8) são as CD mais largamente utilizadas para a complexação de várias classes de drogas como agentes antitumorais (doxorubicina), antidiabéticos (tolbutamida), corticosteróides (dexametasona, prednisolona) e vitaminas A e D₃, que são administrados por diversas vias como intratecal, intravenosa, intramuscular, epidural, oral, nasal e dérmica (Irie & Uekama, 1997; Loftsson & Masson, 2001). Sua cavidade tem um diâmetro de cerca de 7Å, sendo grande o bastante para acomodar um hexanel aromático (Kalinkova, 1999).

As CD naturais, em particular as β -CD, têm solubilidade aquosa limitada (16,4 mM ou 18,6 mg/mL) e a formação de complexos com compostos lipofílicos geralmente resulta em precipitação dos complexos sólidos se o limite de

solubilidade for atingido. Assim, numerosas modificações na estrutura química das β -CDs tem sido feitas originando derivados mais solúveis como 2,6-dimetil- β -ciclodextrina (DM- β -CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e CD sulfatadas como sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD) (Rajewski & Stella, 1996).

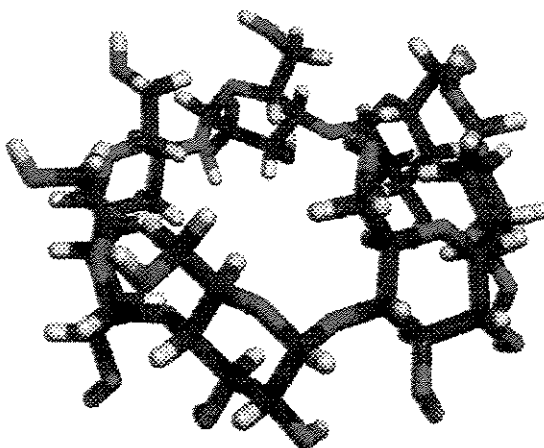


Figura 8. Estrutura da β -CD apresentando sete monômeros de glicose.

Além da estabilização, a modificação da farmacocinética e das propriedades biofarmacêuticas das drogas são os efeitos mais significantes da complexação com CD. Esses efeitos são observados especialmente na solubilidade e na liberação da droga complexada. Como consequência disso, a administração de fármacos complexados com β -CD altera a intensidade e a duração de seus efeitos através do aumento dos níveis plasmáticos da droga (Frömming & Szejtli, 1994).

Essa propriedade das CD torna bastante promissor seu uso para a complexação com AL. Além disso, estudos em animais de laboratório indicam que a utilização de β -CD e alguns derivados (dimetil β -CD e hidroxipropil β -CD) aumentam a solubilidade de AL como etidocaína, lidocaína, prilocaína,

mepivacaína e, especialmente, bupivacaína (Dollo *et al.*, 1996a,b); bem como melhoram os índices terapêuticos da droga (Dollo *et al.*, 1998).

5. MODELOS ANIMAIS EM ANESTESIA E ANALGESIA

Os efeitos farmacológicos produzidos por AL dependem do modelo animal utilizado, do método empregado no teste e da técnica de aplicação da droga. Muitos métodos foram descritos para avaliar a atividade anestésica local como, por exemplo a inibição do reflexo corneal por aplicação tópica daquelas drogas e inibição de respostas a estímulos como pinçamentos em cobaias. No entanto, esses métodos encontravam como principais dificuldades a análise do ponto final e a determinação da expressão quantitativa da anestesia (Leszczynska & Kau, 1992).

Assim começou-se a desenvolver técnicas através do bloqueio da condução do nervo ciático em ratos (Thalhammer *et al.*, 1995) e camundongos (Leszczynska & Kau, 1992), permitindo avaliar a atividade de AL e bloqueadores neuromusculares.

Com relação à pesquisa em analgesia, esta é uma área que conduz a um grande número de avanços no tratamento da dor aguda e crônica na clínica médica, pois possibilita o estudo da fisiologia da transmissão da dor e da farmacologia de drogas analgésicas empregando uma variabilidade de modelos *in vitro* e *in vivo* (Stevens, 1992).

Por ser uma experiência perceptiva, a dor pode ser medida, indiretamente, através de testes em animais. Pode-se detectar alterações comportamentais, tipo, intensidade e duração dos estímulos dolorosos (Chapman *et al.*, 1985; Tjølsen *et al.*, 1994).

A necessidade da pesquisa em modelos animais está fundamentada em fatores como manipulação de variáveis experimentais que podem levar ao entendimento dos mecanismos da dor e terapia analgésica nos níveis celular e sub-celular; além disso, animais podem ser utilizados para simular certas condições patológicas humanas proporcionando precisão na manipulação de variáveis fisio e farmacológicas que não têm possibilidade ou uso eticamente justificável em seres humanos. A adaptação de técnicas modificadas para a avaliação de um estímulo nocivo em modelos animais, tem fornecido bases para o entendimento dos mecanismos da dor e para a seleção de drogas e outros métodos para o alívio da mesma (Short, 1998).

Apesar de não serem capazes de se comunicar verbalmente, os animais exibem respostas motoras aos estímulos nocivos que são similares àquelas observadas em humanos (Sawyer, 1998).

A maioria dos estudos em animais freqüentemente emprega medidas comportamentais para avaliar suas interferências sobre a dor. Entre essas encontram-se: os comportamentos reflexivos que têm funções de proteção podendo ser utilizados para a obtenção de informações sobre os mecanismos nociceptivos e as reações voluntárias que são mais complexas e merecem a utilização de animais previamente treinados para realizar as tarefas comportamentais (Chapman *et al.*, 1985; Besson & Chaouch, 1987).

Entre as reações voluntárias encontram-se a *vocalização* (emissão de ruídos representativos do comportamento afetivo da experiência da dor podendo sua interferência no teste ser minimizada através da utilização de procedimentos e grupos controle), o *comportamento de fuga* (ação aprendida pelo animal com o objetivo de evitar o estímulo doloroso), as *escolhas* (onde o animal aprende a realizar uma tarefa recebendo determinado estímulo doloroso em troca de uma recompensa positiva), a *discriminação* (o animal não recebe reforço positivo por

aceitar uma quantidade controlada de estímulo, mas por acionamento de um painel que encerra o estímulo doloroso) e as *mudanças de comportamentos organizados* (a utilização de um estímulo que cause dor persistente promove mudanças em funções fisiológicas normais como atos de beber e comer, comportamentos sexuais...) (Chapman *et al.*, 1985).

Na pesquisa da atividade analgésica estão envolvidos alguns tipos de modelos experimentais: a dor induzida por estímulos químicos (contorções abdominais, por exemplo), físicos (testes do *hot plate* e *tail flick*) e mecânicos (pressão na pata), que ativam as fibras aferentes da dor (A δ e C), embora a resposta comportamental mais comumente avaliada seja a resposta motora (proveniente das fibras eferentes) que ocorre logo após a estimulação nociva (D'Amour & Smith, 1941; Randall & Selitto, 1957; Stevens, 1992).

Nos ensaios de nocicepção química, como o teste das contorções abdominais, uma substância nociva é injetada no interior da cavidade peritoneal dos animais ativando diretamente os nociceptores (localizados nas vísceras) ou produzindo inflamação visceral (órgãos subdiafragmáticos) e subcutânea (músculos da parede abdominal). Muitas substâncias podem ser utilizadas com o objetivo de produzir dor; como bradicinina, salina hipertônica, acetilcolina e ácido acético; sendo este último o composto mais empregado para a realização do teste (Mogil *et al.*, 1999a,b). Rigon & Takahashi (1996) utilizando os AL (lidocaína, prilocaína e dimetocaína), observaram um efeito dose-dependente de redução do número de contorções abdominais em camundongos; demonstrando a utilização desse teste para avaliação das propriedades antinociceptivas daquelas drogas.

Já os testes de nocicepção física são caracterizados pela reação dos animais ao calor aplicado nas patas ou na cauda (testes do *hot plate* e *tail flick*, respectivamente) correlacionando-se a capacidade do calor de lesar os tecidos com a avaliação da nocicepção e analgesia (Ankier, 1974; Tjølsen *et al.*, 1991;

Grant *et al.*, 1993). Utilizando AL, alguns autores (Moore & Burney, 1979; Rigon & Takahashi, 1996) observaram um aumento dose-dependente no tempo de latência da remoção das patas posteriores de camundongos após administração sistêmica (vias subcutânea e intraperitoneal) de lidocaína e dimetocaína.

Há também os métodos que envolvem estímulos mecânicos como a pressão na pata, padronizado em ratos (Randall & Selitto, 1957), que utiliza a vocalização ou o reflexo de retirada da pata do animal como sinal para que cesse o estímulo nocivo. Esse teste tem sido utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva de formulações AL, encapsuladas em microesferas, por infiltração subcutânea na pata (Buritova *et al.*, 1996; Fletcher *et al.*, 1997) e de AL com isômeros separados por infiltração intramuscular na região do nervo ciático de ratos (Simonetti *et al.*, 1997).

Assim, pode-se verificar a aplicação e a atividade de AL em vários modelos experimentais de nocicepção e analgesia; o que possibilita a utilização de algumas dessas técnicas para avaliar a atividade de novas drogas com efeitos semelhantes aos mesmos ou de sistemas de liberação controlada, como é o caso deste trabalho.

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve por finalidade preparar, caracterizar e avaliar a eficácia de anestésicas locais encapsuladas em lipossomas e complexadas com ciclodextrinas para, posteriormente, compará-las com as formulações disponíveis no mercado e atualmente utilizadas na clínica.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Preparar formulações encapsuladas em lipossomas e/ou complexadas em ciclodextrinas utilizando os anestésicos locais BVC e MVC.
- * Caracterizar, através do uso de técnicas físico-químicas, as preparações com veículos modificados quanto à eficiência da encapsulação ou da complexação.
- * Realizar testes biológicos que simulem estados de dor aguda
- * Comparar os bloqueios motor e sensorial induzidos pelas formulações lipossomais, complexadas com ciclodextrinas e aquelas atualmente utilizadas na clínica, levando em consideração fatores como potência, duração do efeito dos AL e concentrações utilizadas.
- * Avaliar a atividade das formulações de liberação controlada, quando administradas por via sistêmica em um modelo de dor visceral.

III. MATERIAIS & MÉTODOS

1. ANIMAIS

Durante a realização deste trabalho foram utilizados camundongos albinos *Mus musculus*, adultos, machos e com peso variando entre 30 e 35 gramas. Os animais, provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da Unicamp), foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada a $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, alojados coletivamente (10 animais por gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos 7 dias.

Todos os experimentos realizados encontravam-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEa)-IB-Unicamp (protocolos nº 288 -1 e 289 -1).

2. DROGAS, SAIS E SOLVENTES

- *AL*: cloridrato de BVC (Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda) e cloridrato de MVC (Sterling Drug Inc.).
- *Lipídios*: fosfatidilcolina de ovo e colesterol (Sigma Chem. Co.).
- *Ciclodextrinas*: β -CD (Sigma Chem. Co.).
- *Soluções*: ácido acético 0,6%, tampão HEPES 20mM, solução de NaCl 0,9%.
Outros: acetato de α -tocoferol (Sigma Chem. Co.), clorofórmio (Labsynth Ltda.).

3. EQUIPAMENTOS

- Analgesímetro (Ugo Basile-Itália).
- Ultracentrífuga (Beckman®)
- Extrusor (Lipex Biomembranes Inc.)
- Liofilizador (Labconco-freeze dry system/Freezone®)
- "Light Scattering" (Malvern Instruments)
- Espectrofotômetro (Beckman DU-70)
- Calorímetro Universal (V2.3D TA Instruments)
- Microscópio Eletrônico de Varredura (JSM 5800LV, JEOL)

4. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

4.1. LIPOSSOMAS

MLV foram preparadas pelo método de hidratação de filme seco retirando-se alíquotas de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol (na proporção molar de 4: 3: 0,07) de solução estoque em clorofórmio e evaporando-se sob fluxo de N₂ seguido por vácuo (2 h), à temperatura ambiente (Boogaerts *et al.*, 1993a,b; 1994).

Após secagem, o tampão adequado (HEPES 20mM pH 7,4 com NaCl 150mM) foi adicionado e agitou-se em vórtex por 5 min. A dispersão assim preparada apresentou MLV concêntricas, separadas por cavidades aquosas, que foram utilizadas para o preparo de LUV de 0,4 μ m.

As LUV foram obtidas por extrusão das MLV, sob pressão de N₂. A extrusão foi realizada à temperatura ambiente (acima da temperatura de transição de fases dos lipídios usados), passando-se a amostra de MLV por um disco de drenagem e duas membranas de polycarbonato (Poretics) com poros de tamanho controlado

(neste caso, 0,4 μm). Foram realizadas 15 passagens da amostra para que o tamanho das vesículas obtidas fosse homogêneo. Os lipossomas obtidos eram deixados em repouso por pelo menos 2 h para o intumescimento (*swelling*) das vesículas. A concentração de LUV estabelecida para todas as formulações foi de 5mM.

A incorporação do AL nas vesículas de lipossomas foi realizada após a preparação das vesículas e sem posterior separação, tal que a concentração total dos AL fosse a mesma encontrada nas preparações comerciais:

- 3,85 mM (0,125%), 7,7 mM (0,25%) e 15,4 mM (0,5%) de BVC
- 17,6 mM (0,5%), 35,2 mM (1%) e 70,4 mM (2%) de MVC.

4.2. CICLODEXTRINAS

Os complexos sólidos foram obtidos misturando-se quantidades apropriadas de β -CD e AL em água tal que a razão molar fosse 1:1. As amostras foram deixadas sob agitação até equilíbrio à temperatura ambiente. Após isso, a solução foi liofilizada e guardada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior uso (Dollo *et al.*, 1998; Loftsson e Masson, 2001).

