

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



LUCIANA DE MATOS ALVES PINTO

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES
ANESTÉSICAS LOCAIS DE LONGA DURAÇÃO**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Luciana de Matos
Alves Pinto
e aprovada pela Comissão Julgadora.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Luciana de Matos Alves Pinto".

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

Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

Campinas

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
NR CHAMADA	UNICAMP P658d
V	EX
TOMBO BC/	51214
PROC.	16.837-02
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	88,00
DATA	
Nº CPD	

CM00176264-6

BIBID - 275754

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P658d

Pinto, Luciana de Matos Alves
Desenvolvimento de formulações anestésicas locais de longa duração/
Luciana de Matos Alves Pinto. --
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

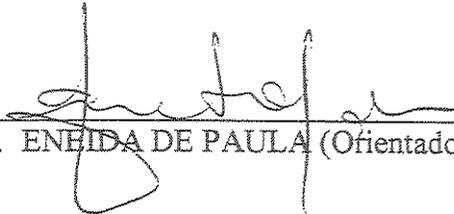
Orientadora: Eneida de Paula
Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de

Biologia.

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

DATA DA DEFESA: 10/09/2002

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. ENÉIDA DE PAULA (Orientadora)



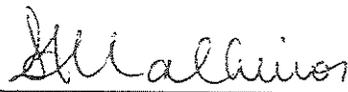
Prof. Dra. GLÓRIA MARIA BRAGA POTERIO



Prof. Dra. MARIA EDWIGES HOFFMAN



Prof. Dra. MARIA HELENA ANDRADE SANTANA

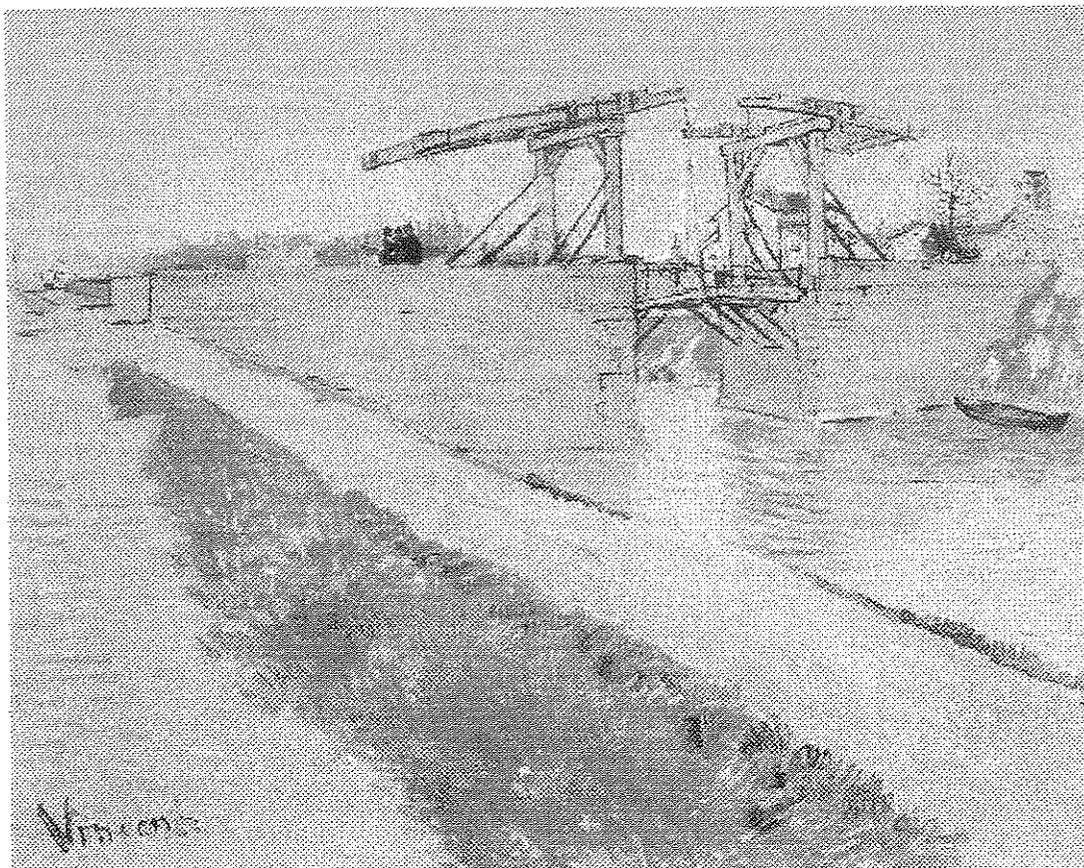


Prof. Dra. SÔNIA VALÉRIA PINHEIRO MALHEIROS MARQUES FERNANDES

Prof. Dr. NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO

Prof. Dra. NILCE CORREA MEIRELLES

200258232



“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino

Ao meu amigo Zeca

... Σ eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos.

Vinicius de Moraes

Gostaria de agradecer...

Aos meus pais Lauro, Cláudia e Nina, pela minha formação.

Aos meus irmãos de sangue Bia e Igor e também meu cunhado Lu, por tanto amor e carinho.

Aos meus irmãos de \heartsuit habitantes da Babilônia: Pô, Zeca, Alê, Cleyton, Granja, pelos jantares, academia, 1,99, colo e farras.

Aos amigos da Bioquímica e agregados: Eneida, Nilce, Bispo, Pô, Mariza, Cleyton, Nonô, Ju, Morango, Haydalina, Sô, Leo, Du, Japipa, Carlos, Maribel, Dani Viu, Jack, Paulo Baldasso, todos os iniciantes, pelo auxílio, amizade e ótimo ambiente de trabalho.

Às meninas da A5 e trupe: Hayda, Rachel, Manu, Ana, Carol, Lili, Adna etc por tantos risos e festas.

Aos meninos da A4: Jura, Glau, Danilo, Domingos por cuidarem de mim tão bem.

À Ruth *et al*, danker.

À Helena, thanks.

À Marizoca, sempre presente, apesar da distância.

Ao Mac, no começo e no fim.

Ao Jura pelas poesias, músicas, pinturas...

Ao Glau, pelo carinho.

Aos amigos de fora: Suzi/Edson, Di, Naná, Siroes, que me receberam tão bem.

Ao Bispo, por sempre arrumar um programinha na rede pra solucionar meus problemas.

Ao meu irmão Zeca, por me fazer acreditar que sempre se pode dar a volta por cima.

À Helenice por cuidar da minha casa tão bem.

À fiel Dorotéia, por espantar visitas indesejadas.

À Eneida, por tantas oportunidades e confiança no trabalho.

Ao povo da FEQ: Maria Helena, Heron, Maria Helena Zanin, Elaine...

Ao Laboratório de cultura de células: Patrícia, Neto e Dra Marcela.

Ao Departamento de Farmacologia/FCM: Renata, Donato.

À Thelma, do Síncrotron, pela ajuda no RMN, no paper e acolhida em Oxford.

À CAPES e FAPESP pela ajuda financeira.

Enfim, a todos que passaram por mim e fizeram parte dessa minha história!!!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIACÕES	xix
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
I) INTRODUÇÃO	1
1) TENTANDO DEFINIR A DOR – DOR AGUDA X DOR CRÔNICA	1
2) ALÍVIO DA DOR	1
3) HISTÓRIA DA ANESTESIA LOCAL	2
4) MECANISMO DE AÇÃO DOS AL	5
5) ESTRUTURA QUÍMICA E PROPRIEDADES CLÍNICAS DOS ANESTÉSICOS LOCAIS	8
6) ANESTÉSICOS LOCAIS UTILIZADOS NA CLÍNICA: BENZOCAÍNA, BUPIVACAÍNA E LIDOCAÍNA	10
6.1) BENZOCAÍNA	10
6.2) BUPIVACAÍNA	11
6.3) LIDOCAÍNA	12
7) COMO MINIMIZAR OS EFEITOS TÓXICOS E AUMENTAR A DURAÇÃO DA AÇÃO ANESTÉSICA?	13
8) USO DE LIPOSSOMAS NA TECNOLOGIA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	14

9) USO DE CICLODEXTRINAS NA TECNOLOGIA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	17
II) OBJETIVOS	21
III) MATERIAIS E MÉTODOS	22
1) PREPARO DOS LIPOSSOMAS	22
2) CARACTERIZAÇÃO DA ENCAPSULAÇÃO DOS AL	23
2.1) DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS VESÍCULAS	23
2.2) DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS	24
2.3) DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO	24
3) PREPARO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ANESTÉSICOS EM β -CICLODEXTRINA	25
4) CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO AL/ β -CD	26
4.1) CÁLCULOS COMPUTACIONAIS UTILIZANDO MECÂNICA MOLECULAR	26
4.2) CINÉTICA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO AL/ β -CD	32
4.3) CÁLCULO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO BZC/ β -CD UTILIZANDO ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE	33
4.4) DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA DO COMPLEXO BZC/ β -CD	34

4.4.1) MÉTODO DE VARIAÇÃO CONTÍNUA	34
4.4.2) FLUORESCÊNCIA	35
4.5) AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA	35
4.6) AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	36
4.7) INTERAÇÃO BZC/ β -CD POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO	36
5) TESTES BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	37
5.1) HEMÓLISE	37
5.1.1) ENSAIO HEMOLÍTICO ISOTÔNICO	37
5.1.2) ENSAIO HEMOLÍTICO HIPOTÔNICO	38
5.2) TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	39
5.3) ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS	40
6) TESTES BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	41
IV) RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
1) ANESTÉSICOS LOCAIS ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS	42
1.1) DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS VESÍCULAS	42
1.2) DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO	43

2) ANESTÉSICOS LOCAIS COMPLEXADOS EM β -CD	44
2.1) CÁLCULOS COMPUTACIONAIS UTILIZANDO MECÂNICA MOLECULAR	44
2.1.1) ESTEQUIOMETRIA 1:1	45
2.1.1) ESTEQUIOMETRIA 1:2	53
2.2) CINÉTICA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO AL/ β -CD	57
2.3) Cálculo da Constante de Associação do Complexo BZC/ β -CD Utilizando Isotermas de Solubilidade	58
2.4) DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA DO COMPLEXO BZC/ β -CD POR FLUORESCÊNCIA	60
2.5) Calorimetria Diferencial de Varredura	63
2.6) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	68
2.7) AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ESPACIAL DO COMPLEXO DE INCLUSÃO BZC/ β -CD POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO	73
2.7.1) ^1H RMN MONODIMENSIONAL	73
2.7.2) ^1H RMN BIDIMENSIONAL	78
3) TESTES BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	81
3.1) HEMÓLISE	81
3.1.1) ENSAIO HEMOLÍTICO ISOTÔNICO	81
3.1.2) ENSAIO HEMOLÍTICO HIPOTÔNICO	88
3.2) TESTES DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	95

3.3) ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS	99
4) TESTES BIOLÓGICOS IN VIVO	101
V) CONCLUSÕES	102
VI) PERSPECTIVAS FUTURAS	105
VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
VIII) TRABALHOS APRESENTADOS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS	118
IX) PUBLICAÇÕES	121

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1** Organização estrutural do canal de sódio. **A e B)** subunidade α com os quatro domínios e os seis segmentos; **C)** conformações durante a propagação do potencial de ação e restabelecimento da polaridade da membrana (adaptado de Nelson & Cox, 2000).....6
- Fig. 2** Estrutura química da Benzocaína.....11
- Fig. 3** Estrutura química da Bupivacaína.....12
- Fig. 4** Estrutura química da Lidocaína.....13
- Fig. 5** Representação esquemática de um lipossoma unilamelar: as moléculas hidrofílicas podem ser encapsuladas no centro aquoso da vesícula, as hidrofóbicas se inserem na bicamada enquanto as moléculas anfifílicas ficam com sua porção apolar inserida na bicamada e sua porção polar voltada para o meio aquoso externo ou interno.....16
- Fig. 6** Estrutura da β -ciclodextrina, apresentando sete monômeros de glicose....19
- Fig. 7** Representação esquemática da geometria molecular da β -CD, onde o número de unidades glicopiranosídicas é igual a 7.....30
- Fig. 8** Orientação relativa à entrada da molécula de ácido benzóico na cavidade hospedeira da β -CD (Salvatierra *et al.*, 1996).....31
- Fig. 9** Tipos de isotermas de solubilidade. S_0 = solubilidade do *guest* na ausência de CD; S_t = concentração do *guest* dissolvido (livre + complexado); S_C = solubilidade limite do complexo pouco solúvel; Tipos de isotermas A_P , A_L e A_N = complexos muito solúveis (limite de solubilidade determinado pela solubilidade da CD); Isoterma B_S = é formado complexo de solubilidade limitada; Isoterma B_I = complexo insolúvel é formado (Fromming & Szejtli, 1994).....33
- Fig. 10** Otimização da estrutura da β -ciclodextrina utilizando o software HYPER CHEM.....46
- Fig. 11** Otimização da estrutura da Benzocaína utilizando o software HYPER CHEM.....47
- Fig. 12** Associação de menor energia observada para o complexo de inclusão BZC/ β -CD 1:1.....48

- Fig. 13** Otimização da estrutura da Bupivacaína utilizando o software HYPER CHEM. **A)** Posição equatorial do anel piperidínico; **B)** Posição axial do anel piperidínico.....49
- Fig. 14** Associação de menor energia observada para o complexo de inclusão BVC/ β -CD 1:1.....50
- Fig. 15** Otimização da estrutura da Lidocaína utilizando o software HYPER CHEM...51
- Fig. 16** Associação de menor energia observada para o complexo de inclusão LDC/ β -CD 1:1.....52
- Fig. 17** Associação de menor energia observada para o complexo de inclusão BVC/ β -CD 1:2.....55
- Fig. 18** Associação de menor energia observada para o complexo de inclusão LDC/ β -CD 1:2.....57
- Fig. 19** Isoterma de solubilidade de BZC em presença de concentrações crescentes de β -CD.....59
- Fig. 20 A)** Espectros de emissão de fluorescência de BZC complexada em β -CD na razão molar de 0 a 0,5. Os valores de r (razão molar BZC/ β -CD) são mostrados no gráfico.....61
B) Espectros de emissão de fluorescência de BZC complexada em β -CD na razão molar de 0,5 a 1,0. Os valores de r (razão molar BZC/ β -CD) são mostrados no gráfico.....61
- Fig. 21** Gráfico de variação contínua (*Job plot*) de BZC/ β -CD. A inflexão em $r = 0,5$ indica complexação na razão molar BZC/ β -CD = 1:1.....62
- Fig. 22** Termogramas de calorimetria diferencial de varredura das amostras: **(A)** β -CD, **(B)** BZC, **(C)** complexo de inclusão BZC/ β -CD 1:1, **(D)** mistura física BZC/ β -CD 1:1, **(E)** complexo de inclusão BZC/ β -CD 1:2 e **(F)** mistura física BZC/ β -CD 1:2.....64
- Fig. 23** Termogramas de calorimetria diferencial de varredura das amostras: **(A)** complexo de inclusão BVC/ β -CD 1:1, **(B)** complexo de inclusão BVC/ β -CD 1:2, **(C)** BVC, **(D)** β -CD, **(E)** mistura física BVC/ β -CD 1:1 e **(F)** mistura física BVC/ β -CD 1:2.....65
- Fig. 24** Termogramas de calorimetria diferencial de varredura das amostras: **(A)** complexo de inclusão LDC/ β -CD 1:1, **(B)** mistura física LDC/ β -CD 1:1, **(C)** complexo de inclusão LDC/ β -CD 1:2, **(D)** mistura física LDC/ β -CD 1:2, **(E)** β -CD e **(F)** LDC.....65

- Fig. 25** Microscopia eletrônica de varredura de cristais de β -CD. Aumento de 1500 x..... 68
- Fig. 26** Microscopia eletrônica de varredura **A)** BZC; **B)** complexo BZC/ β -CD 1:1; **C)** mistura física BZC/ β -CD 1:1; **D)** complexo BZC/ β -CD 1:2; **E)** mistura física BZC/ β -CD 1:2. Aumento de 1500 x.....69
- Fig. 27** Microscopia eletrônica de varredura **A)** BVC; **B)** complexo BVC/ β -CD 1:1; **C)** mistura física BVC/ β -CD 1:1; **D)** complexo BVC/ β -CD 1:2; **E)** mistura física BVC/ β -CD 1:2. Aumento de 1500 x.....70
- Fig. 28** Microscopia eletrônica de varredura **A)** LDC; **B)** complexo LDC/ β -CD 1:1; **C)** mistura física LDC/ β -CD 1:1; **D)** complexo LDC/ β -CD 1:2; **E)** mistura física LDC/ β -CD 1:2. Aumento de 1500 x.....71
- Fig. 29** Espectro de ^1H RMN (500 MHz) de BZC em D_2O , β -CD em D_2O e do complexo BZC/ β -CD na razão molar 1:1. O pico da água residual (HDO) foi ajustado em 4,70 ppm.....73
- Fig. 30** Estrutura química e atribuição dos prótons da BZC (esquerda) e β -CD (direita).....75
- Fig. 31** ^1H RMN – Detalhe espectral da região de 6 a 8 ppm, mostrando os picos dos prótons aromáticos da BZC: em D_2O (espectro inferior) e após a complexação com β -CD (superior)..... 77
- Fig. 32** ^1H RMN – Detalhe espectral mostrando os prótons H2 a H6 da β -CD: em D_2O (espectro inferior) e após a complexação com BZC (espectro superior).....77
- Fig. 33** ^1H RMN – Espectro bidimensional do Efeito Nuclear Overhauser (ROESY) de BZC/ β -CD. Tempo de mixing = 60 ms.....78
- Fig. 34** Modelo de inserção da BZC na cavidade da β -CD proposto por modelagem molecular. As distâncias entre os prótons aromáticos da BZC e H5 são mostradas.....80
- Fig. 35** Curva de hemólise induzida por BZC, utilizando DMSO como solvente, em PBS 5mM pH 7,4 em eritrócitos. Ht = 0,15%, tempo de incubação = 30 min, Csat = 16,6 mM, Csol = 22,4 mM.....82
- Fig. 36** Curva de hemólise induzida por BVC em PBS 5mM pH 7,1 em eritrócitos. Ht = 0,15 %, tempo de incubação = 30 min, Csat = 6,7 mM, Csol = 10,1 mM.....83

- Fig. 37** Curva de hemólise induzida por LDC em PBS 5mM pH 7,4 em eritrócitos. Ht = 0,15 %, tempo de incubação = 30 min, Csat = 89,1 mM, Csol = 100,1 mM.....83
- Fig. 38** Curva de hemólise induzida por BVC/Lip em PBS 5mM pH 7,4 em eritrócitos. Ht = 0,15 %, tempo de incubação = 40 min, Csat = 6,9 mM...84
- Fig. 39** Curva de hemólise induzida por β -CD em PBS 5mM pH 7,4 em eritrócitos. Ht = 0,15 %, tempo de incubação = 1h, Csat = 1,4 mM, Csol = 4,8 m.....85
- Fig. 40** Curva de hemólise induzida por BVC/ β -CD (1:1) em PBS 5mM pH 7,4 em eritrócitos. Ht = 0,15 %, tempo de incubação = 1h, Csat = 1,1 mM, Csol = 2,8 mM.....86
- Fig. 41** Curva de hemólise induzida por LDC/ β -CD (1:1) em PBS 5mM pH 7,4 em eritrócitos. Ht = 0,15 %, tempo de incubação = 1h, Csat = 1,7 mM, Csol = 3,8 mM.....87
- Fig. 42** Efeito protetor da BZC contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 30 min, Cprot = 13 mM.....88
- Fig. 43** Efeito protetor da BVC contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 30 min, Cprot = 1,0 mM.....89
- Fig. 44** Efeito protetor da LDC contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 30 min, Cprot = 160,2 mM.....90
- Fig. 45** Efeito protetor de BVC/Lip contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 40 min, Cprot = 2,6 mM.....91
- Fig. 46** Efeito protetor de LDC/Lip contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 40 min, Cprot = 156,1 mM.....91
- Fig. 47** Efeito protetor de BZC/ β -CD contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 1h, Cprot = 0,8 mM.....92
- Fig. 48** Efeito protetor de BVC/ β -CD contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 1h, Cprot = 0,3 mM.....93

- Fig. 49** Efeito protetor de LDC/ β -CD contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 1h, C_{prot} = 0,2 mM.....93
- Fig. 50** Inibição da agregação induzida por ADP promovida por BZC, BZC/Lip e BZC/ β -CD.....96
- Fig. 51** Inibição da agregação induzida por ADP promovida por BVC, BVC/Lip e BVC/ β -CD.....97
- Fig. 52** Inibição da agregação induzida por ADP promovida por LDC, LDC/Lip e LDC/ β -CD.....97
- Fig. 53** Viabilidade celular após tratamento com Lipossomas durante 24h. Parâmetro avaliado: MTT.....99
- Fig. 54** Viabilidade celular após tratamento com β -CD durante 24h. Parâmetro avaliado: MTT.....99
- Fig. 55** Viabilidade celular após tratamento com BZC/Lip (●), BZC/ β -CD (▲) e BZC (■) durante 24h. Parâmetro avaliado: MTT.....100

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Estrutura química de alguns anestésicos locais.....	4
Tabela 2 Propriedades dos anestésicos locais.....	9
Tabela 3 Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas (Loftsson & Brewster, 1996; Matioli, 2000).....	18
Tabela 4 Distribuição média do tamanho das vesículas medido por espalhamento de luz quasi-elástico.....	42
Tabela 5 Eficiência de encapsulação de anestésicos locais em lipossomas multilamelares. Tampão HEPES 20 mM, pH 7,4.....	43
Tabela 6 Resultados obtidos por cálculos com campos de força MM+ e OPLS. Valores de $E_{\text{afinidade}}$ (Kcal.mol ⁻¹) na estequiometria 1:1 BZC/ β -CD.....	47
Tabela 7 Resultados obtidos por cálculos com campos de força MM+ e OPLS. Valores de $E_{\text{afinidade}}$ (Kcal.mol ⁻¹) na estequiometria 1:1 BVC/ β -CD.....	49
Tabela 8 Resultados obtidos por cálculos com campos de força MM+ e OPLS. Valores de $E_{\text{afinidade}}$ (Kcal.mol ⁻¹) na estequiometria 1:1 LDC/ β -CD.....	51
Tabela 9 Resultados obtidos por cálculos com campos de força MM+ e OPLS. Valores de $E_{\text{afinidade}}$ (Kcal.mol ⁻¹) na estequiometria 1:2 BVC/ β -CD.....	54
Tabela 10 Resultados obtidos por cálculos com campos de força MM+ e OPLS. Valores de $E_{\text{afinidade}}$ (Kcal.mol ⁻¹) na estequiometria 1:2 LDC/ β -CD.....	56
Tabela 11 Tempo médio observado para a formação dos complexos de inclusão em β -CD.....	58
Tabela 12 Temperatura de transição e ΔH observados por DSC.....	67
Tabela 13 ¹ H RMN – Atribuição e deslocamentos químicos dos prótons da β -CD, antes e após a complexação com BZC.....	75
Tabela 14 ¹ H RMN – Atribuição e deslocamentos químicos dos prótons da BZC, antes e após a complexação em β -CD.....	76
Tabela 15 <i>Cross-peaks</i> encontrados na análise do experimento de ROESY do sistema BZC/ β -CD, com um tempo de <i>mixing</i> de 60 ms (espectrômetro de 500 MHz).....	79

Tabela 16 Concentração de droga para proteção contra hemólise hiposmótica (C _{prot}), início (C _{sat}) e solubilização completa (C _{sol}) em condições isotônicas.....	94
Tabela 17 Inibição da agregação induzida por ADP.....	95
Tabela 18 Inibição da agregação induzida por ADP – Efeito dos AL, em diferentes concentrações.....	98
Tabela 19 Inibição da agregação induzida por ADP – Efeito dos AL encapsulados em lipossomas ou complexados em β -CD na razão molar 1:1.....	98

LISTA DE ABREVIÇÕES

AL – Anestésico Local

BVC – Bupivacaína

BZC – Benzocaína

β -CD – β -Ciclodextrina

DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura

EPC – Fosfatidil Colina de Ovo

LDC – Lidocaína

Lip – Lipossoma

LUV – Lipossoma Unilamelar Grande

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MLV – Lipossoma Multilamelar

MM – Mecânica Molecular

MTT– Brometo de Tetrazolium 3 - (4,5 - Dimetiltiazol-2-il) - 2,5 - Bifenil

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SUV – Lipossoma Unilamelar Pequeno

vdW – Interações de van der Waals

RESUMO

A dor crônica ou aguda pode ser controlada utilizando-se anestésicos locais (AL), substâncias que agem ao longo dos axônios impedindo a transmissão do estímulo nervoso. Os AL são moléculas anfifílicas e por isso seu mecanismo de ação é modulado por interações com a bicamada lipídica, além de com a proteína canal de sódio voltagem-dependente dos axônios.

Muitos AL utilizados clinicamente apresentam toxicidade que é proporcional a potência, sendo um grande desafio o desenvolvimento de medicamentos mais potentes e menos tóxicos. A modificação da molécula anestésica por síntese química é uma alternativa interessante, mas hoje em dia muitos trabalhos estão voltados para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas. A adição em veículos viscosos, encapsulação em lipossomas ou microesferas e a complexação em ciclodextrinas são exemplos promissores da tecnologia desenvolvida atualmente no sentido de minimizar fatores de risco para os pacientes, além de aumentar a potência medicamentosa, diminuindo a frequência de aplicação do medicamento.

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de formulações anestésicas locais de longa duração, com Benzocaina (BZC) encapsulada em lipossomas ou complexada com β -ciclodextrina e o preparo e caracterização de formulações similares de Bupivacaina (BVC) e Lidocaina (LDC) visando a redução da toxicidade dos ALs e prolongamento da duração da anestesia através da liberação controlada dos fármacos.

Foram realizados testes de caracterização físico-química quanto à estabilidade e eficácia, além de testes de citotoxicidade *in vitro*, comparando-se com formulações convencionais. Os anestésicos também foram comparados entre si e em relação aos veículos utilizados.

No caso da Benzocaina, a formulação em ciclodextrina mostrou-se menos tóxica em ensaios *in vitro* além de levar a um aumento significativo da solubilidade aquosa do AL, permitindo sua utilização por via infiltrativa, como os demais AL. Testes de toxicidade *in vitro* demonstraram que houve uma diminuição geral da toxicidade das formulações contendo LDC e BVC. Com isto, a formulação de LDC em lipossomas e a de BVC em ciclodextrina também são promissoras quanto à diminuição da toxicidade e aumento do tempo de ação de anestesia.

ABSTRACT

Chronic and acute pain can be treated with local anesthetics (LA), drugs that act along the axon fiber blocking the nervous impulse propagation. Since LA are amphiphilic molecules their mechanism of action is modulated by interactions with the lipid membrane phase, besides specific binding to the voltage-gated Na⁺ channels in the axons.

Many clinically used LA are toxic and a great challenge nowadays consists in the development of new drugs with increased potency and decreased toxicity.

The development of new systems for the controlled release of LA is a strategy to increase the anesthetic potency without increasing its toxicity, minimizing risk-factors and decreasing the drugs' frequency of use. Chemical synthesis is an interesting alternative to discover new potential LA drugs, but nowadays the approach towards this aim is the encapsulation of LA into liposomes or either the complexation with Cyclodextrins (CD).

Here we report results on the encapsulation in liposomes and complexation in β -CD of Benzocaine (BZC), Bupivacaine (BVC) and Lidocaine (LDC), three clinically used LA, in order to reduce their toxicity and increase the potency.

The formulations were characterized using different physico-chemical techniques in relation to the stability and efficacy. *In vitro* tests were used to access the cytotoxicity of the formulations in comparison to the commercial LA formulation.

Benzocaine's formulation in cyclodextrin was less toxic to *in vitro* assays and increased the aqueous solubility of the LA, leading to an infiltrative solution as well as the other LA.

Toxicity tests *in vitro* demonstrated that a general decrease of the toxicity in the formulations containing LDC and BVC was achieved. The liposomal LDC formulation and the cyclodextrin BVC formulation are promising in relation to the decrease in the toxicity and to prolong the anesthesia.

D) INTRODUÇÃO

1) TENTANDO DEFINIR A DOR – DOR AGUDA X DOR CRÔNICA

Todo habitante deste planeta já sentiu, em algum momento da vida, sensações físicas ou emocionais que foram relatadas como Dor. Mas afinal, como poderíamos definir a dor? Diz o poeta que “*toda dor vem do desejo de não sentirmos dor...*”.

Neste caso a dor seria um sinal de que algo no organismo não está funcionando como deveria...

Segundo a literatura especializada, a dor pode ser definida como “*uma experiência sensorial ou emocional desagradável, proveniente de lesão tecidual, contusão ou estado orgânico anômalo*” (Ferreira, 1993). Os eventos eletrofisiológicos que acontecem no sistema nervoso sensorial, após o comprometimento tecidual, são referidos como *nociceptivos*, somente tornando-se dor quando ocorre a noção de consciência. Um paciente sem lesão tecidual periférica pode descrever sintomas devido a esta lesão. Na maioria dos casos de dor aguda, existe um sítio muito óbvio de comprometimento tecidual, mas em muitos pacientes com dor crônica, a origem da dor pode estar obscura, e com freqüência fatores fisiológicos apresentam uma contribuição significativa para a condição de dor como um todo (Adams & Cashman, 1994).

A dor aguda ou *nociceptiva* é causada por dano ao tecido: uma martelada no dedo, um osso quebrado, uma queimadura ou uma incisão cirúrgica. A dor aguda responde bem aos analgésicos, opióides ou bloqueio nervoso; ela pode ser intensa mas normalmente melhora ao longo dos dias. Já a dor crônica difere da aguda pois persiste por longo tempo após o dano inicial ter sido curado (de Jong, 1994).

2) ALÍVIO DA DOR

Apesar de incômoda, a dor desempenha uma função biológica essencial. É a resposta do organismo a um trauma existente ou potencial. Porém, algumas vezes o sofrimento doloroso perde sua função biológica e começa a representar uma conseqüência insuportável aos estados patológicos que a originaram. Por isso, a necessidade de desenvolver novos métodos de tratamento com o objetivo de aliviar ou eliminar a dor tem sido um desafio atual (Stevens, 1992). Então como controlar a dor?

O uso de anestésicos e analgésicos é relatado como eficaz no combate à dor. Mas qual a diferença entre anestesia e analgesia?

Numa definição para a anestesia, podemos dizer que ela é a arte ou ciência de retirar a sensação a um procedimento cirúrgico ou não. Anestesia significa a perda de todas as modalidades de sensação, quer seja o sentido da dor, tato, temperatura ou posição. Já o termo analgesia caracteriza apenas a ausência da sensação dolorosa, embora outras modalidades de sensação possam estar preservadas (Adams & Cashman, 1994).

Há duas classes de anestésicos descritas: os anestésicos locais (objetos dessa tese) e os anestésicos gerais, usados de acordo com o tipo de intervenção cirúrgica.

Os anestésicos gerais são drogas que agem nas transmissões sinápticas. Eles podem ser administrados por diversas vias, porém a administração por via intravenosa ou por inalação é preferida, porque a dose eficaz e o tempo de ação são mais previsíveis quando tais técnicas são utilizadas. Eles também possuem propriedade analgésica, mas a esta é adicionada a inconsciência, amnésia e a perda da motricidade, mantendo-se apenas as funções vitais como circulação sanguínea e respiração (Catteral & Mackie, 1996).

No caso dos anestésicos locais (AL) uma das características é a perda de sensação numa área circunscrita do corpo, sem perda de consciência (de Jong, 1994), devido à depressão da excitabilidade das terminações nervosas ou à inibição da condução nos tecidos nervosos periféricos (Covino & Vassalo, 1985). Sua ação se dá na inibição da condução do estímulo nervoso, quando aplicados localmente sobre este tecido, em concentrações elevadas. Agem sobre os axônios em qualquer parte do sistema nervoso e em todo tipo de fibra nervosa. Suas principais vias de administração são: anestesia epidural, bloqueios de plexos nervosos, além da administração local tópica, em odontologia, em dermatologia e em pequenas incisões.

3) HISTÓRIA DA ANESTESIA LOCAL

O primeiro anestésico de ação local a ser clinicamente utilizado foi a Cocaína, um alcalóide contido em grandes quantidades (0,6 a 1,8 %) nas folhas da *Erythroxylon coca*, um arbusto que cresce em grandes altitudes nas montanhas dos Andes. O alcalóide puro foi isolado pela primeira vez em 1860 por Niemann, porém seu uso

clínico foi iniciado realmente por Sigmund Freud e Karl Koller, em 1884 (Covino & Vassalo, 1985; Vandam, 1987). A neurotoxicidade, a toxicidade sistêmica e o potencial para o vício da Cocaína foram logo reconhecidos, tendo sido iniciada uma pesquisa para a busca de novos AL, menos tóxicos. Disto resultou a síntese da Procaína (um derivado do ácido benzóico) por Einhorn, em 1905. Como ela exibia uma curta duração de ação, provocava toxicidade sistêmica e reações alérgicas ocasionais, novos anestésicos locais foram sendo sintetizados e testados (Vandam, 1987). Assim, surgiram no mercado outros análogos da Procaína, como a Clorprocaína e a Tetracaína (**Tabela 1**) esta última com ação mais duradoura (meia-vida de 2,5 h) e 16 vezes mais potente que a Procaína (Covino & Vassalo, 1985). Além destes a Benzocaína, que tem como característica ser um éster não ionizável em pH fisiológico teve seu uso introduzido na anestesia tópica. A rápida metabolização dos AL do tipo éster por esterases sanguíneas era um fator limitante à sua aplicação, o que impulsionou a busca de novos compostos com atividade anestésica, levando a síntese dos AL tipo amino-amidas. O primeiro composto comercial desta família, a Lidocaína, foi sintetizado em 1943 por Löfgren (Covino & Vassalo, 1985; Vandam, 1987). As amino-amidas são menos potentes que os amino-ésteres (Covino & Vassalo, 1985) porém seu grau de toxicidade - em geral associado à interação não específica com outros canais iônicos membranares, além do de sódio - é relativamente menor.

A **Tabela 1** revela AL de uso clínico, mostrando compostos da família dos ésteres (Benzocaína), amino-ésteres (Procaína, Clorprocaína e Tetracaína), amino-amidas cíclicas (Mepivacaína, Ropivacaína e Bupivacaína) e não cíclicas (Lidocaína, Prilocaína, Etidocaína e Dibucaína). A procura por anestésicos do tipo amino-amida mais potentes, e com um grau de toxicidade mais baixo direcionou, nos anos 90, à síntese de estereoisômeros, como a Ropivacaína, uma amino-amida (de Jong, 1994) sintetizada e comercializada na forma do seu isômero S (-). Estudos usando diferentes isômeros de anestésicos locais mostram que a forma (S) é menos tóxica e causa maior duração no bloqueio nervoso, particularmente nas infiltrações anestésicas (Arvidsson *et al.*, 1994).

