

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



Daniele Ribeiro de Araújo

“ Desenvolvimento e avaliação farmacológica de formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-amidas cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) DANIELE RIBEIRO DE ARAÚJO e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Eneida de Paula".

Orientador: Prof.^ª. Dr.^ª. Eneida de Paula

Co-orientador: Prof.^ª. Dr.^ª. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Campinas

2005

IDADE	BC
CHAMADA	n 15 d
EX	
MBO BC/	66048
OC.	16-86-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
IEÇO	11.0.0
ATA	26.120/05
CPD	

BIB ID: 366734

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Ar15d

Araújo, Daniele Ribeiro de
Desenvolvimento e avaliação farmacológica de
formulações de liberação controlada com anestésicos
locais amino-amidas cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e
ropivacaína / Daniele Ribeiro de Araujo. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2005.

Orientadora: Eneida de Paula.

Co-orientadora: Angélica de Fátima de Assunção Braga.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anestesia. 2. Anestesia local. 3. Analgesia.
4. Lipossomos. 5. Ciclodextrinas. I. Eneida de Paula.
II. Angélica de Fátima de Assunção Braga. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
IV. Título.

Título em inglês: Development and pharmacological evaluation of drug-delivery systems for cyclic amino-amide local anesthetics: bupivacaïne, mepivacaïne and ropivacaïne.

Palavras-chave em inglês: anesthesia, local anesthesia, analgesia, liposomes, cyclodextrins.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutorado.

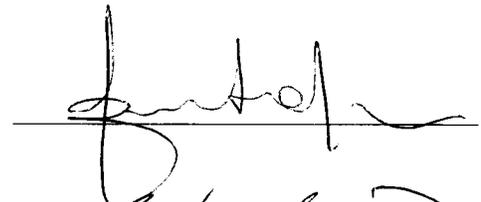
Banca examinadora: Eneida de Paula, Glória Maria Braga Potério, Sílvia S. Guterres, Pietro Ciancaglino, Francesco Langone.

Data da defesa: 10/06/2005.

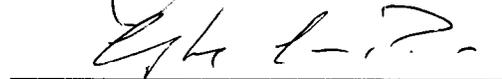
Campinas, 10 de junho de 2005

BANCA EXAMINADORA

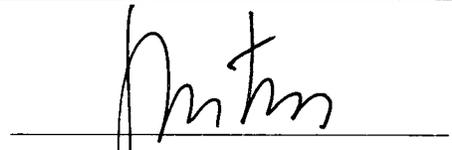
Profª. Drª. Eneida de Paula



Profª. Drª. Glória Maria Braga Potério



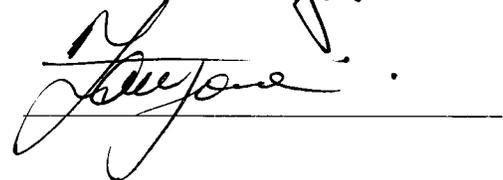
Profª. Drª. Sílvia Stanisquaski Guterres



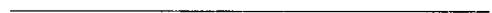
Prof. Dr. Pietro Ciancaglini



Prof. Dr. Francesco Langone



Profª. Drª. Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto





O Jardim (Monet)

“ O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis. ”

(Fernando Pessoa)

*À memória de minha mãe, Laiz, e de
minha tia, Glaucia
...por me ensinarem tanto em tão pouco
tempo.*

"O tempo é um mestre de cerimônias que sempre acaba por nos pôr no lugar que nos compete, vamos avançando e recuando às ordens dele e nosso erro é imaginar que podemos trocar-lhe às voltas."

(José Saramago)

AGRADECIMENTOS

Certa vez, alguém me disse que existem “coisas” que não se publica, não estão no currículo, não contam pontos em concurso e não dão título, mas que (só a gente sabe) valem muito...boa parte delas está aqui.

À Universidade Estadual de Campinas pelas oportunidades e experiências

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro

À Cristália Indústria Química e Farmacêutica, pelo fornecimento dos anestésicos locais e ciclodextrinas para a realização deste trabalho

A meus pais, Francisco e Laiç (in memorian) e irmã (Rafaele) pelo amor, confiança, ensinamentos, companheirismo e apoio que sempre recebo, mesmo de longe. AMO VOCÊS!!! ♥

À Profa. Dra. Eneida de Paula pela orientação, colaboração, sugestões, atenção e amizade durante esses anos

À Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga pela co-orientação, amizade, cooperação e discussões indispensáveis

*À Profa. Dra. Alba Regina Brito (Departamento de Fisiologia, Instituto de Biologia-Unicamp)
Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana (Faculdade de Engenharia Química- Unicamp),
Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling, Profa. Dra. Luciana Le Seur, Profa. Dra. Sarah Arana (Departamento de Histologia, Instituto de Biologia- Unicamp), Profa. Carmen Veríssima Ferreira e Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann (Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia- Unicamp), Prof. Dr. Tomomasa Yano (Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia- Unicamp), Dra. Glória Maria Braga Potério (Departamento de Anestesiologia, Faculdade de Ciências Médicas- Unicamp), ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira e à Ieda (Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina-USP-Ribeirão Preto) pelos esclarecimentos e auxílio tão importantes para o desenvolvimento deste trabalho*

À Profa. Dra. Nilce Corrêa Meirelles pela contribuição profissional e pessoal durante esses cinco anos...e pelas terapias também!

À D. Raquel, Marta, Cleusa e Marta do Departamento de Histologia, pela disponibilidade sempre presente!

À Marina e Andréa, sempre resolvendo meus abacaxis!