Os complexos sólidos foram pesados em quantidades suficientes para obter BVC à 3,85 mM (0,125%), 7,7 mM (0,25%), 15,4 mM (0,5%) e MVC à 17,6 mM (0,5%), 35,2 mM (1%), 70,4 mM (2%) que, posteriormente, foram dissolvidos em tampão adequado (HEPES 20mM pH 7,4 com NaCl 150mM).

5. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

5.1. LIPOSSOMAS

5.1.1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO: ESPALHAMENTO QUASI-ELÁSTICO DE LUZ (*LIGHT SCATTERING*)

As medidas de espalhamento de luz (*light scattering*) são de grande valor na estimativa do tamanho, forma e interação de partículas lipossomais e, além disso, a técnica oferece vantagens como rapidez das medidas, não interferência no sistema e uma análise representativa das amostras, já que o número de partículas é relativamente grande. O princípio da técnica é que quando um raio de luz é direcionado a uma suspensão coloidal ou dispersão, parte dessa luz pode ser absorvida, parte é dispersada e a restante é transmitida através da amostra. A luz dispersa ou “espalhada” (*scattered*) resulta de um campo elétrico associado à luz incidente, induzindo oscilações periódicas das nuvens eletrônicas dos átomos do material analisado, que são detectadas pelo aparelho ao longo de um intervalo de tempo; a dinâmica das oscilações permite calcular o raio hidrodinâmico e a distribuição das partículas (Shaw, 1991).

Foram realizadas medidas contínuas do raio hidrodinâmico das vesículas na presença e ausência de AL com o objetivo de verificar o tamanho médio e a homogeneidade das suspensões antes e após a encapsulação.

As medidas foram realizadas à 25°C com um ângulo de detecção de 90° e a concentração das preparações utilizadas foi de 1mM.

Além disso, alíquotas foram estocadas durante duas semanas em três temperaturas (4°, 25° e 37°C) para verificação da estabilidade em condições de armazenamento diferentes.

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química – Unicamp.

5.1.2. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO: ESPECTROSCOPIA UV

A percentagem de AL encapsulado foi determinada em suspensões lipossomais (MLV), na concentração de 4 mM onde foram adicionadas soluções de AL para que fosse obtida uma concentração final de 2 mM de anestésico. Todas as amostras foram preparadas em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 150 mM e deixadas em repouso por pelo menos duas horas, para que houvesse a restauração do equilíbrio.

Posteriormente, as suspensões foram submetidas à ultracentrifugação (120.000 x g) por duas horas à temperatura de 10 °C, obtendo-se o *pellet* lipossomal e o sobrenadante.

Após separação, alíquotas do sobrenadante foram analisadas por espectrofotometria UV em 260 nm, onde o coeficiente de extinção molar da BVC e da MVC é de cerca de 500 (de Paula & Schreier, 1995).

A percentagem de AL encapsulado em MLV foi determinada através da medida da % do AL não encapsulado. A absorbância do sobrenadante – teste (MLV:AL), subtraída daquela do sobrenadante de uma amostra – controle contendo somente lipossomas (MLV) foi dividida pela absorbância da solução inicial do AL (AI) (2 mM), como mostrado no esquema:

$$\% \text{ Não Encapsulada} = \frac{\text{Absorbância (MLV:AL)} - \text{Absorbância (MLV)}}{\text{Absorbância (AI)}} \quad (1)$$

5.2. CICLODEXTRINAS

5.2.1. EFICIÊNCIA DA COMPLEXAÇÃO: CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

As medidas calorimétricas são bastante utilizadas na indústria com a finalidade de caracterizar princípios ativos e excipientes de formulações farmacêuticas, moléculas orgânicas, inorgânicas, monômeros, polímeros, proteínas e alimentos (Thompson, 2000).

Entre as muitas técnicas calorimétricas, a DSC é bastante aplicável ao estudo de sistemas de liberação controlada como complexos droga/CD (Dollo *et al.*, 1996a, 1996b; Loftsson, 2001), possibilitando uma análise qualitativa da temperatura relacionada à transição dos materiais, que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos. Algumas das vantagens desse método são a simples preparação da amostra, rápida análise e grande aplicabilidade (Verdonck *et al.*, 1999).

Os resultados de DSC são apresentados como termogramas que indicam a temperatura de fusão de um material de referência comparando-se com a da amostra em questão. As amostras foram analisadas da seguinte forma:

- AL: BVC ou MVC
- misturas físicas: BVC ou MVC e β -CD
- complexos (1:1): BVC ou MVC em β -CD

Aproximadamente 10 mg de cada amostra foi enviada à Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp onde foram realizadas as medidas de DSC. A velocidade de aquecimento das amostras foi de 10 °C / min. em uma faixa de 30 a 300 °C.

5.2.2. MORFOLOGIA DA COMPLEXAÇÃO: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM).

A técnica de microscopia eletrônica foi utilizada para analisar diretamente a estrutura e a distribuição dos cristais formados pelas amostras de :

- AL: BVC ou MVC
- misturas físicas: BVC ou MVC e β -CD
- complexos (1:1): BVC ou MVC em β -CD

Esta técnica nos permitiu a avaliação de variações estruturais nos cristais das moléculas de anestésicos e β -CD (*guest* e *host*) que acompanham a formação do complexo. O processo de preparação das amostras consistiu da metalização com ouro das mesmas, sob vácuo, durante 180 seg. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia – Unicamp.

6. TESTES FARMACOLÓGICOS

Para a realização dos testes farmacológicos foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

*** Grupos controle**

- os dois veículos: LUV na concentração de 5mM ou β -CD 1mM

*** Formulações livres**

- AL: BVC ou MVC

*** Formulações de liberação controlada:**

- lipossomais: BVC lipossomal (BVC_{LUV}) e MVC lipossomal (MVC_{LUV});

- complexadas com β -CD (1:1): BVC complexada ($BVC_{\beta\text{-CD}}$) e MVC complexada ($MVC_{\beta\text{-CD}}$).

As concentrações e doses das formulações livres, lipossomais e complexadas foram:

- 0,125 , 0,25 e 0,5% para BVC e 0,5 , 1 e 2% para MVC durante a avaliação dos bloqueios motor e sensorial,
- 5, 10 e 20 mg/kg para BVC e 10, 20 e 30 mg/kg para MVC durante a avaliação da atividade antinociceptiva sistêmica.

A avaliação dos bloqueios motor e sensorial (teste PWTP) foram realizadas simultaneamente e todas as medidas foram executadas pelo mesmo investigador.

6.1. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO MOTOR

A avaliação do bloqueio motor foi realizada de acordo com o método descrito por Leszczynska & Kau (1992) usando a técnica do bloqueio do nervo ciático induzido por AL.

Inicialmente, foi medida a habilidade de cada animal em caminhar normalmente, com os quatro membros, por uma tela metálica de 5 mm de diâmetro. Somente os animais que preencheram tal requisito, foram submetidos à experimentação.

As formulações, inclusive os veículos, foram administrados por infiltração intramuscular (0,1mL) na pata posterior direita, na região próxima ao nervo ciático.

A presença de bloqueio motor foi definida como a perda do controle motor da pata injetada sendo evidenciada pelo “arrastamento” do membro posterior e/ou

fechamento dos dedos (Feldman & Covino, 1988). Além disso, observou-se também a capacidade do animal em caminhar sobre uma tela metálica na posição normal e invertida, como mostrado na Figura 9.

A intensidade do bloqueio motor foi avaliada de acordo com valores de score: 0 (uso normal da pata injetada) até 2 (impossibilidade do uso da pata injetada); (Gantenbein *et al.*, 1996, 1997).

A avaliação foi feita a cada minuto durante os 5 primeiros min. após a administração e, posteriormente, em intervalos de 5 min. até que fosse verificada a total recuperação dos movimentos do animal (pelo menos 1 h de observação).

Relacionou-se graficamente a intensidade e a duração da atividade dos AL testados. O efeito total foi estimado para cada animal utilizando-se a área sobre a curva efeito vs. tempo (AUC).

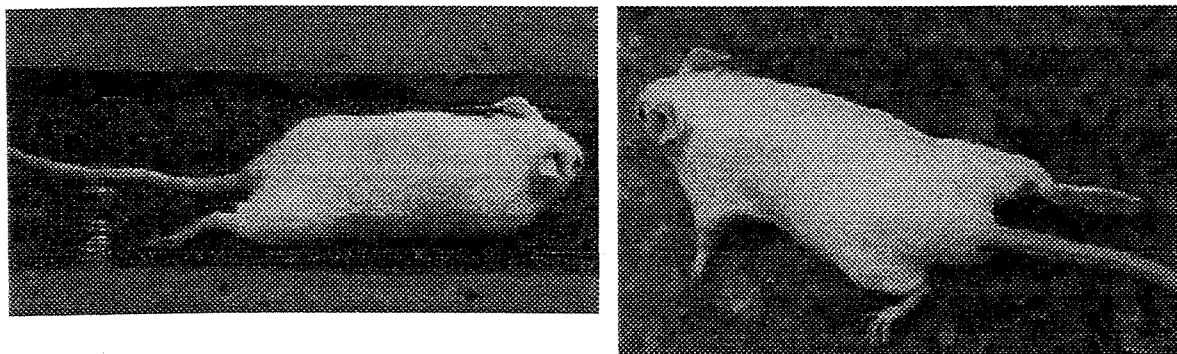


Figura 9. Visualização do bloqueio motor induzido pelos AL.

6.2. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO SENSORIAL

O bloqueio sensorial foi medido pelo limiar de remoção da pata dos animais frente a um estímulo mecânico, como descrito por Randall & Selitto (1957). Para a execução do teste utilizou-se um equipamento apropriado, chamado analgesímetro, que gera um aumento gradual da força (em gramas) exercida por uma extremidade plástica sobre a superfície dorsal da pata do animal (Fletcher *et al.*, 1997), como observado na Figura 10.

Quinze minutos após a injeção das formulações, a pata injetada foi colocada sob a extremidade plástica do aparelho onde a pressão foi sendo aplicada e aumentada a um ritmo constante até que o animal retirasse a pata como sinal indicativo de nocicepção (*Pain Withdrawal Threshold to Pressure – PWTP*).

A analgesia foi definida como um aumento, no limiar de pressão dos animais, pelo menos 50% maior que aqueles observados nos grupos controles. O ponto final da analgesia foi estabelecido quando não houvesse diferença estatística entre os grupos teste e controles.

Estabeleceu-se um valor máximo (*cut-off*) de 150 g para evitar lesões nas patas e estimulação excessiva dos nociceptores. As medidas foram realizadas durante 5 h., com intervalos de 15 min. durante a primeira hora, 30 min. durante a segunda e terceira horas e, finalmente, 60 min. nas últimas duas horas de teste.

Relacionou-se graficamente as medidas de pressão exercida para cada grupo experimental em função tempo.

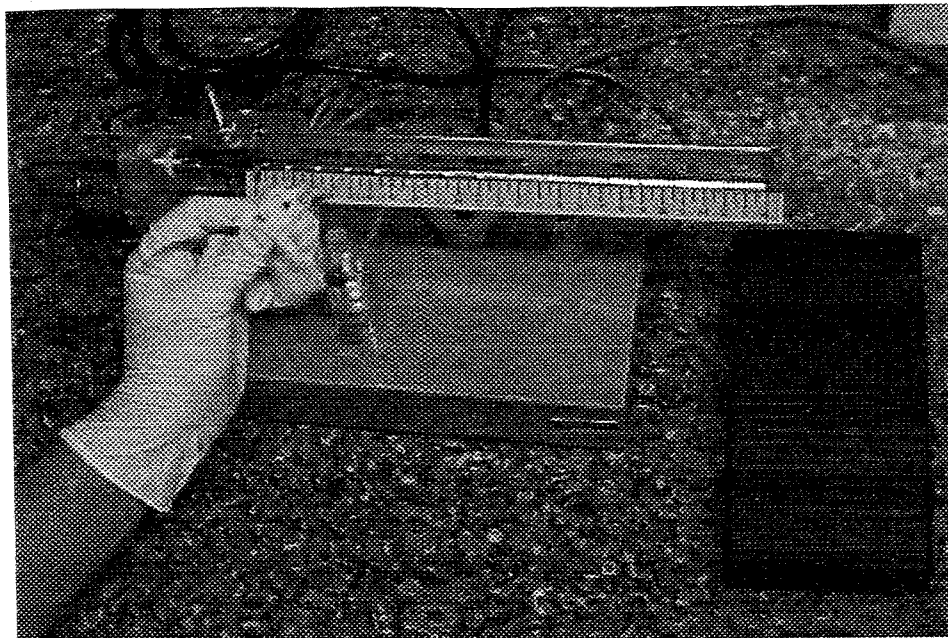


Figura 10. Procedimento realizado durante o teste PWTP.

6.3. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA SISTÊMICA

6.3.1. CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

O modelo das contorções abdominais baseia-se na contagem das contrações da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores (*writhings*, Figura 11), produzidas como respostas reflexas à irritação peritoneal e à peritonite induzida por ácidos fracos (como o ácido acético) (Collier *et al.*, 1968; Mogil *et al.*, 1999a).

Os animais foram tratados, por via subcutânea, com as formulações de anestésicos livres, lipossomais ou complexados com β -CD ou com os veículos (utilizando-se o mesmo volume), 15 min. antes da administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,6% (0,1mL/10g).

Posteriormente, contou-se o número de contorções abdominais durante um período de 20 min. (em intervalos de 5 min.) e relacionou-se graficamente as médias do número de contorções em função das doses utilizadas para cada grupo experimental.