Tabela 1 Estrutura química de alguns anestésicos locais.

Anestésico	Abrev	R ₁	R ₂	X	Estrutura química base
Benzocaína	BZC	- H	- CH ₃	- H	
Procaína	PRC	- H	- CH ₂ -N(C ₂ H ₅) ₂	- H	
Clorprocaína	CLP	- H	- CH ₂ -N(C ₂ H ₅) ₂	- Cl	
Tetracaína	TTC	- C ₄ H ₉	- CH ₂ -N(CH ₃) ₂	- H	
Lidocaína	LDC	- CH ₃			
Prilocaina	PLC	- H			
Etidocaína	EDC	- CH ₃			
Mepivacaína	MVC	- CH ₃			
Ropivacaína	RVC	- CH ₃			
Bupivacaína	BVC	- CH ₃			
Dibucaína	DBC				

4) MECANISMO DE AÇÃO DOS AL

Os anestésicos locais têm como seu local de ação a membrana celular onde bloqueiam a condução nervosa. Fisiologicamente a excitação da membrana nervosa causa ativação da proteína canal de sódio voltagem-dependente, uma glicoproteína integral de membrana presente em altas concentrações nas membranas dos axônios (**Fig. 1**). Em geral ela consiste de uma subunidade α central e duas subunidades auxiliares menores, denominadas de $\beta 1$ e $\beta 2$. A subunidade α é o componente estrutural mais importante do canal de sódio e forma o poro por onde haverá a condução iônica, os "portões" de ativação e inativação; as subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ não estão presentes em algumas espécies como em enguias e no coração de galinha (Caterall, 1992). Também é onde se encontram os sítios de ligação de várias neurotoxinas e drogas terapêuticas. A subunidade α é formada por quatro domínios homólogos (I-IV), cada um composto por seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) que atravessam a membrana como α -hélices (Li *et al.*, 1999).

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 esse canal se abre, fazendo com que haja influxo de sódio e, por conseguinte levando à despolarização da membrana.

Entre a região despolarizada e a adjacente haverá a formação de um dipolo e a corrente de sódio percorrerá toda a extensão do axônio. Logo após, onde houve a despolarização, a membrana inicia a repolarização com a saída de íons potássio por seus canais específicos. A ação da bomba de sódio e potássio ATP-ase promove o restabelecimento das concentrações iônicas de repouso (Carvalho, 1994; Anger *et al.*, 2001), completando o processo.

Assim, ocorre o impulso nervoso e o sinal elétrico é transmitido ao longo do axônio, unidirecionalmente.

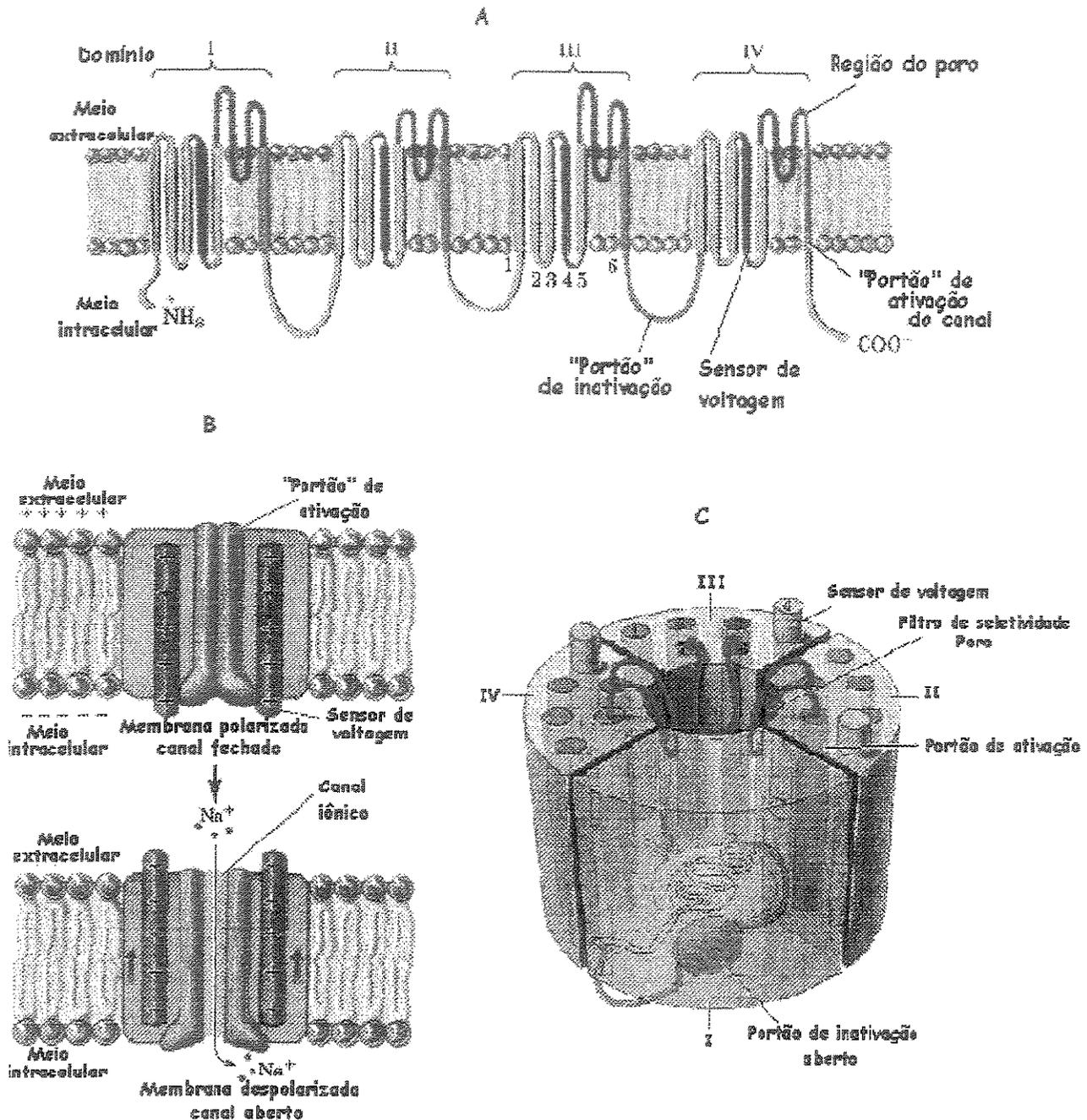


Fig. 1 Organização estrutural do canal de sódio. **A e B)** subunidade α com os quatro domínios e os seis segmentos; **C)** conformações durante a propagação do potencial de ação e restabelecimento da polaridade da membrana (adaptado de Nelson & Cox, 2000).

Por serem moléculas anfifílicas, os AL tem grande afinidade pela membrana celular. Eles 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 à modificações conformacionais na proteína-canal de sódio voltagem-dependente) e/ou a interação específica dos compostos anestésicos locais com os canais de sódio (Covino & Vassalo, 1985).

Até o presente não estão completamente elucidados o mecanismo de ação dos AL nem as exatas características da ligação dos mesmos ao canal de sódio voltagem-dependente dos axônios. AL ligam-se a diferentes proteínas membranares como: calmodulina, canais de potássio, receptores de acetilcolina, ATP-ases, citocromo oxidase, proteína G, entre outras. Uma boa revisão sobre a interação desses compostos com proteínas e com a fase lipídica membranar foi publicada por de Paula & Schreier (1996).

Na tentativa de interpretar o mecanismo de anestesia, destacamos a hipótese do lipídio que considera a importância da hidrofobicidade dos compostos anestésicos como sendo responsável pela interação de grandes quantidades de AL com os fosfolipídios das membranas - dos neurônios e das células da glia (bainha de mielina) - criando um "reservatório" local de moléculas de anestésico, disponíveis para ligação ao canal de sódio, enquanto ocorre o *clearance* sanguíneo do anestésico. Esta teoria também propõe que o anestésico local, por sua atividade na superfície da membrana, produza uma alteração no empacotamento da bicamada fosfolipídica causando uma modificação conformacional nos canais de sódio, levando à inativação temporária.

Quanto à interação com o canal de sódio voltagem-dependente, acredita-se haver mais de um sítio de ligação (Butterworth & Strichartz, 1990). Ressaltamos o efeito anestésico da aplicação de AL protonados na face interna de axônios (Narahashi & Yamada, 1969) como indicativo de um sítio específico para o anestésico carregado e os trabalhos do grupo de Catteral (Ragsdale *et al.*, 1994 e 1996) que detectaram por mutação sítio dirigida um sítio hidrofóbico no canal de sódio, que seria ocupado pela forma neutra (desprotonada) dos AL (Li *et al.*, 1999).

Seja qual for o mecanismo de ação, os AL parecem estabilizar o canal de sódio no estado inativado (Butterworth & Strichartz, 1990) justificando seu efeito de impedir a propagação do potencial de ação ao longo do axônio.

Dessa forma, propõe-se atualmente que os anestésicos locais atuam como reguladores alostéricos da proteína-canal de sódio podendo ligar-se a diferentes regiões e afetar direta ou indiretamente as funções do mesmo (Ragsdale *et al.*, 1994, 1996; Li *et al.*, 1999).

5) ESTRUTURA QUÍMICA E PROPRIEDADES CLÍNICAS DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Os AL são moléculas com diferentes estruturas químicas que apresentam as mesmas três unidades funcionais essenciais: uma cadeia hidrofílica unida a uma porção lipofílica por uma ligação éster ou amida (Covino & Vassalo, 1985; Courtney & Strichartz, 1987; Gupta, 1991).

O grupo hidrofílico é normalmente uma amina terciária, podendo ser também uma amina secundária. O domínio hidrofóbico é constituído de um ou mais anéis aromáticos. A natureza da ligação com o grupo aromático (do tipo éster ou amida) determina algumas das propriedades farmacológicas desses agentes como a metabolização e potência. Por exemplo, os ésteres são mais potentes que as amidas e tem metabolização predominantemente sanguínea (Courtney & Strichartz, 1987).

O aumento na hidrofobicidade da molécula anestésica geralmente está relacionado a uma maior potência anestésica. Quanto maior a hidrofobicidade, menos AL é necessário para o completo bloqueio da atividade fisiológica e elétrica, que também dura mais tempo (**Tabela 2**). Porém, seu potencial de toxicidade irá aumentar (Covino & Vassalo, 1985; Courtney & Strichartz, 1987). O perfil clínico dos agentes anestésicos locais é determinado por três características importantes: potência, velocidade de ação e duração da atividade anestésica.

Tabela 2 Propriedades dos Anestésicos Locais

AL	pKa ^b	Solubilidade aquosa da forma neutra (mM)	Partição da forma neutra entre EPC/água	Potência ^c	Tempo de anestesia (h) ^c	Meia-vida (h) ^c
Benzocaína	--	4,4 ^a	253 ^a	--	--	--
Procaína	9,2	16,3 ^b	84 ^b	1	1	0,1
Clorprocaína	9,2	1,98 ^b	250 ^b	4	0,75	0,1
Tetracaína	8,5	0,76 ^b	868 ^b	16	8	2,5
Lidocaína	7,8	13,1 ^b	144 ^b	4	1,5	1,5
Prilocaina	7,9	23,1 ^b	110 ^b	3	1,5	1,5
Etidocaína	7,7	0,16 ^b	1202 ^b	16	8	3,0
Mepivacaína	7,6	8,82 ^b	98 ^b	2	1,5	1,5
Bupivacaína	8,1	0,58 ^b	798 ^b	16	8	2,5
Dibucaína	8,3	0,03 ^b	2240 ^b	16	--	11,0

a: Pinto *et al*, 2000.

b: de Paula & Schreier, 1995

c: Covino & Vassalo, 1985

Os anestésicos locais 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. A Benzocaína (um anestésico local de uso tópico) não tem o grupamento amino presente nos demais anestésicos do tipo amino-ésteres, tornando-a uma exceção entre os compostos utilizados na clínica.

Já os anestésicos locais com uma ligação amida entre a cadeia intermediária e o grupamento aromático são conhecidos como amino-amidas tendo como exemplos, a Lidocaína, Mepivacaína, Bupivacaína e Ropivacaína (**Tabela 1**).

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

disso, há relatos de que o ácido para-aminobenzóico, um produto de biotransformação dos amino-ésteres, pode induzir reações alérgicas em pacientes, o que em relação as amino-amidas é raro (Covino, 1986).

6) ANESTÉSICOS LOCAIS UTILIZADOS NA CLÍNICA: BENZOCAÍNA, BUPIVACAÍNA E LIDOCAÍNA

Dentre a enorme variedade de moléculas com atividade anestésica local, destacaremos algumas substâncias bastante empregadas, ou potencialmente interessantes na prática clínica e que serão objeto dessa tese.

6.1) BENZOCAÍNA

A Benzocaína (**Tabela 1 e Fig. 2**) possui propriedades bastante específicas que aparentemente desestimulariam seu uso terapêutico: tem baixa solubilidade aquosa e sua hidrofobicidade é baixa, comparada a outros AL da série (Pinto, 1998). Além disso, ela não tem um grupamento amina ionizável como os demais AL de uso clínico, estando sempre na forma desprotonada em pH fisiológico. Sendo assim, ela é uma exceção ao postulado de que a forma protonada dos AL seria a responsável pelo efeito anestésico (Narahashi & Yamada, 1969).

A Benzocaína pertence à família dos ésteres e é bastante utilizada em clínica como anestésico para uso tópico, na forma de sprays ou também em procedimentos endoscópicos. A BZC possui início de ação rápido e uma duração na ação anestésica que pode variar de 5 a 10 minutos. Ela não apresenta bloqueio dose-dependente como os demais AL (Cullis & Verkleij, 1979).

Seu maior efeito indesejável, porém, está relacionado ao aumento dos níveis de metahemoglobina após sua administração (Guertler & Pearce, 1994; Martin *et al.*, 1995; Ellis *et al.*, 1995) que pode estar relacionado a sua semelhança estrutural com drogas indutoras de metahemoglobina , como a p-amino propiofenona (Martin *et al.*, 1995).

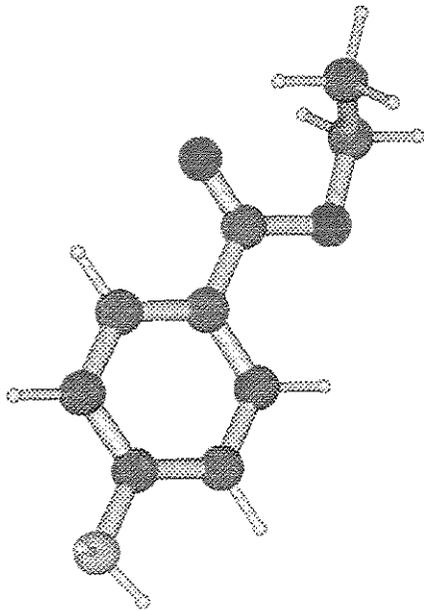


Fig. 2 Estrutura química da Benzocaína.

6.2) BUPIVACAÍNA

A Bupivacaína (Tabela 1 e Fig. 3) pertence à classe das amino-amidas cíclicas que tem como característica interessante a existência de um carbono quiral, levando à obtenção de estereoisômeros R (+) e S (-). Os isômeros R (+) e S (-) dos anestésicos locais, podem apresentar propriedades diferentes, em particular a toxicidade (de Jong, 1994, cap. 5).

A estereoseletividade das amino-amida cíclicas tem sido estudada do ponto de vista da interação com o canal de Na^+ em relação à potência e toxicidade (Yeh, 1980). Este grupo demonstrou que estereoisômeros de BVC possuem coeficientes de partição idênticos, porém grande diferença no bloqueio uso-dependente do canal de Na^+ . Valenzuela *et al.* (1995) demonstraram que o isômero S (-) da BVC é menos tóxico, porém menos potente no bloqueio do canal de Na^+ do músculo cardíaco. Lee-Son e colaboradores também encontraram maior atividade do isômero R (+) da BVC (Lee-Son *et al.*, 1992). Comparando o efeito da BVC racêmica com o da S (-) Ropivacaína (outro AL da família das amino-amidas cíclicas, análoga a BVC) no sistema nervoso central e coração Knudsen *et al.* (1997) encontraram efeito anestésico similar, porém menos prolongado para a S (-) Ropivacaína, refletindo a menor hidrofobicidade desta última.

A BVC é um anestésico representante da série dos AL de longa-duração (Tabelas 1 e 2). Ela é preferida em intervenções como no controle da dor pós-operatória, pós-traumática ou do trabalho de parto (Adams & Cashman, 1994).

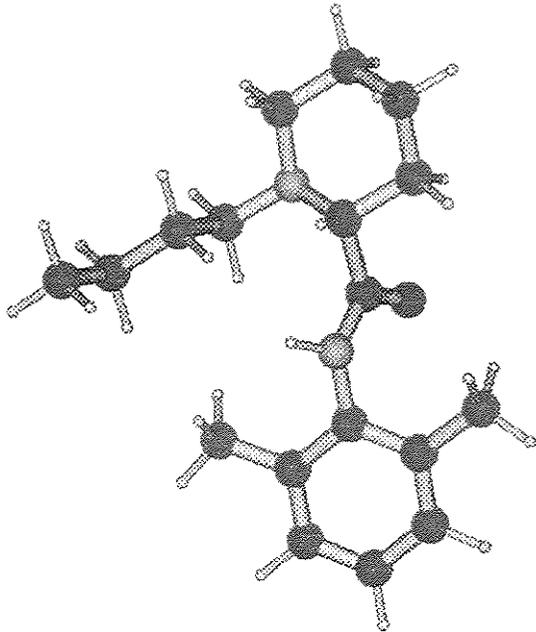


Fig. 3 Estrutura química da Bupivacaína.

6.3) LIDOCAÍNA

Como dissemos anteriormente, até meados do século XX, a maioria dos compostos sintetizados com ação anestésica local era de derivados do ácido benzóico, como a Tetracaína, a Procaína e a Clorprocaína. Uma grande desvantagem de drogas deste grupo químico é o seu potencial alergênico. Em 1943 porém, a síntese da Lidocaína (Tabela 1 e Fig. 4) por Löfgren revelou-se uma grande descoberta química. Por ser uma amino-amida, a LDC não apresenta as reações de sensibilização características dos ésteres derivados do ácido p-amino benzóico. Além disso, ela possui efeito anestésico de início imediato e duração da ação moderada; é rapidamente absorvida no trato gastro-intestinal, nas membranas mucosas e após injeção intramuscular. Sua biodisponibilidade oral é baixa devido ao metabolismo de primeira passagem. Ela é metabolizada principalmente no fígado, geralmente por N-desalquilação, e seus metabólitos são farmacologicamente ativos (Rang & Dale, 1993). A Lidocaína é escolhida quando é necessária uma duração curta ou moderada do bloqueio (Adams & Cashman, 1994).

A LDC também é usada no tratamento de taquiarritmias ventriculares, especialmente as associadas com infarto do miocárdio (Martindale, 1993; de Jong, 1994). Embora ela seja eficaz quando utilizada sem qualquer vasoconstritor, na presença de epinefrina sua velocidade de absorção e toxicidade são reduzidas e a duração da anestesia é prolongada (Rang & Dale, 1993). Além disso, ela age como desacoplador da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa em mitocôndrias de cérebro (de Jong, 1994).

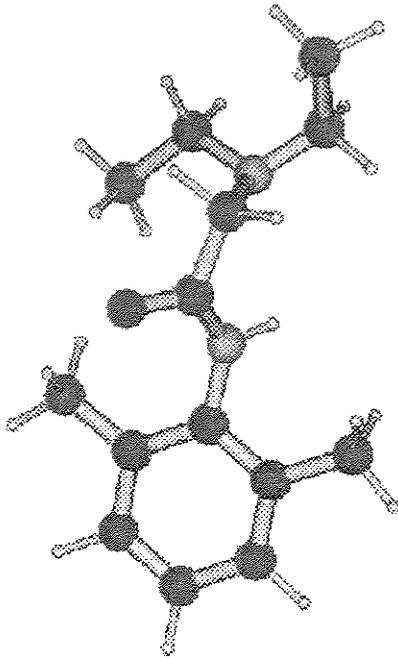


Fig. 4 Estrutura química da Lidocaína.

7) COMO MINIMIZAR OS EFEITOS TÓXICOS E AUMENTAR A DURAÇÃO DA AÇÃO ANESTÉSICA?

Seria óbvio pensar na utilização de compostos mais hidrofóbicos para viabilizar o aumento da duração anestésica, porém há um limite na biodisponibilidade imposto pela solubilidade aquosa, que não pode ser extremamente baixa (de Paula & Schreier, 1995). Além do mais, o aumento da hidrofobicidade da molécula poderia levar a um aumento na toxicidade do fármaco, o que seria indesejável.

Os benefícios de uma analgesia profunda produzida por anestésicos locais estão sendo mais bem conhecidos. Com isso, tem havido um aumento no uso de técnicas de anestesia local e regional para aliviar a dor pós-cirúrgica. Porém, seu uso ainda tem sido limitado devido à duração relativamente curta das drogas disponíveis comparadas com a duração da dor (Duncan & Wildsmith, 1995). Um AL de ação longa poderia

diminuir a frequência de administrações aumentando a eficácia por prolongar o bloqueio anestésico. Um AL de ação longa ideal deveria produzir analgesia por longo tempo, ser livre de efeitos irritantes, ter baixa alergenicidade, ter alto índice terapêutico e afetar as fibras sensoriais, mas não as motoras (Kuzma *et al.*, 1997). Uma primeira abordagem do problema se ateve na tentativa de síntese orgânica de compostos de longa duração por alteração das moléculas de AL ou na identificação de novos agentes com ação anestésica local (Ogura & Mori, 1968; Ross & Akerman, 1972; Scurlock & Curtis, 1981; Korsten *et al.*, 1991). Kuzma e colaboradores (1997) citam a síntese de surfactantes com ação anestésica. Esses compostos estariam disponíveis em altas concentrações locais (na forma de micelas) e teriam liberação gradual (lenta), porém foram relatados efeitos líticos que não recomendam seu uso clínico. O caráter de surfactante é compartilhado por AL de uso clínico como a TTC (CMC da forma protonada = 60-70 mM, Fernandez, 1980 e 1981; Frezzatti *et al.*, 1986) e a Dibucaína (CMC = 10,7 mM, Malheiros *et al.*, 2000).

Hoje, a maior parte dos trabalhos objetivando a melhora na ação anestésica está voltada para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de drogas como lipossomas e polímeros (Kuzma *et al.*, 1997).

Se a síntese de análogos de longa duração não é provável, talvez preparações de liberação controlada e lenta sejam mais eficientes, com menor custo e causem menos desconforto aos pacientes. Isto faria com que o AL fosse potencialmente menos tóxico e aumentaria sua biodisponibilidade.

Dentre várias formas para se obter formulações de longa duração, iremos discutir as veiculadas em lipossomas e em ciclodextrinas, que estão dentro do objetivo deste trabalho.

8) USO DE LIPOSSOMAS NA TECNOLOGIA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Os lipossomas foram descobertos por Bangham, em 1963, ao demonstrar que fosfolipídios poderiam formar vesículas em um meio aquoso. Eles podem ser definidos como bicamadas lipídicas que formam vesículas uni ou multilamelares e que possuem respectivamente, um ou mais compartimentos aquosos no seu interior, o que faz com que se assemelhem às membranas naturais (**Fig. 5**). A simples agitação do fosfolipídio

anidro em água é suficiente para formar multibicamadas (MLV) com diâmetros de 1 a 10 μm (Prasad, 1996).

Os lipossomas funcionam como veículos capazes de liberar determinadas quantidades 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).

Existem vários métodos de obtenção de vesículas unilamelares pequenas (SUV) e grandes (LUV). Dentre eles a agitação ultrassônica é o método mais usado para se converter uma dispersão de MLV em SUV com aproximadamente 20 a 50 nm de diâmetro (Prasad, 1996). Já o método de extrusão sob pressão é bastante utilizado para obtenção de vesículas de tamanho controlado, tanto unilamelares grandes quanto pequenas, a partir de MLV (diâmetro controlado pelo poro do filtro) fornecendo uma população de vesículas bastante homogênea. O tamanho do lipossoma afeta a distribuição, pois após administração subcutânea, lipossomas menores que 120 nm atravessam rapidamente os capilares enquanto que lipossomas maiores tendem a permanecer no sítio de injeção (Grant & Bansinath, 2001). Além disso, a encapsulação de drogas é orientada pela hidro ou lipofilicidade das mesmas. Drogas hidrofílicas têm tendência a permanecer no compartimento aquoso central enquanto drogas hidrofóbicas irão para a bicamada lipídica (**Fig. 5**) (Sharata & Katz, 1996).

Quanto à composição, os lipossomas podem ser formados por fosfolipídios naturais (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina) ou sintéticos, com ou sem colesterol.

As aplicações dos lipossomas têm se disseminado por várias áreas da medicina, além do seu uso já bastante difundido na indústria cosmética. Dentre os diversos medicamentos que estão sendo testados em formulações com lipossomas temos: AL, corticosteróides, interferon, antibióticos de diversas classes, além do estudo bastante promissor de drogas para terapia de câncer, imunodiagnóstico, doenças do sistema imunológico, cardiovascular e na terapia gênica (Monnard *et al.*, 1997; Sharata & Katz, 1996). Eles apresentam diversas vantagens na medicina atual como sistemas de liberação controlada de drogas, já que além de apresentarem composição lipídica semelhante às das membranas biológicas, são capazes de proteger os princípios ativos encapsulados da metabolização fazendo com que alcancem o seu sítio de ação em concentrações efetivas maiores. Com isso consegue-se manter uma concentração

plasmática constante ao invés de picos de concentração após cada administração do fármaco.

Estas vesículas lipídicas são biocompatíveis devido a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade reduzida ou inexistente, podendo ser administradas por diversas rotas: ocular, pulmonar, nasal, oral parenteral, tópica (Kuzma *et al.*, 1997).

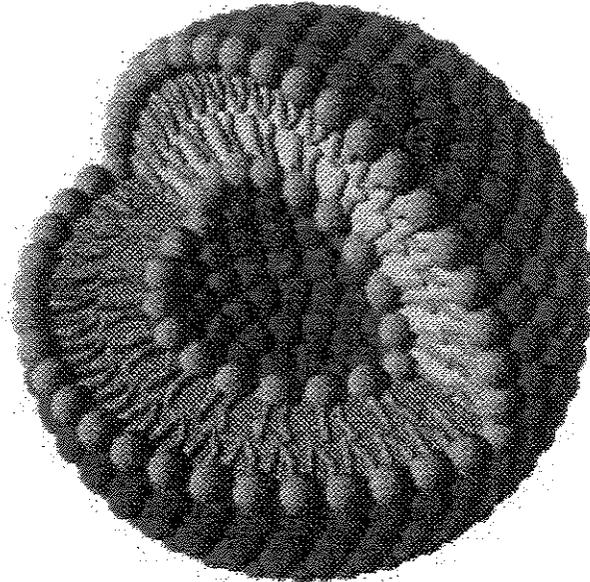


Fig. 5 Representação esquemática de um lipossoma unilamelar: as moléculas hidrofílicas podem ser encapsuladas no centro aquoso da vesícula, as hidrofóbicas se inserem na bicamada enquanto as moléculas anfifílicas ficam com sua porção apolar inserida na bicamada e sua porção polar voltada para o meio aquoso externo ou interno.

No uso de lipossomas como carreadores de drogas, em geral destacamos as preparações utilizando cadeias de polietilenoglicol covalentemente ligados aos fosfolipídios, produzindo os chamados lipossomas de 2ª geração (ou *stealth*) capazes de permanecer na circulação sanguínea por mais tempo. Segundo Woodle & Lasic (1992) as cadeias hidrofílicas de PEG na superfície dos lipossomas *stealth* impedem a aproximação e ligação de opsoninas plasmáticas, responsáveis pelo reconhecimento e eliminação dos mesmos.

O uso de lipossomas como sistema para liberação controlada de drogas vem se desenvolvendo ao longo dos últimos 40 anos. A encapsulação de fármacos anestésicos tem sido relatada com bastante sucesso utilizando-se diversas formulações (Djordjevich

et al., 1986; Gesztes & Mezei, 1988; Legros *et al.*, 1990; Langerman *et al.*, 1992; Mashimo *et al.*, 1992; Planas *et al.*, 1992; Boogaerts *et al.*, 1993 a, b, 1994, 1995 a, b; Mowat *et al.*, 1996; Lener *et al.*, 1997; Fletcher *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 1997; Malinovsky *et al.*, 1997 a, b; 1999; Bucalo *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998), nenhuma delas utilizando BZC.

O uso de anestésicos locais encapsulados em lipossomas tem como vantagens a liberação lenta da droga prolongando a duração da anestesia e a redução da toxicidade para o sistema cardiovascular e sistema nervoso central (Gesztes & Mezei, 1988; Langerman *et al.*, 1992; Boogaerts *et al.*, 1993 a, b; Mowat *et al.*, 1996; Bucalo *et al.*, 1998).

A utilização de Tetracaína encapsulada em lipossomas foi testada em humanos, obtendo-se resultados melhores do que a formulação comercial em relação a duração da ação (Gesztes & Mezei, 1988; Hung *et al.*, 1997). A Lidocaína também já foi testada em animais de laboratório (Mashimo *et al.*, 1992) e em humanos (Planas *et al.*, 1992; Finkel *et al.*, 2002) prolongando a anestesia, após a encapsulação.

Utilizando lipossomas unilamelares grandes (LUV) com gradiente de pH Mowat *et al.* (1996) encapsularam BVC, obtendo um sistema que aumentou a duração do bloqueio neural. Atualmente, o grupo de Grant vem desenvolvendo trabalhos de caracterização das formulações lipossomais de Bupivacaína, desde sua caracterização físico-química até a avaliação *in vivo* (Grant, 1999; Grant & Bansinath, 2001; Grant *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos em animais de laboratório (Djordjevich *et al.*, 1986; Boogaerts *et al.*, 1993 a, b, 1995 a, b; Yu *et al.*, 1998; Malinovsky *et al.*, 1997 a, b; 1999) e em humanos (Boogaerts *et al.*, 1994) vêm utilizando Bupivacaína em MLV obtendo resultados satisfatórios com relação ao aumento na duração da anestesia, potencialização do bloqueio nervoso além de controle dos níveis sistêmicos da droga.

9) USO DE CICLODEXTRINAS NA TECNOLOGIA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

A hidrólise enzimática do amido usualmente resulta na formação de glicose, maltose e em uma longa classe de dextrinas lineares e ramificadas. Mas, alguns microorganismos e plantas produzem certas enzimas denominadas ciclodextrinas glicosiltransferases que degradam o amido. Os produtos cíclicos dessa degradação são chamados ciclodextrinas (Loftsson & Masson, 2001).

As três ciclodextrinas naturais são a alfa (α -CD), beta (β -CD) e gama (γ -CD) compostas de seis, sete ou oito unidades de D-(+)-glicopirranose, respectivamente, unidas por ligações α -1,4. Esses agentes têm em sua estrutura grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior. Portanto, possuem um exterior hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica que, por sua vez, permite às ciclodextrinas complexarem moléculas (que apresentam dimensões compatíveis com a cavidade) e alterarem as propriedades físico-químicas das mesmas como a solubilidade em água, a estabilidade e a biodisponibilidade (McCormack & Gregoriadis, 1998; Matioli, 2000). Algumas propriedades físico-químicas das CDs podem ser vistas na **Tabela 3**.

Tabela 3 Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas (Loftsson & Brewster, 1996; Matioli, 2000).

	α	β	γ
Nº de unidades de glicose	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidade em água (g/100 mL), a 25 °C	14,5	1,85	23,2
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Diâmetro externo da cavidade (Å)	14,6	15,4	17,5
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	472

A habilidade das ciclodextrinas de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e dos critérios de 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 ciclodextrinas, as 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 o 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 (Fig. 6) são as ciclodextrinas mais largamente utilizadas para a complexação com 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 anel aromático por exemplo (Kalinkova, 1999).

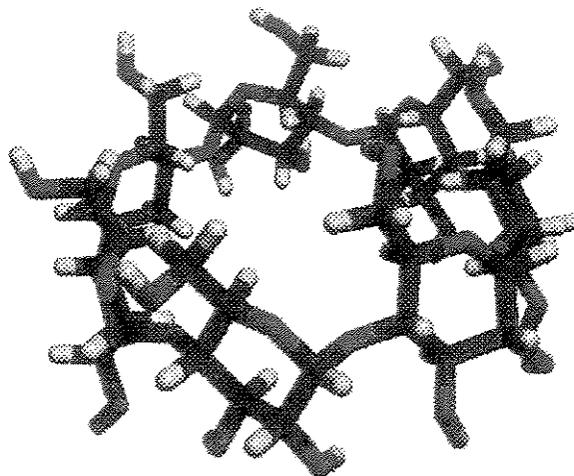


Fig. 6 Estrutura da β -ciclodextrina, apresentando sete monômeros de glicose.

As CDs naturais, em particular as β -CDs, têm solubilidade aquosa limitada e a formação de complexos com compostos lipofílicos geralmente resulta em precipitação dos complexos sólidos se o limite de solubilidade for atingido (16,4mM ou 18,6mg/mL). Assim, numerosas modificações na estrutura química das β -CDs têm sido feitas originando derivados mais solúveis como 2,6-dimetil- β -ciclodextrina (DM- β -CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e ciclodextrinas sulfatadas como sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD) (Rajewski & Stella, 1996).

Além da estabilização, a modificação da farmacocinética e das propriedades biofarmacêuticas das drogas são os efeitos mais significantes da complexação com ciclodextrinas. Esses efeitos são observados especialmente na solubilidade e na liberação da droga complexada. Como consequência disso, a administração de compostos complexados em β -CDs influencia na intensidade e duração dos efeitos através do aumento dos níveis plasmáticos da droga (Frömming & Szejtli, 1994). A imobilização estereoseletiva em α , β ou γ ciclodextrinas tem sido descrita para a solubilização e liberação controlada de compostos como a Carbamazepina (Brewster *et al.*, 1991), a Nifedipina (Skalko *et al.*, 1996), a Hipericina (Sattler *et al.*, 1997), o Propanidid (Vierstein *et al.*, 1997), o Miconazol (Tenjarla *et al.*, 1998), o Praziquantel (Becket *et al.*, 1999) e o Zolpidem (Trapani *et al.*, 2000).