*Ao **Laboratório de Biomembranas...** devo uma parte dos momentos inesquecíveis que vivi. Encontrei amigos que sempre vou guardar em meu coração e aprendi que confiança só merece ser dada a pessoas especiais. Agradeço não só pelas conversas de trabalho, mas especialmente pelas risadas...afinal, tudo sempre acabou assim: ☺ !*

- *Paulinho, meu irmãozinho... obrigada pela amizade, carinho, apoio, pelas conversas (e brigas também...), colo, companheirismo, risadas, filmes, festas...tudo de bom!!!*
- *Cíntia, agradeço a amizade, atenção e ajuda que recebi durante todo o tempo que trabalhamos juntas. Com você aprendi muito mais do que ensinei, tive até aulas de diplomacia*
- *Nonô, agradeço por nossas conversas (acho que caiu uma caixa de lápis!), almoços, risadas, comentários, amizade e pelos trabalhos que fizemos juntas*
- *Léo, agradeço a amizade, consideração, esclarecimentos e os favores também*
- *Giovana e Simone ("minhas primeiras filhas"), peço desculpas pelas vezes que não dei toda a atenção que vocês mereciam, obrigada pela amizade, agradável convivência e por me ajudarem a dividir um pouco melhor meu tempo*
- *Ju, Bispo, Cleyton, Raquel, André obrigada pelas risadas, amizade e almoços...*
- *Márcio, Maribel e D. Cidinha obrigada pelo auxílio que recebi durante todo esse tempo e por tentarem manter "nosso hospício" um pouco organizado.*

- Dani Japa, minha irmã japonesa... obrigada por tudo! Na verdade, o "tudo" significa amizade, apoio, carinho, atenção, pelo tempo de convivência na república, palavras certas em todos os momentos, paciência oriental...na falta da ligação local faço um DDI!
- Zequinha, agradeço a amizade, consideração, conselhos, almoços, conversas divertidas e frases únicas!
- Márcio Miranda, obrigada pela amizade, congressos e pelas oportunidades de trabalho
- Tio Du, você é engraçado até quando reclama, obrigada pela convivência e pelas risadas
- Marcos Zardetto, agradeço as palavras amigas (mesmo via Telefônica, Embratel), risadas, jantares e os dias maravilhosos no "Resort Zardetto" (com reserva sempre garantida!)
- À "Cúpula do Bello" (Eu, Nonô, Paulinho, Zeca, Japa, André e Cíntia)...que ela nunca seja esquecida, mesmo fora da Unicamp
- Às amigas Cristina e Sílvia pela atenção e oportunidades de trabalho
- À Maria Helena, Maria Tereza, Tainá, Aruã, Hugo, Nyck, Bel, Barros e Miriã reencontrá-los é sempre maravilhoso, obrigada pela amizade e apoio que a distância nunca conseguiu atrapalhar
- Enfim, à "família" que adotei (eixo Campinas-São Paulo-Curitiba-Rio), onde cada um tem uma característica especial: Alberto (18), Dani (Japinha), Paulinho (Pó), Claudinha (Sharon), Ericka (Minha Filha), Jr. (Xr.), Cleyton ("De Belhém"), Lucy & Élcio, Mateus ("O Mocinho das Eletrônica"), Juli & Mayara, Ed (Edmo), Marcos (Má), Zeca (Zequinha), Karen (Ká) e Júlio (Julinho). Conhecê-los e ter a oportunidade de conviver com vocês é maravilhoso, agradeço: a amizade, carinho, atenção, cinemas, festas, pizzas, Pantannais, Borbas, Natais, boites, reuniões na mesa redonda e terapias de grupo.

Dani (Morango)

ÍNDICE

	<i>Página</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xviii
LISTA DE ABREVIACÕES	xix
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxii
I. INTRODUÇÃO	1
1. ANESTESIA & ANALGESIA	1
2. ANESTÉSICOS LOCAIS	2
2.1. BUPIVACAÍNA, MEPIVACAÍNA & ROPIVACAÍNA: TRÊS ANÁLOGOS COM PROPRIEDADES DIFERENTES	3
3. ANESTÉSICOS LOCAIS NA TERAPIA DA DOR: COMO AUMENTAR A DURAÇÃO DE AÇÃO E REDUZIR A TOXICIDADE SISTÊMICA?	9
4. FORMULAÇÕES ANESTÉSICAS LOCAIS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	10
4.1. LIPOSSOMAS	10
4.2. CICLODEXTRINAS	14
II. OBJETIVOS	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
III. MATERIAIS & MÉTODOS	19
1. DROGAS, SAIS E SOLVENTES	19
2. EQUIPAMENTOS	19
3. ANIMAIS	20
4. ERITRÓCITOS HUMANOS	20
5. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	21
5.1. LIPOSSOMAS	21
5.2. CICLODEXTRINAS	21
6. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	22
6.1. LIPOSSOMAS	22
6.1.1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO: ESPALHAMENTO QUASI-ELÁSTICO DE LUZ (LIGHT SCATTERING)	22
6.1.2. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO	23
6.1.3. ESTABILIDADE E PERMEABILIDADE DE LIPOSSOMAS: LIBERAÇÃO DE RODAMINA	24

6.1.4. CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS QUANTO À ESTABILIDADE QUÍMICA DE SEUS COMPONENTES ESTRUTURAIS: ESTIMATIVA DA OXIDAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS	26
6.2. CICLODEXTRINAS	29
6.2.1. EFICIÊNCIA DA COMPLEXAÇÃO: CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	29
6.2.2. CINÉTICA DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS: MODIFICAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS AL	29
6.2.3. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS AL: ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE	30
6.2.4. MORFOLOGIA DA COMPLEXAÇÃO: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	32
7. TESTES IN VITRO: LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	33
8. TESTES DE ESTERILIZAÇÃO	33
9. TESTES FARMACOLÓGICOS	34
ENSAIOS IN VITRO: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	34
9.1. CULTIVO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS	35
9.2. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ERITRÓCITOS E DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE HEMÓLISE	36
ENSAIOS IN VIVO: AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO NERVOSO	38
9.3. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL	40
9.4. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO E CAUDAL – BLOQUEIO MOTOR	41
9.5. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO E CAUDAL – BLOQUEIO SENSORIAL	42
10. AVALIAÇÃO NEURO & NEFROHISTOLÓGICA	43
11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
IV. RESULTADOS & DISCUSSÃO	46
1. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	46
<u>LIPOSSOMAS</u>	
1.1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO: DIÂMETRO MÉDIO DOS LIPOSSOMAS E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	46
1.2. ESTABILIDADE E PERMEABILIDADE: LIBERAÇÃO DE RODAMINA	49
1.3. CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS QUANTO À ESTABILIDADE QUÍMICA DE SEUS COMPONENTES ESTRUTURAIS: ESTIMATIVA DA OXIDAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS	54