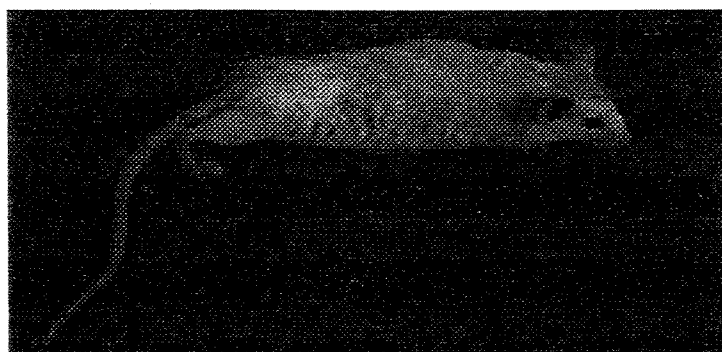


Figura 11. Comportamento observado durante o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O diâmetro médio dos lipossomas foi comparado por análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*). Para avaliação do bloqueio motor, os valores de latência, $T_{\text{máx}}$, tempo de recuperação e AUC foram expressos em mediana (limites mínimo e máximo) e comparados utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. A análise de variância (*ANOVA*) também foi utilizada para comparação dos grupos experimentais no teste PWTP. A análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*) permitiu a comparação entre os grupos em todos os tempos de observação; já *One-way ANOVA* foi utilizada para comparação entre valores de tempos individuais, com teste posterior de Tukey-Kramer.

Os grupos experimentais submetidos ao teste das contorções abdominais foram comparados também por *One-way ANOVA* e, posteriormente, pelo teste de Tukey-Kramer. Foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

Os softwares utilizados foram: Graph Pad InStat e Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., versão 3.0, 1992 – 1998).

IV. RESULTADOS & DISCUSSÃO

1. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

1.1. LIPOSSOMAS

1.1.1. *DIÂMETRO MÉDIO DOS LIPOSSOMAS E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO*

As medidas do raio hidrodinâmico das vesículas por espalhamento de luz mostraram a presença de duas populações distintas: uma maior com cerca de 400 nm e uma fração menor de aproximadamente 150 nm (Tabelas 2 e 3), apresentando dispersão entre 0,14 e 0,20.

Observou-se também que a encapsulação ativa de AL não modificou o diâmetro médio das vesículas, de forma significativa, quando comparadas às vesículas vazias (Tabela 2).

Um outro fato importante é que o armazenamento dos lipossomas em diferentes temperaturas (4°, 25° e 37°C) também não alterou o tamanho dos mesmos sendo que todas as amostras foram analisadas até duas semanas após a preparação, o que permitiu avaliar a estabilidade de estocagem das formulações (Tabela 3).

Alguns dos perfis obtidos durante as medidas de espalhamento de luz estão apresentados no item Anexos.

Tabela 2. Diâmetro médio e proporção das LUV após encapsulação com AL duas semanas após preparação (n = 9 - 10).

LIPOSSOMAS	DIÂMETRO MÉDIO (nm)	PROPORÇÃO (%)
LUV	390 ± 42,5	72,6
	164,8 ± 22	27,4
BVC_{LUV}	413,2 ± 49,2	74,5
	150,3 ± 22	25,5
MVC_{LUV}	357 ± 42	77,1
	150 ± 25	22,9

Tabela 3. Diâmetro médio e proporção das LUV duas semanas após estocagem a diferentes temperaturas (n = 9 - 10).

TEMPERATURA (°C)	DIÂMETRO MÉDIO (nm)	PROPORÇÃO (%)
4	345,2 ± 10.4	72,6
	158 ± 23	27,4
25	385,5 ± 24.5	74,5
	163,4 ± 10.6	25,5
37	341,3 ± 26	77,1
	153 ± 26	22,9

Com relação à eficiência de encapsulação em lipossomas, a análise espectroscópica revelou valores de $24,8 \pm 4,2 \%$ e $18,4 \pm 3,9 \%$ (média $\pm$ erro do processo de encapsulação) para BVC e MVC, respectivamente ($n = 9 - 10$). Esses testes permitiram a avaliação da reprodutibilidade e da eficiência do processo de preparação das formulações lipossomais.

Apesar de pertencerem à classe dos AL amino-amidas cíclicas, a BVC e a MVC apresentam propriedades físico-químicas distintas como coeficiente de partição e solubilidade aquosa (de Paula & Schreier, 1995; 1996), conferidas pelos substituintes do anel piperidínico ver Figura 3). Essas características refletem os diferentes valores obtidos no processo de encapsulação. A alta partição em membranas da BVC (ver item Introdução, Tabela 1) permitiu a encapsulação de maiores concentrações. Já para a MVC, a menor partição em membranas e a boa solubilidade aquosa justificam a percentagem de encapsulação mais baixa. Devido ao seu caráter anfifílico, ambos anestésicos encontram-se distribuídos parte na bicamada lipídica e parte no core aquoso dos lipossomas.

Os resultados podem ser visualizados de uma outra forma considerando-se a equação do coeficiente de partição (P) de um soluto (s) entre duas fases imiscíveis, como a razão das concentrações desse, entre a fase membranar (m) e aquosa (a):

$$P(s) = \frac{n_m(s)/V_m}{n_a(s)/V_a} \quad (2)$$

onde n é o número de moles do soluto e V é o volume da fase; como $n_m + n_a = n_t$ (número de moles total do soluto). Assim, pode-se determinar os valores

de P para a BVC e MVC entre os lipossomas e água em pH 7,4, sendo 136 e 93, respectivamente.

Analisando os dados da Tabela 1 poderia ser esperada uma diferença maior entre os valores de P para esses dois anestésicos, de acordo com suas características químicas citadas anteriormente (ver item 3.1, Introdução). Mas, deve-se considerar que o pH do sistema lipossomal (7,4) encontra-se mais próximo do pKa da MVC (7,8) do que da BVC (8,1) (Covino, 1986) e, portanto, há contribuição de uma fração maior de MVC desprotonada para o coeficiente de partição medido em pH 7,4, do que no caso da BVC. Assim, embora haja maior incorporação de BVC nos lipossomas, a incorporação de MVC foi considerada satisfatória.

Aparentemente esses resultados indicariam que os lipossomas, podendo transportar mais BVC que MVC, deveriam ser bons veículos para aumentar a concentração total (e a potência) de BVC disponível nos sítios de ação dos AL. No caso da BVC, foi demonstrado anteriormente não haver partição ideal com membranas devido à baixa solubilidade aquosa da mesma (de Paula & Schreier, 1995, 1996). Porém, também é necessário ressaltar que muitas variáveis podem interferir na ação desses fármacos, tais como: ligação às proteínas plasmáticas, distribuição e *clearance*, podendo ser diferentemente afetadas pela apresentação do AL encapsulado.

1.2. COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM β -CD

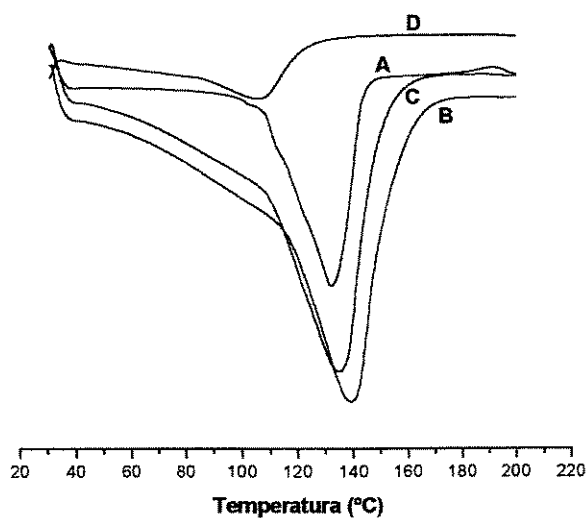
1.2.1. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A análise de DSC mostrou fortes evidências da complexação entre BVC e MVC com β -CD. A Figura 12 apresenta os termogramas da BVC (1A), MVC (1E), β -CD (1B), misturas físicas BVC/ β -CD (1C) e MVC/ β -CD (1F) e complexos sólidos

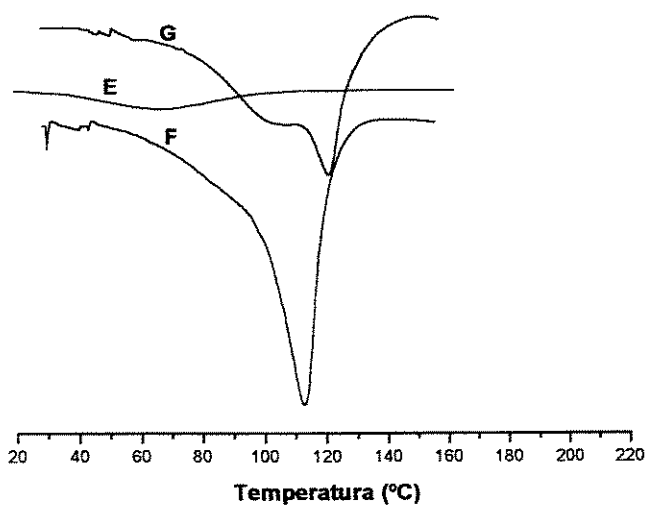
BVC: β -CD (1D) e MVC: β -CD (1G). A Tabela 4 resume os resultados, listando as temperaturas e a variação de entalpia (ΔH) dos picos endotérmicos relativos à transição de fases dos compostos.

A BVC e a β -CD apresentaram picos endotérmicos característicos correspondendo aos seus pontos de fusão (133,5 °C e 139,5 °C, respectivamente). No caso da MVC, foi observado um pico alargado, com temperatura de transição em torno de 74,7 °C. Já as misturas físicas, BVC/ β -CD e MVC/ β -CD, mostraram picos endotérmicos a 135,7 °C e 111,3 °C, respectivamente; essas temperaturas de transição são intermediárias, em relação às observadas para os AL e β -CD isoladamente.

Já os termogramas dos complexos sólidos de BVC: β -CD e MVC: β -CD (na razão molar 1:1, AL: β -CD), mostraram pontos de fusão a 107,2 °C e 121,05 °C, respectivamente. Essas transições de menor entalpia, com picos alargados e “ombros” (mais evidente para MVC: β -CD) são bastante diferentes daquelas observadas para os AL e β -CD, isoladamente ou para a mistura física dos mesmos, evidenciando a complexação molecular.



BVC



MVC

Figura 12. Termogramas de DSC para os sistemas de BVC e MVC com β -CD. (A) BVC, (B) β -CD, (C) mistura física BVC/ β -CD, (D) complexo sólido BVC: β -CD, (E) MVC, (F) mistura física MVC/ β -CD e (G) complexo sólido MVC: β -CD. Os complexos sólidos foram preparados na razão molar de 1:1 (AL : β -CD).

Tabela 4. Temperatura de transição de fases e ΔH dos AL, β -CD, misturas físicas e complexos sólidos determinados através de DSC.

AMOSTRA	TEMPERATURA DE	
	TRANSIÇÃO DE FASES (°C)	ΔH (J/g)
BVC	133,5	140,3
MVC	74,7	29,93
β-CD	139,5	331,3
Mistura física BVC/β-CD	135,7	269,2
Mistura física MVC/β-CD	111,3	327,6
Complexo BVCβ-CD	107,2	*Nd
Complexo MVCβ-CD	121,05	276,0

* Nd - Não determinado

1.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

A análise por SEM permitiu observar a morfologia dos cristais dos AL e β -CD antes e após a complexação. As micrografias ilustram a morfologia da BVC, MVC, β -CD, misturas físicas e complexos sólidos desses compostos.

A Figura 13 mostra os cristais de β -CD (13A), BVC (13B) e MVC (13C) em resolução de 1500 vezes. Essas moléculas organizam-se em estruturas características: onde os cristais de β -CD são mais volumosos (com cerca de 50 a 70 μm de diâmetro médio) e têm formato cúbico com contornos bem definidos; já a BVC forma estruturas menores, cúbico – retangulares de até 30 μm de comprimento por cerca de 10 μm de largura; os cristais de MVC são alongados e ponteagudos, com dimensões médias de 50 μm por 8 μm .

A Figura 14 apresenta as micrografias das misturas físicas de BVC/ β -CD (14A) e MVC/ β -CD (14B), onde as características dos cristais de β -CD e AL, isoladamente, podem ser observadas (tanto para BVC como para MVC), indicando que não houve complexação. Quando os complexos sólidos de BVC: β -CD e MVC: β -CD são formados (Figuras 14C e 14D, respectivamente) observa-se uma alteração bastante evidente nas micrografias: a morfologia original dos cristais de β -CD e AL é perdida, dando lugar a aglomerados de menor tamanho e estrutura pouco definida.