Essa propriedade das ciclodextrinas torna bastante promissor seu uso para a complexação com anestésicos locais. Além disso, estudos em animais de laboratório indicam que a utilização de β -CDs e alguns derivados (dimetil- β -CD e hidroxipropil- β -CD) aumentam a solubilidade de anestésicos locais como a Etidocaína, Lidocaína, Prilocaina, Mepivacaína e, especialmente, Bupivacaína (Dollo *et al.*, 1996 a, b) bem como melhoram os índices terapêuticos da droga (Dollo *et al.*, 1998 e 2000).

A administração de BVC complexada em hidroxipropil- β -CD, associada ao sufentanil, foi testada após administração epidural e intratecal em ratos, produzindo um aumento na duração da anestesia (Meert & Melis, 1992). O uso de β -CD também demonstrou melhorar a solubilidade e estabilidade dos AL: Dibucaína, Tetracaína, Bupivacaína e Lidocaína (Miyoshi *et al.*, 1998).

Num estudo utilizando RMN, a ligação de Cocaína com β -CD foi caracterizada, mostrando haver interação com a inserção do grupamento fenila e a metila do grupo carboximetil, dentro da *borda* da ciclodextrina. Com isto, a síntese de catalisadores efetivos para sua hidrólise pode ser realizada, auxiliando no tratamento de dependentes químicos (Nesnas *et al.*, 2000).

Nenhum trabalho utilizando BZC foi encontrado na literatura, utilizando β -CD ou algum de seus derivados.

II) OBJETIVOS

Este trabalho teve por finalidade preparar, caracterizar e avaliar a eficácia de formulações anestésicas locais de longa duração para, posteriormente, compará-las com as formulações disponíveis no mercado e atualmente utilizadas na clínica, além de avaliar qual o melhor veículo para cada anestésico testado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Preparação de formulações encapsuladas em lipossomas e/ou complexadas em β -ciclodextrina, utilizando os anestésicos locais Benzocaína, Bupivacaína e Lidocaína;
- * Caracterização, através do uso de técnicas físico-químicas, destas formulações, quanto à eficiência e estabilidade de encapsulação em lipossomas ou de complexação em β -CD;
- * Determinação da estequiometria de complexação em β -CD e cálculo da constante de associação;
- * Avaliação teórica, utilizando cálculos computacionais, da complexação dos AL em β -CD;
- * Realização de testes *in vitro* (testes de hemólise, de agregação plaquetária e citotoxicidade em células V79) da toxicidade das formulações lipossomais e/ou complexadas em ciclodextrinas, comparando-as com os fármacos comerciais.

III) MATERIAIS E MÉTODOS

Anestésico Local	Fornecedor
Benzocaína (BZC)	Sigma Chemical Co.
Lidocaína (LDC)	Sigma Chemical Co.
Bupivacaína (BVC)	Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

1) PREPARO DOS LIPOSSOMAS

Lipossomas multilamelares (MLV) foram preparados pelo método de hidratação de filme seco, retirando-se alíquotas de EPC, Colesterol e α -Tocoferol (Sigma Chem. Co.) a partir de solução estoque em clorofórmio e evaporando-se sob fluxo de N_2 , seguida por 2 horas de vácuo, a temperatura ambiente.

Após secagem, o tampão adequado foi adicionado e agitou-se em vórtex por 5 minutos. A dispersão assim preparada teoricamente apresentava vesículas multilamelares concêntricas, separadas por cavidades aquosas, que foram utilizadas para o preparo de lipossomas unilamelares de $0,4 \mu\text{m}$ (LUV).

As LUV foram obtidas por extrusão das vesículas multilamelares, sob pressão de N_2 em um extrusor da marca Lipex Biomembranes Inc. O diâmetro médio de vesículas obtidas nestas condições pode variar de 100 a 1000 nm, de acordo com o tamanho do poro da membrana utilizada (Prasad, 1996).

A extrusão foi realizada a temperatura ambiente (acima da temperatura de transição de fases dos lipídios usados), passando-se a amostra de vesículas multilamelares por membranas de policarbonato (Poretics) com poros de $0,4 \mu\text{m}$. Foram feitas 15 passagens da amostra para que o tamanho das vesículas obtidas fosse homogêneo. Isto foi verificado acompanhando-se o espalhamento de luz em espectrofotômetro a 350 nm até que a leitura, após uma fase de decréscimo, atingisse um valor constante. Os lipossomas obtidos foram deixados em repouso por pelo menos 2 h, para que houvesse o intumescimento (*swelling*) das vesículas (Lasic, 1993).

A composição dos lipossomas preparados foi: EPC (fosfatidilcolina de ovo), Colesterol e α -Tocoferol, na proporção de 4: 3: 0,07 mol%. Composição semelhante vem sendo utilizada em outros trabalhos da literatura empregando AL (Mashimo *et al.*,

1992; Boogaerts *et al.*, 1993, 1994, 1995; Malinovsky *et al.*, 1997) e é representativa das principais classes de lipídios das biomembranas; além disso, o α -Tocoferol (vitamina E) foi usado para prevenir a oxidação dos lipídios das vesículas.

2) CARACTERIZAÇÃO DA ENCAPSULAÇÃO DOS AL

2.1) DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS VESÍCULAS

O tamanho das vesículas foi determinado, medindo-se seus raios hidrodinâmicos por espectroscopia de espalhamento de luz de frequência determinada, obtida por incidência de raio laser (*quasi elastic light scattering*, QLS).

O fundamento da técnica de espectroscopia de espalhamento de luz quasi-elástico diz que quando uma luz interage com partículas ela irá atingi-las e, como consequência, parte da luz será desviada de sua direção original. Chama-se esta luz de "espalhada". A intensidade da luz espalhada em qualquer ângulo depende do comprimento de onda da luz incidente, do tamanho e da forma das partículas dispersas além das propriedades óticas do aparelho, assim como do ângulo de observação. Aplicando-se estes dados aos experimentos de espalhamento de luz, informações sobre o tamanho das partículas responsáveis pelo espalhamento podem ser deduzidas (Hiemenz, 1986).

Pudemos caracterizar as amostras de vesículas preparadas observando a homogeneidade da preparação e tamanho médio final obtido. Com isto, a reprodutibilidade da preparação e a estabilidade das amostras puderam ser acompanhadas. Este tamanho foi determinado medindo-se o raio hidrodinâmico das vesículas. Para partículas esféricas em movimento Browniano, o raio hidrodinâmico médio (R_h) pode ser calculado a partir da relação de Stokes-Einstein, dada pela equação abaixo (Lasic, 1993):

$$R_h = \frac{kT}{6\pi D\mu} \quad [1]$$

onde k é a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, D o coeficiente de difusão médio e μ a viscosidade do solvente.

Foram feitas medidas do raio hidrodinâmico das vesículas vazias e com anestésicos, a fim de se observar a homogeneidade das preparações e o tamanho médio das partículas, antes e após a encapsulação.

O instrumento utilizado é da marca Malvern Instruments Ltd., pertencente ao Departamento de Processos Biotecnológicos, da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. As medidas foram feitas a temperatura ambiente, em soluções diluídas das amostras (cerca de 1 mM).

2.2) DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS

O conteúdo de lipídios foi quantificado utilizando-se a metodologia descrita por Chen *et al.* (1956) de quantificação de fosfato. Neste método promove-se a digestão do fosfolipídio a fosfato inorgânico e CO₂ por hidrólise ácida em altas temperaturas. Em seguida ocorre a complexação do ortofosfato formado com molibdato de amônio, que é então reduzido pelo ácido ascórbico formando um complexo azul, o fosfomolibdato, detectável espectrofotometricamente acima de 700 nm.

Esta determinação foi feita em diversas etapas da preparação dos lipossomas e em experimentos para determinação da eficiência de encapsulação por ultracentrifugação.

2.3) DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO

A incorporação do anestésico local nos lipossomas foi realizada após a preparação das vesículas e a determinação da eficiência de encapsulação foi realizada por leitura no UV após ultracentrifugação.

A porcentagem de anestésicos locais encapsulados foi determinada em suspensões lipossomais (vesículas multilamelares) na concentração de 4mM onde foram adicionadas soluções de anestésicos locais para uma concentração final de 2mM. Todas as amostras foram preparadas em tampão HEPES 20mM, NaCl 150mM, pH 7,4 e deixadas em repouso por pelo menos duas horas para que atingissem o equilíbrio.

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

Após separação do sobrenadante, alíquotas do mesmo foram analisadas por espectrofotometria UV no comprimento de absorção máxima de cada anestésico: 284 nm para a BZC, 260 nm para a BVC e 263 nm para a LDC (de Paula & Schreier, 1995; Pinto *et al*, 2000).

A porcentagem de anestésicos locais encapsulados em vesículas multilamelares foi determinada através da % do anestésico local não encapsulado (livre no sobrenadante). A absorbância do controle-lipossomal (MLV) foi subtraída do sobrenadante-teste (MLV:AL) e dividida pela absorbância do anestésico local em solução (AL). Como mostrado no esquema abaixo.

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

A determinação da eficiência de encapsulação não foi realizada com vesículas unilamelares (LUV) pois estas não sedimentariam após a ultracentrifugação, não havendo uma separação eficaz entre lipossomas e anestésicos.

3) PREPARO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ANESTÉSICOS EM β -CICLODEXTRINA

Os complexos sólidos foram obtidos misturando-se quantidades apropriadas de β -CD e AL em água, tal que a razão molar fosse 1:1 ou 1:2. As amostras foram deixadas sob agitação a temperatura ambiente. Após o equilíbrio (tempo determinado no experimento de cinética - item 4.2 - materiais e métodos) a solução foi liofilizada e guardada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior.

Como não há uma técnica considerada padrão para a preparação de complexos de inclusão, nos baseamos na literatura que compara os métodos de liofilização e de co-precipitação, demonstrando ser este, de liofilização, o mais eficaz (Kurozumi *et al.*, 1975, Becket *et al.*, 1999).

4) CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO AL/ β -CD

4.1) CÁLCULOS COMPUTACIONAIS UTILIZANDO MECÂNICA MOLECULAR

Para a otimização do complexo de inclusão estudado utilizamos o programa de modelagem HYPER CHEM 6.03v (Hyper Cube, Co.), que consiste num programa para PC, de forma perfeitamente adequada à representação espacial da β -ciclodextrina, de acordo com os dados de literatura (Balabai *et al.*, 1998; Lino *et al.*, 1999; De Azevedo *et al.*, 2000).

Os cálculos foram executados utilizando métodos MM com os campos de força MM+ e OPLS (Operating Parameter for Liquid Systems). O campo de força OPLS utiliza parâmetros de solvente nos seus cálculos que levam em consideração parâmetros de cálculos mais modernos como o *Ab Initio*. Eles foram efetuados para prever a estabilidade de formação do complexo de inclusão na estequiometria 1:1 ou 1:2 (AL: β -CD).

A escolha da abordagem computacional deve levar em consideração as respostas desejadas, ou seja, a pergunta a ser feita depende de qual resposta se espera. No caso dos complexos de inclusão, o tamanho e número de orbitais atômicos que compõem as moléculas estudadas inviabilizam o uso de métodos sofisticados como os semi-empíricos e *Ab Initio*, levando-se em consideração as diferenças de tamanho entre as moléculas hospedeira e convidada.

Apesar da Mecânica Molecular (MM) ser um método que considera os átomos como esferas, não considera elétrons e cargas de maneira refinada, ela é adequada no caso de interações características de meios biológicos. Assim, para a simulação de fenômenos que ocorrem em sistemas biomiméticos, cálculos utilizando MM são bastante razoáveis considerando-se a boa concordância entre resultados teóricos e experimentais. O uso em paralelo de métodos teóricos e experimentais para este tipo de abordagem vem sendo apontado como a maneira mais promissora de se projetar experimentos capazes de elucidar detalhes do mecanismo de formação dos complexos de inclusão (Lino, 2002).

A MM pode ser vista como uma conseqüência natural de idéias antigas sobre ligações entre átomos em uma molécula e forças de van der Waals (vdW) entre átomos não-ligados covalentemente. A MM utiliza os fundamentos da espectroscopia

vibracional, onde as ligações químicas têm comprimentos e ângulos fixos tal que as moléculas ajustarão suas geometrias de forma a assumir estes valores. Adicionalmente, são incluídas interações estéricas (espaciais) utilizando-se funções de energia potencial de vdW. Em sistemas mais tensionados, as moléculas sofrem deformações previsíveis, de forma que as energias de tensão podem ser calculadas com grande precisão. As interações de vdW, juntamente com estiramento e deformações angulares, são usadas para minimizar as energias de tensão, o que leva a informações a respeito da estrutura e energia de sistemas moleculares.

Na MM os elétrons não são tratados explicitamente. Supõe-se ainda que os elétrons simplesmente permaneçam em uma distribuição ótima em torno dos núcleos. A energia de uma molécula no estado eletrônico fundamental é função das posições nucleares. Para moléculas mais complexas, pode haver um grande número de configurações nucleares onde a energia é mínima. Uma outra aproximação consiste em representar o sistema como uma mistura de moléculas em equilíbrio com todos os mínimos de energia possíveis. Finalmente, movimentos térmicos levam algumas moléculas através de estados de transição conectando mínimos de energia, a uma taxa correspondente à energia livre de ativação de Gibbs. Cálculos usando a MM empregam uma série de equações derivadas empiricamente para a superfície de energia potencial, cuja formulação matemática é familiar à mecânica clássica (Lino, 2002).

Este conjunto de funções de energia potencial, chamado Campo de Força, contém parâmetros ajustáveis que são otimizados de forma a se obter o melhor acordo entre propriedades calculadas e experimentais, como geometria, energias conformacionais, entalpia de formação e propriedades associadas. A MM assume que parâmetros de constantes de força correspondentes possam ser transferidos de uma molécula para outra.

Estas quantidades são avaliadas para uma série de compostos simples, e então os valores dos parâmetros são mantidos constantes e usados em cálculos envolvendo compostos similares.

As associações mais estáveis dependem do ajuste entre as moléculas hospedeira e convidada. Normalmente, este ajuste pode ocorrer com o auxílio de uma segunda macromolécula obtendo-se assim a estequiometria 1:2. Dependendo da concentração relativa, equimolar, entre estas moléculas. Considerando as aplicações

biológicas envolvidas, cálculos utilizando efeito de solvente melhoram significativamente os resultados (Estrada *et al.*, 2000).

Utilizando MM foi possível realizar cálculos para a determinação da estabilidade do complexo de inclusão formado entre AL e β -CD. O cálculo da energia de afinidade ($E_{\text{afinidade}}$), como o abaixamento de energia total no sistema devido à formação do complexo de inclusão, também foi obtido. Esta é definida como contribuição energética ou entálpica (ΔH). Utilizando cálculos de MM é possível calcular a entalpia de formação (ΔH_f) para cada uma das espécies envolvidas, tal que:



onde **S** é o soluto de interesse, **CD** é o sistema macromolecular e **S • CD** é o complexo de inclusão formado. A energia resultante do abaixamento de energia total do sistema devido à formação do complexo de inclusão é a $E_{\text{afinidade}}$ entre as duas moléculas. Esta é dada pela diferença entre o ΔH_f do soluto mais o ΔH_f do sistema macromolecular e o ΔH_f do complexo de inclusão, como descrito na equação abaixo (Jaime *et al.*, 2000):

$$E_{\text{afinidade}} = \Delta H_{f \text{ SCD}} - (\Delta H_{f \text{ S}} + \Delta H_{f \text{ CD}}) \quad [2]$$

A formação do complexo de inclusão é influenciada simultaneamente por três tipos de força diferentes: energia de van der Waals, interações hidrofóbicas e efeitos eletrônicos. A primeira está relacionada com as forças de atração, dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, dipolo momentâneo, etc. A segunda é um efeito da repulsão entre o soluto e o solvente. Quando uma molécula está imersa em um ambiente químico desfavorável a sua tendência natural será a de diminuir o contato com as moléculas de solvente. Isto pode ocorrer quando esta molécula é inserida na geometria molecular de outra maior (como a β -CD) utilizando um encaixe molecular (reconhecimento molecular). O terceiro tipo de força responsável pela formação dos complexos de inclusão é representado pelas cargas sobre os átomos, devido a diferença de eletronegatividade. Comparando os parâmetros termodinâmicos podemos relacionar a diminuição de energia total do sistema e a estabilidade do complexo de inclusão.

Para a estequiometria 1:2, ao sistema inicial 1:1 é adicionada uma segunda molécula de β -CD, por meio da reação:



Onde $S \cdot CD$ é o complexo formado em estequiometria 1:1, CD é o sistema macromolecular e $S \cdot CD_2$ é o complexo de inclusão composto de duas moléculas de β -CD. Esta $E_{\text{afinidade}}$ pode ser definida, neste caso, pela equação [3]:

$$E_{\text{afinidade}} = \Delta H_{f SCD_2} - (\Delta H_{f SCD} + \Delta H_{f CD}) \quad [3]$$

Seja a entropia envolvida constante para uma série, quando aplicamos o cálculo a vários compostos para comparação, obtemos uma compensação entre ΔH e ΔG por meio da equação:

$$\Delta G \propto \Delta H - T\Delta S \quad [4]$$

Neste caso, $\Delta H \approx \Delta G$ e a relação obtida para a constante de equilíbrio do complexo é:

$$\Delta H \propto \Delta G \propto -RT \ln K \quad [5]$$

Lino (2002) definiu a $E_{\text{afinidade}}$ proveniente das equações 2 e 3 como ΔH , e assim relacionou esta variação da entalpia com a constante de equilíbrio das reações.

A estabilidade do complexo de inclusão depende do ajuste molecular entre a cavidade e a molécula convidada. Devido ao estudo comparativo, as energias envolvidas são consideradas relativas e depende do método aplicado, devendo ser levada em consideração apenas uma comparação qualitativa.

Portanto, o ΔH será tão maior quanto maior for a estabilidade do complexo formado. A partir destas definições foram elaboradas estratégias específicas para cada tipo de associação estudada. Estas estratégias levam em consideração características estruturais/geométricas próprias das moléculas hospedeiras, mas também das moléculas convidadas. Para as CDs definem-se inicialmente duas posições para a entrada de uma molécula em sua cavidade. Devido a geometria molecular, as CDs possuem duas faces, a de maior diâmetro e a de menor diâmetro. Iremos adotar a

nomenclatura, *borda* e *coroa*, respectivamente, para essas duas faces como mostra a Fig. 7:

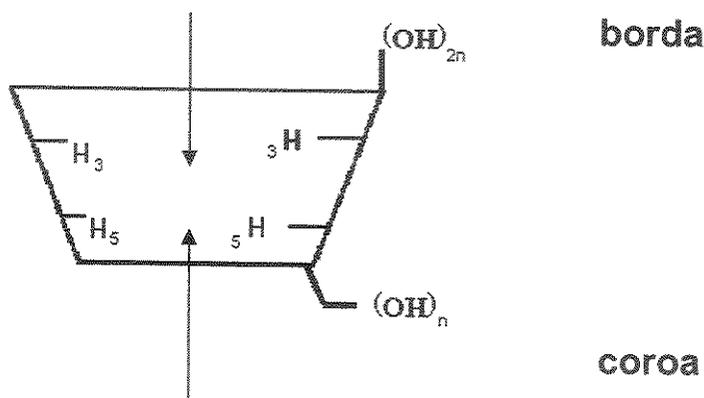


Fig. 7 Representação esquemática da geometria molecular da β -CD, onde o número de unidades glicopiranosídicas é igual a 7.

Para a estequiometria 1:1 devemos levar em consideração a orientação para a entrada na cavidade. Esta entrada depende da formação de pontes de hidrogênio entre as hidroxilas e a molécula convidada. Estas forças de atração devem ser no mínimo maiores do que a força de atração das moléculas de água, para que estas saiam da cavidade e regiões próximas a entrada, e o efeito hidrofóbico possa ocorrer. A orientação relativa à molécula convidada depende de qual molécula estamos estudando. Salvatierra *et al.* (1996) utilizando como modelo o sistema aromático do ácido benzóico em β -CD utilizou Ressonância Magnética Nuclear (NOE¹) para caracterizar as interações existentes entre prótons de β -CD e do ácido benzóico. Os deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) dos prótons, em diferentes proporções de ácido benzóico e β -CD foram obtidos para a elaboração de um *Job plot* (Connors, 1987) onde pôde ser observada uma tendência à formação de estequiometria 1:1. A alta intensidade dos sinais de NOE demonstrou uma grande afinidade entre o anel aromático (apolar) e o interior da cavidade da CD. Todos os prótons de CD mostram *cross-peaks* quando os

prótons aromáticos foram irradiados. Porém, foram observados valores maiores para o NOE dos prótons em meta para H_3 e em orto para H_5 (Fig. 8). Esta observação sugere uma geometria de inclusão com o próton aromático H_o e H_m localizado no plano equatorial da β -CD e, conseqüentemente, o próton H_p localizado no eixo central da posição vertical.

Observando a Fig. 8 podemos entender porque H_p não é observado quando qualquer próton da β -CD é irradiado, ficando longe de H_3 e H_5 simultaneamente. O átomo de referência, nesse caso, é o H_p

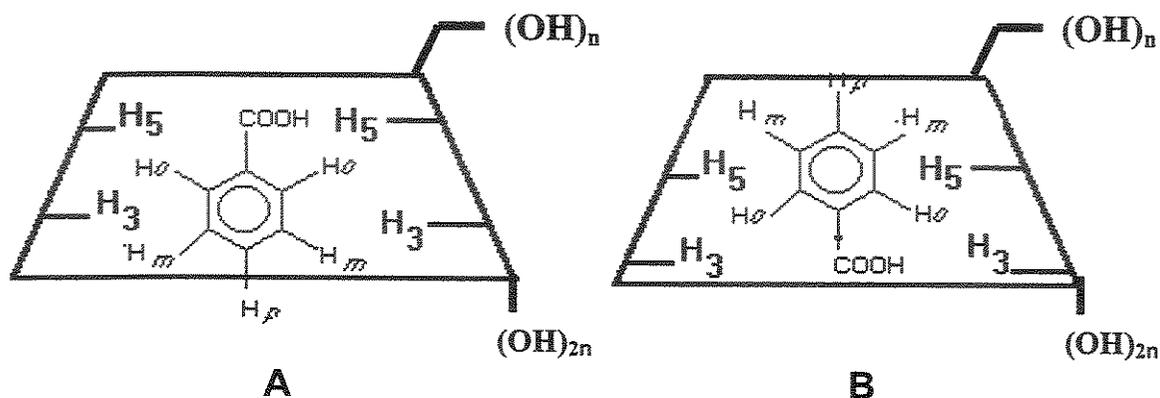


Fig. 8 Orientação relativa à entrada da molécula de ácido benzóico na cavidade hospedeira da β -CD (Salvatierra *et al.*, 1996).

A MM foi utilizada neste estudo (Salvatierra *et al.*, 1996) para a comparação energética entre as possíveis posições relativas do anestésico na cavidade da β -CD. Duas posições relativas foram inicialmente propostas: (a) paralela; (b) perpendicular, com o anel aromático prioritariamente inserido na cavidade da β -CD. A primeira foi logo descartada por não haver nenhuma interação importante que fosse beneficiada com essa orientação. A segunda pode ser representada pelas duas formas da Fig. 8. A diferença energética obtida entre os dois mecanismos propostos foi de apenas $0,27 \text{ kcal.mol}^{-1}$, a favor da orientação A.

¹ NOE Nuclear Overhauser Effect: detecta interações espaciais entre átomos de moléculas diferentes ou da mesma molécula, não unidas por interações escalares (Silverstein, 1991).

A entrada na cavidade deve ser estudada também com relação a molécula convidada considerando a inserção de cada parte separadamente, para analisar uma possível orientação mais favorável energeticamente.

O caráter hidrofóbico encontrado para cada parte da molécula pode influenciar na formação do complexo de inclusão em estequiometria 1:1, ou até mesmo ser um fator coadjuvante para a estabilização de complexos em estequiometrias variáveis. Usualmente consideramos estequiometrias maiores com a adição de moléculas de CD, 1:2, 1:3, etc. Porém, podem ocorrer estequiometrias 2:1, 3:2.

Portanto, o estudo das estequiometrias para a inclusão deve-se a uma análise cuidadosa de ambas as moléculas. Esta análise é uma das mais importantes em termos do estudo teórico/experimental porque a estequiometria implica nos efeitos que a formação do complexo de inclusão pode exercer na biodisponibilidade do fármaco. A formação de estequiometrias 1:1, 1:2 e 1:3 ocorre em passos. Lino & Loh (2000) demonstraram por meio de medidas de coeficientes de difusão a formação do complexo de inclusão com a série dos p-hidroxibenzoatos de alquila (parabenos) e a β -CD. Neste estudo foi possível observar a diminuição no coeficiente de difusão das moléculas convidadas quando entram no sistema macromolecular. Com o aumento na concentração de β -CD uma segunda associação apareceu apenas para o butilparabeno.

Para duas moléculas de CD devemos levar em consideração também o alinhamento relativo devido as hidroxilas que fazem pontes de hidrogênio. Jaime *et al.* (2000) demonstraram por meio de cálculos de MM e Dinâmica Molecular a importância destas pontes de hidrogênio para a estabilidade de dímeros de CDs. O alinhamento onde as bordas estão voltadas uma para a outra é a mais estável em todos os casos, comprovando uma maior estabilidade quando o número de pontes de hidrogênio é o maior.

4.2) CINÉTICA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO AL/ β -CD

Foram feitas avaliações do tempo necessário para que houvesse incorporação da molécula de AL à cavidade da β -CD. Após adição de β -CD à solução de AL, foram feitas leituras no espectrofotômetro de 10-10 minutos, no comprimento de onda de máxima absorção de cada um dos AL no UV, até que fosse atingido um equilíbrio.

4.3) CÁLCULO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO BZC/ β -CD UTILIZANDO ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE

Este método foi descrito por Higuchi & Connors (1965) e tem como fundamento a variação da solubilidade do soluto, com o aumento da concentração da molécula hospedeira (ou *host*, no caso a β -CD). Este método é bastante utilizado e seu tratamento matemático permite o cálculo da constante de associação (K_a) do complexo (Frömming & Szejtli, 1994).

Em 9 erlenmeyers foram adicionados 10 mL de água e excesso de BZC (20 mM). Posteriormente colocou-se concentrações crescentes de β -CD (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12,14 e 16 mM) nos respectivos erlenmeyers. As amostras foram deixadas sob agitação a temperatura ambiente e foi feita filtração a vácuo seguida de centrifugação (500 xg/5 min) para separar o que não havia sido solubilizado. Foi feita leitura em espectrofotômetro a 284 nm, após diluição das amostras.

De acordo com o complexo formado, a solubilidade pode apresentar diversos tipos de isotermas, uma vez que pode haver um aumento ou diminuição na solubilidade. Uma correlação entre a solubilidade do composto a incorporar e a concentração de CD está ilustrada na Figura abaixo.

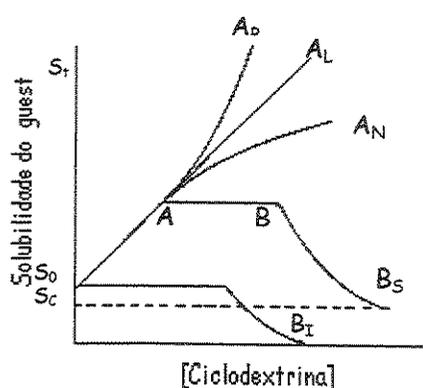


Fig. 9 Tipos de isotermas de solubilidade. S_0 = solubilidade do *guest* na ausência de CD; S_1 = concentração do *guest* dissolvido (livre + complexado); S_c = solubilidade limite do complexo pouco solúvel; Tipos de isotermas A_p , A_L e A_N = complexos muito solúveis (limite de solubilidade determinado pela solubilidade da CD); isoterma B_s = é formado complexo de solubilidade limitada; isoterma B_1 = complexo insolúvel é formado (Frömming & Szejtli, 1994).

De acordo com os mesmos autores, os valores da constante de associação (K_a) para um complexo 1:1 podem ser calculados pela razão entre inclinação e intercepto da

porção inicial linear do diagrama, como segue (Higuchi & Connors, 1965; Fromming & Szejtli, 1994):

$$K_a = \frac{S_t - S_0}{S_0 \{ [CD]_t - (S_t - S_0) \}} = \frac{\text{tg } \alpha}{S_0 (1 - \text{tg } \alpha)} \quad [6]$$

4.4) DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA DO COMPLEXO BZC/ β -CD

4.4.1) MÉTODO DE VARIAÇÃO CONTÍNUA

A determinação da estequiometria do complexo AL/ β -CD pode ser estabelecida pela técnica de variação contínua (*Job plot*, Connors, 1987) que se baseia na variação de um parâmetro físico-químico, observado na presença de β -CD e que pode ser medido por técnicas espectroscópicas, como RMN ou fluorescência.

Por este método soluções equimolares de AL e β -CD foram preparadas e misturadas para um volume padrão e as proporções foram mantidas de forma que a concentração total (M) permanecesse constante ($M = [AL]_{\text{total}} + [\beta\text{-CD}]_{\text{total}}$). O parâmetro físico-químico escolhido (por ex: deslocamento químico, $\Delta\delta$) pode ser então determinado na ausência (δ_0) e na presença (δ) de β -CD. Subseqüentemente, $\Delta\delta$ $[AL]_{\text{total}}$ pode ser graficado contra r ($r = [AL]_{\text{total}} / [AL]_{\text{total}} + [\beta\text{-CD}]_{\text{total}}$). Segundo Connors (1997) a concentração da molécula convidada (aqui representada pelo AL) e a da ciclodextrina (CD) em um complexo de inclusão de 1:n ($AL_m:CD_n$) podem ser expressas, como segue:

$$[AL] = r.M - [AL:CD] \quad [7]$$

$$[CD] = M.(1 - r) - n.[AL:CD] \quad [8]$$

Sendo que, para um dado valor de r , a concentração do complexo AL:CD irá atingir um máximo correspondente ao ponto onde a derivada $d[AL:CD]/dr = -M$. Rearranjos das equações acima levam a uma única solução: a concentração máxima

absoluta do complexo é atingida quando $r = (n + 1)^{-1}$ e não depende de M ou da constante de ligação.

4.4.2) FLUORESCÊNCIA

Nesta técnica, pudemos aplicar o tratamento de *Job plot* (Connors, 1987) de modo a se observar mudanças na intensidade de fluorescência (I_0/I) por variação da concentração de BZC e β -CD. Neste caso a cavidade da β -CD funciona como um solvente orgânico e sua adição a uma solução aquosa do AL irá aumentar a fluorescência da molécula hóspede. Deste modo, pôde-se determinar a estequiometria do complexo.

Este experimento só pôde ser realizado com BZC, o único anestésico estudado que possui fluorescência intrínseca detectável (Pinto, 1998). A concentração de BZC e de β -CD variou de modo a obter-se uma soma das concentrações constante e igual a 3 mM. O Fluorímetro utilizado é da marca Hitachi, modelo F-4500. As amostras foram preparadas em água variando-se o r de 0 a 1 (ver item 4.4.1) e excitadas a 284 nm. A emissão de fluorescência da BZC foi observada entre 320 e 450 nm.

4.5) AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

O experimento de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizado num calorímetro Universal V2.3D TA Instruments, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP. Amostras de 10 mg foram aquecidas a uma velocidade de 10 °C/min, numa faixa de 30-200 °C. A calibração do instrumento foi feita com Índio.

Foram feitas 4 amostras: AL; β -CD; mistura física de AL/ β -CD; complexo AL/ β -CD, nas razões molares 1:1 e 1:2.

Pelos termogramas obtidos pode-se avaliar se há a formação de complexos de inclusão na razão molar testada, monitorando-se mudanças nas temperaturas de fusão e na entalpia dos compostos antes e após a complexação. Estas medidas são bastante úteis para a caracterização de compostos ativos na indústria.

Esta técnica vem sendo empregada para avaliação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (Dollo *et al.*, 1996 a; 1996 b; Becket *et al.*, 1999; Loftsson & Masson,

2001) avaliando mudanças na temperatura de transição dos compostos após a complexação.

4.6) AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise morfológica do complexo de inclusão AL/ β -CD (1:1 e 1:2) foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio de varredura JEOL JSM –T300, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Amostras de AL, β -CD, misturas físicas AL/ β -CD e complexos de inclusão AL/ β -CD (1:1 e 1:2) foram montadas em *stubs* de alumínio, usando fita dupla face e cobertas com ouro sob vácuo por 180 s, para tornarem-se eletricamente condutivas.

Por esta técnica foi possível observar alterações morfológicas na estrutura cristalina dos compostos após a inclusão em β -CD. Embora estas evidências não sejam quantitativas, a morfologia ajudou a caracterizar a formação do complexo nas diferentes razões molares.

4.7) INTERAÇÃO BZC/ β -CD ANALISADA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

As medidas de ^1H RMN monodimensional foram realizadas em um espectrômetro Bruker DRX 500, pertencente ao Instituto de Química da USP. O pico da água foi ajustado em 4,7 ppm. Estas medidas serviram para uma análise qualitativa da complexação de BZC com β -CD na razão molar 1:1, observando-se alterações nos deslocamentos químicos após a inclusão.

Espectroscopia 2D de efeito Overhauser com rotating frame (ROESY) foi realizada com as seguintes condições: tempo de mixing = 0,3 s, spin-lock de 3 kHz, varredura de 6 kHz, 32 scans e 1 pulso de delay. Estas medidas foram realizadas em um espectrômetro Varian 600 MHz pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em colaboração com a Dra. Thelma de Aguiar Pertinhez e nos permitiram avaliar a formação do complexo de inclusão, assim como determinar a localização da molécula convidada dentro da cavidade da β -CD.

5) TESTES BIOLÓGICOS *IN VITRO*

5.1) HEMÓLISE

Utilizamos ratos Wistar isogênicos com idade de 90 dias, obtidos do Biotério Central da UNICAMP, alimentados com ração padrão e água *ad libidum*. A coleta de sangue foi feita por punção cardíaca em solução anticoagulante Alsiver (citrato de sódio 27 mM, NaCl 72 mM, glicose 114 mM e ácido cítrico 2,6 mM). As amostras foram centrifugadas a 10 °C por 5 min. a 700 x g e o plasma foi removido por aspiração. Os glóbulos vermelhos foram ressuspensos em PBS 5mM (fosfato de sódio 5 mM + NaCl 154 mM) a pH 7,4 tampão de osmolaridade e pH fisiológicos, sendo novamente centrifugados nas mesmas condições. Após três repetições consecutivas desse processo obteve-se o concentrado de hemácias (hematócrito de 100%), que foi mantido sob refrigeração a 10 °C.