CICLODEXTRINAS

1.4. EFICIÊNCIA DA COMPLEXAÇÃO: CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	56
1.5. CINÉTICA DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS: MODIFICAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS AL	62
1.6. ESTEQUIOMETRIA DA COMPLEXAÇÃO: ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE	64
1.7. MORFOLOGIA DAS FORMULAÇÕES: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	66
2. TESTES IN VITRO: LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	72
2.1. ANESTÉSICOS LOCAIS COMPLEXADOS COM CD	72
2.2. ANESTÉSICOS LOCAIS ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS (LUV)	74
3. TESTES DE ESTERILIZAÇÃO	76
4. ENSAIOS IN VITRO: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	77
4.1. ENSAIOS EM CULTURA DE CÉLULAS: VIABILIDADE CELULAR	77
4.1.1. ANESTÉSICOS LOCAIS COMPLEXADOS COM CD	77
4.1.2. ANESTÉSICOS LOCAIS ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS (LUV)	82
4.2. ENSAIOS EM ERITRÓCITOS HUMANOS: INTERAÇÃO COM MEMBRANAS	84
5. ENSAIOS IN VIVO: AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO NERVOSO	90
5.1. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL	90
5.2. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO E CAUDAL - BLOQUEIO MOTOR	95
5.3. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO – BLOQUEIO SENSORIAL	100
5.4. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO CAUDAL – BLOQUEIO SENSORIAL	107
6. AVALIAÇÃO NEURO & NEFROHISTOLÓGICA	112
V. CONCLUSÕES	123
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
VII. PERSPECTIVAS FUTURAS	139
XIX. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química de alguns AL do tipo amino-ésteres (procaína e tetracaína) e amino-amida cíclicos (bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína).	5
Figura 2	Representação esquemática de lipossomas: multilamelar (A) e unilamelar (B) (Araujo et al., 2003).	12
Figura 3	Representação esquemática dos mecanismos de interação celular e liberação de drogas carregadas por lipossomas. a- interação não-específica, b- adsorção à superfície celular, c- fusão com a membrana celular, d- pinocitose da droga, e- submissão à endocitose específica, f- formação de endossoma, g- formação de lisossoma, h- liberação da droga no citoplasma (Adaptado de Torchilin, 2005).	13
Figura 4	Formação de complexos de inclusão entre fármacos e ciclodextrina, nas proporções de 1:1 e 1:2 (A) e representação da complexação 1:2 (B) (Adaptado de Davis & Brewster, 2004).	15
Figura 5	Estrutura geral das ciclodextrinas naturais* e alguns dos derivados da β -CD (adaptado de Rajewsky & Stella, 1996).	16
Figura 6	Estrutura química da rodamina B.	25
Figura 7	Representação esquemática das alterações químicas em fosfolipídios com conseqüente variação na permeabilidade dos lipossomas (Adaptado de Torchilin, 2005).	28
Figura 8	Tipos de isotermas de solubilidade. Onde: S_o = solubilidade da molécula “convidada”, S_t = concentração da molécula “convidada” dissolvida (livre e complexada), S_c = limite de solubilidade do complexo pouco solúvel em água. A_P , A_L e A_N = complexos muito solúveis (solubilidade limite determinada pela solubilidade da CD), B_S = complexo de solubilidade limitada, B_I = complexo insolúvel (adaptado de Frömming & Szejtli, 1994).	31
Figura 9	Representação do sistema para liberação de fármacos. A= Compartimento doador (amostra+membrana), B= compartimento receptor (solução tampão), C= local de retirada das alíquotas, D= barra magnética para agitação.	33
Figura 10	Estrutura química do MTT.	34
Figura 11	Inserção da agulha no espaço intervertebral (L5-L6) para injeção intratecal em ratos (adaptado de Mestre et al., 1994).	40

Figura 12	Representação esquemática da região do nervo infraorbital e local de injeção das formulações anestésicas em ratos (adaptado de Fink et al., 1975).	41
Figura 13	Visualização do bloqueio motor induzido pelos AL (A) e procedimento realizado durante o teste PWTP (Araujo et al., 2004).	43
Figura 14	Caracterização espectrofotométrica (A) e espectros de fluorescência para RDM ($\lambda_{exc.}$ 554 nm e λ_{emis} 574 nm) (B) em pH 7,4 (HEPES 20 mM em NaCl 150 mM).	50
Figura 15	Cinética da permeabilidade das MLV à RDM durante 60 min. antes e após adição de Triton X-100 (2 %). A- Sistema contendo RDM encapsulada em MLV; B- Sistema contendo RDM encapsulada em MLV com presença de RVC (em água), C- Sistema contendo RDM e RVC em MLV. rdm= rodamina em água; rdmrvc= rodamina e ropivacaína em água (n=4).	52
Figura 16	Liberação de RDM em MLV em relação à variação de temperatura (4, 25 e 37°C) antes e após (t) adição de Triton X-100 (2%). A- Sistema contendo RDM encapsulada em MLV; B- Sistema contendo RDM encapsulada em MLV com presença de RVC (em água), C- Sistema contendo RDM e RVC em MLV. Dados representados como médias \pm SD (n=4).	53
Figura 17	Concentração de MDA (nM, 532 nm) em lipossomas unilamelares (LUV 5mM) armazenados a 4 °C e protegidos da luz (n=3-4).	54
Figura 18	Concentração de MDA (nM, 532 nm) em lipossomas unilamelares (LUV 5mM) armazenados em três diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C) durante 30 dias e protegidos da luz (n=2-3).	55
Figura 19	Termogramas de DSC para o sistema de BVC com β -CD. (A) BVC, (B) β -CD, (C) mistura física BVC/ β -CD, (D) complexo sólido BVC $_{\beta}$ -CD (razão molar de 1:1 AL: β -CD).	58
Figura 20	Termogramas de DSC para o sistema de RVC com β -CD. (A) β -CD, (B) RVC, (C) mistura física RVC/ β -CD, (D) complexo sólido RVC $_{\beta}$ -CD (razão molar de 1:1 AL: β -CD).	58
Figura 21	Termogramas de DSC para o sistema de BVC com HP β -CD. (A) HP β -CD, (B) BVC, (C) mistura física BVC/HP β -CD, (D) complexo sólido BVC:HP β -CD (razão molar de 1:1 AL : HP β -CD).	59