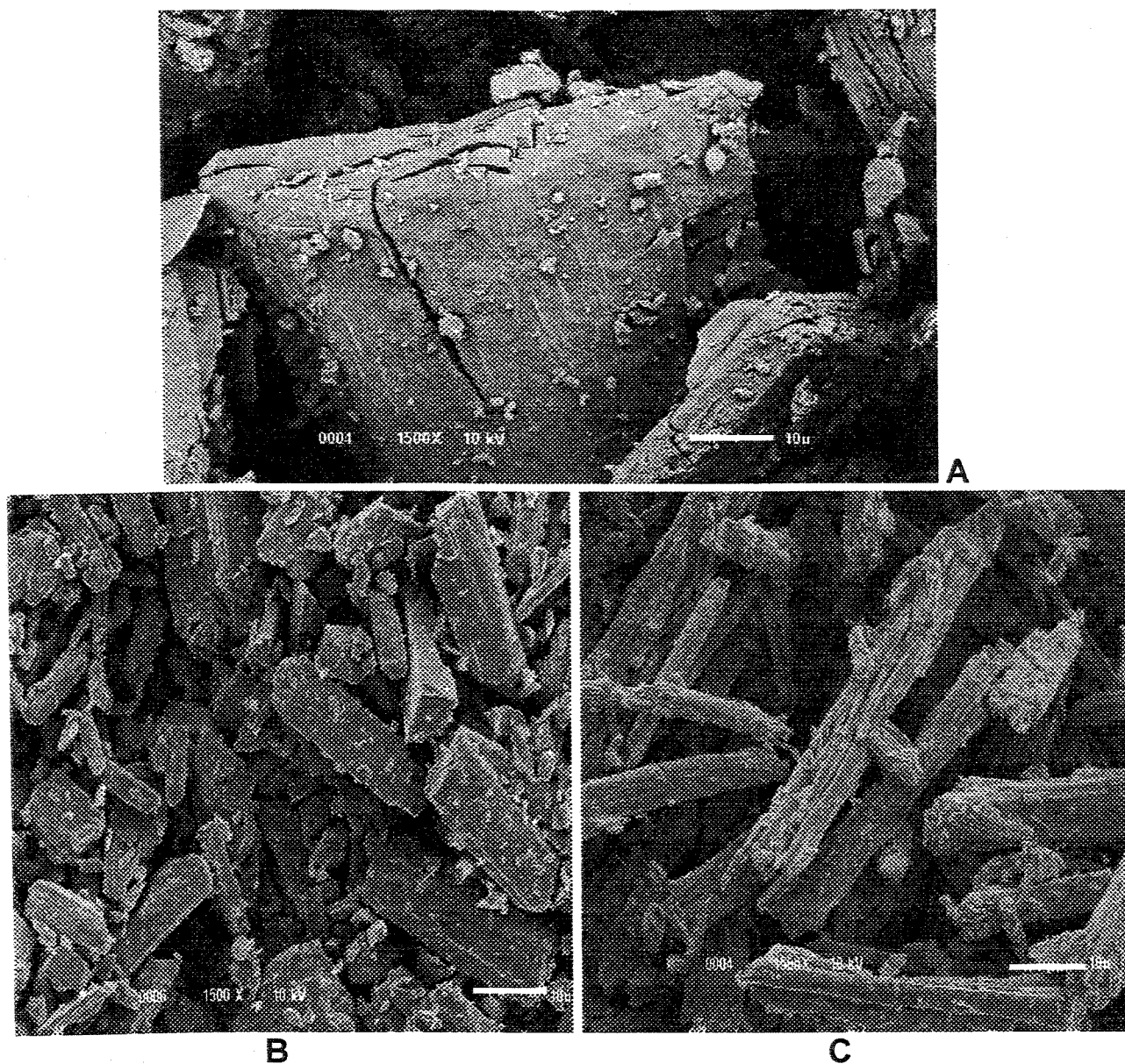


Figura 13. Análise por SEM dos cristais de β -CD (A), BVC (B) e MVC (C). Aumento de 1500X.

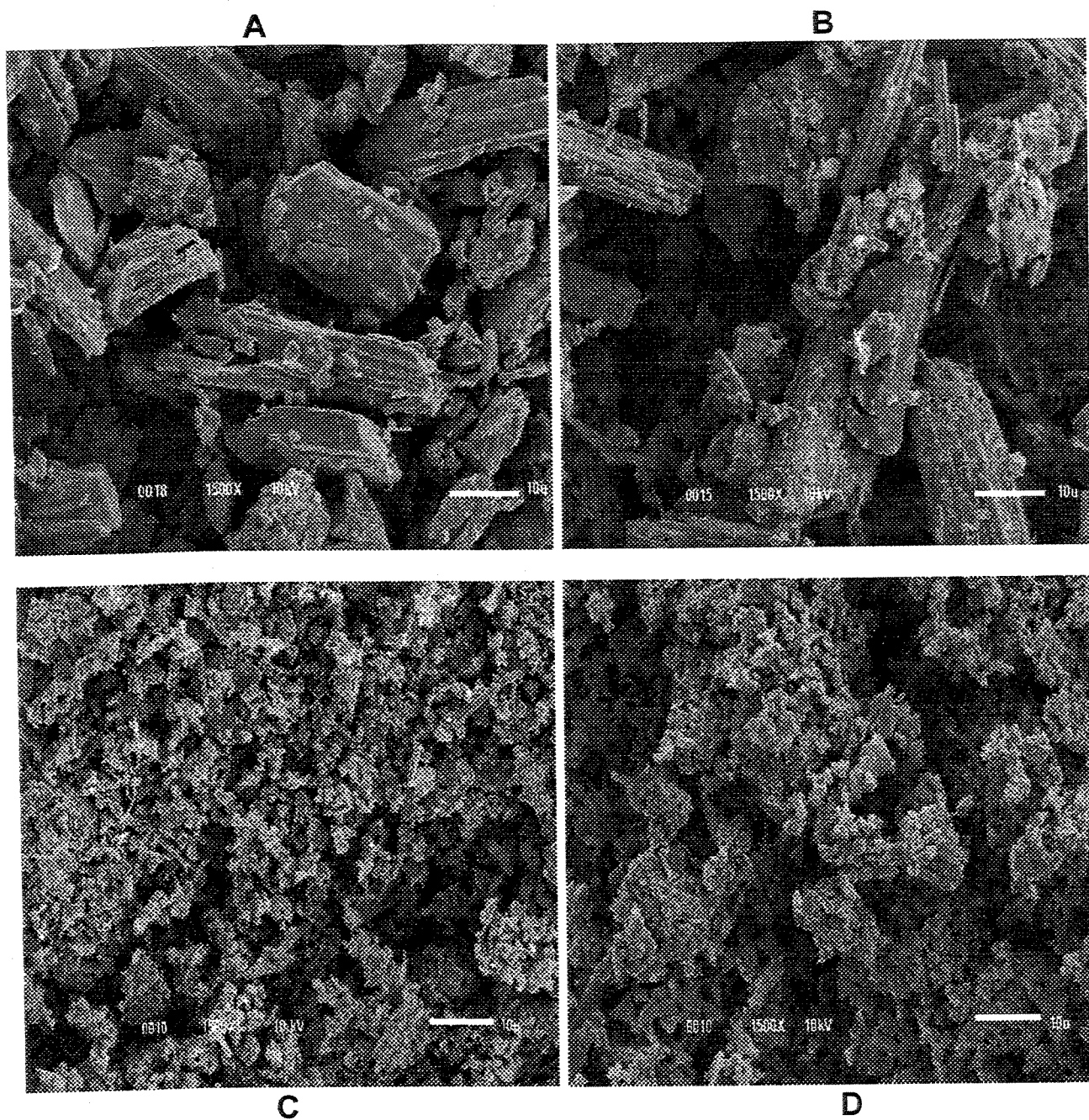


Figura 14. Análise por SEM das misturas físicas de BVC/ β -CD (A), MVC/ β -CD (B) e dos complexos sólidos BVC _{β -CD} (C) e MVC _{β -CD} (D). Aumento de 1500X.

2. TESTES FARMACOLÓGICOS

2.1. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO MOTOR

A função motora foi afetada pela injeção de BVC e MVC na região do nervo ciático havendo a perda dos reflexos motores da pata injetada, que foi reversível em todos os animais testados.

A latência, o tempo para o efeito máximo ($T_{\text{máx}}$), tempo de recuperação e o efeito total das formulações AL (AUC) foram os parâmetros medidos e comparados para todos os grupos experimentais (Tabela 5).

A injeção dos veículos na região do nervo ciático não induziu bloqueio motor. Com relação aos AL, embora a BVC seja mais potente que a MVC (como verificado pelas concentrações utilizadas) não foram observadas diferenças significantes entre as formulações lipossomais ou complexadas e as drogas livres em relação aos parâmetros avaliados.

Comparações entre as concentrações de BVC mostraram diferenças estatísticas em relação ao $T_{\text{máx}}$, tempo de recuperação do bloqueio motor e AUC entre as formulações livres (BVC 0,5 % e 0,125 %) com $p < 0,001$ e lipossomais (BVC_{LUV} 0,5 % e BVC_{LUV} 0,125 %) apresentando $p < 0,01$, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente. Os mesmos parâmetros também revelaram diferenças estatísticas entre os complexos (BVC _{β -CD} 0,5 % e BVC _{β -CD} 0,125 %) sendo $p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,01$ para $T_{\text{máx}}$, tempo de recuperação do bloqueio motor e AUC, respectivamente.

Com relação à MVC, as diferenças significantes foram observadas nas concentrações de 2 e 0,5 % tanto para os anestésicos livres quanto encapsulados

em lipossomas comparando-se os tempos de recuperação do bloqueio motor e AUC ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

Tabela 5. Latência, $T_{máx}$, tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (AUC) induzido pelas formulações de AL livres, lipossomais e complexadas. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) ($n = 8$ / grupo). **a** BVC 0,5 % e BVC 0,125 %; **b** BVC_{LUV} 0,5 % e BVC_{LUV} 0,125 %; **c** BVC _{β -CD} 0,5 % e BVC _{β -CD} 0,125%; **d** MVC 0,5 % e MVC 2 %; **e** MVC_{LUV} 0,5 % e MVC_{LUV} 2 %. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Teste de Kruskal – Wallis).

Concentração (%)	Grupos	Latência (min.)	$T_{máx}$ (min.)	Tempo de recuperação (min.)	AUC (score/h)
0,125	BVC	1 (1 – 2)	3 (2 – 3)	20,0 (-)	22,5 (19,0 – 28,0)
	BVC _{LUV}	1 (1 – 2)	4 (2 – 5)	20,0 (20,0 – 30,0)	21,5 (17,0 – 38,0)
	BVC _{β-CD}	1 (1 – 2)	3 (2 – 5)	20,0 (20,0 – 30,0)	25,0 (17,0 – 37,0)
0,25	BVC	1 (1 – 2)	2 (2 – 3)	40,0 (30,0 – 40,0)	41,0 (37,0 – 48,0)
	BVC _{LUV}	1 (-)	2,5 (1 – 3)	40,0 (30,0 – 50,0)	57,0 (19,0 – 78,0)
	BVC _{β-CD}	1 (1 – 2)	2 (2 – 3)	40,0 (30,0 – 40,0)	56,0 (29,0 – 68,0)
0,5	BVC	1 (-)	1 (-) ^{a***}	50,0 (30,0 – 60,0) ^{a***}	58,0 (50,0 – 88,0) ^{a**}
	BVC _{LUV}	1 (-)	1 (1 – 2) ^{b**}	40,0 (40,0 – 50,0) ^{b*}	68,0 (58,0 – 98,0) ^{b***}
	BVC _{β-CD}	1 (-)	1,5 (1 – 2) ^{c*}	50,0 (50,0 – 60,0) ^{c***}	68,0 (58,0 – 98,0) ^{c***}
0,5	MVC	1 (1 – 2)	2 (2 – 3)	25,0 (20,0 – 40,0)	28,5 (20,0 – 58,0)
	MVC _{LUV}	1 (1 – 2)	2,5 (1 – 3)	20,0 (20,0 – 40,0)	27,0 (19,0 – 38,0)
	MVC _{β-CD}	1 (1 – 2)	2,5 (1 – 4)	20,0 (20,0 – 40,0)	28 (18,0 – 58,0)
1	MVC	1 (-)	2 (1 – 4)	30,0 (20,0 – 40,0)	37,5 (27,0 – 48,0)
	MVC _{LUV}	1 (-)	2,5 (1 – 3)	40,0 (30,0 – 40,0)	47,5 (37,0 – 58,0)
	MVC _{β-CD}	1 (-)	2 (1 – 2)	30,0 (20,0 – 40,0)	38,0 (20,0 – 48,0)
2	MVC	1 (-)	1,5 (1 – 3)	40,0 (40,0 – 50,0) ^{d*}	68,0 (39,0 – 78,0) ^{d*}
	MVC _{LUV}	1 (-)	1 (1 – 3)	40,0 (40,0 – 50,0) ^{e**}	58,0 (47,0 – 78,0) ^{e**}

A análise estatística não mostrou diferenças entre as concentrações dos complexos que foram utilizadas. Isso pode ser explicado pelo fato de que não foram realizados testes com MVC complexada a 2 % pois, nessa concentração

mais alta o complexo mostrou-se insolúvel. Seriam necessários 70,4 mM de β -CD para formar uma solução equimolar de MVC 2 % ultrapassando a solubilidade aquosa da β -CD, que é em torno de 16,4 mM (Rajewski & Stella, 1996). Na verdade, o limite de solubilização da β -CD já havia sido ultrapassado quando foi utilizada a formulação MVC $_{\beta$ -CD 0,5 % (17,6 mM de β -CD) mas, alterações na solubilidade (turbidez) só foram observadas com MVC $_{\beta$ -CD 1 % (35,2 mM), o que poderia ser um indicio da complexação e, provavelmente, de uma vantagem adicional da mesma: uma possível alteração na solubilidade aquosa da β -CD.

2.2. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO SENSORIAL

Utilizando-se o teste PWTP, foram determinadas as relações dose – efeito para as formulações livres, lipossomais e complexadas de BVC e MVC.

Observou-se, ao longo do tempo, os efeitos da infiltração intramuscular tanto dos veículos (LUV e β -CD) quanto das formulações de BVC e MVC livres, lipossomais e complexadas (BVC, BVC $_{LUV}$ e BVC $_{\beta$ -CD ou MVC, MVC $_{LUV}$ e MVC $_{\beta$ -CD) em três diferentes concentrações de AL (Figuras 15 e 16).

A avaliação do bloqueio sensorial mostrou que a infiltração dos veículos na região do nervo ciático não modificou os valores de linha basal para o limiar da dor em camundongos. Porém, todas as formulações elevaram o limiar de dor dos animais tratados sendo estatisticamente diferentes dos grupos controle ($p < 0,001$). Por outro lado, os sistemas BVC $_{\beta$ -CD e MVC $_{LUV}$ aumentaram a duração e a intensidade do bloqueio sensorial quando comparados às drogas livres.

A infiltração de BVC $_{\beta$ -CD aumentou a potência anestésica (avaliada como a média de resposta ao estímulo mecânico no PWTP) e a duração do efeito antinociceptivo em até 5 h. após a administração (Figura 15). A análise estatística

mostrou diferenças, em relação à potência, comparando-se $BVC_{\beta-CD}$, BVC_{LUV} e BVC a 0,125 , 0,25 e 0,5 % ($p < 0,001$).