5.1.1) ENSAIO HEMOLÍTICO ISOTÔNICO

Neste experimento adicionamos concentrações crescentes das seguintes amostras: AL; suspensão de lipossomas; β -CD; AL/lipossomas; complexo de inclusão AL/ β -CD (1:1), a uma suspensão de hemácias com hematócrito (Ht) de 0,15% diluídos em um volume final de 1 mL de tampão. Após incubação de 30 minutos as amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 1500 x g e a absorbância do sobrenadante foi lida a 412 nm, para determinação da hemoglobina livre em solução. Foram realizadas medidas em triplicata, para cada concentração testada e também para os seguintes controles: C₁ = eritrócitos em PBS (controle de hemólise mecânica) e C₂ = eritrócitos em água (controle de 100% de hemólise).

O efeito hemolítico (% de hemólise) pôde ser acompanhado medindo-se a concentração de hemoglobina no sobrenadante de acordo com a fórmula [9]:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \times 100 \quad [9]$$

onde A_a, A_{c1} e A_{c2} são, respectivamente, as absorbâncias da amostra e dos controles C₁ e C₂ a 412 nm (Ht 0,15%). Com os valores calculados de % de hemólise, curvas de

hemólise induzida por cada solução testada foram construídas, a partir das quais determinamos os valores da concentração máxima que a membrana suporta sem que haja promoção de hemólise (concentração de saturação da membrana - C_{sat}) e da concentração capaz de induzir hemólise total (C_{sol}) (Lichtenberg, 1985).

Nas amostras contendo lipossomas, foram feitos controles somente com a suspensão lipossomal, assegurando que o espalhamento das vesículas não ultrapassasse a leitura da hemólise mecânica em PBS (controle C_1). Com isso só foram considerados resultados em que a absorbância lida fosse maior que o controle contendo somente lipossomas. No caso dos testes com a LDC, foi necessário fazer a correção do pH para 7,4 com o menor volume possível de solução concentrada de NaOH devido à redução destes valores.

5.1.2) ENSAIO HEMOLÍTICO HIPOTÔNICO

A determinação da proteção à hemólise foi acompanhada também pela liberação de hemoglobina, após a incubação das suspensões de eritrócitos em solução hipotônica (tampão PBS contendo 0,063 M de NaCl) com diferentes concentrações das mesmas soluções usadas anteriormente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos e a concentração de hemoglobina no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente, a 412 nm. Foram realizadas medidas em triplicata, para cada concentração de droga e para os seguintes controles: C_1 = eritrócitos em PBS isotônico (controle da estabilidade dos eritrócitos), C_2 = eritrócitos em água destilada (controle de hemólise total) e C_3 = eritrócitos em PBS hipotônico (controle de 50% de hemólise).

O controle C_3 define a condição inicial de fragilidade da hemácia.

O cálculo para determinação do efeito protetor, definido como hemólise relativa (H.R.) foi feito de acordo com a seguinte equação (Malheiros *et al*, 1998):

$$H.R. = \frac{A_a}{A_{C_2}} \quad [10]$$

Valores de H.R. menores que 1 indicam proteção, enquanto valores maiores que 1 caracterizam a lise eritrocitária. A partir da curva de hemólise relativa obtida pôde-se determinar a concentração de droga onde ocorreu a máxima proteção (C_{prot}).

As medidas de hemólise iso e hipotônica indicam a estabilidade de membranas biológicas frente a formulação anestésica padrão e encapsulada em lipossomas ou complexada em β -CD. Elas são descritas como um bom parâmetro para medida de toxicidade de novos fármacos (Pape *et al.*, 1987; Parnham & Wetzig, 1993).

5.2) TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Outro teste sugerido para avaliação da toxicidade *in vitro* das formulações anestésicas é o de agregação plaquetária (Parnham & Wetzig, 1993), visto que anestésicos locais inibem a agregação plaquetária induzida por ADP e outros agentes indutores (Barbieri *et al.*, 1997; Watala *et al.*, 1999). Junto com testes de hemólise a agregação plaquetária pode ser utilizada como um *screening* inicial para registro de novas drogas e é considerado essencial para o estudo do uso de lipossomas para administração parenteral, por avaliar possíveis efeitos pró-agregantes das formulações (Parnham & Wetzig, 1993).

Quando um vaso sangüíneo é lesionado, o controle da homeostase se inicia com a rápida adesão de plaquetas circulantes no local do dano. Em segundos, as plaquetas são ativadas, secretando o conteúdo de suas organelas de modo a serem recrutadas mais plaquetas para o desenvolvimento do trombo. Porém, se este mesmo processo ocorre num vaso esclerótico ou obstruído, o trombo plaquetário resultante pode bloquear a artéria, restringindo o suplemento de sangue que pode levar à morte celular cuja extensão pode resultar em ocorrências fatais como o enfarte do miocárdio ou derrame cerebral (Andrews *et al.*, 1997; Lévy-Toledano, 1999). Portanto é importante se entender o que causa a ativação e agregação das plaquetas (Zucker & Nachmias, 1985).

Neste experimento utilizou-se um agregômetro de 2 canais da marca Chrono-Log, pertencente ao Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em colaboração com o Prof. Dr. Gilberto de Nucci.

O sangue de voluntários saudáveis, que não haviam ingerido medicamentos por pelo menos 2 semanas, foi coletado em citrato trissódico 3,18 % e centrifugado a 250 x g / 10 min. O sobrenadante (plasma rico em plaquetas - PRP) foi recolhido. Em seguida foi feita nova centrifugação a 900 x g / 12 min, para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP) usado como controle de 100% de agregação das plaquetas.

O PRP e o PPP foram então diluídos (1:5 v/v) com tampão PBS, conforme descrito na literatura (Parnham & Wetzig, 1993; Schreier *et al.*, 1997). Aliquotas de 400 μL de PRP foram tratadas com diversas concentrações de AL, lipossomas, $\beta\text{-CD}$, AL/lipossomas ou complexos de inclusão AL/ $\beta\text{-CD}$. Após 5 min. de incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$ foi adicionado o agonista (3-10 μM de ADP obtido da Sigma Chem. Co.) e observado o registro da agregação, por 5 min. Foram feitas triplicatas de cada concentração com diferentes doadores.

5.3) ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas células de fibroblastos da linhagem estabelecida V79, clone M8, de pulmão de hamster chinês, cedidas pelo Prof. Rogério Meneghini do Instituto de Química da USP/SP. Os fibroblastos foram mantidos em cultura contínua através de repiques periódicos pelos laboratórios de cultura de células e ensaios toxicológicos *in vitro*, até atingirem a densidade de confluência. As células foram cultivadas em meio DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbeco), contendo antibióticos (100 U/mL de penicilina G e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino em uma atmosfera umedecida com 5% de CO_2 , a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Para os ensaios de viabilidade celular, 96 poços de placas de cultura de células foram inoculados com $3 \cdot 10^4$ células/mL a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 48 h. O meio foi removido e repostado com meio tratado com diferentes concentrações do material a testar. As células foram então incubadas por 24 h e em seguida as amostras foram aspiradas. O teste da redução do brometo de tetrazolium 3 - (4,5 - dimetiltiazol-2-il) - 2,5 - bifenil (MTT) foi realizado adicionando-se o corante na concentração de 1 mg/mL e incubando as amostras por 5h (tempo necessário para a redução acontecer). O meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado etanol absoluto para solubilização do formazan. Após 10 minutos de agitação foi feita leitura no espectrofotômetro em 570 nm (Denizot & Lang, 1986). Foram testadas amostras com diferentes concentrações de AL; suspensão de lipossomas; $\beta\text{-CD}$; AL/lipossomas; complexos de inclusão AL/ $\beta\text{-CD}$ (1:1).

Diferentes ensaios têm sido usados para se analisar a citotoxicidade *in vitro* de drogas, incluindo a redução do brometo de tetrazolium 3 - (4,5 - dimetiltiazol-2-il) - 2,5 - bifenil (MTT). Neste teste, a redução do MTT nos indica a função mitocondrial baseado

na redução enzimática do sal brometo de tetrazolium que ocorre principalmente pela succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis.

6) TESTES BIOLÓGICOS *IN VIVO*

Os testes *in vivo* foram realizados com as formulações desenvolvidas e comparados com formulações comerciais. Estes ensaios fizeram parte do projeto de iniciação científica do aluno Rafael Vanini (Fapesp nº 99/09132-8) e também foram realizados em parte dentro da tese de mestrado da aluna Daniele Ribeiro de Araújo (CAPES).

Deste modo, os resultados serão apresentados como colaborações/orientações dentro deste trabalho e também nas perspectivas futuras.

IV) RESULTADOS E DISCUSSÕES

1) ANESTÉSICOS LOCAIS ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram preparados como descrito em materiais e métodos (item 1) e posteriormente caracterizados, como mostraremos a seguir.

1.1) DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS VESÍCULAS

Comparando-se as medidas realizadas com vesículas unilamelares de 0,4 μM vazias e após a incorporação dos anestésicos, pudemos observar que as vesículas apresentavam um bom grau de homogeneidade, com duas populações principais de ca 400 (75% das vesículas) e 150 (25%) nm. Após a encapsulação com os anestésicos, estas populações se mantiveram aproximadamente iguais, assim como suas proporções relativas (Tabela 4).

Tabela 4 Distribuição média do tamanho das vesículas medido por espalhamento de luz quasi-elástico.

Tipo de Lipossoma	Nº de amostras	Tamanho médio das populações (nm)	Proporção aproximada (%)
LUV 0,4 μM	n=10	392,4 \pm 41,8	74
		146,9 \pm 20,9	26
BZC/LUV 0,4 μM	n=9	428,7 \pm 30,2	75,5
		147,8 \pm 30,1	24,5
BVC/LUV 0,4 μM	n=10	413,2 \pm 49,2	74,5
		150,3 \pm 22,0	25,5
LDC/LUV 0,4 μM	n=10	433,0 \pm 47,3	73
		145,1 \pm 18,1	27

As medidas foram realizadas com as mesmas amostras após 4 semanas do preparo (dados não mostrados), não sendo observadas mudanças significativas nos tamanhos e proporções apresentados, para nenhum dos três AL estudados. Isto demonstra a estabilidade das formulações testadas durante este período.

1.2) DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Por esta metodologia é possível determinar a eficiência de encapsulação dos AL nas vesículas lipossomais. Porém a técnica requer o uso de MLV, pois as unilamelares não têm peso suficiente para serem separadas por ultra-centrifugação (de Paula, 1993). Assim, fizemos a quantificação das preparações de vesículas MLV, que posteriormente foram transformadas em unilamelares, por extrusão.

Os valores da % de encapsulação obtidos utilizando 4,0 mM de vesículas podem ser vistos na **Tabela 5**.

Tabela 5 Eficiência de encapsulação de anestésicos locais em lipossomas multilamelares. Tampão HEPES 20 mM, pH 7,4.

Anestésico Local	Nº de amostras	Eficiência de encapsulação (%)
BZC	n = 4	30,0 ± 2,8
BVC	n = 9	24,8 ± 4,2
LDC	n = 4	19,1 ± 3,6

Os AL estudados apresentam propriedades físico-químicas distintas como coeficiente de partição e solubilidade aquosa (**Tabela 2**). Essas características refletem os diferentes valores obtidos no processo de encapsulação.

A LDC, o mais hidrofílico, foi o que apresentou a menor % de encapsulação, comparando-se com a BZC e a BVC. A menor partição em membranas e a boa solubilidade aquosa justificam essa porcentagem de encapsulação mais baixa. É interessante notar que em pH fisiológico, a ionização parcial da BVC (pKa = 8,1) contrapõe sua grande lipofilicidade, tornando sua encapsulação menos eficiente que a da BZC. Neste caso, a BZC apresenta caráter mais lipofílico que o da BVC, em pH 7,4.

Tanto o sobrenadante quanto o precipitado foram testados para se saber o teor de fosfato, obtendo-se valores bem próximos do esperado no precipitado (3,81 mM) e um valor baixo no sobrenadante (0,02 mM) provavelmente devido a uma população de vesículas menores que não puderam ser separadas. Esses testes foram importantes para avaliar a reprodutibilidade e eficiência do processo de preparação das formulações lipossomais.

2) ANESTÉSICOS LOCAIS COMPLEXADOS EM β -CD

2.1) CÁLCULOS COMPUTACIONAIS UTILIZANDO MECÂNICA MOLECULAR

Cálculos computacionais foram utilizados para melhor compreendermos como é a relação entre as moléculas hospedeira (ciclodextrina) e convidada (anestésico). As diferentes possibilidades de interação entre hospedeiro/convidado foram montadas, gerando-se assim os arquivos de entrada, que em seguida foram submetidos aos testes de minimização molecular no sistema MM+ e OPLS por meio do pacote computacional HYPER CHEM. Com isso, obtivemos as entalpias (ΔH) de formação do complexo e as energias de afinidade ($E_{\text{afinidade}}$) para as associações (como descrito em Materiais e Métodos - item 4.1).

A formação do complexo de inclusão ocorre no sentido de atingir a associação mais estável. Quando duas moléculas possuem afinidade, a inclusão em uma região específica da molécula hospedeira, chamada de cavidade, implica em um abaixamento de energia total do sistema. Existem muitos tipos e formas diferentes de duas moléculas se relacionarem. Os estudos de Van der Waals, sobre interações dipolares, e o desenvolvimento posterior das teorias sobre o efeito hidrofóbico (Tanford, 1973) formam a base para estes estudos.

Chamamos de efeito hidrofóbico a associação entre moléculas que levam à exclusão do meio aquoso. Quando duas moléculas se associam na formação de um complexo de inclusão, a parte mais hidrofóbica fica situada na posição de menor probabilidade de se encontrar uma molécula de água. Como o interior da CD oferece um ambiente de baixa polaridade, ela exerce atração sobre a parte hidrofóbica de moléculas anfífilas hóspedes, sendo a interação hidrofóbica e interações dipolares de Van der Waals as principais forças estabilizadoras da complexação (Lasic, 1993).

Já está descrito na literatura que cerca de seis moléculas de água cabem no interior da cavidade da β -ciclodextrina. Porém, estas moléculas não possuem grande afinidade com esta região, sendo liberadas rapidamente quando uma estrutura apolar se aproxima (Matioli, 2000).

No caso dos anestésicos, os cálculos foram baseados nos trabalhos de De Azevedo (2000) e Lino (2002), onde as posições possíveis em cada associação convidado-CD foram testadas. Estas posições são relativas a um eixo imaginário que passa pelo centro de massa da molécula hospedeira. O ângulo com o eixo vertical marca a inclinação do soluto dentro do sistema macromolecular e a variação deste ângulo está relacionada com a formação de complexos estáveis, com mais de uma molécula de ciclodextrina.

As posições relativas entre o centro de massa do sistema macromolecular e o meio externo foram estudadas para encontrarmos a posição de menor energia entre as duas moléculas, hospedeira e convidada (Marconi *et al.*, 1995; Ashwin *et al.*, 1997; Balabai *et al.*, 1998). Assim, através deste eixo imaginário a aproximação entre as duas moléculas pôde ser mapeada encontrando-se a estrutura e o local de inserção de menor energia entre as duas moléculas. Esta posição geométrica está próxima do centro da cavidade da ciclodextrina.

Descreveremos os resultados obtidos para estequiometria 1:1 e 1:2, como segue.

2.1.1) ESTEQUIOMETRIA 1:1

As interações levaram em consideração as diferentes possibilidades de interação de cada molécula anestésica com a cavidade da β -CD. Sendo que a entrada na cavidade poderia ser feita pela *borda* ou pela *coroa* (Fig. 7 - materiais e métodos). Como o volume da β -CD é de 262 \AA^3 (Frömming & Szejtli, 1994), pudemos esquematizar a interação dos AL com o cone hidrofóbico da β -CD. Descreveremos então, cada anestésico em separado.

Utilizando a geometria da molécula convidada como referência, um átomo pode ser marcado na extremidade da molécula. Assim, as posições **A** e **B** são definidas como aquelas onde o átomo de referência está próximo da *coroa* e da *borda*, respectivamente.

Utilizando dados de cristalografia de raios-X foi possível elaborar a geometria molecular da β -ciclodextrina. A elaboração da macromolécula foi feita tomando-se como base uma unidade glicopiranosídica e conectando as outras, uma a uma até o fechamento

do anel. Para a perfeita simetria é necessário observar os ângulos diedros, torcionais e planares para cada unidade. Foi utilizado para ambos os campos de força, o gradiente Polak-Ribiere menor do que $0,01 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. A geometria de menor energia para a β -ciclodextrina é apresentada na Fig. 10.

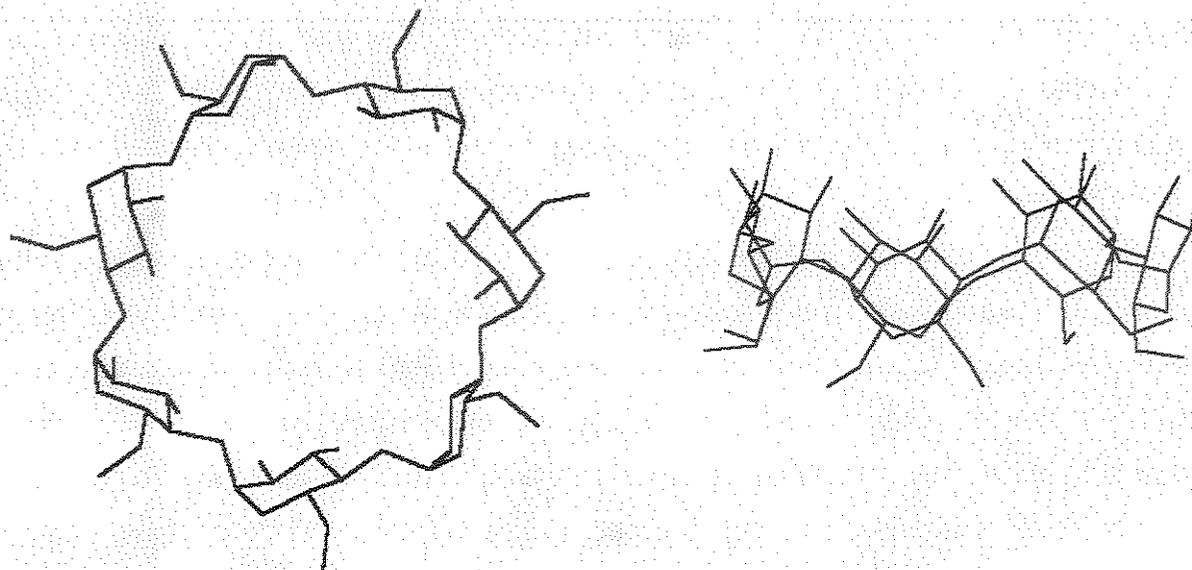


Fig. 10 Otimização da estrutura da β -ciclodextrina utilizando o software HYPER CHEM.

- **Benzocaína**

A BZC, um éster derivado do ácido benzóico, possui volume molecular pequeno comparativamente aos demais AL de uso clínico (Pinto *et al.*, 2000). A BZC pode interagir com seu anel aromático (Ar) de 2 formas: pela *coroa* (A) ou pela *borda* (B) da β -CD. Na **Fig. 11**, podemos observar a modelagem da molécula.



Fig. 11 Otimização da estrutura da Benzocaína utilizando o software HYPER CHEM.

Como demonstra a modelagem, a complexação do anel aromático da BZC dentro da cavidade hidrofóbica da β -CD é favorecida e a razão molar BZC/ β -CD prevista para a formação do complexo de inclusão é de 1:1. Na **Fig. 12**, observa-se uma complexação total da molécula de Benzocaína, com o anel aromático localizado dentro da cavidade hidrofóbica da β -CD. Isto se deve ao fato da profundidade da cavidade ser de tamanho semelhante ao comprimento do anel aromático.

A **Tabela 6** mostra as $E_{\text{afinidade}}$ obtidas para a BZC.

Tabela 6 Resultados obtidos por cálculos com campos de força MM+ e OPLS. Valores de $E_{\text{afinidade}}$ (Kcal.mol⁻¹) na estequiometria 1:1 BZC/ β -CD.

	MM+	OPLS
Ar - A	-17,25	-19,48
Ar - B	-19,77	-20,86

A associação que leva ao maior abaixamento de energia total ($E_{\text{afinidade}}$) é a posição **B** (**Ar-borda** - **Fig. 12**) isto se deve a forte interação entre o átomo de nitrogênio -NH₂ e as hidroxilas localizadas na *borda* da ciclodextrina, pois o alinhamento **B** coloca este grupo próximo a face que contém o maior número de pontes de hidrogênio.

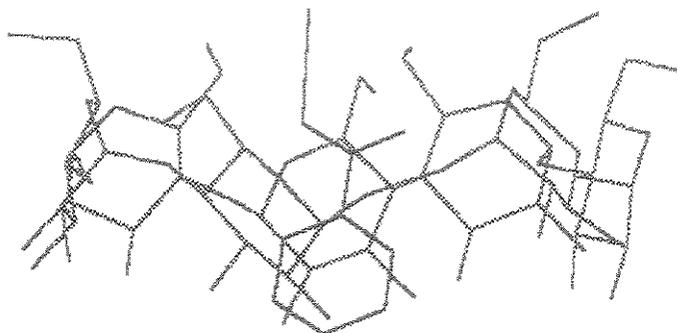


Fig. 12 Associação de menor energia observada para o complexo de inclusão BZC/ β -CD 1:1.

- **Bupivacaína**

No caso da BVC é importante destacar três características ausentes na molécula de BZC e importantes para a complexação com a CD: i) os grupamentos metila em posição orto no anel aromático, ii) a ciclização da cadeia lateral originando o anel piperidínico da BVC e iii) o substituinte butila hidrofóbico, associado ao anel piperidínico.

Portanto, a primeira pergunta proposta foi a de como seria a complexação das diferentes regiões da BVC com a ciclodextrina. Foram utilizadas duas abordagens diferentes, direcionando o anel aromático (**Ar**) e o grupo piperidínico (**Pi**), como faces da molécula de BVC. Utilizamos a associação entre o aromático da molécula de Bupivacaína com o anel piperidínico em axial (**Ar-ax**) ou equatorial (**Ar-eq**), totalmente inseridas na cavidade da β -CD pela *coroa* ou pela *borda* (**Fig. 13**), assim como o anel piperidínico. Isto nos levou às interações, que podem ser vistas na **Tabela 7**.

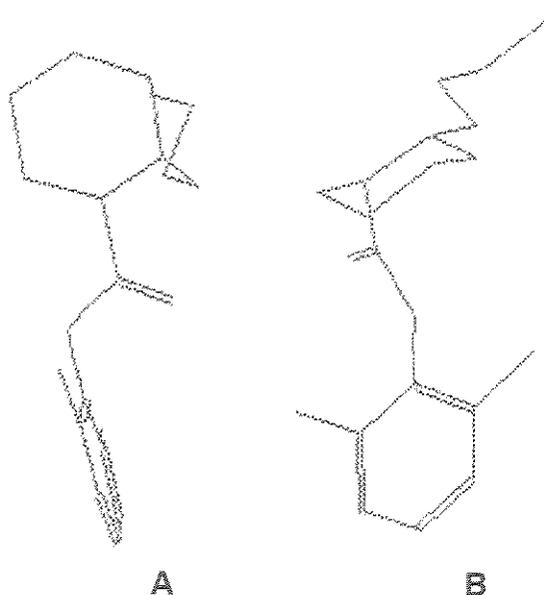


Fig. 13 Otimização da estrutura da Bupivacaína utilizando o software HYPER CHEM. **A)** Posição equatorial do anel piperidínico; **B)** Posição axial do anel piperidínico.

Tabela 7 Resultados obtidos por cálculos com campos de força MM+ e OPLS. Valores de $E_{\text{afinidade}}$ (Kcal.mol⁻¹) na estequiometria 1:1 BVC/ β -CD.

	MM+	OPLS
Ar-ax – A	-23,54	-53,52
Ar-ax – B	-28,90	-50,31
Ar-eq – A	-27,03	-37,52
Ar-eq – B	-24,38	-44,48
Pi-ax – A	-74,91	2,37
Pi-ax – B	-53,89	11,37
Pi-eq – A	-70,38	-17,64
Pi-eq – B	-68,93	-22,49

A associação que demonstrou o maior abaixamento de energia total, na razão molar 1:1 para o anel aromático, foi o isômero com o anel piperidínico em axial, direcionado para a *coroa* da ciclodextrina (**Ar-ax-A**). A diferença entre a posição *coroa* e *borda* foi pequena no OPLS, como observado por Salvatierra *et al.* (1996) para a inserção de ácido benzóico na cavidade de β -CD. Esta posição é coerente com a densidade eletrônica em volta do anel piperidínico, demonstrando uma forte interação, através de pontes de hidrogênio, entre o nitrogênio do grupamento amina e as hidroxilas secundárias da ciclodextrina. Este nitrogênio deve ficar prioritariamente direcionado para a *borda* (**Fig. 14**). Para a inserção da face piperidínica, parte dieltralmente oposta ao anel aromático, foram observadas energias relativamente maiores do que a inserção do anel aromático, como pode ser observada na **Tabela 7**.

Para a estequiometria 1:1, portanto, a geometria de menor energia é aquela do isômero axial em orientação **A**. A inserção do grupo piperidínico, neste caso, forma o composto de inclusão mais estável do que com o anel aromático inserido na cavidade. Este resultado é uma indicação da forte interação do anel piperidínico com as $-OH$ da β -CD. A **Fig. 14** apresenta a geometria de menor energia para o campo de força MM+.

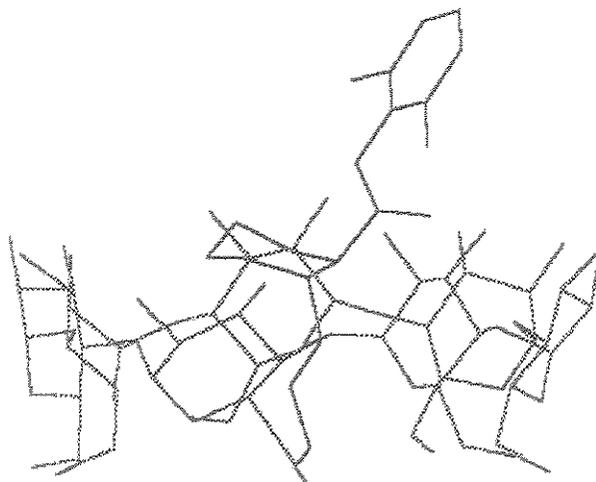


Fig. 14 Associação de menor energia observada para o complexo de inclusão BVC/ β -CD 1:1.

• Lidocaína

A Lidocaína possui uma geometria molecular formada por um anel aromático (**Ar**) e um garfo formado pela ligação $N-(CH_2-CH_3)_2$ (**Garfo**) (**Fig. 15**).

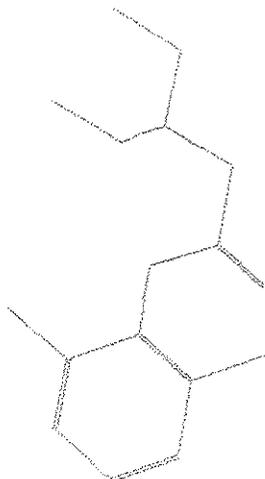


Fig. 15 Otimização da estrutura da Lidocaína utilizando o software HYPER CHEM.

Estas duas partes da molécula podem ser bem distintas e causar efeitos hidrofóbicos bastante semelhantes. Portanto, optamos por estudar estas duas possíveis orientações, com relação a Lidocaína. Estas duas possibilidades, associadas às duas posições para a inserção na cavidade da CD (*borda* ou *coroa*) estabeleceram 4 possíveis formas de interação. A **Tabela 8** apresenta as energias de afinidade de todas as espécies envolvidas na formação do composto de inclusão LDC/ β -CD 1:1.

Tabela 8 Resultados obtidos por cálculos com campos de força MM+ e OPLS. Valores de $E_{\text{afinidade}}$ (Kcal.mol⁻¹) na estequiometria 1:1 LDC/ β -CD.

	MM+	OPLS
Ar – A	-18,75	-37,14
Ar – B	-16,96	-26,38
Garfo – A	-25,40	-57,95
Garfo - B	-24,07	-34,55

As duas posições relativas **Ar** e **Garfo** foram definidas anteriormente como ponto de partida. As duas moléculas (hospedeiro e convidado) foram alinhadas de forma que a energia mínima local para aquela conformação específica fosse obtida. As duas posições são bastante semelhantes, porém, uma pequena diferença para a interação do garfo com a coroa da β -ciclodextrina foi observada. O composto de inclusão de menor energia de afinidade é apresentado na **Fig. 16**.

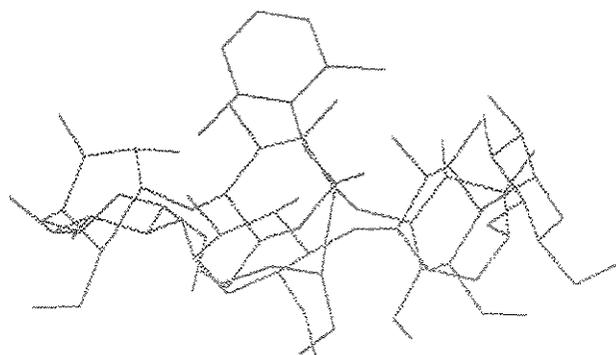


Fig. 16 Associação de menor energia observada para o complexo de inclusão LDC/ β -CD 1:1.

Foi possível observar a proximidade entre a estrutura **Garfo** e as hidroxilas primárias da β -CD, demonstrando uma forte interação entre os átomos da molécula hospedeira e da molécula convidada. Outra indicação da estabilidade do composto de inclusão foi a inclinação de unidades glicopiranosídicas do sistema macromolecular, induzida pela LDC. A posição relativa de menor energia nos sugere a possibilidade da formação do complexo de inclusão também em estequiometria 1:2 (Lino & Loh, 2000), pois o anel aromático está fora da cavidade, na interação 1:1 de menor energia (**Garfo-borda**). Portanto, outra ciclodextrina poderia se acomodar neste anel e estabilizar ainda mais a geometria molecular final.

Somente a BZC acomodou seu anel aromático preferencialmente na cavidade da ciclodextrina, enquanto a BVC e LDC acomodaram seus substituintes alquila. Comparando as energias relativas para a estabilidade dos compostos de inclusão obtemos uma ordem de encapsulamento efetivo para a formação dos compostos de inclusão entre os AL e a β -CD: BVC > LDC > BZC.

2.1.2) ESTEQUIOMETRIA 1:2

Nesta etapa consideramos para interação na razão molar 1:2 com a β -CD somente a BVC e a LDC, por possuírem mais de um local para inserção dentro da cavidade.

Um detalhe que deve ser levado em consideração neste caso, é a energia entre as duas moléculas de β -ciclodextrina. Um estudo sobre as energias envolvidas na interação entre dímeros de ciclodextrinas (Cervello *et al.*, 2000) demonstrou que, se não houver outra molécula envolvida, duas moléculas de ciclodextrinas tem a tendência de formar um complexo *borda-borda*. Nesse arranjo as hidroxilas secundárias talvez possam ficar mais próximas entre si, estabilizando-se. Os resultados daquele grupo também comprovaram a pequena barreira de energia entre estas posições relativas.

- **Bupivacaína**

Inicialmente fizemos o estudo da BVC complexada em β -CD na estequiometria 1:2 (AL/ β -CD), pois os cálculos teóricos demonstraram que duas moléculas de β -CD podem acomodar uma molécula de BVC, como veremos a seguir.

A partir da estrutura inicial do anel piperidínico:coroa (a de menor energia entre todas as possíveis estequiometrias 1:1 – como visto na **Tabela 7**) adicionamos uma segunda molécula de β -ciclodextrina.

Os resultados obtidos (**Tabela 9**) demonstraram uma tendência a formação de um sistema em que a adição da segunda ciclodextrina empurra o anel aromático da BVC mais para baixo. O anel piperidínico fica posicionado entre as duas ciclodextrinas e a ramificação alquila tem seus quatro carbonos inclusos na cavidade, porém com a segunda β -ciclodextrina direcionando sua *borda* para a *coroa* do primeiro sistema (**Fig. 17**).

Tabela 9 Resultados obtidos por cálculos com campos de força MM+ e OPLS. Valores de $E_{\text{afinidade}}$ (Kcal.mol^{-1}) na estequiometria 1:2 BVC/ β -CD.

	MM+	OPLS
Pi-ax - bb	-24,65	-6,23
Pi-ax - cb	-21,30	-44,56
Pi-ax - cc	-18,03	-137,68
Pi-eq - bb	-41,55	-105,80
Pi-eq - cb	-24,21	-30,33
Pi-eq - cc	-21,96	18,01

É importante observar que a estequiometria 1:2 resulta em interações com $E_{\text{afinidade}}$ mais negativas do que no caso 1:1, indicando ser mais estável (utilizando campo de força OPLS). Parece existir também um equilíbrio entre a atração devido às interações ponte de hidrogênio e a hidrofobicidade para a inclusão. Devido ao anel piperidínico ter um átomo de nitrogênio esta é a parte mais polar de todo sistema, dedicando-se assim às interações ponte de hidrogênio. Talvez, neste caso, as duas coroas direcionadas uma para outra criassem uma competição desnecessária. A diferença entre *coroa-borda* e *borda-coroa* não é significativa, assim como discutido anteriormente para *Ar:coroa* ou *Ar:borda*. A interação *borda-borda* é menos favorável, porém apresenta uma energia mais favorável do que para *coroa-coroa*.

Este resultado é importante porque foi possível comprovar que, para o caso da formação do complexo de inclusão em estequiometria 1:2, o fator determinante para as posições relativas entre as moléculas de ciclodextrinas envolvidas é a interação entre elas e a região da molécula hóspede que é utilizada na formação do complexo de inclusão. Além disso, as interações intermoleculares podem ser relevantes para a formação do complexo.

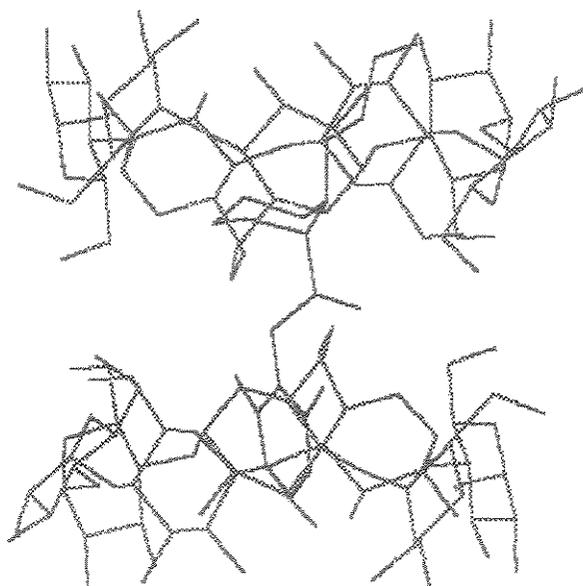


Fig. 17 Associação de menor energia observada para o complexo de inclusão BVC/ β -CD 1:2.