Figura 22	Termogramas de DSC para o sistema de RVC com HP β -CD. (A) HP β -CD, (E) RVC, (F) mistura física RVC/HP β -CD, (G) complexo sólido RVC:HP β -CD (razão molar de 1:1 AL : HP β -CD).	60
Figura 23	Cinética de formação dos complexos de BVC ou RVC com HP β -CD (1:1). Os sistemas foram mantidos sob agitação durante 12 horas. Dados representados como médias \pm SD (n=4).	63
Figura 24	Diagramas de solubilidade de fases para BVC e RVC com β -CD (A) e HP β -CD (B) a 25°C, pH 7,4. Dados representados como médias \pm SD (n=3). Ensaio realizado com AL em excesso (30 mM) e concentrações crescentes de β -CD e HP β -CD; os valores nas ordenadas referem-se à concentração de AL solúvel após 24 horas de equilíbrio.	65
Figura 25	Análise por MEV dos cristais de β -CD nativa (A) e liofilizada (B), HP β -CD nativa (C) e liofilizada (D). Aumento de 1500x.	68
Figura 26	Análise por MEV dos cristais de BVC nativa (A) e liofilizada (B), RVC nativa (C) e liofilizada (D). Aumento de 1500x.	69
Figura 27	Análise por MEV dos cristais das misturas físicas contendo BVC/ β -CD (A), BVC/HP β -CD (B), RVC/ β -CD (C) e RVC/HP β -CD (D). Aumento de 1500x.	70
Figura 28	Análise por MEV dos cristais dos complexos de inclusão (AL:CD, 1:1) BVC: β -CD (A), BVC:HP β -CD (B), RVC: β -CD (C) e RVC:HP β -CD (D). Aumento de 1500x.	71
Figura 29	Liberção cumulativa de BVC (A) e RVC (B) (%) a partir de sistemas contendo β -CD e HP β -CD (1:1, razão molar AL:CD), pH 7,4 e 25 °C. Dados representados como médias \pm SD (n=4).	73
Figura 30	Liberção cumulativa de MVC* e RVC (%) a partir de sistemas contendo lipossomas unilamelares, pH 7,4 e 25 °C. Dados representados como médias \pm SD (n=4). *Dados obtidos de Araujo et al., 2004.	74
Figura 31	Efeitos citotóxicos da β -CD e HP β -CD (4, 8 e 16 mM), em células 3T3 (incubação por 2 h a 37 °C e 5% CO ₂ , pH 7,4) avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT (Médias \pm SD, n=4 experimentos). **p < 0,01 (ANOVA).	78

Figura 32	Efeitos citotóxicos da β -CD, HP β -CD, BVC, BVC _{HPβ-CD} e BVC _{β-CD} a 4mM (A), 8mM (B) e 16 mM (C) em células 3T3 (incubação por 2 h a 37 °C e 5% CO ₂ , pH 7,4) avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT (Médias \pm SD, n=4 experimentos). a BVC _{HPβ-CD} ou BVC _{β-CD} e BVC; * p , 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,001 (ANOVA).	80
Figura 33	Efeitos citotóxicos da β -CD, HP β -CD, RVC, RVC _{HPβ-CD} e RVC _{β-CD} a 4mM (A), 8mM (B) e 16 mM (C) em células 3T3 (incubação por 2 h a 37 °C e 5% CO ₂ , pH 7,4) avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT (Médias \pm SD, n=4 experimentos).	81
Figura 34	Efeitos citotóxicos MVC e MVC _{LUV} (17, 35 e 70 mM) (A); RVC e RVC _{LUV} (4, 8 e 16 mM) (B) em células 3T3 (incubação por 2 h a 37 °C e 5% CO ₂) avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT (Médias \pm SD, n= 3 experimentos). a MVC _{LUV} e MVC ou RVC _{LUV} e RVC. **p < 0,01 (ANOVA).	83
Figura 35	Efeito hemolítico da β -CD e HP β -CD sobre eritrócitos humanos incubados a 37 °C por 15 min. em solução (Hematócrito 0,15%, pH 7,4, n=6).	86
Figura 36	Efeito hemolítico da β -CD, HP β -CD, RVC, RVC _{β-CD} (A) e RVC _{HPβ-CD} (B) sobre eritrócitos humanos incubados a 37 °C por 15 min. em solução (Hematócrito 0,15%, pH 7,4, n=4-6).	88
Figura 37	Efeito hemolítico da β -CD, BVC e BVC _{β-CD} sobre eritrócitos humanos incubados a 37 °C por 15 min. em solução (Hematócrito 0,15%, pH 7,4, n=4-6).	89
Figura 38	Porcentagem de animais com analgesia x tempo no bloqueio do nervo infraorbital induzido pelas formulações de RVC livre e lipossomal; 0,125 % (A), 0,25 % (B) e 0,5 % C) (n=7-8/grupo).	93
Figura 39	Porcentagem de animais com analgesia x tempo no bloqueio do nervo infraorbital induzido pelas formulações de MVC livre, lipossomal e com vasoconstritor; 0,5 % (A), 1 % (B) e 2 % (C) (n=7-8/grupo).	94
Figura 40	Curvas efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os veículos (β -CD e HP β -CD), BVC, BVC _{β-CD} e BVC _{HPβ-CD} a 0,125% (A) , 0,25% (B) e 0,5% (C). Valores expressos em média \pm SD (n=8-10). a, BVC e β -CD / HP β -CD ; b, BVC _{β-CD} e β -CD / HP β -CD; c, BVC _{HPβ-CD} e β -CD / HP β -CD; d, BVC _{HPβ-CD} e BVC; e BVC _{β-CD} e BVC; f BVC _{HPβ-CD} e BVC _{β-CD} . * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ANOVA).	104