Analisando os valores de limiar nociceptivo em tempos individuais, o tratamento dos animais com $BVC_{\beta-CD}$ 0,125 % (Figura 15A) foi diferente daquele com BVC e BVC_{LUV} à 90 e 120 min. ($p < 0,001$) e a analgesia foi prolongada por até 180 min. após a injeção. Observou-se também um aumento na potência anestésica de cerca de 1,7 vezes em relação à BVC livre e encapsulada em lipossomas.

A infiltração de $BVC_{\beta-CD}$ 0,25 % (Figura 15B) mostrou resultados semelhantes aos da concentração de 0,125 %. Diferenças estatísticas foram observadas de 90 a 150 min. ($p < 0,001$); durante esse intervalo a potência anestésica foi 1,8 vezes maior que a da BVC ou BVC_{LUV} e o ponto final da analgesia ocorreu somente 240 min. após o tratamento.

O grupo que recebeu $BVC_{\beta-CD}$ 0,5 % (Figura 15C) diferenciou-se daqueles tratados com BVC e BVC_{LUV} em relação à potência ($p < 0,001$) durante o intervalo de 90 a 300 min. após a injeção, sendo cerca de 2 vezes maior que a apresentada por aquelas formulações nas mesmas concentrações de anestésico.

De um modo geral, o tratamento com BVC_{LUV} apresentou perfil semelhante aquele observado com BVC nas concentrações de 0,125 % e 0,25 %. Diferenças estatísticas na potência anestésica foram observadas somente a 90 e 120 min. após o tratamento com BVC_{LUV} 0,5 % ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) em contrapartida, o efeito analgésico apresentou a mesma duração.

Por outro lado, MVC_{LUV} mostrou-se ser o sistema de liberação controlada mais eficiente para a MVC , aumentando a potência e o tempo de duração da

analgesia até 240 min. (MVC_{LUV} 0,5 %) e 300 min. (MVC_{LUV} 1 e 2 %) ($p < 0,001$) após o tratamento.

As formulações MVC e MVC_{LUV} 0,5 % (Figura 16A) apresentaram efeitos semelhantes durante os primeiros 120 min. após a infiltração, mas a administração de MVC_{LUV} prolongou a analgesia por até 300 min. A análise estatística mostrou diferença somente no tempo de 150 min. ($p < 0,001$).

Embora a administração de $MVC_{\beta-CD}$ 0,5 % tenha induzido menor potência anestésica que MVC_{LUV} e MVC 0,5 % (de 45 a 120 min. após a injeção, $p < 0,001$), o ponto final da analgesia ocorreu ao mesmo tempo (150 min.).

Já a MVC_{LUV} 1 % aumentou a potência analgésica (1,6 vezes em 180 min.) durante o intervalo de 90 a 180 min. ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) e prolongou a analgesia por mais que 300 min. após a infiltração (Figura 16B).

Um aumento na potência anestésica também foi observado após o tratamento com MVC_{LUV} 2 % em relação à MVC 2 %. Diferenças significantes foram observadas nos tempos de 90, 180 e 240 min. ($p < 0,001$) e o aumento da potência anestésica foi de aproximadamente 1,4 vezes (300 min.) em relação às formulações livre e complexada (Figura 16C).

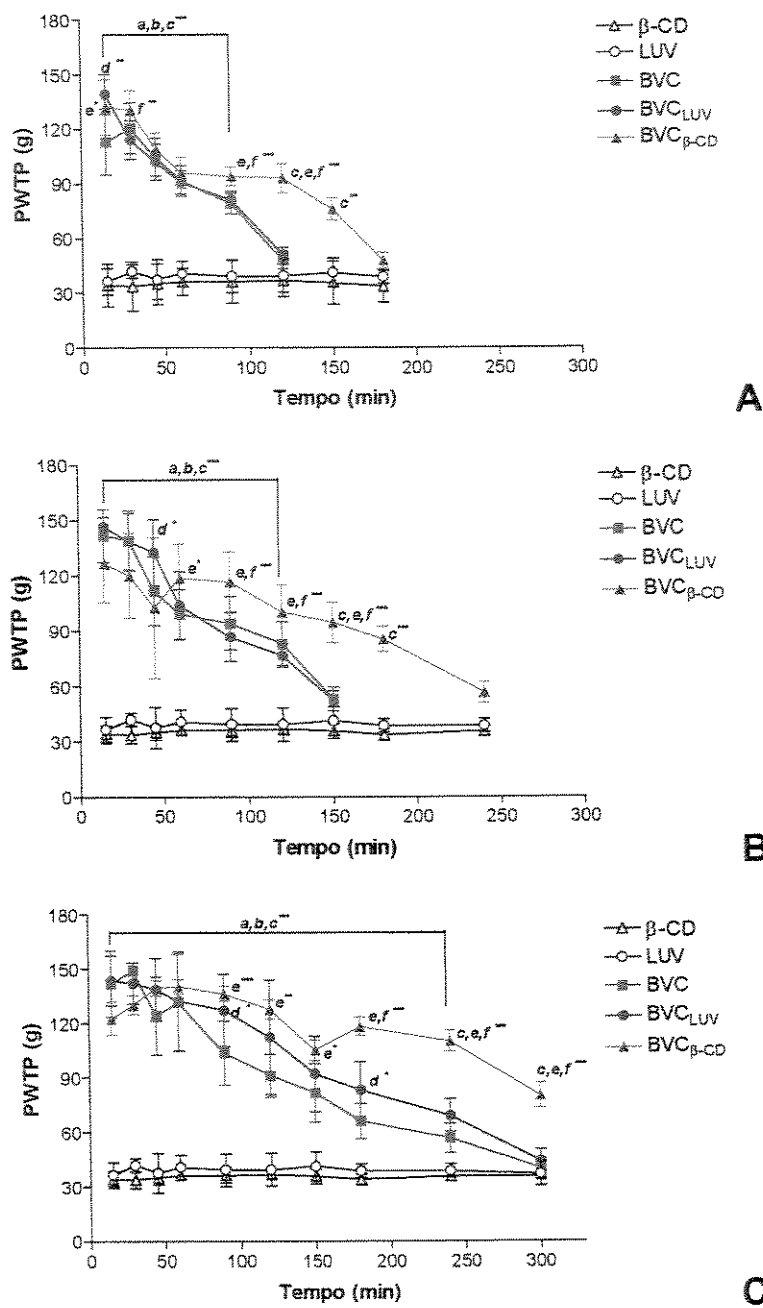
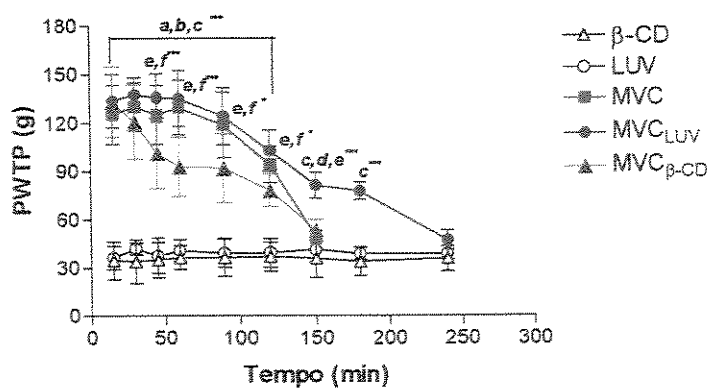
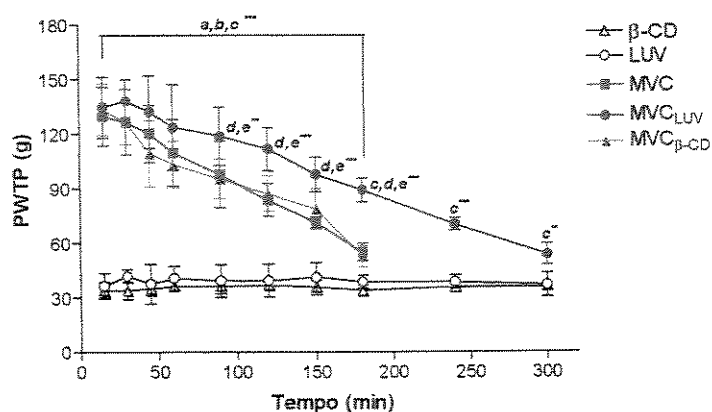


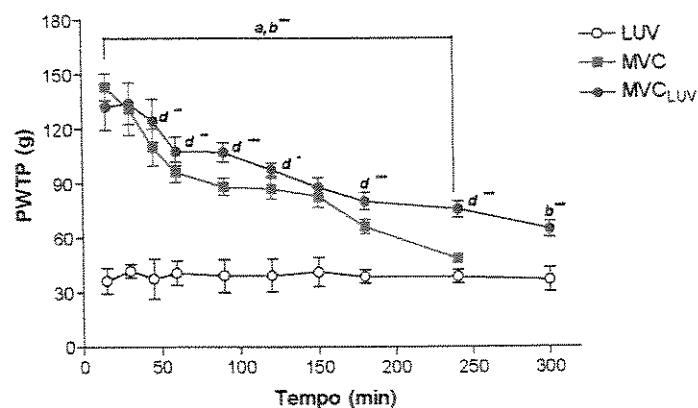
Figura 15. Curvas efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os veículos (LUV / β -CD), BVC, BVC_{LUV} e BVC _{β -CD} nas concentrações de 0,125 (A) , 0,25 (B) e 0,5 % (C). Valores expressos em média $\pm$ SD ($n = 10$). a, BVC e LUV / β -CD; b, BVC_{LUV} e LUV / β -CD; c, BVC _{β -CD} e LUV / β -CD; d, BVC_{LUV} e BVC; e BVC _{β -CD} e BVC; f, BVC _{β -CD} e BVC_{LUV}. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA).



A



B



C

Figura 16. Curvas efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os veículos (LUV / β -CD), BVC, MVC_{LUV} e MVC _{β -CD} nas concentrações de 0,5 (A), 1 (B) e 2 % (C). Valores expressos em média $\pm$ SD (n = 10). a, MVC e LUV / β -CD; b, MVC_{LUV} e LUV / β -CD; c, MVC _{β -CD} e LUV / β -CD; d, MVC_{LUV} e MVC; e MVC_{LUV} e MVC _{β -CD}; f, MVC e MVC _{β -CD}. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ANOVA).

Um AL ideal deve ter uma longa duração de ação, baixa toxicidade sistêmica e maior seletividade para fibras sensoriais que motoras. Para atingir esses objetivos, diversas abordagens têm sido utilizadas como: a síntese orgânica de novos compostos (homólogos dos AL comerciais), o controle do pH das soluções e o uso de associações com vasoconstrictores. Na última década, o desenvolvimento de formulações de AL em carreadores como lipossomas e ciclodextrinas veio oferecer a possibilidade de controlar a liberação de drogas em sistemas biológicos, prolongar o efeito anestésico e/ou reduzir sua toxicidade (Kuzma *et al.*, 1997). Além disso, a duração de ação relativamente curta dos AL disponíveis atualmente na clínica impulsiona as pesquisas com sistemas de liberação controlada dessas drogas para o tratamento da dor aguda e/ou crônica (Grant & Bansinath, 2001).

Alguns autores têm utilizado testes para avaliação dos bloqueios motor e sensorial em ratos (Feldman & Covino, 1988; Grant *et al.*, 1992; Simmonetti *et al.*, 1997; Kohane *et al.*, 2000) e em camundongos (Grant *et al.*, 1993; 2001; Gantenbein *et al.*, 1997). O bloqueio do nervo ciático foi utilizado como modelo experimental de dor aguda para observar a potência anestésica e a duração da analgesia induzidas por agentes AL, mostrando-se eficiente e reprodutível na avaliação das formulações de liberação controlada em camundongos.

Assim, foi possível também mostrar as relações entre os bloqueios motor e sensorial. Embora nenhuma das formulações tenha sido capaz de modificar a duração do bloqueio motor (como descrito no item 2.1.), os sistemas BVC _{β -CD} e MVC_{LUV} prolongaram os efeitos antinociceptivos dos AL (potência e duração) nas mesmas concentrações das formulações livres.

Para a pesquisa e desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, alguns fatores devem ser considerados: i) a droga deve ser encapsulada ou complexada possibilitando a manutenção das concentrações terapêuticas por um

longo tempo e ii) a eliminação do sistema carreador/AL (*clearance*) deve ser reduzida o suficiente para que concentrações de droga sejam retidas no local da injeção (Langerman *et al.*, 1992a,b; Mowat *et al.*, 1996).

Nossos resultados sugerem que a baixa solubilidade aquosa da BVC e a discreta partição na membrana da MVC foram afetadas pela complexação com β -CD e encapsulação em LUV, respectivamente; aumentando a fração disponível das drogas (em água e em lipídios) necessária à penetração na membrana. Como consequência, desse aumento na disponibilidade e na liberação controlada dos anestésicos no sítio de ação ou no local de injeção, as formulações de BVC $_{\beta$ -CD e MVC $_{LUV}$ melhoraram a potência e a duração da analgesia, além de potencializar o bloqueio nervoso diferencial induzido pelos mesmos.

A liberação controlada de AL tem como objetivos principais manter o índice terapêutico das drogas para os tratamentos da dor aguda ou crônica (Fletcher *et al.*, 1997; Garry *et al.*, 1999), no pós-operatório (Boogaerts *et al.*, 1994), reduzindo a toxicidade sistêmica e agindo mais sobre fibras sensoriais do que motoras (Kuzma *et al.*, 1997; Grant & Bansinath, 2001). Essa última característica, manter a analgesia sem afetar excessivamente a função motora, tem uma grande relevância clínica.

Alguns trabalhos, utilizando BVC encapsulada em MLV, mostraram um aumento na duração de ação (Boogaerts *et al.*, 1994; Umbrain *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1998; Malinovsky *et al.*, 1999) bem como uma diminuição da toxicidade local e sistêmica do anestésico (Boogaerts *et al.*, 1993 a,b; 1995; Malinovsky *et al.*, 1997 a,b). Neste estudo não foi observado um melhor efeito da BVC em LUV quando comparada à BVC livre, apesar da maior estabilidade osmótica desse tipo de vesículas em relação às MLV (Mui *et al.*, 1993; 1994; Mowat *et al.*, 1996).