- **Lidocaína**

Para a LDC a estequiometria 1:2 foi estudada levando-se em consideração os alinhamentos relativos as ciclodextrinas e a posição de menor energia 1:1 (**Garfo-coroa**, **Tabela 8**) como molécula convidada do segundo sistema hospedeiro. Assim, as três posições relativas entre as ciclodextrinas são: **borda-borda (bb)**, **coroa-borda (cb)** e **coroa-coroa (cc)**. A **Tabela 10** mostra as energias de afinidade para a formação do complexo de inclusão em estequiometria 1:2 para LDC/ β -CD.

Tabela 10 Resultados obtidos por cálculos com campos de força MM+ e OPLS. Valores de $E_{\text{afinidade}}$ (Kcal.mol⁻¹) na estequiometria 1:2 LDC/ β -CD.

	MM+	OPLS
bb	-27,79	-10,25
cb	-25,73	-42,4
cc	-25,62	-70,49

Observando as **Tabelas 9 e 10** é possível observar um pequeno aumento na energia de afinidade para a estequiometria 1:2. Os alinhamentos menos estáveis se confundem com a energia do composto mais estável 1:1, devendo ser considerado compatível com aquele. Uma diferença de apenas 2,3 Kcal.mol⁻¹ entre $E_{\text{afinidade}}$ da posição de menor energia nas estequiometrias 1:1 e 1:2 claramente aponta para a maior estabilidade da estequiometria 1:1. A estrutura 1:1 possui energia compatível com a 1:2 quando o **Garfo** está orientado para a inserção na cavidade, próximo das hidroxilas primárias (CH₂-OH). Na **Fig. 18** podemos observar a estrutura de menor energia da estequiometria 1:2 para o complexo de inclusão LDC/ β -CD.

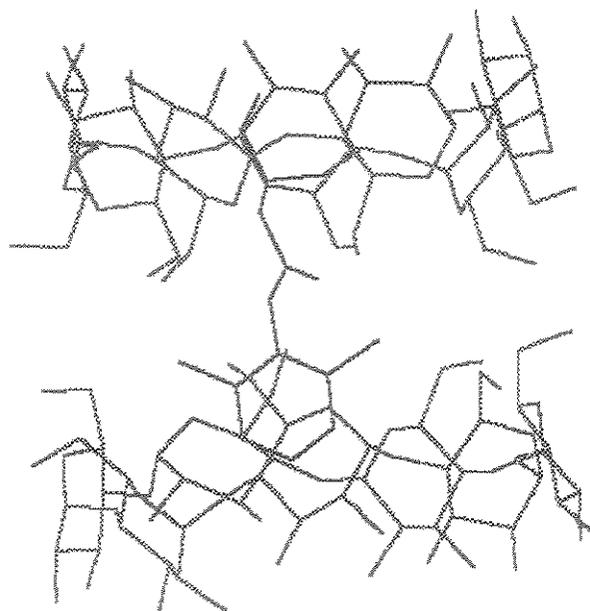


Fig. 18 Associação de menor energia observada para o complexo de inclusão LDC/ β -CD 1:2.

O anestésico BZC forma complexos 1:1 com o anel aromático inserido na cavidade preferencialmente pela borda. A LDC e a BVC podem formar estequiometrias 1:1 ou 1:2 (dependente da concentração), sendo que os cálculos indicam um abaixamento de energia que pode favorecer a formação de complexos 1:2.

2.2) CINÉTICA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO AL/ β -CD

A cinética de formação dos complexos está diretamente relacionada a hidrofobicidade da molécula hospedeira a ser incorporada. Devido a grande hidrofobicidade da molécula de BVC, a cinética de formação do complexo BVC/ β -CD é bastante rápida, não observando-se um aumento gradual na absorbância após a solubilização e agitação dos compostos (**Tabela 11**).

Tabela 11 Tempo médio observado para a formação dos complexos de inclusão em β -CD.

Complexo de inclusão com β -CD	Tempo (min)
BVC	< 10
BZC	40
LDC	150

Para drogas com hidrofobicidade intermediária como a BZC, observa-se o equilíbrio após cerca de 40 minutos de agitação e no caso da LDC, um anestésico considerado mais hidrofílico, o tempo necessário para atingir o equilíbrio chega a 2,5 h ou 150 min.

Já foram observados tempos médios de aproximadamente 24 h para a formação de complexos com compostos mais hidrofílicos que os AL, como é o caso das drogas para tratamento da tuberculose: Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol (Lima, 2001).

2.3) CÁLCULO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO BZC/ β -CD UTILIZANDO ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE

A habilidade da β -CD em aumentar a solubilidade aquosa da BZC foi examinada. Observou-se um aumento linear em função da concentração de ciclodextrina (**Fig. 19**) correspondendo a uma isoterma de solubilidade definida por Higuchi & Connors (1965) como do tipo A_L . Esta relação sugere a formação de complexo de inclusão na razão molar 1:1 e, neste caso, somente complexos solúveis foram formados.

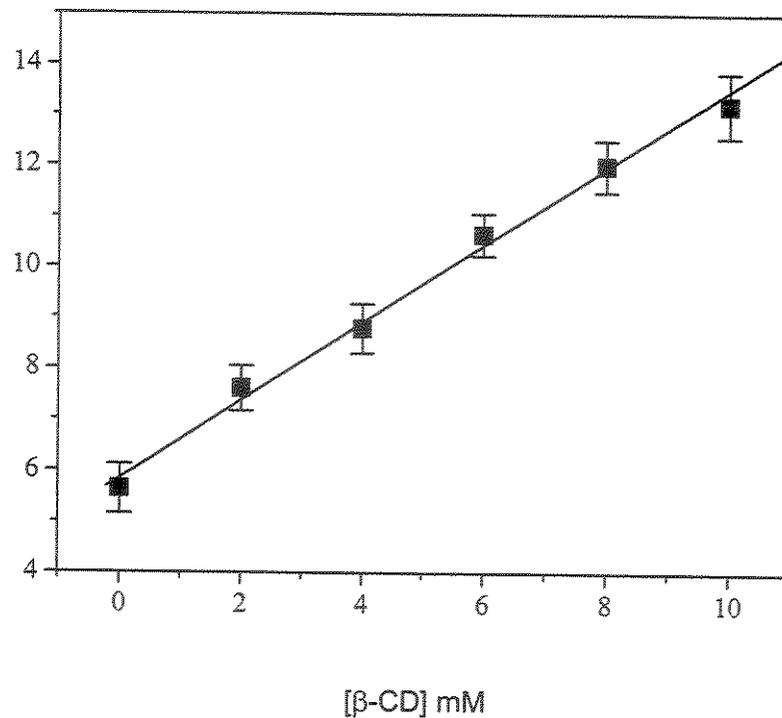


Fig. 19 Isoterma de solubilidade de BZC em presença de concentrações crescentes de β -CD.

A constante de associação (K_a) foi calculada como descrito pela equação 6, como 549 M^{-1} , indicando a formação de um complexo estável (Loukas *et al.*, 1998).

O aumento na solubilidade aquosa da BZC na presença de β -CD nos mostra que esta molécula é capaz de formar complexos de inclusão. Devido a complexação ocorrer na razão molar 1:1, espera-se que a solubilidade em água seja aumentada pela complexação até o limite da solubilidade da β -CD (ca. 16 mM, Szejtli, 1998). De fato os resultados da **Fig. 19** parecem provar esta hipótese, pois na presença de 10 mM de β -CD, a solubilidade de BZC atinge valores de 13,4 mM, i.e., pelo menos 3 vezes maior do que a da droga sozinha (Pinto *et al.*, 2000).

Dollo *et al.* (1996) determinaram para a BVC e a LDC neutras a constante de associação. Segundo eles a BVC apresentou o maior K_a ($112,0 \text{ M}^{-1}$) enquanto a LDC teve uma associação de apenas $25,8 \text{ M}^{-1}$. Segundo ele, a associação da BVC pode ser considerada como uma interação forte.

2.4) DETERMINAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA DO COMPLEXO BZC/ β -CD POR FLUORESCÊNCIA

Neste experimento utilizamos o tratamento de *Job plot* (Connors, 1987) para avaliar a estequiometria de complexação do anestésico BZC com β -CD. Os outros AL não puderam ser testados desta maneira, por não possuírem fluorescência intrínseca (de Paula & Schreier, 1995).

Para se determinar a estequiometria de complexação pelo método de variação contínua, um parâmetro físico diretamente relacionado com a concentração do complexo pode ser medido e graficado em função de r (por exemplo, o deslocamento químico no RMN ou a intensidade de fluorescência neste experimento). O valor máximo para este parâmetro irá ocorrer em $r = m / m + n$, onde m e n são as proporções de BZC e β -CD no complexo, respectivamente ($BZC_m:\beta\text{-}CD_n$). Isto quer dizer que, se a estequiometria é 1:1 ($m, n = 1$) o valor máximo para o parâmetro examinado será observado em $r = 0,5$ (se a estequiometria é 1:2 o valor máximo será observado em $r = 0,33$). A quantidade calculada de variação do parâmetro físico (neste caso, a intensidade de fluorescência) é proporcional a concentração de complexo e podem ser graficadas contra r .

Foram obtidas varreduras de cada razão molar testada como visto nas **Fig. 20 - A e B**.

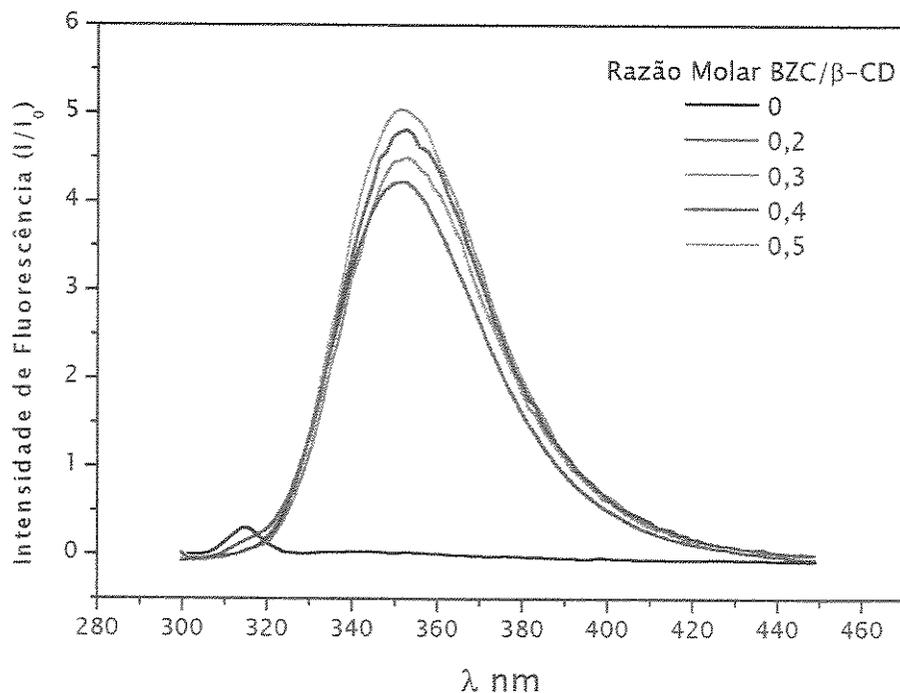


Fig. 20 – A) Espectros de emissão de fluorescência de BZC complexada em β -CD na razão molar de 0 a 0,5. Os valores de r (razão molar BZC/ β -CD) são mostrados no gráfico.

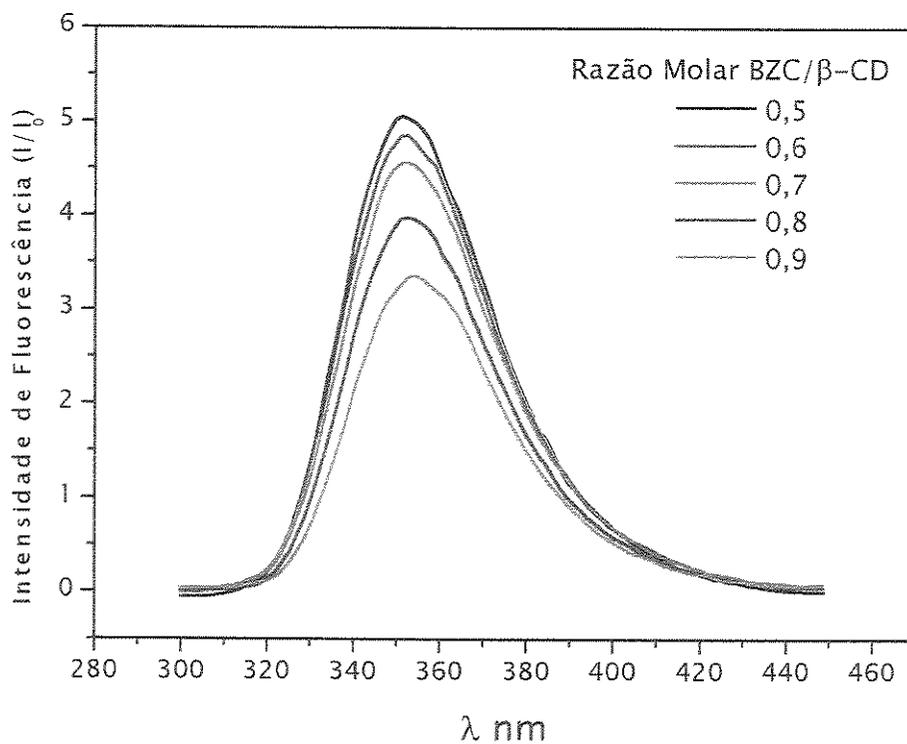


Fig. 20 – B) Espectros de emissão de fluorescência de BZC complexada em β -CD na razão molar de 0,5 a 1,0. Os valores de r (razão molar BZC/ β -CD) são mostrados no gráfico.

Ao analisarmos o gráfico acima observamos que, com o aumento da concentração de BZC há apenas uma pequena variação (3 nm) no comprimento de emissão máximo dos espectros, deslocando-se para λ maiores.

A intensidade de fluorescência (I/I_0) aumenta e depois diminui. O seu máximo é atingido justamente na razão molar 1:1 ($r = 0,5$), indicando ser esta a razão molar de maior anisotropia da molécula do anestésico dentro da cavidade e por isso a estequiometria preferencial deste complexo.

Ao graficarmos a variação da intensidade de fluorescência pela razão molar de complexação (r) observamos que o valor máximo tem um valor de $r = 0,5$ para o complexo BZC/ β -CD, evidenciando uma estequiometria de 1:1 (Fig. 21). O cálculo de r foi feito utilizando $\lambda = 352$ nm.

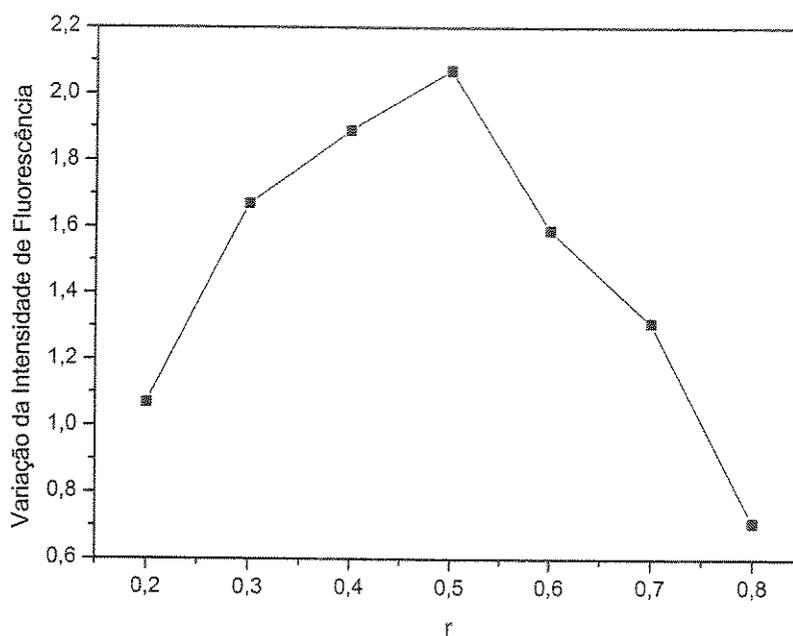


Fig. 21 Gráfico de variação contínua (*Job plot*) de BZC/ β -CD. A inflexão em $r = 0,5$ indica complexação na razão molar BZC/ β -CD = 1:1.

2.5) CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

Algumas evidências da ocorrência de inclusão podem ser obtidas pela análise térmica de complexos. Quando a molécula hóspede se insere na cavidade de ciclodextrinas, o seu ponto de fusão ou sublimação geralmente se desloca para temperaturas diferentes ou desaparecem dentro da faixa de temperatura onde a ciclodextrina se decompõe (Frömming & Szejtli, 1994).

Nesta etapa do projeto foram feitos testes utilizando as razões molares 1:1 e 1:2 AL/ β -CD. Com isto pudemos mais uma vez comparar qual seria a melhor razão molar de incorporação dos AL dentro da cavidade.

Obtivemos termogramas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) que nos indicam a formação de complexo de inclusão na razão molar 1:1. Nos termogramas abaixo (**Figs. 22, 23 e 24**) podemos ver as 4 amostras usadas no ensaio: β -CD, AL, complexo de inclusão AL/ β -CD, e mistura física AL/ β -CD. Os valores das temperaturas de transição e de ΔH estão mostrados na **Tabela 12**.

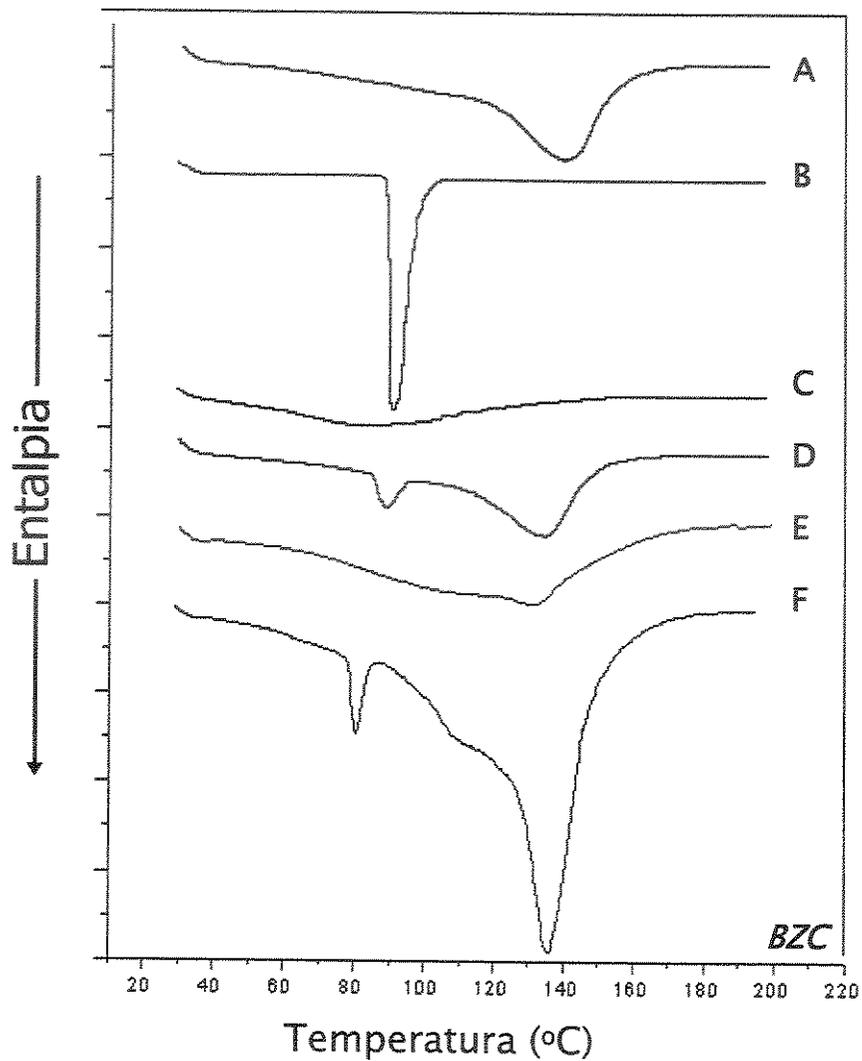


Fig. 22 Termogramas de calorimetria diferencial de varredura das amostras: (A) β -CD, (B) BZC, (C) complexo de inclusão BZC/ β -CD 1:1, (D) mistura física BZC/ β -CD 1:1, (E) complexo de inclusão BZC/ β -CD 1:2 e (F) mistura física BZC/ β -CD 1:2.

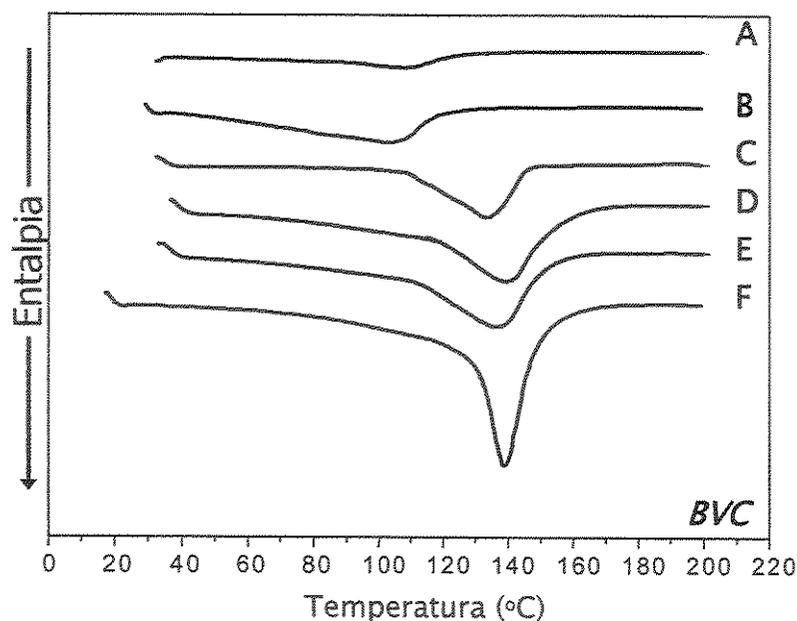


Fig. 23 Termogramas de calorimetria diferencial de varredura das amostras: (A) complexo de inclusão BVC/ β -CD 1:1, (B) complexo de inclusão BVC/ β -CD 1:2, (C) BVC, (D) β -CD, (E) mistura física BVC/ β -CD 1:1 e (F) mistura física BVC/ β -CD 1:2.

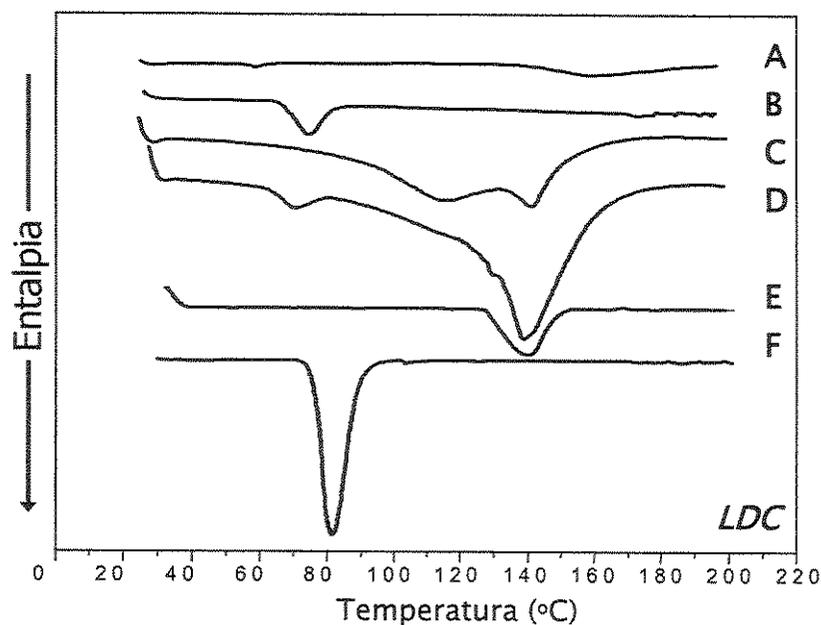


Fig. 24 Termogramas de calorimetria diferencial de varredura das amostras: (A) complexo de inclusão LDC/ β -CD 1:1, (B) mistura física LDC/ β -CD 1:1, (C) complexo de inclusão LDC/ β -CD 1:2, (D) mistura física LDC/ β -CD 1:2, (E) β -CD e (F) LDC.

O termograma dos AL puros mostram picos endotérmicos com temperaturas de transição máxima em 90,7 (BZC), 132,9 °C (BVC) e 81,5 para a (LDC) correspondentes aos seus respectivos pontos de fusão (Merck Index, 1996). A transição observada na amostra de β -CD também está de acordo com os dados já observados na literatura (Loftsson & Brewster, 1996). Em relação à mistura física dos compostos foi observado um pico intermediário ao das substâncias puras demonstrando que não há complexação total neste caso. Podemos considerar a ausência de interações entre *host-guest* neste sistema.

Neste experimento, optamos por testar a incorporação nas estequiometrias 1:1 e 1:2 AL/ β -CD, como discutido anteriormente, devido a possibilidade de interação da molécula do anestésico com mais de uma molécula de β -CD.

A LDC, a mais hidrofílica dos três AL, não deve formar complexos 1:2 como pode ser observado nos termogramas em que aparecem duas populações: Lidocaína complexada (114,4 °C) e CD livre restante (141,2 °C). Esses resultados estão de acordo com os previstos na modelagem molecular (item 2.1).

A formação de complexos de inclusão é evidenciada pela perda da transição endotérmica antes observada nos compostos puros em ambas as razões molares para a BZC, BVC e para a LDC (**Figs. 22, 23 e 24**). Porém nota-se que na razão molar 1:1 esta perda na transição é mais pronunciada do que na razão 1:2, demonstrando ser esta a melhor razão de inclusão das moléculas testadas.

O alargamento dos picos observado após a complexação pode ser evidenciado pela diminuição geral da entalpia da β -CD livre.

Tabela 12 Temperatura de transição e ΔH observados por DSC.

	Temperatura de transição (°C)	ΔH (J/g)
β -CD	140,4	382,0
Complexo BZC/ β -CD 1:1	Alargado entre 60,0 e 120,0	174,0
Complexo BZC/ β -CD 1:2	Alargado 131,3	340,6
BZC	90,7	145,4
Mistura Física BZC/ β -CD 1:1	87,5 e 132,9	20,8 e 168,3
Mistura Física BZC/ β -CD 1:2	84,9 e 140,1	10,5 e 274,8
Complexo BVC/ β -CD 1:1	Alargado 107,5	Nd
Complexo BVC/ β -CD 1:2	Alargado 103,6	301,9
BVC	132,9	140,3
Mistura Física BVC/ β -CD 1:1	135,2	269,2
Mistura Física BVC/ β -CD 1:2	138,7	319,3
Complexo LDC/ β -CD 1:1	Alargado 159,1	46,6
Complexo LDC/ β -CD 1:2	114,4 e 141,2	356,9
LDC	81,5	119,6
Mistura Física LDC/ β -CD 1:1	74,2	22,5
Mistura Física LDC/ β -CD 1:2	70,5 e 139,1	10,2 e 268,3

2.6) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Além das evidências de formação dos complexos de inclusão por DSC, pudemos observar a morfologia dos complexos formados utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os diferentes aspectos dos cristais obtidos indicaram a formação de complexos de inclusão entre os AL e a β -CD.

Nas fotos obtidas (**Figs. 25-28**) ressaltamos as características e diferenças entre o aspecto e tamanho das substâncias puras (AL e β -ciclodextrina) e os complexos. Cristais típicos dos AL e da β -CD foram encontrados. Os cristais de β -ciclodextrina têm dimensões de dezenas de micra e superfície lisa e com contornos definidos (**Fig. 25**).

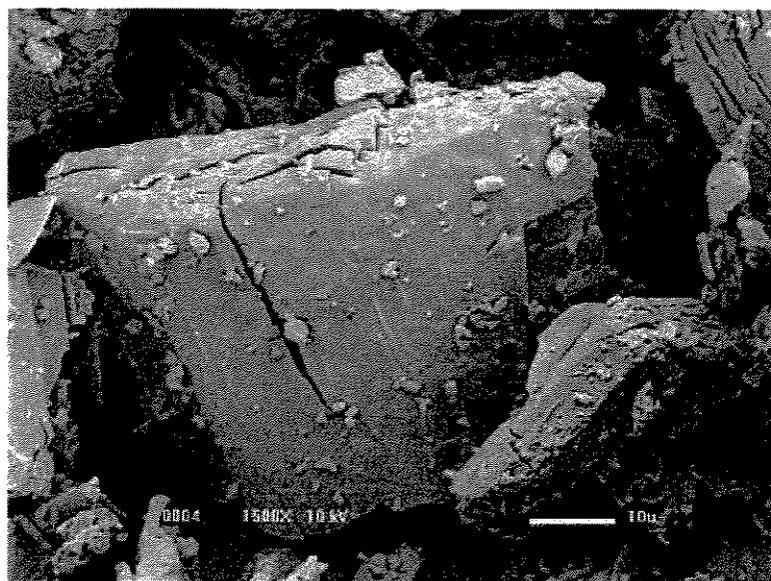


Fig. 25 Microscopia eletrônica de varredura de cristais de β -CD. Aumento de 1500 x.

Os cristais de BZC (**Fig. 26-A**) são bastante distintos: têm tamanho maior, chegando a centenas de micra, são cilíndricos e têm uma superfície de aparência rugosa (não lisa), coberta por estruturas repetitivas menores - de cerca de 10 micra - formando uma rede estruturada que se espalha sobre toda a superfície do cristal.

Após a formação do complexo há a perda do arranjo cristalino da BZC e da β -CD, obtendo-se uma estrutura amorfa, tanto na razão molar AL:CD 1:1 (**Fig. 26-B**) quanto na razão 1:2 (**Fig. 26-D**). A microscopia do complexo mostra-se bastante diferente dos cristais de BZC e β -CD e também distinta daquela da mistura física desses compostos sólidos (**Fig. 26-C e 26-E**) que mantém características dos cristais de BZC e da β -ciclodextrina.

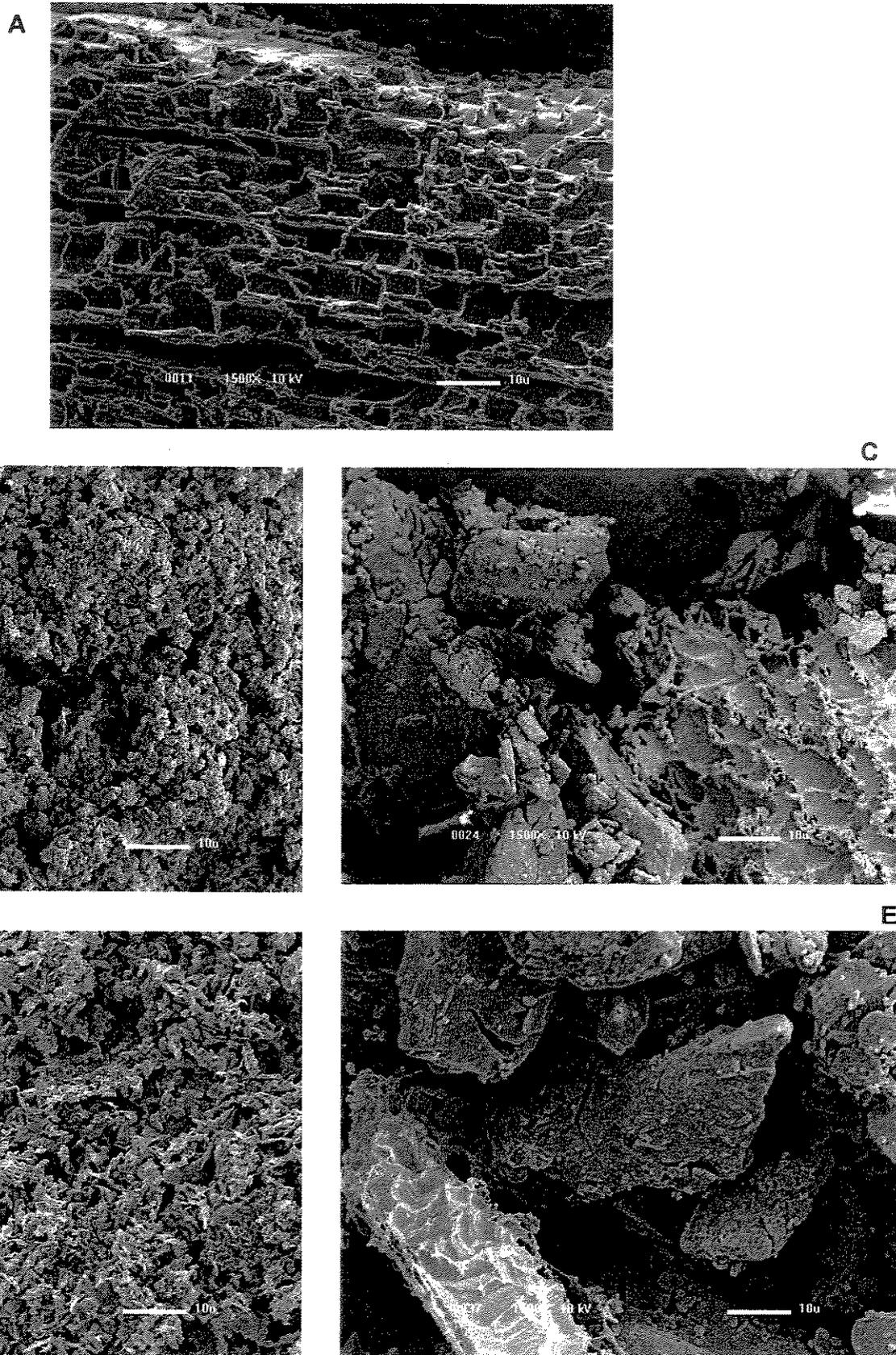


Fig. 26 Microscopia eletrônica de varredura A) BZC; B) complexo BZC/ β -CD 1:1; C) mistura física BZC/ β -CD 1:1; D) complexo BZC/ β -CD 1:2; E) mistura física BZC/ β -CD 1:2. Aumento de 1500 x.