Figura 41	Curvas efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os veículos (β -CD e HP β -CD), RVC, RVC $_{\beta$ -CD e RVC $_{HP\beta$ -CD} a 0,125% (A) , 0,25% (B) e 0,5% (C). Valores expressos em média \pm SD (n=8-10). a , RVC e β -CD / HP β -CD ; b , RVC $_{\beta$ -CD e β -CD / HP β -CD; c , RVC $_{HP\beta$ -CD e β -CD / HP β -CD; d , RVC $_{HP\beta$ -CD e RVC; e RVC $_{\beta$ -CD e RVC; f RVC $_{HP\beta$ -CD e RVC $_{\beta$ -CD}. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ANOVA).	105
Figura 42	Curvas efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com o veículo (LUV), RVC e RVC $_{LUV}$ a 0,125% (A) , 0,25% (B) e 0,5% (C). Valores expressos em média \pm SD (n=8-10). a , RVC e LUV ; b , RVC $_{LUV}$ e LUV; c , RVC $_{LUV}$ RVC. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ANOVA).	106
Figura 43	Curva efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os veículos (β -CD e HP β -CD), BVC, BVC $_{\beta$ -CD e BVC $_{HP\beta$ -CD} a 0,5% (100 μ g/20 μ L). Valores expressos em média \pm SD (n=5). a BVC e β -CD / HP β -CD; b BVC $_{\beta$ -CD e β -CD / HP β -CD; c BVC $_{HP\beta$ -CD e β -CD / HP β -CD; d BVC $_{HP\beta$ -CD e BVC; e BVC $_{\beta$ -CD e BVC; f BVC $_{HP\beta$ -CD e BVC $_{\beta$ -CD}. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ANOVA).	108
Figura 44	Fotomicrografias de cortes da medula espinhal (L5-L6) de ratos do grupo sem injeção, corados com hematoxilina e eosina. A- substância cinzenta apresentando corpos celulares de neurônios e núcleos de células gliais (g). B- substância cinzenta com neurônios de aspecto normal: citoplasma basófilo de limites nítidos, núcleo com cromatina frouxa/homogênea e nucléolo evidente. Entre os corpos celulares dos neurônios observar núcleos de células da glia (g) e vasos sanguíneos íntegros (v).(n=5). Objetiva de 40X.	115
Figura 44	Fotomicrografia de corte da medula espinhal (L5-L6) de ratos do grupo sem injeção, corado com hematoxilina e eosina. C- substância branca apresentando inúmeros axônios (a) e núcleos de células gliais (g). Observar a preservação dos componentes teciduais (n=5). Objetiva de 40X.	116
Figura 45	Fotomicrografias de cortes da medula espinhal de ratos tratados com o veículo HP β -CD (100 μ g/20 μ L). A- notar preservação normal dos componentes do tecido nervoso apresentando neurônios (n) com citoplasma basófilo e nucléolo evidente, núcleos de células gliais (g). B- substância branca, com numerosos axônios (a) e células da glia (g). (n=5). Objetivas de 40X.	117
Figura 46	Fotomicrografias de corte da medula espinhal de ratos tratados com BVC (100 μ g/20 μ L). A- Substância cinzenta apresentando corpos celulares de neurônios (n) e núcleos de células gliais (g) morfolologicamente íntegros, além de vasos sanguíneos (v). B- Detalhe da substância branca com numerosos núcleos de células gliais (g). (n=5). Objetiva de 40X.	118

- Figura 47 Fotomicrografias de cortes de medula espinhal de ratos tratados com o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$ ($100\mu g/20\mu L$). A,B- detalhes da substância cinzenta mostrando neurônios com aspecto necrótico (N) (citoplasma escuro e nucléolo não evidente) em meio a vasos sanguíneos (v) e núcleos de células gliais (g). Observar comparação com neurônio normal (n) em A e sinais de retração celular (r) em B (n=2). Objetiva de 40X. 119
- Figura 47 Fotomicrografias de cortes da medula espinhal (L5-L6) de ratos do grupo tratados com o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$ ($100\mu g/20\mu L$), corados com hematoxilina e eosina. C- substância cinzenta mostrando corpos celulares de neurônios (n), núcleos de células gliais (g) e vasos sanguíneos (v). D- substância branca com numerosas fibras amielínicas (a), observar núcleos de células da glia (g). Notar a preservação morfofuncional dos componentes do tecido nervoso. (n=3). Objetiva de 40X. 120
- Figura 48 Fotomicrografias de rim de ratos dos grupos: sem injeção (A) e tratado com $HP\beta-CD$ ($100\mu g/20\mu L$) (B), corados com hematoxilina e eosina. A e B- córtex renal mostrando glomérulos (G), túbulos contorcidos proximais (tp) e túbulos contorcidos distais (td). Notar a preservação morfofuncional dos componentes do tecido renal: glomérulo com margens delimitadas pela cápsula de Bowman (seta) e presença de inúmeras células nos túbulos contorcidos distais. (n=5). Objetiva de 20X. 121
- Figura 49 Fotomicrografias de rim de ratos dos grupos tratados com BVC (C) e com o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$ ($100\mu g/20\mu L$) (D), corados com hematoxilina e eosina. C e D- córtex renal mostrando preservação aspectos morfofuncionais normais de glomérulos (G), túbulos contorcidos proximais (tp) e túbulos contorcidos distais (td) (n=5). Objetiva de 20X. 122