Além disso, a difusão de drogas em lipossomas que apresentam apenas uma bicamada é mais rápida que em vesículas multilamelares (Grant & Bansinath, 2001), o que poderia diminuir a eficiência de retenção da BVC na bicamada lipídica. Porém, nossos dados são bastante coerentes considerando-se que o coeficiente de partição da molécula e a difusão através da membrana são altos (ver Tabela 1), de forma que as vesículas não deveriam oferecer auxílio no aumento da concentração total de droga disponível no sítio de ação, sendo mais provável que a solubilidade em água seja o fator limitante para a eficiência da BVC.

Um outro fator interessante é que nosso sistema lipossomal foi preparado em pH 7,4 de forma diferente dos trabalhos anteriores (Boogaerts *et al.*, 1994; Umbrain *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1998; Malinovsky *et al.*, 1999), nos quais foram utilizadas formulações em pH 8,1, próximo ao pKa da BVC (pKa = 8,1; segundo Covino, 1986), disponibilizando maiores quantidades de BVC na forma não carregada. Essa é uma importante consideração, pois o fato da encapsulação em lipossomas não ter potencializado os efeitos da BVC poderia ser explicado pela quantidade reduzida da forma não carregada da droga, que tem mais afinidade pela membrana que a forma protonada. Provavelmente modificações, como um gradiente de pH, poderiam ser alternativas eficazes para melhorar a encapsulação e os efeitos da BVC em LUV (Mowat, 1996).

Avaliando-se os resultados obtidos com os sistemas de liberação controlada, a complexação com β -CD aumentou a potência e a duração da analgesia induzida por BVC (em relação à droga livre) em todas as concentrações utilizadas. Esse efeito pode ser claramente correlacionado ao aumento da concentração de BVC total (em água e complexada) disponibilizada pela formulação. Portanto, acredita-se que a BVC complexada com β -CD poderia ser uma formulação útil na clínica (Dollo *et al.*, 1998; 2000), pois mostrou efeitos

equivalentes à BVC livre com a vantagem de poder ser utilizada em concentrações menores.

Tal efeito não foi observado com $MVC_{\beta\text{-CD}}$, o que poderia ser explicado pelo fato de que a solubilidade em água da MVC (1,03 M) não seria um fator limitante na cinética de particionamento da droga; como para a BVC (solubilidade aquosa de 0,07 M) (de Paula & Schreier, 1995).

Já a administração de MVC_{LUV} 0,5 , 1 e 2 % induziu efeitos antinociceptivos semelhantes aqueles obtidos com BVC 0,5 %. Dessa forma, pode-se sugerir que a MVC_{LUV} poderia também ser comparada à BVC livre em relação à potência e duração de ação quando utilizada em concentrações clinicamente relevantes.

2.3. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA SISTÊMICA

2.3.1. CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

A propriedade dos AL de apresentarem efeitos analgésicos sistêmicos tem sido bastante discutida. Wiesenfeld-Hallin & Lindblom (1985) observaram que a utilização de bupivacaína e lidocaína em ratos durante o teste da placa quente (*hot plate*) não produziu efeitos antinociceptivos. Já Rigon & Takahashi (1996) verificaram efeitos analgésicos sistêmicos em três modelos nociceptivos (*tail flick*, *hot plate* e contorções abdominais induzidas por ácido acético) após a administração intraperitoneal e subcutânea de procaína e lidocaína em camundongos.

Neste estudo, o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético foi utilizado como um modelo de dor visceral com o objetivo de observar os efeitos analgésicos sistêmicos induzidos pela liberação controlada de AL. Foram

investigadas as formulações eficazes de acordo os resultados obtidos na avaliação do bloqueio sensorial (item 2.2): $BVC_{\beta\text{-CD}}$ e MVC_{LUV} .

A injeção subcutânea de $BVC_{\beta\text{-CD}}$ apresentou diferenças significantes em relação à formulação livre apenas na dose mais alta (30 mg/kg) ($p < 0,001$) utilizada (Figura 17A). Já a MVC_{LUV} induziu efeitos analgésicos similares à MVC (Figura 17B). Tanto as formulações livres quanto lipossomais ou complexadas foram estatisticamente diferentes dos grupos controle (salina e $\beta\text{-CD}$ ou LUV) ($p < 0,001$).

A liberação controlada das drogas que promovem concentrações terapêuticas, mas com cinética de liberação lenta (Rajewski & Stella, 1996; Irie & Uekama, 1997; Dollo *et al.*, 1998) poderiam explicar esses resultados. Neste modelo, os sistemas de liberação controlada para BVC e MVC produziram antinocicepção de uma forma semelhante às drogas livres.

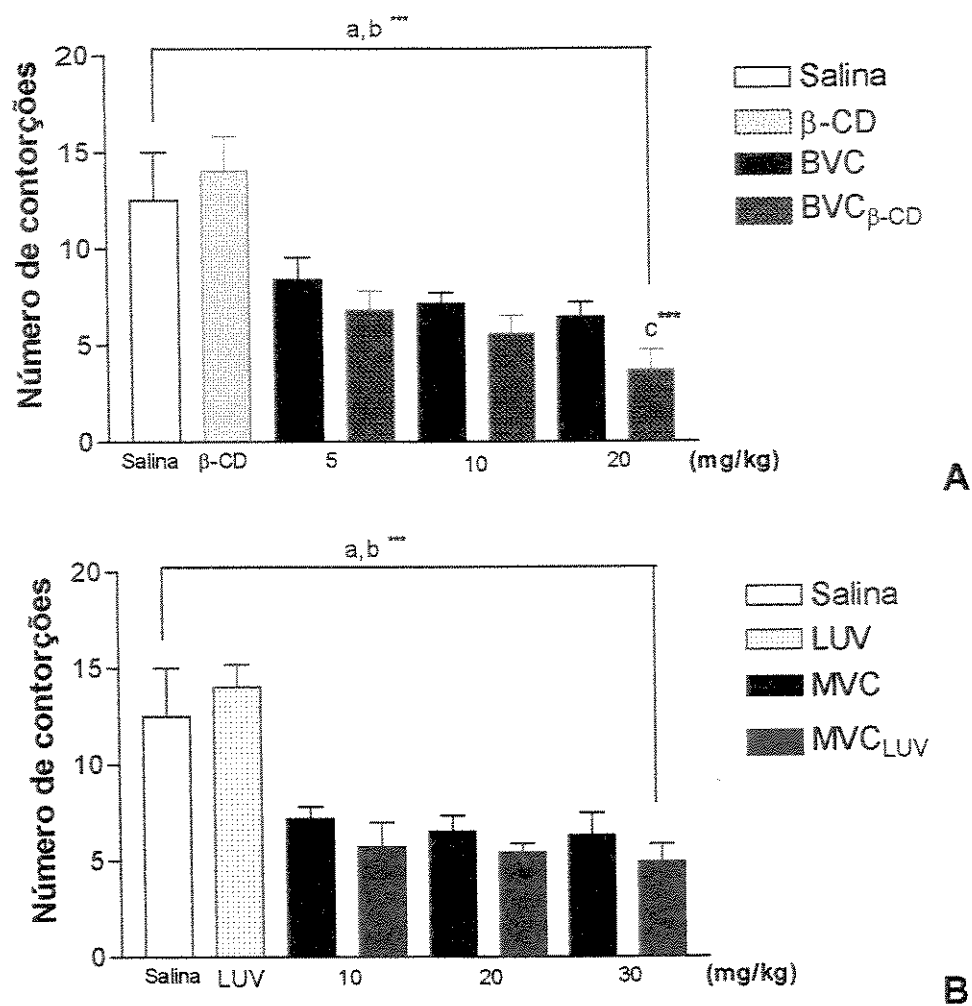


Figura 17. Redução do número de contorções abdominais (média $\pm$ SD) após tratamento com AL (s.c.). As contorções foram registradas durante 20 min. após a administração (i.p.) de ácido acético 0,6 %. Os gráficos mostram os tratamentos com veículos (salina e β -CD) BVC, BVC _{β -CD} (A) e veículos, MVC, MVC_{LUV} (B) (n = 10). **a**, BVC e salina/ β -CD; **b**, BVC _{β -CD} e salina/ β -CD ; **c**, BVC _{β -CD} e BVC (A). **a**, MVC e salina/ β -CD; **b**, MVC_{LUV} e salina/ β -CD (B). *** $p < 0,001$.

V. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que:

- A determinação do raio hidrodinâmico dos lipossomas mostrou a presença de duas populações de vesículas distintas: com aproximadamente 400 nm (em maior proporção) e 150 nm, compatíveis com o poro da membrana utilizada no processo de extrusão.
- Não ocorreu alteração do raio hidrodinâmico das vesículas após a encapsulação de AL e a variação da temperatura de estocagem das formulações lipossomais até duas semanas após a preparação.
- A eficiência de encapsulação dos anestésicos em lipossomas mostrou percentagem de incorporação maior para BVC que para MVC, fato este já esperado devido às diferenças entre esses dois anestésicos com relação à partição na membrana.
- A caracterização dos sistemas com AL e β -CD por DSC mostrou evidências da formação dos complexos sólidos na razão molar 1:1 (AL : β -CD) através das diferenças observadas nas temperaturas de transição de fases dos anestésicos isolados, em misturas físicas e complexados com β -CD. Além disso, a análise das micrografias obtidas por SEM mostraram perda do padrão dos cristais de AL e de β -CD puros, compatível com a formação do complexo AL : β -CD.
- A avaliação do bloqueio motor induzido pelos AL mostrou que a encapsulação e a complexação não induziram modificações significantes na latência, $T_{m\acute{a}x}$, duração e intensidade ou efeito total (AUC) do bloqueio motor (nas mesmas concentrações) em relação às

drogas livres. No entanto, as formulações livres, lipossomais e complexadas demonstraram um aumento dose-dependente tanto na intensidade quanto na duração do bloqueio motor.

- Já em relação ao bloqueio sensorial, a complexação de BVC com β -CD aumentou a amplitude (potência) e a duração do efeito antinociceptivo nos animais tratados ao passo que a encapsulação de MVC em lipossomas promoveu uma potencialização do efeito analgésico em relação à amplitude e ao tempo de duração do mesmo, após comparação com as soluções comerciais. Este fato sugere que a encapsulação em lipossomas seria mais eficaz para AL hidrofílicos, como a MVC, enquanto a complexação com CD favoreceria AL hidrofóbicos, como a BVC.
- Dentre as formulações aqui avaliadas, a encapsulação de MVC em lipossomas possibilitou o transporte de uma fração da droga incorporada em membranas; o que lhe conferiu maior potência anestésica em relação às preparações comerciais. Já a complexação de BVC com β -CD aumentou a quantidade total de droga na fase aquosa (limitante nas formulações comerciais). Acredita-se que esses fatores foram responsáveis pela potencialização dos efeitos terapêuticos desses anestésicos, facilitando a infiltração na membrana axonal, uma vez que a concentração total de AL administrado não foi alterada nos protocolos aqui adotados.
- O bloqueio nervoso diferencial induzido pelos AL foi aumentado pelas formulações, MVC_{LUV} e $BVC_{\beta-CD}$, possivelmente através da liberação controlada das drogas no sítio de ação ou no local de injeção (o que provavelmente reduziria também o *clearance*) melhorando a potência e aumentando a duração da analgesia em relação às formulações livres.

- No modelo de dor visceral utilizado, a administração sistêmica das formulações lipossomais e complexadas apresentou efeitos similares aqueles observados com as drogas livres. A liberação controlada das drogas promovendo concentrações terapêuticas, mas com cinética de liberação lenta, poderiam explicar os resultados obtidos. Comparando-se esses dados com a avaliação dos bloqueios motor e sensorial, pode-se sugerir que a potencialização dos efeitos antinociceptivos pelas formulações AL encapsuladas ou complexadas é eficaz no nível local, sendo interessante ressaltar que a injeção local é a via preferencial de administração desses fármacos tendo em vista a grande toxicidade sistêmica dos mesmos.
- Embora existam diferenças entre a clínica e as condições de realização desses experimentos, as formulações $BVC_{\beta-CD}$ e MVC_{LUV} mostraram efeitos comparáveis ou melhores (no caso de $BVC_{\beta-CD}$), em termos de potência e duração da analgesia, à BVC livre podendo ser úteis na clínica como alternativas para o tratamento da dor aguda, crônica ou pós-operatória.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista os resultados obtidos com este trabalho pode-se sugerir:

- A preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada com lipossomas e ciclodextrinas utilizando outros anestésicos locais de aplicação clínica promissora, como a ropivacaína;
- Avaliação *in vitro*, a toxicidade das formulações anestésicas lipossomais e/ou complexadas tanto para os anestésicos já estudados (bupivacaína e mepivacaína) quanto para a ropivacaína, utilizando como testes de escolha: hemólise e cultura de células;
- Realização de ensaios pré-clínicos, utilizando camundongos (via infiltrativa) e coelhos (via epidural) avaliando a intensidade e duração dos bloqueios motor e sensorial induzidos pelas formulações e utilizando concentrações clinicamente relevantes;
- Realização de ensaios clínicos (em humanos) comparando os sistemas de liberação controlada e comerciais, com o objetivo de desenvolver formulações anestésicas locais de efeito prolongado mas com baixa toxicidade sistêmica.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Åkerman, B., Arweström, E., Post, C. (1988) Local anesthetics potentiate spinal morphine antinociception. **Anesth. Analg.** **67**, 943-948.
- Anger, T., Madge, D. J., Mulla, M., Riddall, D. (2001) Medicinal chemistry of neuronal voltage-gated sodium channels blockers. **J. Med. Chem.** **44**, 115-138.
- Ankier, S. I. (1974) New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. **Eur. J. Pharmacol.** **27**, 1-4.
- Bennett, G., Deer, T., Stuart, D. P., Rauck, R., Yaksh, T., Hassenbusch, S. J. (2000) Future directions in the management of pain by intraspinal drug delivery. **J. Pain Symp. Manag.** **20**, 44-50.
- Besson, J-M., Chaouch, A. (1987) Periferal and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.** **67**, 67-154.
- Bianconi, M. L. (1998) Mechanism of action of local anesthetics: a practical approach to introducing the principles of pKa to medical students. **Biochem. Educ.** **26**, 11-13.
- Bibby, D., Davies, N. M., Tucker, I. G. (2000) Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **Int. J. Pharmac.** **197**, 1-11.
- Boogaerts, J., Declercq, A., Lafont, N., Benameur, H., Akodad, E. M., Dupont, J-M. Legros, F.J. (1993a). Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. **Anesth. Analg.** **76**, 553-555.
- Boogaerts, J. G., Lafont, N. D., Luo, H. C., Legros, F. J. (1993b) Plasma concentrations of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome-associated and plain solutions to rabbits. **Can. J. Anaesth.** **40**, 1201-1204.
- Boogaerts, J. G., Lafont, N. D., Declercq, A. G., Luo, H. C., Gravet, E. T., Bianchi, J. A., Legros, F. J. (1994) Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. **J. Clin. Anesth.** **6**, 315-320.
- Boogaerts, J. G., Lafont, N. D., Carlino, S., Noel, E., Raynal, P., Goffinet, G., Legros, F. J. (1995) Biodistribution of liposome-associated bupivacaine after extradural administration to rabbits. **Br. J. Anaesth.** **75**, 319-325.
- Boyes, R. N. (1975) Review of metabolism of amide local-anesthetic agents. **Br. J. Anaesth.** **47**, 225-230.