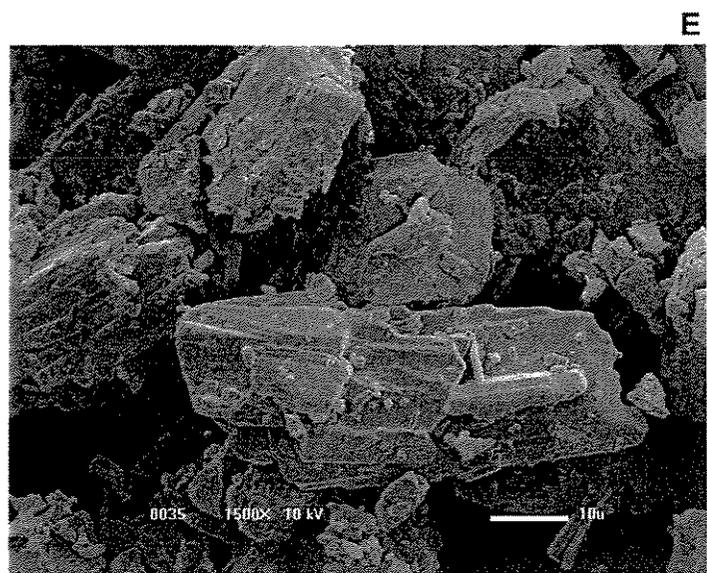
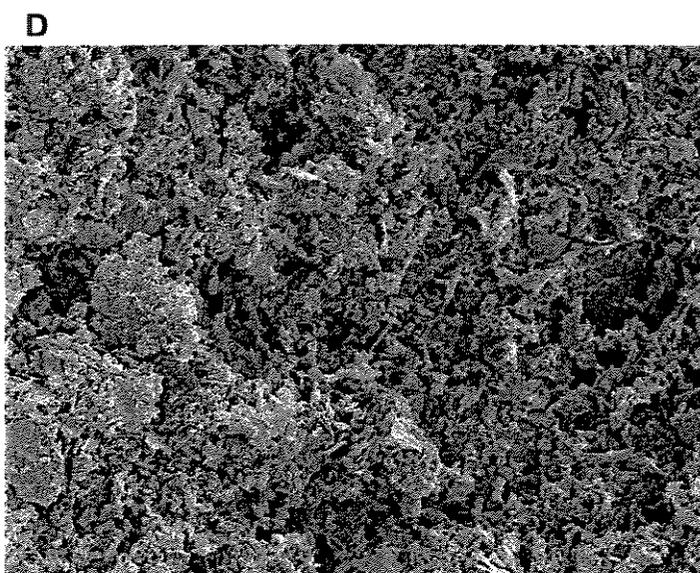
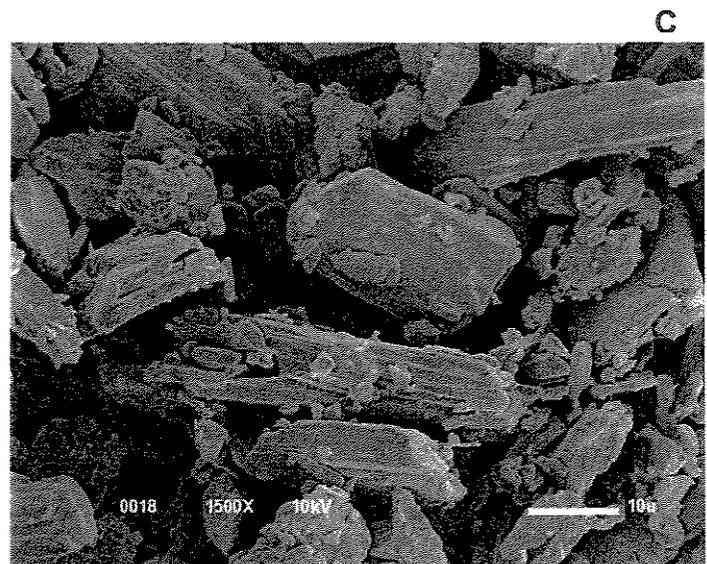
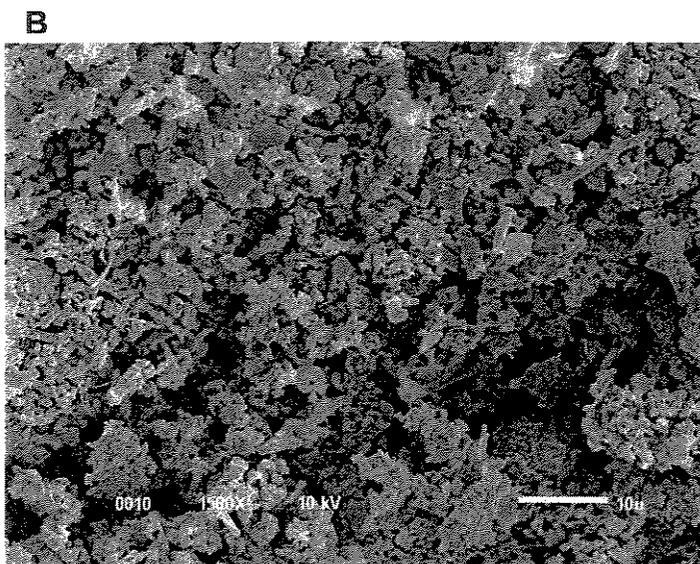
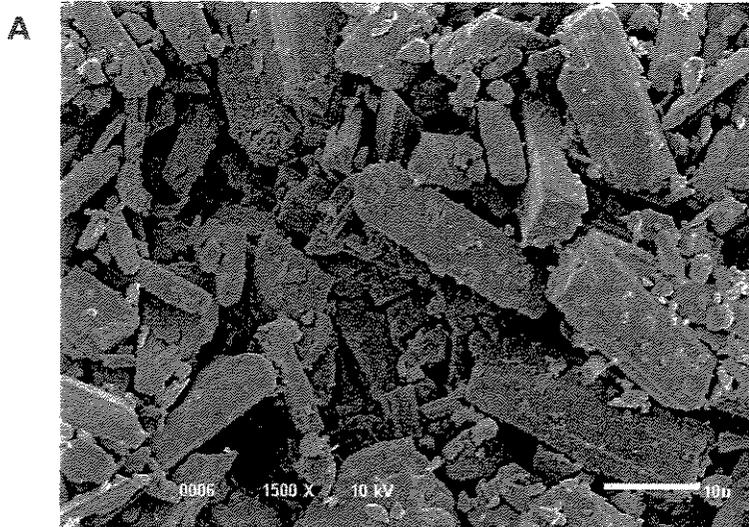


Fig. 27 Microscopia eletrônica de varredura **A)** BVC; **B)** complexo BVC/ β -CD 1:1; **C)** mistura física BVC/ β -CD 1:1; **D)** complexo BVC/ β -CD 1:2; **E)** mistura física BVC/ β -CD 1:2. Aumento de 1500 x.

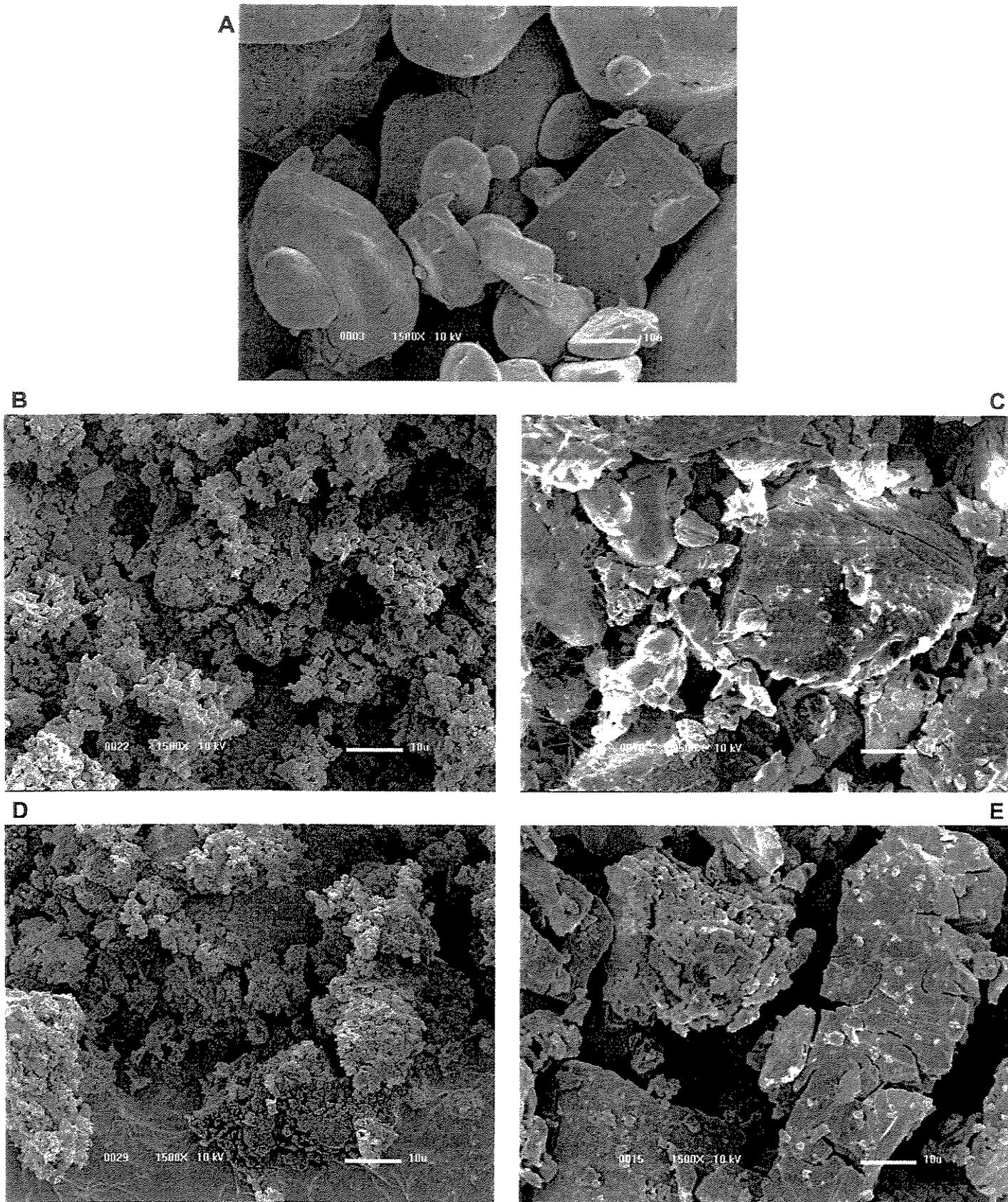


Fig. 28 Microscopia eletrônica de varredura **A)** LDC; **B)** complexo LDC/ β -CD 1:1; **C)** mistura física LDC/ β -CD 1:1; **D)** complexo LDC/ β -CD 1:2; **E)** mistura física LDC/ β -CD 1:2. Aumento de 1500 x.

Resultados semelhantes foram obtidos com a BVC (**Fig. 27**), comprovando a formação do complexo de inclusão BVC: β -CD. A Bupivacaína apresenta cristais menores que os da BZC, com formato cilíndrico e que não atingem 100 μ m (**Fig. 27-A**). Os complexos têm aspecto totalmente diferente (**Fig. 27-B e D**) do da BVC e da β -CD e os cristais da mistura física guardam semelhança com o das amostras puras (**Fig. 27-C e E**).

Esta análise também se mostrou útil para avaliação da formação de complexos entre a LDC e a β -CD (**Fig. 28**). Os cristais de LDC apresentam formato arredondado e superfície lisa, em média com diâmetros de 10 a 100 nm (**Fig. 28-A**). Mais uma vez o aspecto do complexo obtido é distinto, caracterizando a interação entre LDC e β -CD.

Assim, para ambas as razões molares estudadas (1:1 e 1:2) um rearranjo completo foi observado nos complexos AL: β -CD (**Fig. 26-28**). Os cristais originais das substâncias puras desapareceram e estruturas amorfas com dimensões bem menores (ca. 1 micra) foram formadas, caracterizando os AL complexados em β -ciclodextrina. Notar que o aspecto dos complexos é bastante semelhante, para os três AL estudados.

Em relação à estequiometria dos complexos pudemos observar que para a BZC a estequiometria 1:1 parece ser a mais provável de ocorrer, como pudemos constatar pelos testes de modelagem molecular utilizando mecânica molecular, pelo experimento de construção do Job plot utilizando fluorescência, pelo DSC e pela MEV (neste último caso, não foi possível concluir qual a melhor estequiometria apenas pela observação dos cristais).

Para a BVC e a LDC também parece haver uma predominância da estequiometria 1:1 observadas pelas técnicas descritas acima (com exceção do Job plot). Dependendo da concentração porém, a estequiometria 1:2 também pode ser favorecida como se constatou nos estudos teóricos de mecânica molecular.

2.7) AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ESPACIAL DO COMPLEXO DE INCLUSÃO BZC/ β -CD POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

2.7.1) ^1H RMN MONODIMENSIONAL

Uma avaliação qualitativa da complexação de BZC em β -CD foi feita através das técnicas de Calorimetria e Microscopia Eletrônica de Varredura (itens 2.5 e 2.6 de resultados e discussões). Na tentativa de obter informações mais refinadas, ao nível molecular, da interação entre o AL e a β -CD realizamos ainda experimentos de ^1H -RMN. Os espectros monodimensionais obtidos podem ser vistos abaixo (Fig. 29), a partir dos quais começamos a colher informações sobre a conformação da molécula convidada dentro da cavidade da molécula hospedeira.

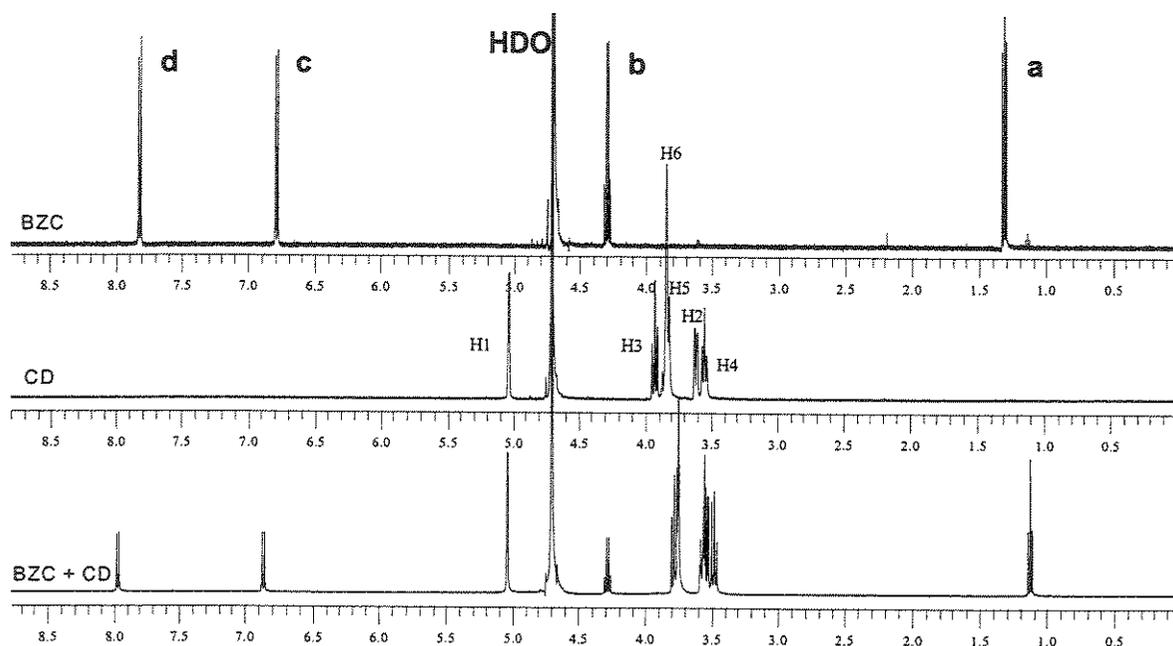


Fig. 29 Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) de BZC em D_2O , β -CD em D_2O e do complexo BZC/ β -CD, na razão molar 1:1. O pico da água residual (HDO) foi ajustado em 4,70 ppm.

O espectro de ^1H -RMN da ciclodextrina é muito informativo. Seis picos são identificáveis (**Fig. 29**) e os acoplamentos J indicam a conformação em cadeira dos anéis de glicose (Schneider *et al.*, 1998). Somente o pico do próton anomérico H1 aparece em frequência maior que 4 ppm enquanto os demais (H2 a H6) tem ressonância entre 3,5 e 4,0 ppm, (**Fig. 29**), como mostram os dados da **Tabela 13**.

A estabilidade do anel cíclico da CD é mantida por interações do tipo pontes de hidrogênio entre grupamentos OH do carbono 1 de um monômero de glicose e o OH do carbono 2 da glicose seguinte, pois diminuem a movimentação do heptanel cíclico da β -CD. As hidroxilas primárias do carbono 6 não fazem pontes de hidrogênio, mas devido à sua rotação, ocluem a entrada da cavidade da CD (Schneider *et al.*, 1998). Com a rotação livre das hidroxilas primárias há redução do diâmetro efetivo da cavidade no lado onde elas ocorrem, enquanto o grupo das hidroxilas secundárias apresenta uma cadeia relativamente rígida, sem rotação (Bekers *et al.*, 1991). Isso caracteriza o menor diâmetro da *coroa* em relação à *borda* da β -CD (ver **Fig. 7** - item 4.1 de materiais e métodos e **Fig. 30**).

Na complexação com moléculas no seu interior, o efeito de blindagem do anel da ciclodextrina sobre as moléculas hóspedes é pequeno (de cerca de décimos de ppm), pois a CD tem uma rede de ligações polares e polarizáveis que constituem tensores de deslocamento químico fracos (Schneider *et al.*, 1998).

Enquanto a superfície externa possui natureza hidrofílica, os pares de elétrons livres dos oxigênios envolvidos em ligações glicosídicas são dirigidos para o interior da cavidade, proporcionando uma elevada densidade eletrônica e, por conseqüência, um caráter apolar no interior. Graças à natureza hidrofóbica da cavidade, moléculas de tamanho, forma e hidrofobicidade adequada são capazes de interagir de forma não covalente, para formar um complexo estável, por inclusão molecular (Tagushi, 1986). Interações do tipo dipolo-multipolo (hóspede-CD) seriam as principais forças de complexação e os prótons H3 e H5 são sempre os mais afetados pela inserção de moléculas com anéis aromáticos na cavidade (Schneider *et al.*, 1998).

O espectro da BZC é bastante simples, com 4 picos referentes aos grupos CH_3 , CH_2 e aos substituintes para (equivalentes) e orto (equivalentes) do anel benzóico, respectivamente. Analisando as variações espectrais do anestésico local (**Tabela 14**), vimos que a complexação induziu desblindagem do anel; as alteração no deslocamento

químico dos hidrogênios aromáticos e da porção alquila da molécula, indicam interação com a cavidade da β -CD.

Os resultados de ^1H -RMN evidenciaram a formação do complexo de inclusão devido a mudanças no deslocamento químico de ambos os compostos, BZC e da β -CD (Fig. 29 e Tabelas 13 e 14). A variação diferencial desse deslocamento irá nos apontar as regiões das moléculas comprometidas com essa associação.

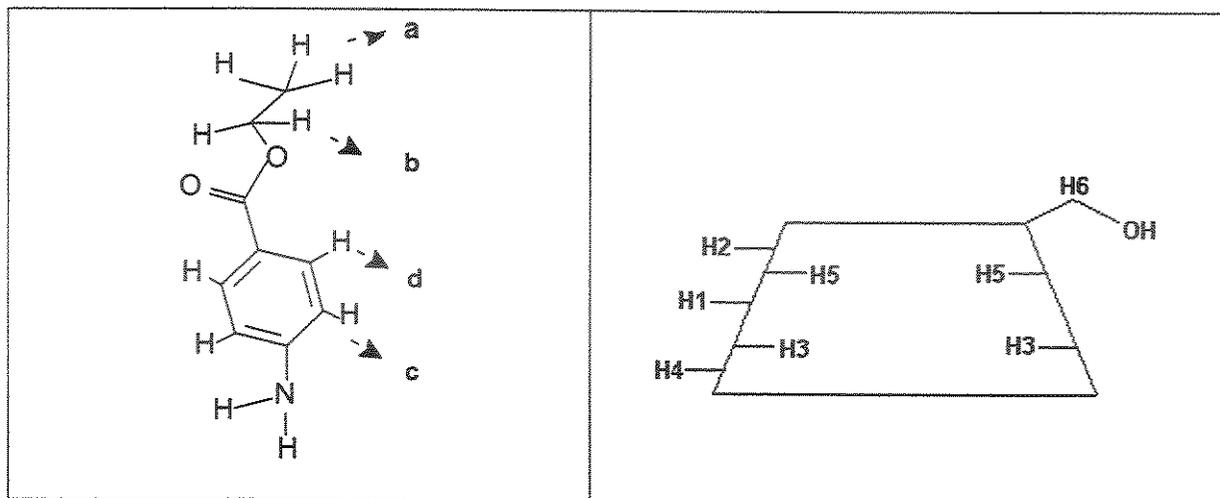


Fig. 30 Estrutura química e atribuição dos prótons da BZC (esquerda) e β -CD (direita).

Tabela 13 ^1H RMN – Atribuição e deslocamentos químicos dos prótons da β -CD, antes e após a complexação com BZC.

Atribuição*	β -CD (ppm)	BZC/ β -CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H1	5,036	5,043	-0,007
H2	3,616	nd	nd
H3	3,927	3,781	0,146
H4	3,564	nd	nd
H5	3,817	3,754	0,063
H6	3,840	3,748	0,092

* Segundo Schneider *et al.*, 1998. Ver Figs. 29 e 30.

nd - não determinado devido a sobreposição dos picos.

Tabela 14 ^1H RMN – Atribuição e deslocamentos químicos dos prótons da BZC, antes e após a complexação em β -CD.

Atribuição	BZC (ppm)	BZC/ β -CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
a CH ₃ -et	1,313	1,128	0,185
b CH ₂ -et	4,299	4,282	0,017
c Ar-3,5	6,789	6,866	-0,077
d Ar-2,6	7,818	7,968	-0,15

Segundo Schneider e col. (1998) os prótons H3 e H5 - que estão dentro da cavidade da β -CD - geralmente são os que sofrem maiores alterações na inclusão de moléculas hóspedes, sendo que H3 é ainda mais sensível que H5. De fato os dados da **Tabela 13** mostram que em nosso experimento H3 sofreu alterações mais significativas que H6 e H5, indicando interação da BZC com essa porção da molécula de β -CD.

Os deslocamentos químicos dos prótons da BZC e da β -CD estão de acordo com os dados da literatura (Pinto, 1998; Schneider *et al.*, 1998). Após a inclusão observamos uma variação significativa em todos os prótons do AL e da β -CD, com exceção do próton H1 da β -CD, com uma pequena variação. Abaixo podemos ver com detalhes a região dos picos dos prótons aromáticos da BZC, antes e após a complexação (**Fig. 31**), e também a expansão da região espectral dos picos dos prótons da β -CD (**Fig. 32**).

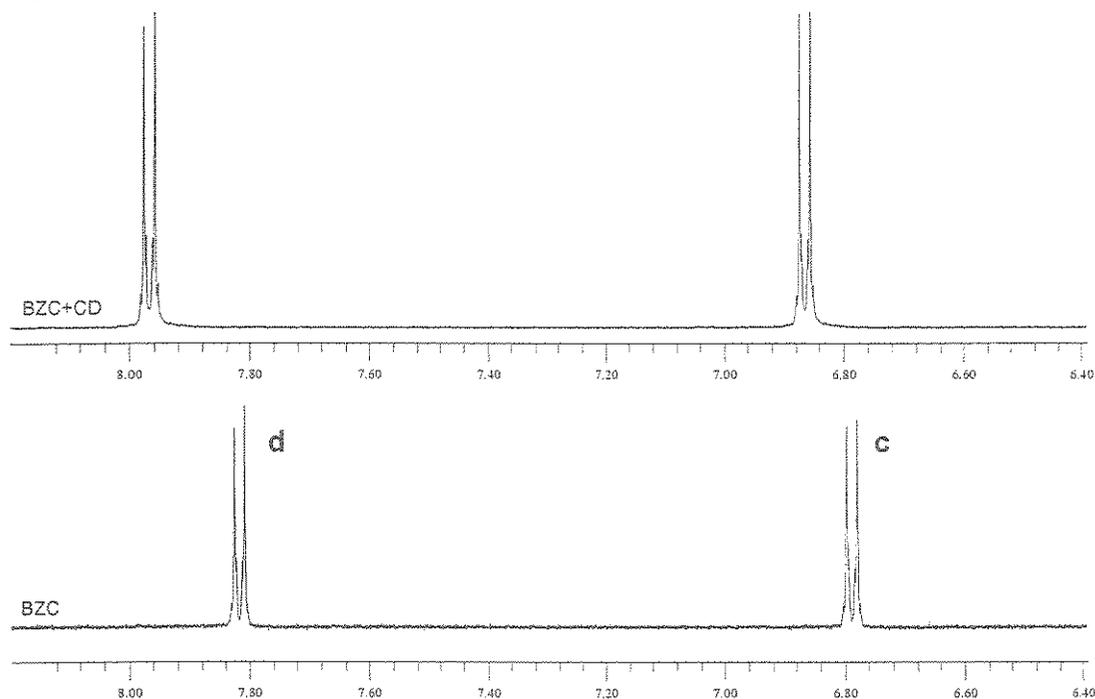


Fig. 31 ¹H RMN – Detalhe espectral da região de 6 a 8 ppm, mostrando os picos dos prótons aromáticos da BZC: em D₂O (espectro inferior) e após a complexação com β-CD (superior).

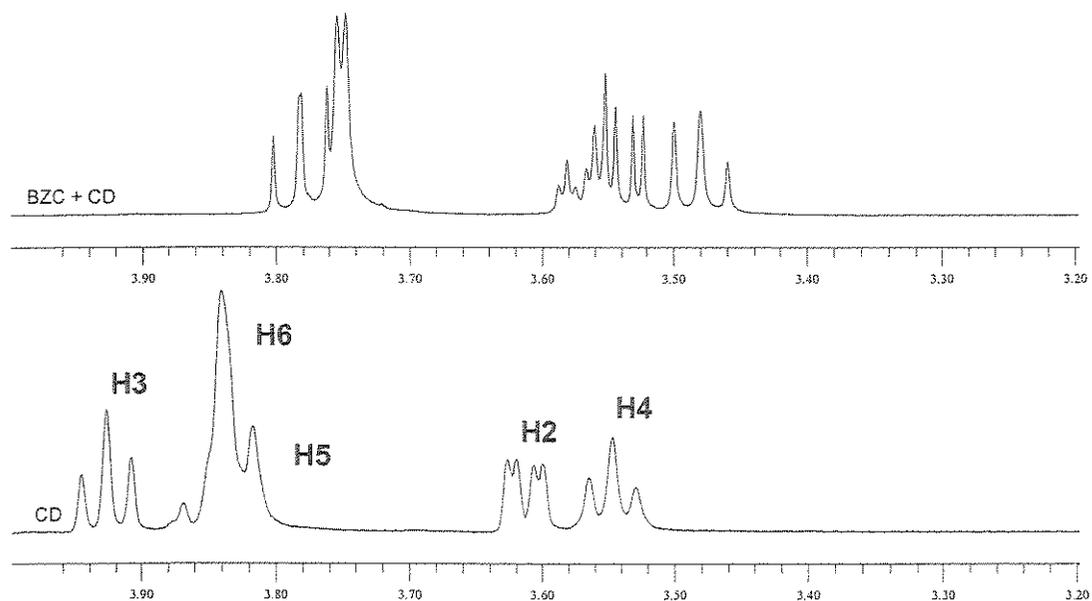


Fig. 32 ¹H RMN – Detalhe espectral mostrando os prótons H2 a H6 da β-CD: em D₂O (espectro inferior) e após a complexação com BZC (espectro superior).

Observamos pela **Fig. 32** que após a complexação, os prótons H3 e H5 da β -CD se deslocam para δ menores, havendo uma sobreposição com o pico H6. Isto está de acordo com o que já foi observado na literatura após inclusão de moléculas hóspedes – como o p-iodofenolato – em ciclodextrina (Schneider *et al.*, 1998). Além disso, o acoplamento J está modificado, indicando que alguns desses prótons estão envolvidos em outras interações – com os prótons da BZC.

2.7.2) ^1H RMN BIDIMENSIONAL

Foram realizados experimentos de NOE bidimensional para o sistema BZC/ β -CD, utilizando a seqüência ROESY (métodos – item 4.7) e tempo de “mixing” curtos, para evitar a difusão de spins. No espectros da **Fig. 33** os picos na diagonal correspondem aos hidrogênios (AL e β -CD) cujas atribuições podem ser vistas na **Fig. 30** e **Tabelas 13** e **14**. Os picos fora da diagonal indicam os NOEs determinados com tempo de mixing de 60 ms.

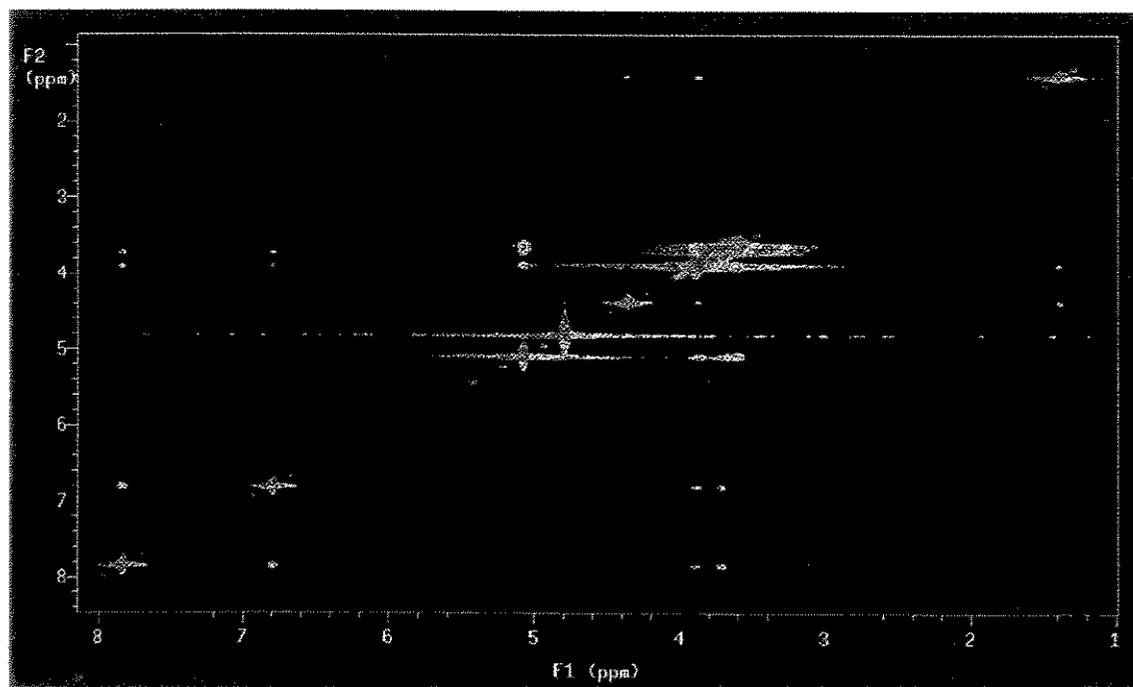


Fig. 33 ^1H RMN – Espectro bidimensional do Efeito Nuclear Overhauser (ROESY) de BZC/ β -CD. Tempo de mixing = 60 ms.

Foram determinados *cross-peaks* entre os prótons H5 e os aromáticos da BZC e H6 com a metila, assim como as distâncias entre os hidrogênios, como resumido na **Tabela 15**. Foram observadas ainda interações do tipo intramoleculares tanto para os prótons do anestésico quanto para os da CD.

Tabela 15 *Cross-peaks* encontrados na análise do experimento de ROESY do sistema BZC/ β -CD, com um tempo de *mixing* de 60 ms (espectrômetro de 500MHz).

Cross-peaks intermoleculares (BZC/ β -CD)	Distância (Å)
a – H5	3,6
a – H6	2,6
c – H5	2,5
c – H6	2,5
d – H5	2,5
d – H6	2,3

As interações intermoleculares ocorreram entre os prótons aromáticos da BZC e os picos H5 e H6, indicando a inserção do anel aromático na cavidade da ciclodextrina. Os *cross-peaks* são intensos e concordam com os dados de deslocamento químico descritos anteriormente. As distâncias intermoleculares foram calculadas e os dados sugerem que a BZC interage com seu anel aromático mais próximo dos hidrogênios H5 da cavidade da β -CD e também com H6, *i.e.*, próximo à *coroa*.

Estes dados estão de acordo com o esperado pelos cálculos de mecânica molecular (item 2.1.1) em que a estrutura de menor energia observada foi com o anel inserido na cavidade da β -CD, deixando o grupamento alquila mais próximo do H6 da *coroa* da β -CD. Com os dados de ROESY, foi possível realizar uma simulação de forma a propor um modelo de inserção da BZC dentro da cavidade da β -CD, como pode ser visto na **Fig. 34**. É interessante notar que, apesar de não terem sido fixadas distâncias, os resultados da simulação mostram boa concordância com as distâncias medidas pelo

RMN bidimensional, principalmente para a interação dos aromáticos da BZC com H5 (2,66 e 2,43 Å) . Este experimento demonstra ser interessante quando se quer elucidar interações intermoleculares, especialmente entre complexos de inclusão como o estudado neste trabalho.