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros físicos químicos e farmacológicos de AL da série amino-amida cíclicos (adaptado de: de Jong, 1994 e Sociedade de Anestesiologia do Chile http://www.socanestesia.cl/).	8
Tabela 2	Classificação de lipossomas de acordo com os parâmetros estruturais ou métodos de preparação (adaptado de: Lichtenberg & Barenholz, 1988; Grant, 2002; Santos & Castanho, 2002).	11
Tabela 3	Diâmetro médio das LUV após encapsulação com AL trinta dias após preparação (n = 4).	47
Tabela 4	Diâmetro médio e proporção dos sistemas LUV, RVC _{LUV} e MVC _{LUV} 30 e 60 dias de preparação (n = 3).	55
Tabela 5	Temperatura de transição de fases e ΔH da BVC, RVC, β -CD e HP β -CD, misturas físicas e complexos sólidos determinados através de DSC.	61
Tabela 6	Valores das constantes de associação (Kc) com β -CD e HP β -CD para a BVC e RVC (pH 7,4 a 25 °C, n = 4).	65
Tabela 7	Concentrações para início (C _{início}) e solubilização da membrana (C _{sol}) determinadas para as CDs (β -CD, HP β -CD), AL livres (RVC e BVC) e complexados (RVC β -CD, RVC _{HPβ-CD} e BVC β -CD) em eritrócitos humanos (hematócrito 0,15%, pH 7,4) (n=6).	89
Tabela 8	Tempo de recuperação e efeito total do bloqueio sensorial (AUC) induzido pelas formulações de RVC livre e lipossomal; MVC livre, lipossomal e com vasoconstritor durante o bloqueio do nervo infraorbital em ratos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 7-8/grupo). a RVC _{LUV} e RVC; b MVC _{LUV} e MVC; c MVC _{VASO} e MVC. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001. Testes de Kruskal – Wallis (MVC) e Mann – Whitney (RVC).	92
Tabela 9	Latência, T _{máx} , tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (AUC) induzido pelas formulações de BVC livre e complexada (β -CD e HP β -CD) durante o bloqueio do nervo ciático em camundongos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 8-10/grupo). a BVC _{HPβ-CD} e BVC; b BVC _{HPβ-CD} e BVC β -CD; c BVC 0,25% e BVC 0,125%; d BVC β -CD 0,25% e BVC β -CD 0,125%; e BVC _{HPβ-CD} 0,25 % e BVC _{HPβ-CD} 0,125%; f BVC 0,5% e BVC 0,125%; g BVC β -CD 0,5% e BVC β -CD 0,125%; h BVC _{HPβ-CD} 0,5% e BVC _{HPβ-CD} 0,125%. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 (Teste de Kruskal – Wallis).	97
Tabela 10	Latência, T _{máx} , tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (AUC) induzido pelas formulações de RVC livre e complexada (β -CD e HP β -CD) durante o bloqueio do nervo ciático em camundongos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 8-10/grupo). i RVC _{HPβ-CD} e RVC; j RVC 0,25% e RVC 0,125%; l RVC β -CD 0,25% e RVC β -CD 0,125%; m RVC _{HPβ-CD} 0,25 % e RVC _{HPβ-CD} 0,125%; n RVC 0,5% e RVC 0,125%; o RVC β -CD 0,5% e RVC β -CD 0,125%; p RVC _{HPβ-CD} 0,5% e RVC _{HPβ-CD} 0,125%, q RVC _{LUV} 0,25% e RVC _{LUV} 0,125%, r RVC _{LUV} 0,5% e RVC _{LUV} 0,25%, s RVC _{LUV} 0,5% e RVC _{LUV} 0,125% . * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 (Teste de Kruskal – Wallis).	98
Tabela 11	Latência, T _{máx} , tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (AUC) induzido pelas formulações de BVC livre e complexada (0,5%) após injeção intratecal em ratos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 5/grupo). a BVC _{HPβ-CD} e BVC. * p < 0,05.	99

LISTA DE ABREVIACOES

AL: anestésico (s) local (is)

A ou Abs: absorbância

ASC: área sob a curva efeito x tempo

BVC: bupivacaína

β -CD: β -ciclodextrina (s)

BVC _{β -CD}: bupivacaína complexada com β -ciclodextrina

BVC_{HP β -CD}: bupivacaína complexada com hidroxipropil β -ciclodextrina

CD: ciclodextrina (s)

DSC: calorimetria diferencial de varredura

H&E: coloração por hematoxilina e eosina

HP β -CD: hidroxipropil β -ciclodextrina (s)

LUV: lipossomas unilamelares

MDA: malondialdeído

ME: medula espinhal

MLV: lipossomas multilamelares

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio

MVC: mepivacaína

MVC_{LUV}: mepivacaína lipossomal

MVC_{VASO}: mepivacaína com vasoconstritor

PWTP: *paw withdrawal threshold to pressure*

RDM: rodamina

RVC: ropivacaína

RVC _{β -CD}: ropivacaína complexada com β -ciclodextrina

RVC_{HP β -CD}: ropivacaína complexada com hidroxipropil β -ciclodextrina

RVC_{LUV}: ropivacaína lipossomal

MEV: microscopia eletrônica de varredura

T_{máx}: tempo para o efeito máximo

Triton X-100: t-octilfenoxipoli (9,10) oxietileno

RESUMO

Dentre os fármacos usados para aliviar ou eliminar a dor, encontram-se os anestésicos locais (AL). Esses compostos, capazes de bloquear a excitação-condução em nervos periféricos, têm duração de ação relativamente curta e toxicidade para os sistemas nervoso central e cardiovascular. Com a finalidade de prolongar a duração de ação e reduzir a toxicidade sistêmica dos AL, pesquisas com diferentes tipos de sistemas carreadores têm sido desenvolvidas. Essas novas formulações, denominadas de liberação lenta, possibilitam a liberação controlada e evitam picos plasmáticos dos AL, prolongando a analgesia e reduzindo sua toxicidade.