- Bucalo, B. D., Mirikitani, E. J., Moy, R. L. (1998) Comparision of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine and EMLA using 30-minute application time. **Dermatol. Surg.** **24**, 537-541.
- Buritova, J., Fletcher, D., Honoré, P., Besson, J-M. (1996) Effects of local anesthetics on carrageenan-evoked inflammatory nociceptive processing in the rat. **Br. J. Anaesth.** **77**, 645-652.
- Butterworth, J. F., Strichartz, G. R. (1990) Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. **Anesthesiol.** **72**, 711-734.
- Carvalho, J. C. A. (1994) Farmacologia dos anestésicos locais. **Rev. Bras. Anesthesiol.** **44**, 75-82.
- Catterall, W., Mackie, K. (1996) Anestésicos locais. In: Goodman, L. S., Gilman, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Chapman, C. R., Casey, K. L., Dubner, R., Foley, K. M., Gracely, R. H., Reading, A. E. (1985) Pain measurement: an overview. **Pain.** **22**, 1-31.
- Cleveland Clinical Foundation - Pain Management Center 2001.
http://medstat.med.utah.edu/pain_center/education/outlines/noci_transduc.html.
(consultado em 15 de outubro de 2001).
- Collier, H. O. J., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., Schneider, C. (1968) The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmac. Chemother.** **32**, 295-310.
- Collins, V. J. (1993) **Principles of Anesthesiology general and regional**. 3rd.ed. U.S.A.: Lea & Febiger, v.2.
- Covino, B. G. (1986) Pharmacology of local anaesthetic agents. **Br. J. Anaesth.** **58**, 701-716.
- D'Amour, F. E., Smith, D. L. (1941) A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **72**, 74-79.
- de Jong, R. H. (1994) **Local anesthetics**. U.S.A: Mosby-Year Book.
- de Paula, E., Schreier, S. (1995) Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of a local anesthetics on membrane structure. **Bioch. Biophys. Acta** **1240**, 25-33.
- (1996) Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **29**, 877-894

- Dollo, G., Le Corre, P., Chevanne, F., Le Verge, R. (1996a) Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. I. Physicochemical characterization. **Int. J. Pharmac.** **131**, 219-228.
- (1996b) Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. II. Evaluation of affinity constants and in vitro transfer constants. **Int. J. Pharmac.** **136**, 165-174.
- Dollo, G., Thompson, D. O., Le Corre, P., Chevanne, F., Le Verge, R. (1998) Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- β -CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. **Int. J. Pharmac.** **164**, 11-19.
- Dollo G, Le Corre P., Freville J.C., Chevanne, F. and Le Verge, R. (2000) Biopharmaceutics of local anesthetic cyclodextrin complexes following loco-regional administration. **Ann. Pharm. Fr.** **58**, 425-432.
- Feldman, H. S., Covino, B. G. (1988) Comparative motor-blocking effects of bupivacaine and ropivacaine, a new amino amide local anesthetic, in the rat and dog. **Anesth. Analg.** **67**, 1047-1052.
- Fletcher, D., Le Corre, P., Guilbaud, G., Le Verge, R. (1997) Antinociceptive effect of bupivacaine encapsulated in poly(D,L)-lactide-co-glycolide microspheres in the acute inflammatory pain model of carrageenin-injected rats. **Anesth. Analg.** **84**, 90-94.
- Frazier, D. T., Narahashi, T., Yamada, M. (1970) The site of action and active form of local anesthetics. III. Experimental with quaternary compounds. **J. Pharm. Exp. Ther.** **171**, 45-51.
- Frömming, K. H. & Szejtli, J. (1994) **Topics in Inclusion Science - Cyclodextrins in Pharmacy**, Hungria: Kluwer Academic Publishers.
- Gantenbein, M., Abat, C., Attolini, L., Pisano, P., Emperaire, N., Bruguerolle, B. (1997) Ketamine effects on bupivacaine local anaesthetic activity and pharmacokinetics of bupivacaine. **Life Sci.** **61**, 2027-2033.
- Gantenbein, M., Attolini, L., Bruguerolle, B. (1996) Potassium channel agonists modify the local anesthetic activity of bupivacaine in mice. **Can. J. Anaesth.** **43**, 871-876.
- Garry, M. G., Jackson, D. L., Geier, H. E., Southam, M., Hargreaves, K. M. (1999) Evaluation of the efficacy of a bupivacaine polymer system on nociception and inflammatory mediator release. **Pain** **82**, 49-55.

- Gesztes, A., Mezei, M. (1988) Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine. **Anesth. Analg.** **67**, 1079-1081.
- Graeff, F.G. (1989) **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação**. 2.ed. São Paulo: EPU.
- Grant, G. J., Vermeulen, K., Zakowski, M. I., Sutin, K. M., Ramanathan, S., Langerman, L., Weissman, T. E., Turndorf, H. (1992) A rat sciatic nerve model for independent assessment of sensory and motor block induced by local anesthetics. **Anesth. Analg.** **75**, 889-894.
- Grant, G. J., Zakowski, M. I., Vermeulen, K., Langerman, L., Ramanathan, S., Turndorf, H. (1993) Assessing local anesthetic effect using the mouse tail flick test. **J. Pharmacol. Meth.** **29**, 223-226.
- Grant G. J, Barenholz, Y., Piskoun, B., Bansinath, M., Turndorf, H., Bolotin, E. M. (2001) DRV liposomal bupivacaine: preparation, characterization and *in vivo* evaluation in mice. **Pharm. Res.** **18**, 336-343.
- Grant. G. J., Bansinath, M. (2001) Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Reg. Anesth. Pain. Med.** **26**, 61-63.
- Gupta, S. P. (1991) Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. **Chem. Rev.** **91**, 1109-1119.
- Guyton, A. C., Hall, J. E. (1998) **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Irie, T., Uekama, K. (1997) Pharmaceutical applications of ciclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm. Sci.** **86**, 147-162.
- Kalinkova, G. N. (1999) Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. **Int. J. Pharm.** **187**, 1-15.
- Kohane DS, Lipp M, Kinney RC, Lotan N and Langer R (2000) Sciatic nerve blockade with lipid-protein-sugar particles containing bupivacaine. **Pharm Res** **17**:1243-1249.
- Kuzma, P. J., Kline, M. D., Calkins, M. D., Staats, P. S. (1997) Progress in the development of ultra-long-acting local anesthetics. **Reg. Anesth.** **22**, 543-551.
- Langerman, L., Grant, G. J., Zakowski, M., Golomb, E., Ramanathan, S., Turndorf, H. (1992) Prolongation of epidural anesthesia using a lipid carrier with procaine, lidocaine and tetracaine. **Anesth. Analg.** **75**, 900-905.

- Lemonica, L., Perreira, S. M. (1992) Dor: bases anatomo-fisiológicas e do tratamento. In: Braz, J. R. C., Castiglia, Y. M. **Temas de Anestesiologia para o curso de graduação em medicina**. São Paulo: UNESP.
- Leszczynska, K., Kau, S. T. (1992) A sciatic blockade method to differentiate drug-induced local anesthesia from neuromuscular blockade in mice. **J. Pharmacol. Meth.** **27**, 85-93.
- Li, H-L., Galue, A., Meadows, L., Ragsdale, D. S. (1999) A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. **Mol. Pharmacol.** **55**, 134-141.
- Loftsson, T., Masson, M. (2001) Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int. J. Pharm.** **225**, 15-30.
- Malamed, S. F. (2001) **Manual de anestesia local**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Malinovsky, J. M., Bernard, J. M., Baudrimont, M., Dumand, J. B., Lepage, J. Y. (1997a) A chronic model for experimental investigation of epidural anesthesia in the rabbit. **Reg. Anesth.** **22**, 80-85.
- Malinovsky, J-M., Benhamou, D., Alafandy, M., Mussini, J-M., Coussaert, C., Couaraze, G., Pinaud, M., Legros, F. J. (1997b) Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. **Anesth. Analg.** **85**, 1331-1336.
- Malinovsky, J-M., Le Corre, P., Meunier, J-F., Cheveanne, F., Pinaud, M., Le Verge, R., Legros, F. (1999) A dose-response study of liposomal bupivacaine in rabbits. **J. Contr. Rel.** **60**, 111-119.
- Mashimo, T., Uchida, I., Pak, M., Shibata, A., Nishimura, S., Inagaki, Y., Yoshiya, I., (1992) Prolongation of canine epidural anesthesia by liposome encapsulation of lidocaine. **Anesth. Analg.** **74**, 827-834.
- McCormack, B., Gregoriadis, G. (1998) Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs *in vivo*. **Int. J. Pharmac.** **162**, 59-69.
- Mogil, J. S., Wilson, S. G., Bom, K., Lee, S. E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J. O., Hain, H. S., Belknap, J. K., Hubert, L., Elmer, G. I., Chung, J. M., Devor, M. (1999a) Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. **Pain.** **80**, 67-82.

- Mogil, J. S., Wilson, S. G., Bom, K., Lee, S. E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J. O., Hain, H. S., Belknap, J. K., Hubert, L., Elmer, G. I., Chung, J. M., Devor, M. (1999b) Heritability of nociception II. "Types" of nociception revealed by genetic correlation analysis. **Pain**. **80**, 83-93.
- Moore, P. A., Burney, R. G. (1979) Analgesic properties of lidocaine in mice. **Anesth. Analg.** **58**, 85-87.
- Mowat, J. J., Mok, M. J., MacLeod, B. A., Madden, T. D. (1996) Liposomal bupivacaine. **Anesthesiol.** **85**, 635-643.
- Mui, B. L. S., Cullis, P. R., Evans, E. A., Madden, T. D. (1993) Osmotic properties of large unilamellar vesicles prepared by extrusion. **Biophys. J.** **64**, 443-453.
- Mui, B. L. S., Cullis, P. R., Pritchard, P. H., Madden, T. D. (1994) Influence of plasma on the osmotic sensitivity of large unilamellar vesicles prepared by extrusion **J. Biol. Chem.** **269**, 7364-7370.
- Narahashi, T., Farzier, D. T., Yamada, M. (1970) The site of action and active form of local anesthetics. I. Theory and pH experiments with tertiary compounds. **J. Pharm. Exp. Ther.** **171**, 33-44.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2000) **Lehninger-Principles of Biochemistry**. 3rd.ed. New York: Worth Publishers.
- Ossipov, M. H., Suarez, L. J., Spaulding, T. C. (1988) A comparison of the antinociceptive and behavioral effects of intrathecally administered opiates, α -2-adrenergic agonists and local anesthetics in mice and rats. **Anesth. Analg.** **67**, p.616-624.
- Pinto, L. M. A., Yokaichiya, D. K., Fraceto, L. F., de Paula, E. (2000) Interaction of benzocaine with model membranes. **Biophys. Chem.** **87**, p.213-223.
- Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T., Catterall, W. A. (1994) Molecular determinants of state-dependent block of sodium channels by local anesthetics. **Sci.** **265**, 1724-1728.
-
- (1996) Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic and anticonvulsant block of voltage-gated sodium channels. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **93**, 9270-9275.
- Ragsdale, D. S., Avoli, M. (1998) Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. **Brain Res. Rev.** **26**, 16-28.
- Rajewski, R. A., Stella, V. J. (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo Drug delivery. **J. Pharm. Sci.** **85**, 1142-1169.