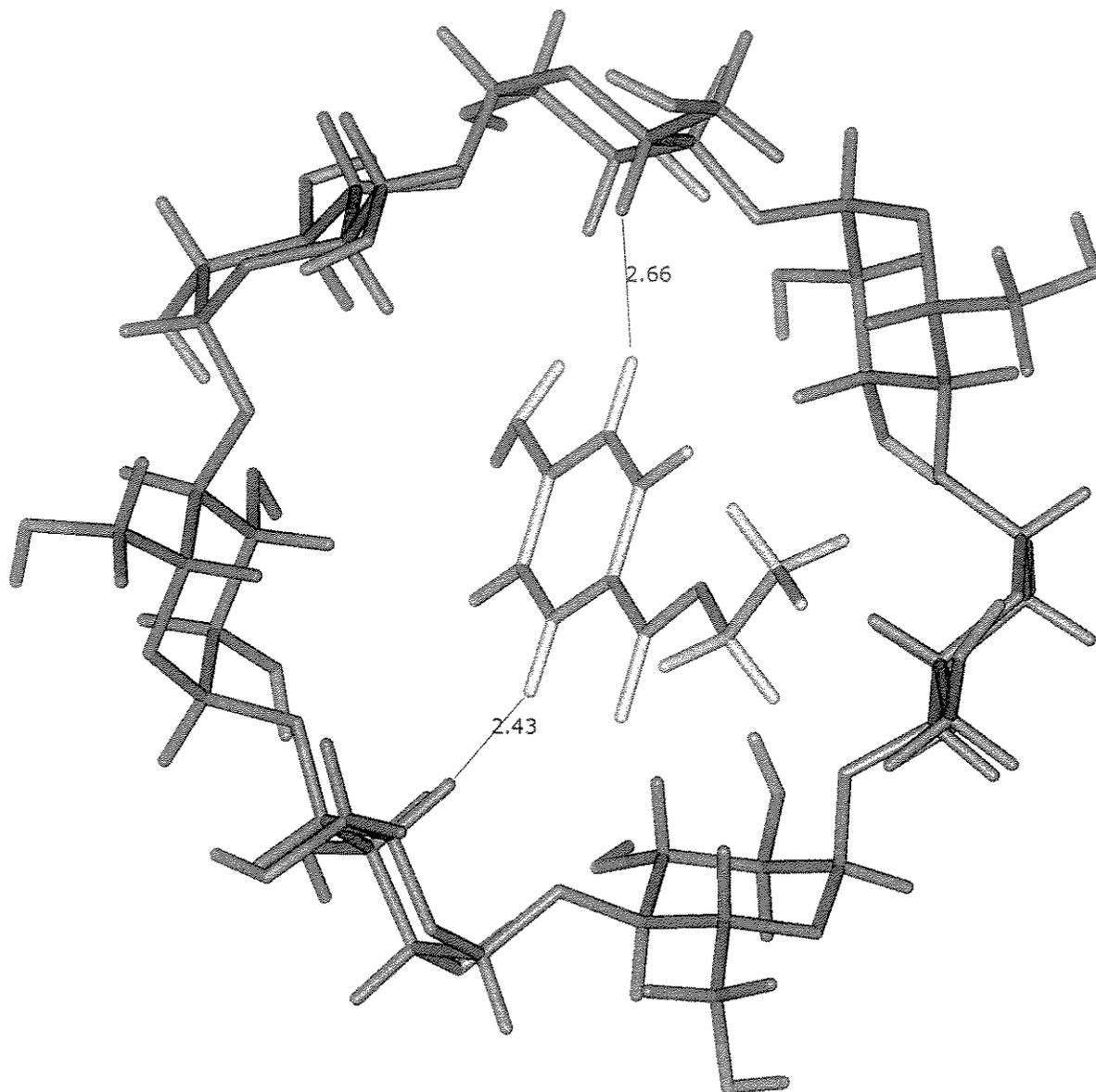


Fig. 34 Modelo de inserção da BZC na cavidade da β -CD proposto por modelagem molecular. As distâncias entre os prótons aromáticos da BZC e H5 são mostradas.

3) TESTES BIOLÓGICOS *IN VITRO*

3.1) HEMÓLISE

Em nosso laboratório temos trabalhado na determinação do efeito lítico de moléculas anfifílicas como detergentes (Galembeck *et al.*, 1998, Preté *et al.*, 2002), fenotiazínicos (Malheiros *et al.*, 1998) e anestésicos locais (Malheiros *et al.*, 2000). A razão molar anfifílico/lipídio da membrana revela importantes informações sobre a natureza da interação da droga com componentes da membrana, além de ser um teste toxicológico bastante reconhecido (Pape *et al.*, 1987; Parnham & Wetzig, 1993).

Este experimento teve o intuito de observar o perfil de toxicidade associado à solubilização da membrana eritrocitária medida pela liberação da hemoglobina dos AL incorporados em lipossomas ou complexados em ciclodextrinas.

3.1.1) ENSAIO HEMOLÍTICO ISOTÔNICO

A) AL SOZINHOS

Anestésicos locais, assim como outros anfifílicos, são capazes de promover hemólise isotônica de forma bifásica (Seeman, 1972, Malheiros *et al.*, 2000). Em baixas razões molares AL:lipídios da membrana, protegem a hemácia da lise e em altas concentrações solubilizam a mesma.

A BZC sozinha não apresentou efeito hemolítico até a concentração de 4 mM, devido a sua baixa solubilidade aquosa. Somente com o uso de DMSO como solvente é que foi possível atingir concentrações da droga que provocassem a lise da célula, como mostrado abaixo:

E) COMPLEXOS AL/ β -CD

Assim como as formulações lipossomais, a utilização de ciclodextrinas como carreadores teria um melhor desempenho se o efeito hemolítico antes observado para os AL sozinhos e a β -CD sozinha fosse revertido. Isto indicaria uma diminuição da toxicidade potencial destas drogas ao serem metabolizadas. Por outro lado, a mudança no perfil hemolítico pode revelar informações importantes sobre a estabilidade do complexo formado.

O complexo BZC/ β -CD (1:1) não induziu hemólise, nas mesmas condições realizadas com os outros complexos.

Já a BVC/ β -CD e a LDC/ β -CD apresentaram ação hemolítica, como podemos ver abaixo (Figs. 40 e 41).

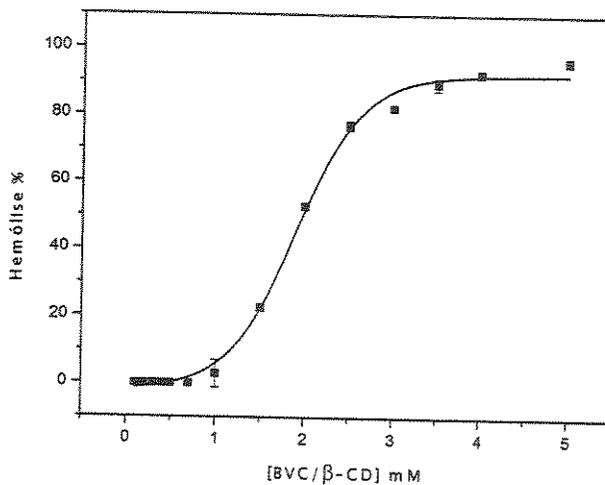


Fig. 40 Curva de hemólise induzida por BVC/ β -CD (1:1) em PBS 5mM pH 7,4 em eritrócitos. Ht = 0,15 %, tempo de incubação = 1h, Csat = 1,1 mM, Csol = 2,8 mM.

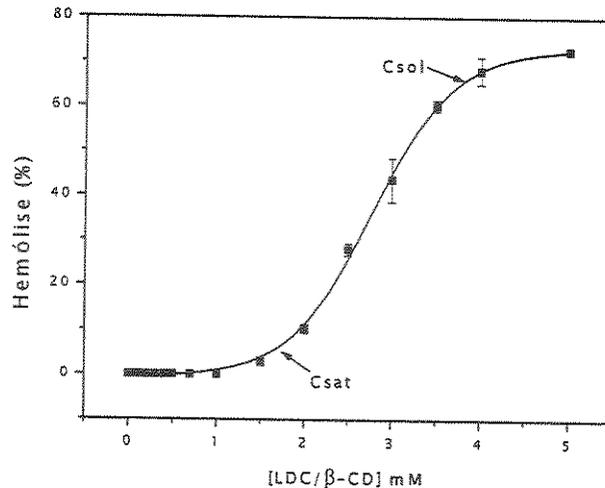


Fig. 41 Curva de hemólise induzida por LDC/ β -CD (1:1) em PBS 5mM pH 7,4 em eritrócitos. Ht = 0,15 %, tempo de incubação = 1h, Csa t = 1,7 mM, Csol = 3,8 mM.

Os valores de Csat e Csol, isto é, da concentração dos anestésicos para início (0%) e hemólise completa (100%), respectivamente, dos 3 anestésicos já estudados até agora e também das formulações em lipossomas ou ciclodextrinas podem ser consultados na **Tabela 16**.

Após a complexação da BVC e da LDC observa-se lise em concentrações próximas às observadas para a β -CD. Isto pode nos indicar que a hemólise está sendo causada neste caso pela β -CD e estaria havendo uma proteção das drogas à lise.

A BVC, que era lítica somente em concentrações maiores, passa a lisar nas concentrações típicas da β -CD. Já a LDC que não apresentava efeito lítico, passa a ser lítica também em concentrações próximas às da β -CD livre. Já o complexo BZC/ β -CD (1:1) não apresentou efeito lítico nas concentrações testadas.

3.1.2) ENSAIO HEMOLÍTICO HIPOTÔNICO

Ensaio hemolítico em condições de fragilidade da membrana eritrocitária mostram grande sensibilidade à ação dos anfífilos sobre a membrana e são muito interessantes para mostrar a partição na bicamada de monômeros desses compostos, e em concentrações sub-líticas. Acreditamos que estes ensaios sejam muito interessantes para comprovar a eficácia das formulações (lipossomais e em ciclodextrina) no sentido de comparação das velocidades de troca e efeito hemolítico.

A) AL SOZINHOS

A curva de proteção à hemólise induzida por BZC, utilizando DMSO como solvente, pode ser visualizada abaixo. A BZC sozinha não apresentou efeito protetor pois, como discutido anteriormente, sua baixa solubilidade impede que se atinjam concentrações suficientes para partição na membrana (de Paula & Schreier, 1995, Pinto *et al.*, 2000).

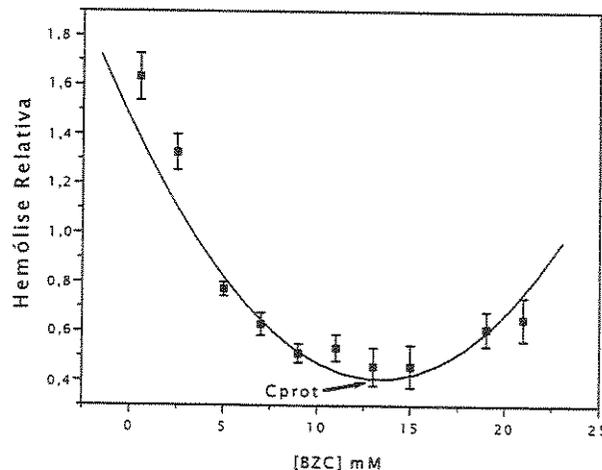


Fig. 42 Efeito protetor da BZC contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 30 min, C_{prot} = 13 mM.

O ensaio com BZC foi feito usando-se DMSO:H₂O até a razão de 8,5% (v:v) como solvente. Pode-se observar uma concentração de proteção máxima (C_{prot}) em 13 mM, correspondente a inflexão da curva da **Fig. 42**. A Benzocaína, assim como outros AL, apresenta um comportamento bifásico em relação à hemólise (Pinto *et al.*, 2000), isto é, em baixas concentrações protege o eritrócito da lise, enquanto altas concentrações na membrana, promovem a solubilização da mesma (Seeman, 1972; Malheiros *et al.*, 2000).

Acredita-se que a membrana seja capaz de abrigar uma quantidade limitada do anfifílico, a partir da qual ocorre uma saturação da membrana e, a partir daí, solubilização da mesma, como visto no ensaio isotônico. A concentração de BVC para proteção é menor ($C_{prot} = 13 \text{ mM}$) do que a de lise, determinada nas mesmas condições experimentais ($C_{sat} = 16,6 \text{ mM}$, $C_{sol} = 22,4 \text{ mM}$) e reflete a sua partição na membrana eritrocitária.

A **Fig. 43** mostra o efeito protetor da hemólise hiposmótica exercida pela BVC sozinha. No ensaio hipotônico há duas regiões da curva a serem destacadas: i) a região de baixa concentração de droga, quando a partição na membrana justifica a maior resistência à lise (diminuindo a concentração de hemoglobina liberada em solução) e ii) a região de concentrações maiores, quando ocorre ruptura da membrana e liberação do conteúdo celular, detectado pelo aumento da absorção em 412 nm. Embora não tenha sido possível determinar o efeito hemolítico da BVC em pH 7,4, o valor de C_{prot} obtido aqui, em meio hipotônico (1mM) para a BVC está em concordância com os valores de C_{sat} e C_{sol} , determinados em pH 7,1 **Tabela 16**).

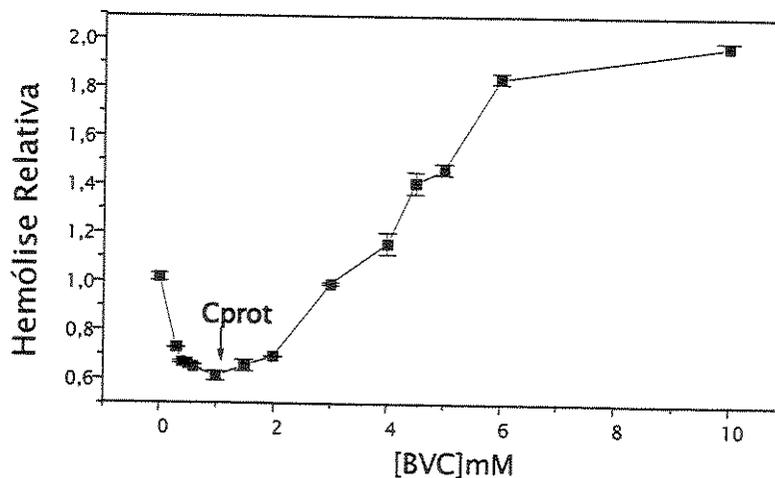


Fig. 43 Efeito protetor da BVC contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,1. Tempo de incubação = 30 min, $C_{prot} = 1,0 \text{ mM}$.

Nos ensaios de proteção à hemólise, induzida pela LDC, a curva de proteção obtida sem ajuste de pH pode ser vista na **Fig. 44**. Observar que as concentrações de LDC usadas são muito altas e, mesmo assim, não são suficientes para se observar a lise dos eritrócitos, como também evidenciaram os ensaios em meio isotônico. Fica evidente a proteção à hemólise, até concentrações de 200 mM. A LDC protonada é menos hidrofóbica e o pH mais ácido desfavorece a partição, justificando as maiores concentrações de LDC encontradas. Não foi possível ajustar o pH de maneira eficiente, sem alterar a fragilidade iônica/osmótica dos eritrócitos.

Esse experimento mostra que a LDC interage com a membrana, porém as concentrações para lise seriam superiores aquelas utilizadas, devido a baixa partição da LDC nas membranas eritrocitárias, no pH mais ácido do ensaio.

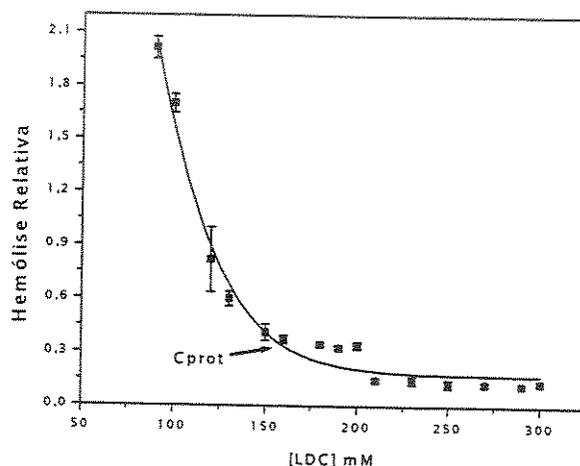


Fig. 44 Efeito protetor da LDC contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 30 min, C_{prot} = 160,2 mM.

B) LIPOSSOMAS VAZIOS

A padronização da técnica de proteção à hemólise para lipossomas vazios não foi satisfatória. A mudança na osmolaridade da solução de PBS influenciou de forma insatisfatória as suspensões lipossomais, inviabilizando o teste. Portanto, utilizando esta metodologia não foi possível caracterizar as formulações lipossomais em relação a proteção à hemólise.

C) AL/LIPOSSOMAS

Assim como no teste de hemólise isotônica, a formulação de BVC/Lip não apresentou proteção à hemólise.

A BVC/Lip e LDC/Lip porém mostraram proteção à hemólise apresentando também valores de C_{prot} próximos aos dos AL não encapsulados.

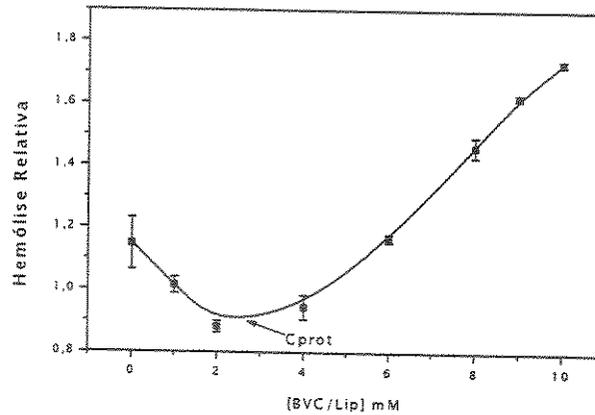


Fig. 45 Efeito protetor de BVC/Lip contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 40 min, C_{prot} = 2,6 mM.

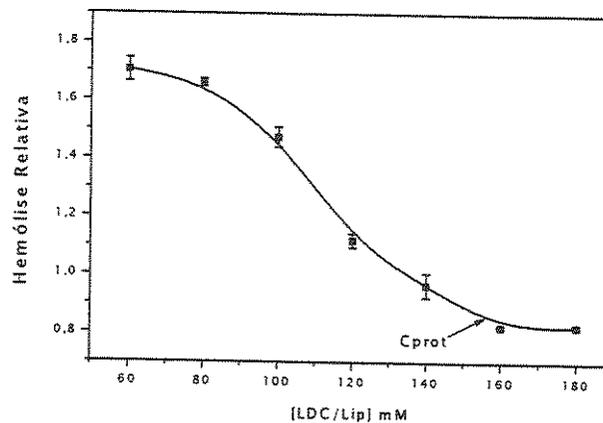


Fig. 46 Efeito protetor de LDC/Lip contra a hemólise hiposmótica de eritrócitos. Ht = 0,15%, PBS 66 mM, pH 7,4. Tempo de incubação = 40 min, C_{prot} = 156,1 mM.

et al., 1997; Watala *et al.*, 1999) e está relacionado a mobilização de cálcio intra e extracelular, por diferentes mecanismos.

Ao complexarmos em β -CD ou encapsularmos os AL em lipossomas este padrão de inibição se modificou. Houve aumento da inibição após a encapsulação dos AL em lipossomas (**Tabelas 18 e 19**). Esta tendência já havia sido descrita para a encapsulação de indometacina (Pillai & Salim, 1999) e é uma característica interessante da formulação lipossomal, visto que ela passa a não apresentar efeito pró-agregante. Neste caso, a formulação lipossomal aumenta de forma geral a biodisponibilidade do AL, mesmo em formulações em que este efeito não seria tão esperado, como no caso da BVC.

Na complexação com β -CD o padrão de inibição da agregação induzida por ADP também foi alterado (**Tabelas 18 e 19**). A BZC não apresenta uma inibição significativa após inclusão em β -CD, comparada a BZC sozinha na mesma concentração (**Fig. 50**). No caso da BVC, o mais hidrofóbico dos AL testados, a inibição foi ligeiramente maior quando complexada em β -CD em relação a formulação lipossomal (**Fig. 51**) e também foi maior do que o anestésico livre, indicando o aumento da solubilidade deste.

No caso da LDC, o mais hidrofílico dos 3 anestésicos testados, a inibição diminuiu após a complexação em β -CD, comparando-se com a mesma concentração do anestésico sozinho (**Fig. 52**).

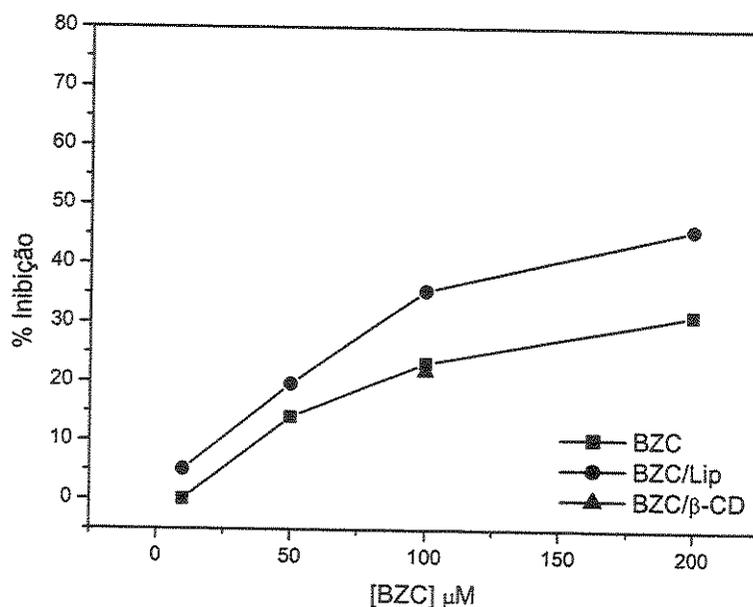


Fig. 50 Inibição da agregação induzida por ADP promovida por BZC, BZC/Lip e BZC/ β -CD.

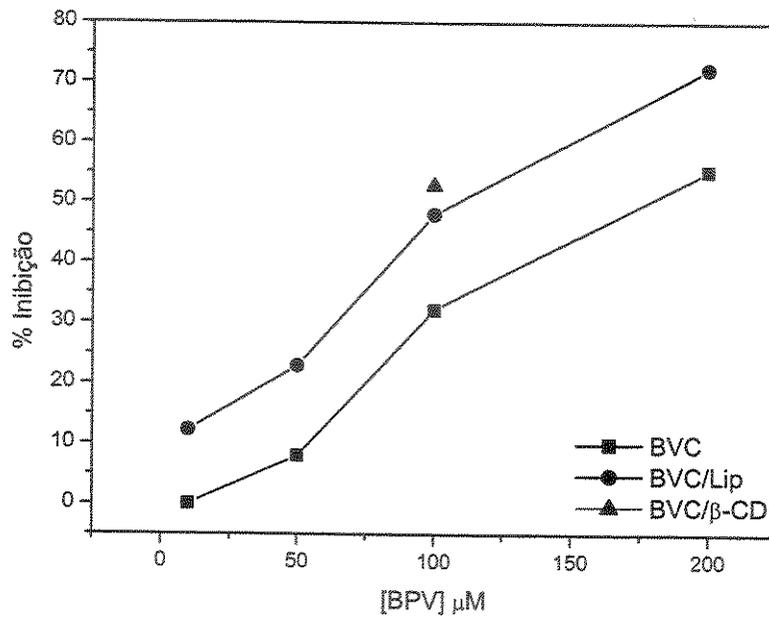


Fig. 51 Inibição da agregação induzida por ADP promovida por BVC, BVC/Lip e BVC/β-CD.

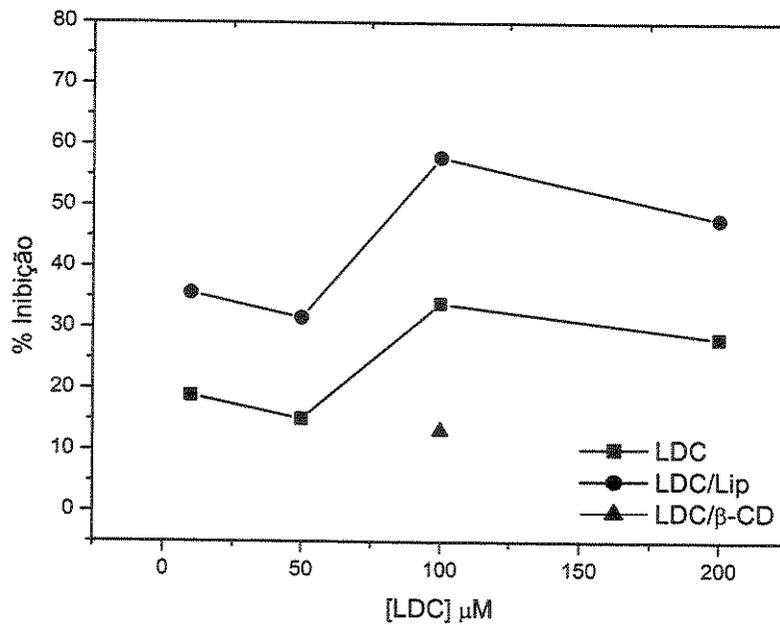


Fig. 52 Inibição da agregação induzida por ADP promovida por LDC, LDC/Lip e LDC/β-CD.

Tabela 18 Inibição da agregação induzida por ADP – Efeito dos AL, em diferentes concentrações.

Concentração de AL (μM)	% de Inibição		
	BZC	BVC	LDC
10	0	0	18,8
50	14,1	8,0	15,1
100	23,3	32,1	33,9
200	31,5	55,3	28,3

Tabela 19 Inibição da agregação induzida por ADP – Efeito dos AL encapsulados em lipossomas ou complexados em β -CD na razão molar 1:1.

	% de Inibição		
	BZC	BVC	LDC
Lip 10 μM	5,1	12,3	35,7
Lip 50 μM	19,7	22,9	31,6
Lip 100 μM	35,5	48,0	57,9
Lip 200 μM	46,0	72,2	47,8
β -CD 100 μM	22,0	52,8	13,2

Em todos os casos, a formulação lipossomal permitiu maior efeito inibitório do anestésico, comprovando: i) a liberação eficiente da molécula hóspede para interação com as membranas das plaquetas e ii) aumento da concentração de anestésico disponível para efeito nas membranas plaquetárias, por solubilização desses AL, cujas partições são consideradas não-ideais (de Paula & Schreier, 1995).

Esses ensaios serviram para caracterizar a complexação em β -CD e encapsulação em lipossomas, modificando a disponibilidade e efeitos biológicos dos AL nos sistemas de liberação controlada. Isto é importante, pois já foi demonstrado que a LDC promoveria a

fibrinólise e inibição da coagulação sanguínea, com implicações na eficácia de aplicação epidural (Tobias *et al.*, 1997).

Mostra-se um perfil de inibição de agregação de BVC>BZC>LDC, o que pode refletir a hidrofobicidade das moléculas e sua partição nas células.

3.3) ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS

Utilizando-se a linhagem de células V79, pudemos fazer um *screening* de toxicidade das preparações lipossomais e em β -ciclodextrina contendo AL. Foram testadas as amostras: lipossoma (lip), β -CD, AL, AL/lip e AL/ β -CD.

Abaixo podemos ver o perfil de viabilidade celular após tratamento com lipossomas vazios e β -CD (Figs. 53 e 54).

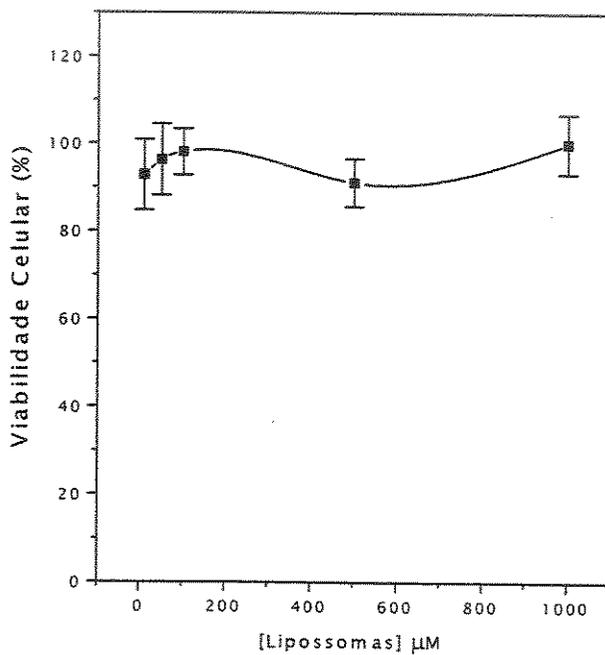
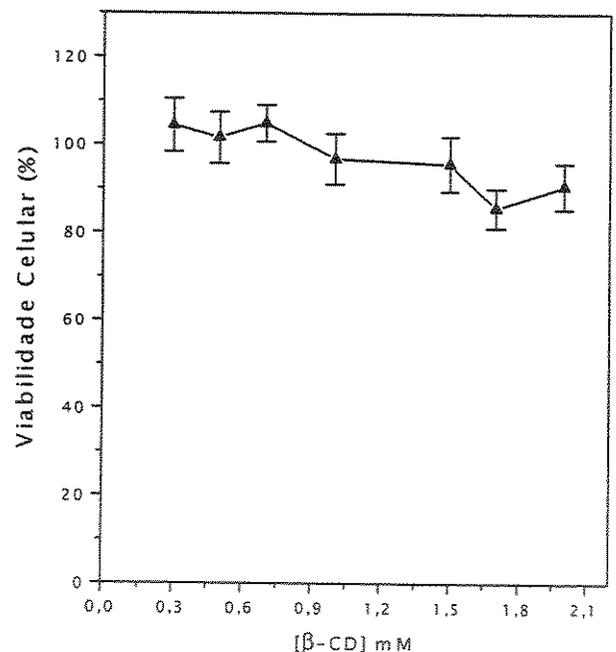


Fig. 53 Viabilidade celular após tratamento com Lipossomas durante 24h. Parâmetro avaliado: MTT.

Fig. 54 Viabilidade celular após tratamento com β -CD durante 24h. Parâmetro avaliado: MTT.



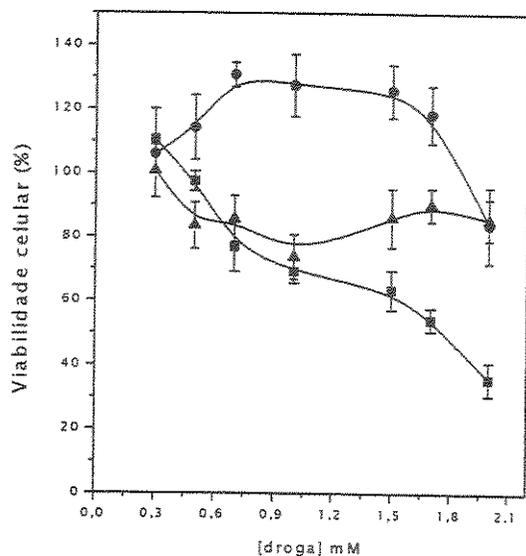


Fig. 55 Viabilidade celular após tratamento com BZC/Lip (●), BZC/β-CD (▲) e BZC (■) durante 24h. Parâmetro avaliado: MTT.

Nas concentrações usadas, a solução de BZC promoveu efeitos de citotoxicidade no ensaio do MTT observando-se uma concentração para 50 % de inibição (IC_{50}) = 1,8 mM.

O que se pôde observar neste experimento é que os lipossomas reverteram o efeito tóxico que a Benzocaína, sozinha, apresenta. Ao encapsular este anestésico em vesículas, obtivemos um aumento na viabilidade celular de células V79 para o parâmetro testado (MTT), que avalia a atividade respiratória das mitocôndrias das células.

Com base nestes resultados podemos concluir que, nas concentrações usadas, a formulação lipossomal de Benzocaína apresenta um efeito de citotoxicidade menor em células V79 do que a formulação anestésica convencional (sem lipossomas). Porém, usando um microscópio de contraste de luz, foram observadas mudanças na morfologia das células tratadas, observadas como corpos apoptóticos, quando comparadas às culturas controle.

Os complexos de BZC/β-CD (1:1) testados também apresentaram diminuição do efeito citotóxico, porém em menor extensão.

Já os anestésicos LDC e BVC, não apresentaram toxicidade às células V79 nas condições de ensaio, como avaliado pelo teste do MTT.

Este trabalho inicialmente teve a colaboração da Dra. Patrícia da Silva Melo e Dra. Marcela Haun, do laboratório de cultura de células do Departamento de Bioquímica IB/Unicamp.

Os demais dados foram obtidos em colaboração com a Dra. Maria Edwiges Hoffman, responsável pelo laboratório de ensaios toxicológicos *in vitro*, também deste departamento.

4) TESTES BIOLÓGICOS IN VIVO

Testes iniciais com os anestésicos BZC, BVC e LDC foram conduzidos pelo aluno de iniciação científica Rafael Vanini (Fapesp). Foi realizada a avaliação do bloqueio sensorial pelo teste de retirada da cauda utilizando placa quente (*hot plate*). Observou-se, para a BZC encapsulada em lipossomas, um aumento na intensidade de 1,6 vezes e na duração da analgesia em até 70 minutos após a injeção, em relação às formulações: comercial e complexada em β -CD.

Para a BVC a complexação em β -CD demonstrou ser melhor do que em lipossomas. Houve uma duração da analgesia de 130 minutos e a potência aumentou até 1,9 vezes.

Ambas as formulações com LDC aumentaram a potência e duração da analgesia. A duração da formulação utilizando β -CD foi até 120 minutos e em lipossomas até 100 minutos, enquanto a comercial foi até 80 minutos. A potência da formulação encapsulada em lipossomas aumentou 1,3 vezes, enquanto a complexada em β -CD aumentou até 1,7 vezes em relação à comercial.

Em outro trabalho, foram realizados testes com a BVC onde pudemos avaliar o bloqueio motor e atividade antinociceptiva da BVC lipossomal ou em β -ciclodextrina, comparando com a BVC comercial. Para se observar o bloqueio regional foi administrada injeção subcutânea na pata de camundongos (bloqueio do nervo ciático) e avaliada a diminuição da função motora, com o tempo. Já a atividade antinociceptiva foi avaliada pelo teste de pressão na pata utilizando analgesímetro. O que se pôde concluir é que tanto a formulação lipossomal, quanto em β -CD aumentaram a duração do bloqueio nervoso em relação a comercial, porém só em β -CD a BVC teve efeito antinociceptivo significativo. Além disso, não há comprometimento do bloqueio motor, o que é altamente desejável. Estes testes fizeram parte da dissertação de mestrado da aluna Daniele Ribeiro Araújo (CAPES) e já foram submetidos para publicação.

V) CONCLUSÕES

Formulações lipossomais e em β -ciclodextrinas foram preparadas com sucesso. A caracterização físico-química foi realizada para as formulações lipossomais por espalhamento de luz quase-elástico e determinando-se a eficiência de encapsulação (ca 30 %). Observou-se que as vesículas preparadas apresentavam homogeneidade e uma eficiência de encapsulação compatível com a hidrofobicidade dos AL em pH 7,4.