Neste trabalho objetivamos preparar, caracterizar (quanto a encapsulação ou complexação, estabilidade e liberação da droga) e avaliar *in vitro* (toxicidade celular) e *in vivo*, a atividade farmacológica (latência, intensidade, duração de ação e toxicidade local) de novas formulações anestésicas de liberação controlada, comparando-as com os fármacos disponíveis no mercado. Os AL de escolha foram as amino-amidas cíclicas: Bupivacaína (BVC), Mepivacaína (MVC) e Ropivacaína (RVC), bastante utilizadas em clínica médica e odontológica. Os sistemas carreadores de drogas adotados foram lipossomas unilamelares grandes (LUV de 400nm, compostos de fosfatidilcolina e colesterol) e as ciclodextrinas: β -CD ou hidroxipropil β -CD (HP β -CD).

Ensaio de estabilidade física, por fluorescência, revelaram que os lipossomas mantêm o conteúdo encapsulado e que a presença do AL não interfere na permeabilidade dos mesmos, analisada em função do tempo e temperatura. O coeficiente de partição foi calculado e indicou o perfil esperado pelas substituições, i.e., MVC<RVC<BVC (93,132 e 136, respectivamente). Testes de estabilidade química não indicaram mudanças nos índices de peroxidação lipídica em até 4 meses de estocagem (a 4°C) após encapsulação dos AL. Porém, análises por espalhamento de luz mostraram aumento no tamanho das vesículas após 30 dias de preparação, inviabilizando o uso das mesmas por períodos maiores.

A complexação com CDs foi evidenciada através de calorimetria diferencial de varredura, que detectou alterações na temperatura de fusão dos AL puros, bem como perda do pico endotérmico referente à desidratação da cavidade da ciclodextrina, nos sistemas de BVC e RVC complexadas com β -CD e HP β -CD. Imagens de microscopia eletrônica de varredura confirmaram que há perda da estrutura cristalina dos AL e CDs puros, após a complexação. Experimentos de solubilidade de fases revelaram aumento linear na solubilidade da BVC e RVC em função da concentração de CDs, além de permitir o cálculo da constante de associação entre AL: β -CD (8,9 e 7,9 M⁻¹) e AL:HP β -CD (14,7 e 10,0 M⁻¹) para BVC e RVC, respectivamente.

Através de ensaios *in vitro* (diálise) observou-se diminuição nas taxas de liberação de BVC e RVC complexadas e de RVC encapsulada em lipossomas, em relação aos AL livres, indicando que a interação com esses carreadores alterou a permeação dos AL através de membranas. Os ensaios de

toxicidade, em cultura de fibroblastos e em eritrócitos humanos, revelaram diminuição na toxicidade dos AL após complexação com CDs (BVC e RVC) ou encapsulação em lipossomas (MVC e RVC).

Nos ensaios *in vivo* observou-se que, após o bloqueio do nervo infraorbital em ratos, as formulações lipossomais (MVC_{LUV} e RVC_{LUV}) prolongaram a duração e aumentaram a intensidade da analgesia em relação aos AL livres ou associados a vasoconstritores (no caso da MVC), sugerindo as formulações de AL encapsulados em lipossomas como alternativa ao uso de vasoconstritores em procedimentos cirúrgicos prolongados e manutenção da analgesia pós-operatória, especialmente em Odontologia.

Com relação à avaliação do bloqueio motor, a injeção dos AL livres, encapsulados ou complexados alterou, de maneira dose-dependente, a função motora dos animais após bloqueios caudal (injeção intratecal) e do nervo ciático (infiltração) havendo a perda reversível dos reflexos motores em todos os animais testados. Nenhuma das formulações de AL testadas, tanto com β -CD, $HP\beta$ -CD ou LUV, prolongou ou intensificou a potência do bloqueio motor induzida por BVC e RVC. No entanto, nos sistemas $BVC_{HP\beta-CD}$ e $RVC_{HP\beta-CD}$ observou-se redução significativa na latência ou tempo para instalação do bloqueio, indicando um início de ação mais rápido, sem modificar a duração do bloqueio motor, o que é bastante desejável.

Já a avaliação do bloqueio sensorial do nervo ciático de camundongos, demonstrou que os sistemas $BVC_{HP\beta-CD}$, $RVC_{HP\beta-CD}$ e RVC_{LUV} e induziram aumento na intensidade e duração da analgesia em relação aos AL livres ou complexados com β -CD, tornando-os de grande interesse para uso no período pós-operatório. A injeção intratecal de $BVC_{HP\beta-CD}$ 0,5% também aumentou o limiar de nocicepção dos animais em relação à $BVC_{\beta-CD}$ e BVC livre, mostrando aumento na potência e duração da analgesia. Esse resultado, em particular, nos permite sugerir que o aumento da potência anestésica (ca 1,5 vezes), obtido com as formulações deve-se, além de ao aumento na concentração total de AL (em água e associado ao carreador) disponibilizada pelas formulações, à menor ligação dos anestésicos com proteínas do líquor e/ou sua menor captação pela circulação; mantendo o AL por mais tempo em contato com a membrana neuronal.

Em avaliação neurohistológica encontramos sinais de neurotoxicidade em alguns dos animais tratados com o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$ (a 0,5% de BVC) que não foram observados após injeção de $HP\beta$ -CD ou BVC, isoladamente. A potencialização do efeito tóxico da BVC pela complexação com $HP\beta$ -CD deve-se à maior disponibilidade do AL em contato com a membrana neuronal, sugerindo que o uso do complexo em concentrações menores (como 0,25%), reduziria o efeito neurotóxico sem modificar a potência anestésica. Além disto, a análise nefrohistológica não detectou quaisquer indícios de alterações morfofuncionais após o tratamento dos animais com $HP\beta$ -CD, BVC ou $BVC_{HP\beta-CD}$ após administração intratecal, confirmando a potencialidade do uso clínico desta formulação anestésica.

ABSTRACT

Local anesthetics (LA) are among the different classes of pharmacological compounds used to attenuate or to eliminate pain. These drugs, which are able to reversibly block the excitation/transmission of the nerve impulse in axons have a relatively short action and a significant toxicity to the Central Nervous and Cardiovascular systems. In order to prolong the time of action and to reduce the systemic toxicity of LA, many investigations have been carried out with LA in drug-delivery systems. These novel formulations, called long-acting local anesthetics, allow the controlled-release - avoiding high plasmatic concentrations to be reached – in such a way that they prolong analgesia as well as they reduce LA's intrinsic toxicity.