- Ranade, V. V. (1989) Drug delivery systems. 1. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. **J. Clin. Pharmacol.** **29**, 685-694.
- Randall, L. O., Selitto, J. J. (1957) A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Archiv. Int. Pharmacodyn.** **CXI**, 409-419.
- Rigon, A. R., Takahashi, R. N. (1996) The effects of procaine, lidocaine and dimethocaine on nociception in mice. **Gen. Pharmac.** **27**, 647-650.
- Rongen, H. A. H., Bult, A., van Bennekom, W. P. (1997) Liposomes and immunoassays. **J. Immunol. Meth.** **204**, 105-133.
- Sawyer, D. C. (1998) Pain control in small-animal patients. **Appl. Animal Behav. Sci.** **59**, 135-146.
- Sharata, H. H., Katz, K. H. (1996) Liposomes. **Int. J. Dermatol.** **35**, 761-769.
- Shaw, D. J. (1991) **Introduction to colloid & surface chemistry**. 4th.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Short, C. E. (1998) Fundamentals of pain perception in animals. **Appl. Animal Behav. Sci.** **59**, 125-133.
- Siddall, P. J., Cousins, M. J. (1995) Pain mechanisms and management: an update. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** **22**, 679-688.
- Simonetti, M. P. B., Valinetti, E. A., Ferreira, F. M. C. (1997) Avaliação da atividade anestésica local da S (-) bupivacaína. Estudo experimental *in vivo* no nervo ciático de rato. **Rev. Bras. Anesthesiol.** **47**, 425-434.
- Skidmore, R. A., Patterson, J. D., Tomsick, R. S. (1996) Local anesthetics. **Dermatol. Surg.** **22**, 511-522.
- Stevens, C. W. (1992) Alternatives to the use of mammals for pain research. **Life Sci.** **50**, 901-912.
- Strichartz, G. R. (1987) **Local anesthetics**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sudo-Havashi, L. S., Bersani-Amado, C. A. (2001) Analgésicos e antipiréticos. In: Oga, S., Tedesco, J. Farmacologia Aplicada. <http://www.farmacologia.com.br> (consultado em 15 de outubro de 2001).
- Thalhammer, J. G., Vladimirova, M., Bershadsky, B., Strichartz, G. R. (1995) Neurologic evaluation of the rat during sciatic nerve block with lidocaine. **Anesthesiol.** **82**, 1013-1025.

- Thompson, K. C. (2000) Pharmaceutical applications of calorimetric measurements in the new millennium. **Thermochimica Acta**. **355**, 83-87.
- Tjølsen, A. (1994) Animals models in pain research. *In*: Svendsen, P., Hau, J. **Handbook of laboratory animal science**. USA: CRC.
- Umbrain, V., Alafandy, M., Bougeois, P., D'Haese, J., Boogaerts, J.G., Goffinet, G., Camu, F., Legros, F. J. (1995) Biodistribution of liposomes afetr extradural administration in rodents. **Br. J. Anaesth.** **75**, 311-318.
- Verdonck. E., Schaap, K., Thomas, L. C. (1999) A discussion of the principles and applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC). **Int. J. Pharm.** **192**, 3-20.
- Way, W. L., Way, E. L., Fields, H. L. Analgésicos e antagonistas opióides. *In*: Katzung, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. (1998) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Wiesenfeld-Hallin, S., Lindblom, U. (1985) The effect of systemic tocinide, lidocaine and bupivacaine on nociception in the rat. **Pain** **23**, 357-360.
- Wildsmith, J. A. W. Gissen, A. J., Takman, B., Covino, B. G. (1987) Differential nerve-blockade: esters vs amides and the influence of pKa. **Br. J. Anaesth.** **59**, 379-384.
- Yu, H-Y., Sun, P., Hou, W-Y. (1998) Prolonged local anesthetic effect of bupivacaine liposomes in rats. **Int. J. Pharm.** **176**, 133-136.
- Zanin, M. H. A., (2001) Preparação e caracterização de lipossomas com a superfície modificada com gangliosídios para uso em imunoterapia. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP.

VIII. COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS

- “Primer Workshop de Biomembranas del Mercosur” realizado na Universidade Nacional de Quilmes (Bernal, Argentina) durante o período de 30 a 1º de dezembro de 2000. “Evaluation of two long action bupivacaine formulations”.
- XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq realizada em Caxambu, MG, durante o período de 19 a 22 de maio de 2001. “Development of long-acting bupivacaine formulations” .
- VI PHARMATECH / International Conference on Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology realizado em Recife, PE, durante o período de 5 a 8 de agosto de 2001. “Preparation and evaluation of drug – delivery systems for mepivacaine and bupivacaine”. Premiado com o “*Honorary award*” por estar entre os cinco melhores trabalhos apresentados por alunos de pós – graduação.

IX. ANEXOS

1. DIÂMETRO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS VESÍCULAS LIPÍDICAS

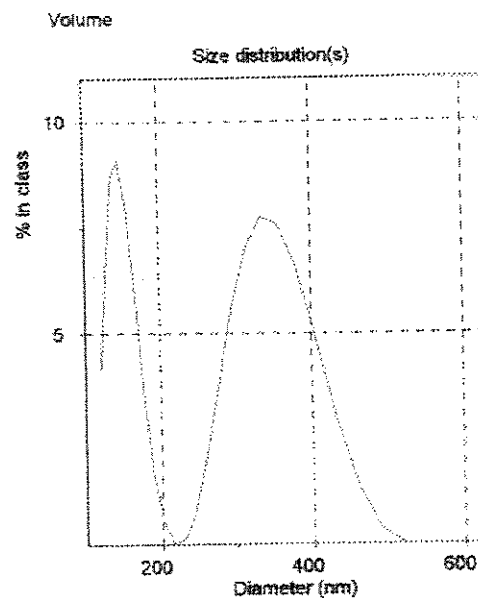
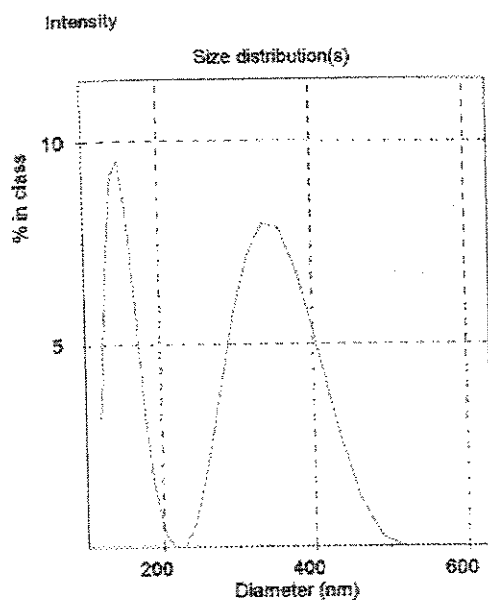
* AMOSTRA: LUV (4 °C)

System

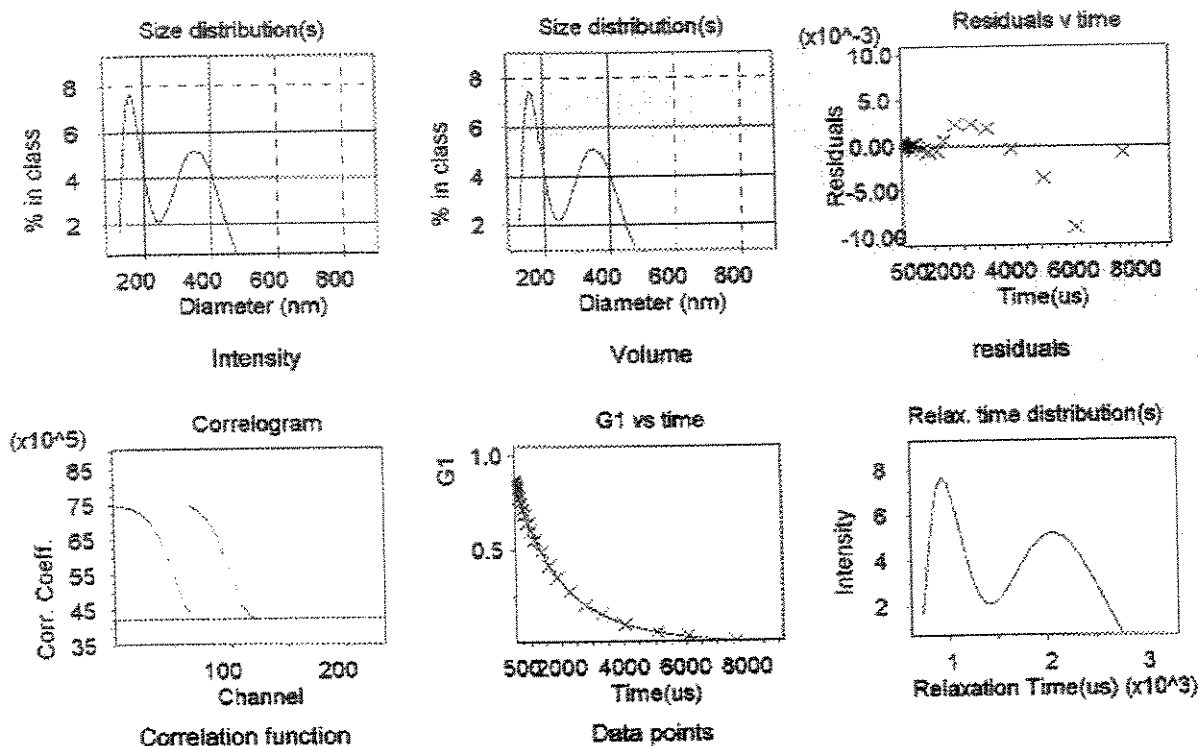
Instrument Type:	Autosizer 4700		
Temperature (°C):	25.0		
Count rate (kCps):	359.3		
Cell Type:	Unknown (-1)		
Detector Angle (deg.):	90.00		
Dispersant RI:	1.33	Wavelength (nm):	633.0
Disp. Viscosity (cP):	0.890		
Date (DMY):	17/09/01		
Time:	16:39:56		

Result

Quality Factor:	Pass	Intensity Mean (nm):	250.2
Z Average Mean(nm):	252.4	Volume Mean (nm):	250.5
Polydispersity:	0.18	Analysis Mode:	Contin



* AMOSTRA: LUV após encapsulação de MVC



Cumulants mean (Z Ave) 244.7 Polydispersity 0.144

SAMPLE TITLES

Title 1st line = luv
 Title 2nd line =
 Title 3rd line = Elaine
 File data from luv4.sz2 Record 1

INSTRUMENT PARAMETERS

Wavelength (nm) = 633
 Temperature = 25.0
 Angle = 90.0
 Autosizer 4700

MEASUREMENT PARAMETERS

Measurement duration (sec) = 203
 Analysis type = Contin
 Number of fitted points = 26
 Spacing ratio = 1.2
 First point used = 9

SAMPLE PARAMETERS

Viscosity (cp) = 0.890
 pH = N/A
 Dispersant RI = 1.331
 Sample RI = 2.700
 Sample Abs. = .00

RESULT PARAMETERS

In Range = 99.4
 Signal/Noise ratio = 75.4
 Fit error = 0.0002
 Analysis range = 100
 Peak 1: Intensity mean 171.8
 Peak 2: Intensity mean 340.9

CORRELATOR PARAMETERS

Corr. Sample time (us) = 1.0
 Dilution factor = 2
 Thousands Counts/sec = 144.3
 Calc. far point 4232964
 Meas. far point 4233194

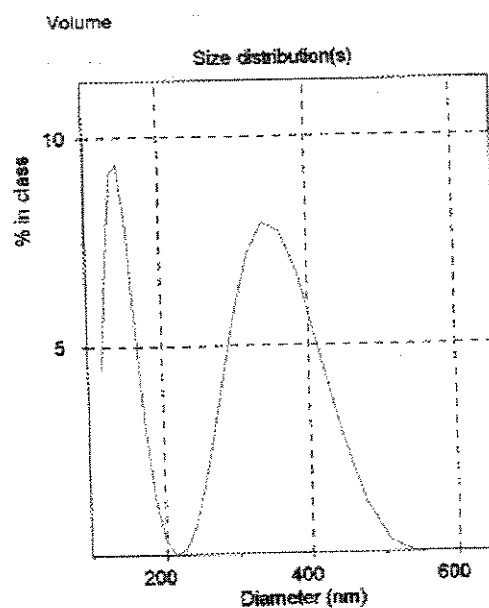
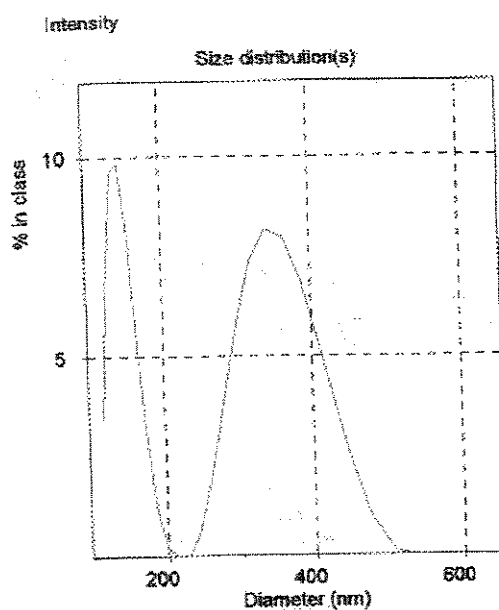
This report printed on 28/06/01 at 13:03:21

*** AMOSTRA: LUV após encapsulação de BVC****System**

Instrument Type:	Autosizer 4700		
Temperature (°C):	25.0		
Count rate (kCps):	353.1		
Cell Type:	Unknown (-1)		
Detector Angle (deg.):	90.00		
Dispersant RI:	1.33	Wavelength (nm):	633.0
Disp. Viscosity (cP):	0.890		
Date (DMY):	17/09/01		
Time:	16:18:41		

Result

Quality Factor:	Pass	Intensity Mean (nm):	249.4
Z Average Mean(nm):	251.9	Volume Mean (nm):	249.7
Polydispersity:	0.19	Analysis Mode:	Contin



* AMOSTRA: LUV (25 °C)

System

Instrument Type:	Autosizer 4700	
Temperature (°C):	25.1	
Count rate (kCps):	336.5	
Cell Type:	Unknown (-1)	
Detector Angle (deg.):	90.00	
Dispersant RI:	1.33	
Disp. Viscosity (cP):	0.888	Wavelength (nm): 633.0
Date (DMY):	17/09/01	
Time:	16:24:33.	

Result

Quality Factor:	Pass
Z Average Mean(nm):	244.1
Polydispersity:	0.20

Intensity Mean (nm):	236.4
Volume Mean (nm):	236.8
Analysis Mode:	Contin