A caracterização físico-química das formulações em β -CD também foram realizadas, inicialmente por cálculos teóricos utilizando mecânica molecular, e também por testes de fluorescência, calorimetria diferencial de varredura, microscopia eletrônica de varredura e ressonância magnética nuclear. Por estas técnicas foi possível prever a estequiometria mais provável de complexação e também a localização da molécula convidada dentro da cavidade da ciclodextrina. Um modelo de inserção para o anestésico BZC foi proposto, baseando-se em cálculos teóricos e experimentais (ROESY).

Os cálculos computacionais utilizando mecânica molecular nos indicaram que em relação à estequiometria o anestésico BZC parece formar preferencialmente complexos 1:1 com o anel aromático inserido na cavidade pela borda da β -CD. Este modelo de inserção também pôde ser comprovado experimentalmente pelos experimentos de 2D ROESY. Outros experimentos, como a construção do Job plot utilizando fluorescência, o DSC e a MEV também parecem apontar para uma estequiometria preferencial 1:1, sendo que a MEV não foi conclusiva em relação à estequiometria, apenas pela observação dos cristais.

Para a BVC e a LDC também parece haver uma predominância da estequiometria 1:1 observadas pelas técnicas descritas acima (com exceção do Job plot). Dependendo da concentração porém, a estequiometria 1:2 também pode ser favorecida como se constatou nos estudos teóricos de mecânica molecular.

Em relação à cinética de complexação foi observado que para drogas com hidrofobicidade intermediária como a BZC, o equilíbrio é atingido após cerca de 40 minutos de agitação e no caso da LDC, um anestésico considerado mais hidrofílico, o tempo necessário para atingir o equilíbrio chega a 2,5 h ou 150 min.

Os testes *in vitro* serviram como um *screening* para avaliar a toxicidade das formulações em relação aos fármacos comerciais. Observou-se para ambas as formulações (lipossomais e em β -CD) uma diminuição geral da toxicidade, demonstrando ser esta uma vantagem das formulações de BZC, BVC e LDC.

Os testes de hemólise, em condições iso e hiposmóticas, revelaram várias informações importantes: i) a interação com membranas biológicas, sítio de ação dos AL, não é impedida após a encapsulação em lipossomas ou complexação em β -ciclodextrina.; ii) a inserção dos AL na bicamada lipídica ou interior hidrofóbico da β -CD modifica o efeito hemolítico de cada anestésico, caracterizando a complexação; iii) o efeito hemolítico do complexo reflete características do veículo (aumento do efeito hemolítico das formulações em β -CD) e iv) o efeito hemolítico do complexo reflete o aumento da concentração de AL disponível para interação com a membrana.

A Benzocaína, assim como outros AL, apresenta um comportamento bifásico em relação à hemólise (Pinto *et al.*, 2000), isto é, em baixas concentrações protege o eritrócito da lise, enquanto altas concentrações na membrana, promovem a solubilização da mesma (Seeman, 1972; Malheiros *et al.*, 2000).

É interessante observar que a interação com lipossomas não impede a interação do AL com a membrana biológica, o que é desejável para o sistema de liberação controlada. Sendo assim, há um aumento da segurança das formulações. Em presença de lipossoma ocorre diminuição do efeito lítico e conseqüentemente diminuição da toxicidade.

Após a complexação da BVC e da LDC observa-se lise em concentrações próximas às observadas para a β -CD. Isto pode nos indicar que a hemólise está sendo causada neste caso pela β -CD e estaria havendo uma proteção das drogas à lise. A BVC, que era lítica somente em concentrações maiores, passa a lisar nas concentrações típicas da β -CD. Já a LDC que não apresentava efeito lítico, passa a ser lítica também em concentrações próximas às da β -CD livre. Já o complexo BZC/ β -CD (1:1) não apresentou efeito lítico nas concentrações testadas.

Nos testes de agregação plaquetária os AL inibiram a agregação induzida por ADP, como já relatado na literatura e as formulações lipossomais aumentaram esse efeito de inibição.

A formulação de BZC encapsulada em lipossomas e complexada em β -ciclodextrina diminuiu a toxicidade celular no teste do MTT, refletindo uma diminuição na toxicidade.

Testes *in vivo*, realizados em paralelo, através de outros dois projetos de pesquisa desenvolvidos em nosso laboratório, indicam que as formulações aqui preparadas são potencialmente promissoras para aumento do tempo de anestesia e diferenciação do bloqueio motor. De acordo com nossas hipóteses iniciais, cada anestésico beneficiou-se mais de um dos veículos estudados, de acordo com suas propriedades físico-químicas. Para a BZCe BVC a ciclodextrina demonstrou ser mais vantajosa enquanto para a LDC a encapsulação em lipossomas rendeu melhores resultados.

VI) PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho teve como objetivos o preparo e caracterização físico-química de formulações contendo anestésicos locais que aumentassem sua potência e duração, sem o aumento proporcional da toxicidade.

Testes *in vitro* foram realizados como um *screening* inicial para a veiculação dos fármacos. Testes preliminares com animais de laboratório também já foram realizados com essas formulações, porém ainda precisam ser complementados.

Outros testes *in vivo* estão em andamento em nosso laboratório (tese de doutorado da aluna Daniele Ribeiro Araujo) cujo objetivo é o de chegar a testar algumas destas formulações em humanos.

Além do mais, outros testes de caracterização físico-química e *in vitro* também podem ser implementados, viabilizando o desenvolvimento dessa área de pesquisa dentro do laboratório. Os testes de RMN mostraram ser uma poderosa ferramenta para a caracterização da complexação de moléculas anfifílicas em β -CD e pretendemos explorar mais os recursos dessa técnica.

VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, A. P. & Cashman, J. N. (1994). **Anestesia, Analgesia e Tratamento Intensivo**, Revinter Ltda., Rio de Janeiro.
- Andrews, R. K., López, J. A. & Berndt, M. C. (1997). Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation **Int. J. Biochem. Cell Biol.** **29**: 91-105.
- 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.
- Arvidsson, T., Bruce, H. F. & Halldin, M. M. (1994). Lack of metabolic racemisation of RVC determined by liquid chromatography using a chiral AGP column **Chirality** **7**: 272-277.
- Ashwim, G., Rodiger, V., Schinider, H.-J. & Connors, K. (1997). Binding of Cyclodextrins to alicyclic and aromatic substrate complex formation of α -, β - e γ -cyclodextrins with substituted cyclohexacarboxylic acid phenylalkanoic acid **J. Pharm. Sci.** **86**: 235-243.
- Balabai, N., Linton, A., Napper, B., Priyardarshy, S., Sukharevsky, P. & Waldeck, D. H. (1998). Orientational dynamics of β -cyclodextrin inclusion complexes **J. Phys. Chem. B** **102**: 9617-9624.
- Barbieri, B., Papadogiannakis, N., Eneroth, P., Söderstedt, A., Stain-Malmgren, R. & Olding, L. B. (1997). p-aminobenzoic acid, but not its metabolite p-acetamido-benzoic acid, inhibits thrombin induced thromboxane formation in human platelets in a non nsaid like manner **Thrombosis Research** **86**: 127-140.
- Becket, G., Schep, L. J. & Tan, M. Y. (1999). Improvement of the in vitro dissolution of Praziquantel by complexation with α -, β - and γ -cyclodextrins **Int. J. Pharm.** **179**: 65-71.
- Bekers, O., Uijtendaal, E. V. & Bijnen, J. H. (1991). Cyclodextrins in the pharmaceutical field **Drug Dev. Ind. Pharm.** **17**: 1503-1549.
- Bibby, D., Davies, N. M. & Tucker, I. G. (2000). Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems **Int. J. Pharm.** **197**: 1-11.

- Boogaerts, J. G., Declercq, A., Lafont, N. D., 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. & 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., Hongwen, C. L., 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. (1995a). Biodistribution of liposome-associated bupivacaine after extradural administration to rabbits **Br. J. Anaesth.** **75**: 319-325.
- Boogaerts, J., Lafont, N., Donnay, M., Luo, H. & Legros, F. (1995b). Motor blockade and absence of local nerve toxicity induced by liposomal bupivacaine injected into the brachial plexus of rabbits **Acta Anaesthesiol. Belg.** **46**: 19-24.
- Brewster, M. E., Anderson, W. R., Estes, K. S. & Bodor, N. (1991). Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins **J. Pharm. Sci.** **80**: 380- 383.
- Bucalo, B. D., Mirikitani, E. J. & Moy, R.L. (1998). Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine, and EMLA using 30-minute application time **Dermatol. Surg.** **24**: 537-541.
- Butterworth, J. F. & Strichartz, G. R. (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: a review **Anesthesiology** **72**: 711-734.
- Carvalho, J. C. A. (1994). Farmacologia dos anestésicos locais. **Rev. Bras. Anesthesiol.** **44**: 75-82.
- Catterall, W. (1992). **Physiol. Rev.** **72**: S15- S48.
- Catteral, W. & Mackie, K. (1996). Anestésicos locais: In: Goodman, L. S., Gilman, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9 ed. México, Mcgraw-Hill Interamericana.
- Cervello, E., Mazzucchi, F. & Jaime, C. (2000). Molecular mechanics and molecular dynamics calculations of the β -cyclodextrin inclusion complexes with m-, and p-nitrophenyl alkanoates **J. Mol. Struct.-THEOCHEM.** **530**: 155-163.
- Chen, P. S., Toribara, T. Y. & Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorous **Anal. Chem.** **28**: 1756-1758.

- Connors, K. A. (1987). **Binding constants, the measurement of molecular complex stability**, Wiley, New York.
- Courtney, K. R. & Strichartz, G. R. (1987). Structural elements which determine local anesthetics activity In: **Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology**, (Strichartz G. R. ed.), vol. 81, cap. 3, Springer-Verlag, Berlin.
- Covino, B. G.(1986). Pharmacology of local anaesthetic agents **Br. J. Anesth.** **58**: 701-716.
- Covino, B. G. & Vassalo, H. G.(1985). **Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico**, Colina, Rio de Janeiro.
- Cullis, P. R. & Verkleij, A. J. (1979). **Biochim. Biophys. Acta** **552**: 546-551.
- De Azevedo, M. B. M., Alderete, J. B., Lino, A. C. S., Loh, W., Faljoni-Alario, A. & Durán, N. (2000). Violacein/ β -Cyclodextrin inclusion complex formation studied by measurement of diffusion coefficient and circular dichroism **J. Incl. Phenom. Macr. Chem.** **37**: 67-74.
- Debouzy, J. C., Fauvelle, F., Crouzy, S., Girault, L., Chapron, Y., Göschl, M. & Gadelle, A. (1998). Mechanism of α -cyclodextrin induced hemolysis. 2. a study of the factors controlling the association with serine-, ethanolamine-, and choline-phospholipids **J. Pharm. Sci.** **87**: 59-66.
- de Jong, R. H. (1994). **Local Anesthetics**, C. C.Thomas, Springfield, Illinois.
- Denizot, F. & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability **J. Immunol. Methods**, **89**: 271-277.
- de Paula, E. (1993). **Estudos espectroscópicos dos efeitos de anestésicos locais sobre as propriedades estruturais e dinâmicas de membranas lipídicas**, tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP/SP.
- de Paula, E. & Schreier, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficient to compare the effect of local anesthetics on membrane structure **Biochim. Biophys. Acta** **1240**: 25-33.
- de Paula, E. & Schreier, S. (1996). Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction **Braz. J. Med. Res.** **29**: 877-894.
- Djordjevich, L., Ivankovich, A. D., Chigurupati, R., Woronowich, A. & McCarthy, R. (1986). Efficacy of liposome encapsulated bupivacaine **Anesthesiology** **65**: A185.

-
- 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. Pharm.** **131**: 219-228.
 - Dollo, G., Le Corre, P., Chevanne, F. & Le Verge, R. (1996b). Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. II. Evaluation of affinity constants and in vitro transfer rate constants **Int. J. Pharm.** **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. Pharm.** **164**: 11-19.
 - Dollo, G., Le Corre, P., Freville, J. C., Chevanne, F. & Le Verge, R. (2000). Biopharmaceutics of local anesthetic cyclodextrin complexes following loco-regional administration **Ann. Pharm. Fr.** **58**: 425-432.
 - Duncan, L. & Wildsmith, J. A. W. (1995). Liposomal local anaesthetics **Br. J. Anaesth.** **75**: 260-261.
 - Ellis, F. D., Seiler, J. D. & Palmore, M. M. Jr. (1995). Methemoglobinemia: a complication after fiberoptic orotracheal intubation with benzocaine spray **J. Bone Joint Surg. Amer.** **77**: 937-939.
 - Estrada, E., Perdono-Lopez, I. & Torres-Labandeira, J. (2000). MM (MM2 and PM3) and Experimental (NMR and thermal analysis) studies of inclusion complex of subatamol and β -cyclodextrin **J. Org. Chem.** **65**: 8510.
 - Fauvelle, F., Debouzy, J. C., Crouzy, S., Göschl, M. & Chapron, Y. (1997). Mechanism of α -cyclodextrin-induced hemolysis. 1. The two-step extraction phosphatidylinositol from the membrane **J. Pharm. Sci.** **86**: 935-943.
 - Feinstein, M. B., Fiekers, J. & Fraser, C. (1976). An analysis of the mechanism of local anesthetic inhibition of platelet aggregation and secretion **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **197**: 215-228.
 - Fernandez, M. F. (1980). Formation of micelles and membrane action of the local anesthetic tetracaine hydrochloride **Biochim. Biophys. Acta** **597**: 83-91.
 - Fernandez, M. F. (1981). Disruption of liposomes by tetracaine micelles **Biochim. Biophys. Acta** **647**: 27-30.

-
- Ferreira, A. B. H. (1993). **Minidicionário da Língua Portuguesa**, Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
 - Finkel, J. C., Yang, C. I., Yarvitz, J. L. & Patel, K. M. (2002). Neuroselective sensory electrodiagnostic evaluation of 4% liposomal topical lidocaine **Anesth. Analg.** **94**: 1259-1262.
 - 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 carragenin-injected rats **Anesth. Analg.** **84**: 90-94.
 - Frezzatti Jr., W.A., Toselli, W. R. & Schreier, S. (1986). Spin label study of local anesthetic-lipid membrane interactions. Phase separation of the uncharged form and bilayer micellization by the charged form of tetracaine **Biochim. Biophys. Acta** **860**: 531-538.
 - Frömming, K. H. & Szejtli, J. (1994). **Topics in inclusion science – cyclodextrins in pharmacy**, Hungria: Kluwer Academic Publishers.
 - Galembeck, E., Alonso, A. & Meirelles, N. C. (1998). Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonylphenol] non-ionic surfactants **Chem. Biol. Interac.** **113**: 91-103.
 - Gesztes, A. & Mezei, M. (1988). Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine **Anesth. Analg.** **67**: 1079-1081.
 - Grant, G. J. (1999). Bupivacaine release from a novel liposomal formulation: effect of lipid composition and temperature **Anesthesiology** **91**: 891.
 - Grant, G. J. & Bansinath, M. (2001). Liposomal delivery systems for local anesthetics **Reg. Anesth. Pain Med.** **26**: 61-63.
 - 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.
 - Guertler, A. T. & Pearce, W. A. (1994). A prospective evaluation of benzocaine-associated methemoglobinemia in human beings **Ann. Emerg. Medic.** **24**: 626-630.
 - Gupta, S. P. (1991). Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics **Chem. Rev.** **91**: 1109-1119.
 - Hiemenz, P. C. (1986). **Principles of Colloid and Surface Chemistry**, Marcel Dekker Inc., New York.

-
- Higuchi, T. & Connors, K. A. (1965). Phase-solubility techniques **Adv. Anal. Chem. Inst.** **4**: 117-121.
 - Hung, O. R., Comeau, L., Riley, M. R., Tan, S., Whynot, S. & Mezei, M. (1997). Comparative topical anaesthesia of EMLA and liposome-encapsulated tetracaine **Can. J. Anaesth.** **44**: 707-711.
 - Irie, T. & Uekama, K. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation **Pharm. Sci.** **86**:147-162.
 - Jaime, C., Mazzuchi, F. & Cervello, E. (2000). Molecular mechanics and molecular dynamics calculations of the β -cyclodextrin inclusion complex with m- and p-nitrophenyl alkanoates **J. Mol. Struct. THEOCHEM.** **530**: 155.
 - Kalinkova, G. N. (1999). Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceuticals formulations **Int. J. Pharm.** **187**: 1-15.
 - Knudsen, K., Suurküla, M.B., Blomberg, S., Sjövall, J. & Edwardsson, N. (1997). **Br. J. Anesth.** **78**: 507-514.
 - Korsten, H. H., Ackerman, E. W., Grouls, R. J., van Zundert, A. A., Boon, W. F., Bal, F., Crommelin, M. A., Ribot, J. G., Hoefsloot, F. & Sloof, J. L. (1991). Long-lasting epidural sensory blockade by n-butyl-p-aminobenzoate in the terminally ill intractable cancer pain patient **Anesthesiology** **75**: 950-960.
 - Kurozumi, M., Nambu, N. & Nagai, T. (1975). **Chem. Pharm. Bull.** **23**: 3062-3068.
 - Kuzma, P. J., Kline, M. D., Calkins, M. D. & Staats, P. S. (1997). Progress in the development of ultra-long-acting local anesthetics **Regional Anesthesia** **22**: 543-551.
 - Langerman, L., Grant, G. J., Zakowski, M., Golomg, E., Ramanathan, S. & Turndorf, H. (1992). Prolongation of epidural anesthesia using a lipid drug carrier with procaine, lidocaine and tetracaine **Anesth. Analg.** **75**: 900-905.
 - Lasic, D. D. (1993). **Liposomes: from physics to applications** Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
 - Lee-Son, S., Wang, G. K., Concus, A., Crill, E., & Strichartz, G. (1992). **Anesthesiol.** **77**: 324-335.
 - Legros, F., Luo, H., Bourgeois, P., Lafont, N. & Boogaerts, J. (1990). Influence of different liposomal formulations on pharmacokinetics of encapsulated bupivacaine **Anesthesiology** **73**: A851.
 - Lener, E. V., Bucalo, B. D., Kist, D. A. & Moy, R. L. (1997). Topical anesthetic agents in dermatologic surgery **Dermatol. Surg.** **23**: 673-683.

- Lévy-Toledano, S. (1999). Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'? **Haemostasis** **29**: 4-15.
- 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.
- Lichtenberg, D. (1985). Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants **Biochim. Biophys. Acta** **821**: 470-478.
- Lima, H. O. S. (2001) **Estudo da Encapsulação de Fármacos de Primeira Linha no Tratamento da Tuberculose em Lipossomas e Ciclodextrinas**, Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química / Unicamp.
- Lino, A. C. S., Alderete, J. & Takahata, Y. (1999). **Aspectos computacionais e estruturais dos complexos de inclusão entre 6-mercaptopurina e β -ciclodextrina** XI Simpósio Brasileiro de Química Teórica, Poços de Caldas, MG, Brasil.
- Lino, A. C. S. & Loh, W. (2000). Diffusion evidence for a stepwise association between alkyl p-hydroxybenzoates and β -cyclodextrin forming 1:2 complex **J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.** **36**: 267-277.
- Lino, A. C. S. (2002). **Estudo sobre o encapsulamento molecular de fármacos em ciclodextrinas**, tese de doutorado apresentada ao Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNICAMP.
- Loftson, T. & Brewster, M. E. (1996). Pharmaceuticals applications of cyclodextrins 1. Drug solubilization and stabilization **J. Pharm. Sci.** **85**: 1017-1025.
- Loftsson, T. & Masson, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice **Int. J. Pharm.** **225**: 15-30.
- Loukas, Y. L., Vraika, V. & Gregoriadis, G. (1998). Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis, **Int. J. Pharm.** **162**: 137-142.
- Malheiros, S. V. P., de Paula, E. & Meirelles, N. C. (1998). Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis **Biochim. Biophys. Acta** **1373**: 332-340.
- Malheiros, S. V. P., Meirelles, N. C. & de Paula, E. (2000). Pathways involved in Trifluoperazine-, Dibucaine- and Praziquantel-induced hemolysis **Biophys. Chem.** **83**: 89-100.

- Malinovsky, J.-M., Bernard, J. M., Baudriment, 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., Couarraze, 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., Chevanne, F., Pinaud, M., Le Verge, R. & Legros, F. (1999). A dose-response study of liposomal bupivacaine in rabbits **J. Contr. Rel.** **60**: 111-119.
- Marconi, G. , Monti, S., Mayer, B. & Koher, G. (1995). Circular Dichroism of methylated phenols included in β -cyclodextrins. An experimental and theoretical study **J. Phys. Chem.** **99**: 3943-3950.
- Martin, D. G., Watson, C. E., Gold, M. B., Woodard, C. L. Jr. & Baskin, S. I. (1995). Topical anesthetic-induced methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia in macaques: a comparison of benzocaine and lidocaine **J. Appl. Toxicol.** **15**: 153-158.
- Martindale (1993). **The Extra Pharmacopoeia**, The Pharmaceutical Press, London.
- 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.
- Matioli, G. (2000). **Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**, Eduem, Maringá.
- McCormack, B. & Gregoriadis, G. (1998). Drugs-in-cyclodextrins-in liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo **Int. J. Pharm.** **162**: 59-69.
- Meert, T. F. & Melis, W. (1992). Interactions between epidurally and intrathecally administered sufentanil and bupivacaine in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the rat **Acta Anesthesiol. Belg.** **43**: 79-89.
- Merck Index (1996). 12th edition, Merck & Co. Inc., New Jersey.
- Miyoshi, M. Imoto, T. & Hiji, Y. (1998). Alkalinizing water-soluble local anesthetics solutions by addition of cyclodextrin **Reg. Anesth. Pain Med.** **23**: 176-181.

-
- Monnard, P.-A., Oberholzer, T. & Luisi, P. (1997). Entrapment of nucleic acids in liposomes **Biochim. Biophys. Acta** **1329**: 39-50.
 - Mowat, J. J., Mok, M. J., MacLeod, B. A. & Madden, T. D. (1996). Liposomal Bupivacaine, extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient **Anesthesiology** **85**: 635-643.
 - Narahashi, T. & Yamada, M. (1969). Cationic forms of local anaesthetics block action potentials from inside the nerve membrane **Nature** **223**: 748-749.
 - Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2000). **Lehninger-Principles of Biochemistry**, 3 ed. New York: Worth Publishers.
 - Nesnas, N., Lou, J & Breslow, R. (2000). The binding of cocaine to cyclodextrins **Bioorg. Med. Chem. Let.** **10**: 1931-1933.
 - Ogura, Y. & Mori, Y. (1968). Mechanism of local anesthetic action of crystalline tetrodotoxin alone and its derivatives **Eur. J. Pharmacol.** **3**: 58-67.
 - Pape, W. J. W., Pfannenbecker, U. & Hoppe, U. (1987). Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants **Mol. Toxicol.** **1**: 525-536.
 - Parnham, M. J. & Wetzig, H. (1993). Toxicity screening of liposomes **Chem. Phys. Lipids** **64**: 263-274.
 - Pillai, G. K. & Salim, M. L. D. (1999). Enhanced inhibition of platelet aggregation in-vitro by niosome-encapsulated indomethacin **Int. J. Pharm.** **193**: 123-127.
 - Pinto, L. M. A. (1998). **Interação dos Anestésicos Locais Benzocaína, Lidocaína e Tetracaína com Membranas Modelo**, tese de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP.
 - Pinto, L. M. A., Lima, H. O. S., Santana, M. H. A. & de Paula, E. (1999). **Cyclodextrin complexation with anti-tuberculosis drugs diminish its hemolytic effect IV** Pharmatech: New perspectives in drug delivery systems, 8 a 11 de agosto de 1999, Natal, RN.
 - Pinto, L. M. A., Yokaichiya, D. K., Fraceto, L. F. & de Paula, E. (2000). Interaction of benzocaine with model membranes **Biophys. Chem.** **87**: 213-223.
 - Planas, M. E., Gonzales, P., Rodriguez, L., Sanchez, S. & Cevc, G. (1992). Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes **Anesth. Analg.** **75**: 615-621.

-
- Prasad, R. (1996). **Manual on membrane lipids**, Springer-Verlag, Berlin.
 - Preté, P. S. C., Gomes, K., Malheiros, S. V. P., Meirelles, N. C. & de Paula, E. (2002). Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series **Biophys. Chem.** **97**: 45-54.
 - Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, R. & Catterall, W. A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics **Science** **265**: 1724-1728.
 - Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, R. & Catterall, W. A. (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**: 9270-9275.
 - Rajewski, R. A. & Stella, V. J. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. II. In vivo drug delivery **J. Pharm. Sci.** **85**: 1142-1169.
 - Rang, H. P. & Dale, M. M. (1993). **Farmacologia**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
 - Ross, S. B. & Akerman, B. A. (1972). Cyclization of three N-W-Haloalkyl-N-Methylaminoaceto-2,6-Xylidide derivatives in relation to their local anesthetic effect in vitro and in vivo **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **182**: 351-361.
 - Salvatierra, D., Jaime, C., Virgile, A. & Sanchez-Ferrando, F. (1996). **J. Org. Chem.** **61**: 9578.
 - Sattler, S., Schaefer, U., Schneider, W., Hoelzl, J. & Lehr, C.-M. (1997). Binding, uptake, and transport of hypericin by caco-2 cell monolayers **J. Pharm. Sci.** **86**: 1120-1131.
 - Schneider, H.-J., Hacket, F., Rüdiger, V. & Ikeda, H. (1998). NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes **Chem. Rev.** **98**: 1755-1785.
 - Schreier, H., Gagné, L., Bock, T., Erdos, G. W., Druzgala, P., Conary, J. T. & Müller, B. W. (1997). Physicochemical properties and in vitro toxicity of cationic liposome cDNA complexes **Pharmaceutica Acta Helvetiae** **72**: 215-223.
 - Scurlock, J. E. & Curtis, B. M. (1981). Tetraethylammonium derivatives: ultralong-acting local anesthetics? **Anesthesiology** **54**: 265-269.
 - Seeman, P. (1972). **Pharmacol. Rev.** **24**: 583-655.
 - Sharata, H. H. & Katz, K. H. (1996). Liposomes **Int. J. Dermat.** **35**: 761-769.
 - Silverstein, R. M., Bassler, G. C. & Morrill, T. C. (1991). **Spectrometric identification of organic compounds**, 5 ed., John Wiley & Sons, New York.

-
- Skalko, N., Filipović-Grcić, J., Becirević-Lacan, M. & Jalsenjak, I. (1996). Nifedipine and nifedipine-cyclodextrin complexes in liposomes and microspheres **Acta Pharm.** **46**: 159-168.
 - Stensrud, G., Passi, S., Larsen, T., Sandset, P. M., Smistad, G., Mönkkönen, J. and Karlsen, J. (1999). Toxicity of gamma irradiated liposomes. 1. In vitro interactions with blood components **Int. J. Pharm.** **178**: 33-46.
 - Stevens, C. W. (1992). Alternatives to the use of mammals for pain research **Life Sci.** **50**: 901-912.
 - Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry **Chem. Rev.** **98**: 1743-1753.
 - Tagushi, K. (1986). Transient binding mode of phenolphthalein - β - cyclodextrin complex: an example of induced geometrical distortion **J. Am. Chem. Soc.** **108**: 2705-2709.
 - Tanford, C. (1973). **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes**, John Wiley & Sons, New York.
 - Tenjarla, S., Puranajoti, P., Kasina, R. & Mandal., T. (1998). Preparation, characterization, and evaluation of miconazole-cyclodextrin complexes for improved oral and topical delivery **J. Pharm. Sci.** **87**: 425-429.
 - Tobias, M. D., Henry, C. & Augostides, Y. (1997). Lidocaine and bupivacaine exert differential effects upon whole blood coagulation **Anesthesiology** **87**: A766.
 - Trapani, G., Latrofa, A., Franco, M., Pantaleo, M. R., Sanna, E., Massa, F., Tuveri, F. & Liso, G. (2000). Complexation of zolpidem with 2-hydroxypropyl- β -, methyl- β -, and 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin effect on aqueous solubility, dissolution rate, and ataxic activity in rat **J. Pharm. Sci.** **89**: 1443-1451.
 - Valenzuela, C., Snyders, D. J., Bennett, P., Tamargo, J. & Hondeghem, L.M. (1995). Stereoselective block of cardiac sodium channels by bupivacaine in guinea pig ventricular myocytes **Circulation** **92**: 3014-3024.
 - Vandam, L. D. (1987). Some aspects of the history of local anesthesia In: **Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology**, (Strichartz G. R. ed.), vol. 81, cap.1, Springer-Verlag, Berlin.
 - Vierstein, H., Stumpf, Ch. & Wolschann, P. (1997). Pharmaceutical and pharmacological properties of propanidid as cyclodextrin complex **Pharm. Pharmacol. Lett.** **7 (1)**: 39-41.

-
- Watala, C., Boncler, M., Golanski, J., Koziolkiewicz, W., Walkowiak, B. & Cierniewski, C. S. (1999). Release of calcium and p-selectin from intraplatelet granules is hampered by procaine **Thrombosis research 94**: 1-11.
 - Woodle, M. C. & Lasic, D. D. (1992). Sterically stabilized liposomes **Biochim. Biophys. Acta 1113**: 171-199
 - Yeh, J. Z. (1980). Blockage of Sodium Channels by Stereoisomers of Local Anesthetics **Progr. Anesthesiol. 2**: 35-44.
 - Yoshihara, E. & Nakae, T. (1986). Cytolytic activity of liposomes containing stearylamine **Biochim. Biophys. Acta 854**: 93-101.
 - Yu, H.-Y., Sun, P. & Hou, W.-Y. (1998). Prolonged local anesthetic effect of bupivacaine liposomes in rats **Int. J. Pharm. 176**: 133-136.
 - Zucker, M. B. & Nachmias, V. T. (1985). Platelet activation **Arteriosclerosis 5**: 2-18.

VIII) TRABALHOS APRESENTADOS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

1) NACIONAIS

- Pinto, L. M. A., Gonçalves, P. R., Belline, P., Granjeiro, P. A., Messias Jr., N. S., de Paula, E., Macedo, D. V. & Torres, B. B. *Biochemistry of water: a multidisciplinary approach* XXVIII^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), resumo nº J07, 22 a 25 de maio de 1999, Caxambu - MG.

- Pinto, L. M. A., Lima, H. O. S., Santana, M. H. A. & de Paula, E. *Hemolytic studies involving plain formulations and β -cyclodextrin trapped drugs* XXIX^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), resumo nº P03, 27 a 30 de maio de 2000, Caxambu - MG.

- Pinto, L. M. A., Araújo, D. R., Vanini, R., Pereira, R., de Nucci, G., Santana, M. H. A. & de Paula, E. *Development of long-acting bupivacaine formulations* XXX^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), resumo nº H09, 19 a 22 de maio de 2001, Caxambu - MG.

- Pinto, L. M. A., de Jesus, M. B. & de Paula, E. *Complexation of praziquantel into β -cyclodextrin carrier* XXX^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), resumo nº Q12, 19 a 22 de maio de 2001, Caxambu - MG.

- Pinto, L. M. A., Santana, M. H. A. & de Paula, E. *Inclusion complexation of an ester-type local anesthetic with β -cyclodextrin* VI Pharmatech, resumo nº DD-02, 5 a 8 de agosto de 2001, Recife - PE.

- Araújo, D. R., Pinto, L. M. A. & de Paula, E. *Preparation and evaluation of drug-delivery systems for mepivacaine and bupivacaine* VI Pharmatech, resumo nº DD-14, 5 a 8 de agosto de 2001, Recife - PE.

- Pinto, L. M. A., Araújo, D. R. & de Paula, E. *Scanning electron microscopy analysis of inclusion complexes between local anesthetics and β -cyclodextrin* XXXI^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), resumo nº H53, 18 a 21 de maio de 2002, Caxambu - MG.
- de Jesus, M. B., Pinto, L. M. A., Lino, A. C. S., Takahata, Y., de Paula, E., Fraceto, L. F. & Pertinhez, T. A. *Morphological and theoretical analysis of a cyclodextrin complex developed for the treatment of schistosomiasis* XXXI^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), resumo nº H57, 18 a 21 de maio de 2002, Caxambu - MG.
- Laverde Jr, A., Fernandes, S. A., Lino, A. C. S., Pinto, L. M. A., de Paula, E., Takahata, Fujiwara, F. Y. & Marsaioli, A. J. *Estudos de RMN de complexos de inclusão entre ciclodextrina e anestésicos locais* VII Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, 31 de julho a 02 de agosto de 2002, Maringá - PR.
- de Jesus, M. B., Pinto, L. M. A., Lino, A. C. S., Takahata, Y. & de Paula, E. *Caracterização e ensaios in vitro de formulações anti-schistosomais de liberação controlada* X Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 25 a 26 setembro de 2002, Campinas – SP.

2) INTERNACIONAIS

- Pinto, L. M. A., Melo, P. S., Haun, M. & de Paula, E. *Cytotoxicity of benzocaine and liposome encapsulated benzocaine on V79 cells* 27th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, 7-13 Julho de 2000, Paris, França (Award from the Nagai Foundation)
- Pinto, L. M. A. & de Paula, E. *Benzocaine-lipid membrane interaction and its application in the development of long-acting, encapsulated, local anesthetic formulations* 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 16-20 de julho de 2000, Birmingham, UK.

- Araújo, D. R., Pinto, L. M. A. & de Paula, E. *Evaluation of two long acting bupivacaine formulations*, Primer Workshop de Biomembranas de Mercosul, 30 de novembro a 01 de dezembro de 2000, Buenos Aires, Argentina.

- Pinto, L. M. A. & de Paula, E. *Development of local anesthetics- β -cyclodextrin inclusion complexes: characterization and toxicity studies* 28th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, 23-27 Junho de 2001, San Diego, USA.

IX) PUBLICAÇÕES

- Pinto, L. M. A., Yokaichiya, D. K., Fraceto, L. F. & de Paula, E. (2000). Interaction of benzocaine with model membranes **Biophys. Chem.** **87**: 213-223.
- Fraceto, L. F., Pinto, L. M. A., Franzoni, L., Braga, A. A. C., Spisni, A., Schreier, S. & de Paula, E. (2002). Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers **Biophys. Chem.** *In press*.
- Pinto, L. M. A., Fraceto, L. F., Santana, M. H. A., Pertinhez, T. A., Junior, S. O. & de Paula, E. (2002). Preparation and characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes, submetido ao **Int. J. Pharm.**
- Araujo, D. R., Pinto, L. M. A., Santana, M. H. A. & de Paula, E. (2002). Liposomal systems for bupivacaine and mepivacaine: in vivo evaluation, submetido ao **Acta Anaesthesiol. Scand.**
- Araújo, D. R., Pinto, L. M. A., Braga, A. F. A. & de Paula, E. (2002). Formulações anestésicas locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas, submetido à **Rev. Bras. Anesthesiol.**