Our aim was to prepare, to characterize (the encapsulation, stability and drug-release) and to evaluate - both *in vitro* (cellular toxicity) and *in vivo* (latency, intensity and duration of anesthesia as well as local toxicity) the pharmacological activity of new drug-delivery systems for LA, in comparison to the commercially available anesthetics. We have chosen the cyclic amino-amide anesthetics Bupivacaine (BVC), Mepivacaine (MVC) and Ropivacaine (RVC), since they are largely used in medicine and dentistry. The drug-carrier systems used were large unilamellar liposomes (400 nm LUV, composed by phosphatidylcholine and cholesterol) and cyclodextrins: β -CD and hydroxypropyl (HP β -CD).

Stability tests showed that liposomes were able to keep their content and that LA incorporation did not change their permeability at different times and temperatures. Partition coefficients were measured and indicated the profile expected from the substitution degree, i.e. MVC < RVC < BVC (P values = 93, 132 and 136, respectively). Chemical stability was evaluated through oxidative tests and no changes in the lipid oxidation levels were observed up to 4 months after preparation and storage at 4°C, with and without LA. Nevertheless, light-scattering measurements revealed an increase in the vesicles size after 30 days, restraining the use of the liposome formulations for a longer time.

LA complexation with CDs was evidenced by Differential Scanning Calorimetry, which runs detected changes in the fusion temperature of the pure LA, as well as loss of the characteristic endothermic peak of dehydration of the cyclodextrin's (β -CD and HP β -CD) cavity following complexation with BVC and RVC. Electron microscopy images revealed that LA:CD complexation leads to disappearance of the typical crystal structures of pure LA and CD, what was not noticed with juxtaposition (or physical mixture) of the compounds. Kinetic studies showed that complexation equilibrium is reached in a few hours, while phase-solubility tests detected an enhance in the water solubility of BVC and RVC in the presence of increasing CD concentrations, also allowing calculation of the association constants between LA: β -CD (8.9 and 7.9 M⁻¹) and LA:HP β -CD (14.7 and 10.0 M⁻¹) for BVC and RVC, respectively. *In vitro* dialysis equilibrium tests disclosed a decrease in the release of BVC and RVC after complexation with HP β -CD or β -CD as well as for liposomal RVC, when compared

to free LA molecules, in a clear demonstration that the interaction with the carriers changed LA permeation through the membranes. Toxicity tests *in vitro*, including fibroblast cells culture and human erythrocyte hemolysis, have registered a decrease in the LA toxicity after complexation with both CDs (BVC and RVC) or encapsulation in liposomes (MVC and RVC).

In vivo tests have shown, using the infraorbital nerve blockade test in rats, that liposomal formulations (MVC_{LUV} and RVC_{LUV}) prolonged the action and enhanced the intensity of the analgesia effect of free LA, as well as of vasoconstrictor associated-LA preparations (for MVC), suggesting that liposomal LA formulations could possibly replace vasoconstrictors use in long-lasting surgical procedures or at the post-operative period, specially for dentistry purposes.

Motor blockade tests revealed that all the samples used: free, CD-complexed or liposome-encapsulated LA changed in a dose-dependent manner the motor function of the animals after caudal (intrathecal) or sciatic (infiltrative) injection, leading to the reversible loss of motor answer in all animals studied. None of the LA formulations tested (with β -CD, HP β -CD or LUV), were able to prolong or to intensify the motor blockade induced by BVC and RVC. However, both BVC_{HP β -CD} and RVC_{HP β -CD} systems significantly reduced the latency for the motor blockade, indicating a fast onset of action, without changing the overall motor blockade, what is highly desirable for a LA.

Evaluation of the sensorial blockade in the sciatic nerve of mice demonstrated that BVC_{HP β -CD} and RVC_{HP β -CD}, as well as RVC_{LUV} formulation increased the intensity and duration of the analgesia effect, when compared to free or β -CD-complexed LA, revealing that those systems can be of great interest at the post-operative period. Intrathecal injection of 0.5% BVC_{HP β -CD} enhanced the animals' noniceptive limiar in relation to BVC _{β -CD} and free BVC, revealing an increase in the analgesia potency and duration of action. This result allowed us to suggest that the enhance in the noniceptive effect (ca 1.5 times) observed with the new LA formulations can be attributed, not only to the increase in total LA concentration available to the nerve fibers, but also to the lower protein-binding of the LA molecules, as well as to their lower clearance; altogether, these mechanisms keep the LA for a longer time in contact with the neuronal membrane.

Morphological analysis of nervous' system cells disclosed neurotoxic signals in part of the animals treated with 0.5% BVC_{HP β -CD} that were not observed if HP β -CD or BVC, alone, were used. The rise in the BVC toxic effect observed after complexation with HP β -CD can be explained by the enhanced availability of the LA molecules in contact with the neuronal membrane, what lead us to suggest that employment of the complex, at lower BVC dosages (0.25% for instance) could reduce the neurotoxic effect without changing the anesthetic potency. Besides, nephro-histological images did not detect any sign of morpho-functional alterations after intrathecal treatment of the animals with HP β -CD, BVC or BVC_{HP β -CD} substantiating the potentiality of the clinical use of that LA formulation.

I. INTRODUÇÃO

1. ANESTESIA E ANALGESIA

O estudo da dor é, possivelmente, uma das maiores e mais importantes áreas da Medicina, onde a dor pode ter como causas desordens orgânicas ou até psicológicas (Carpenter & Dickenson, 2002). Considerando todos esses aspectos, a *Associação Internacional para o Estudo da Dor*, definiu esse fenômeno como uma experiência sensitiva e emocional desagradável onde há percepção de um estímulo nocivo associado a uma lesão tecidual real ou potencial (Lemonica & Pereira, 1992).

Apesar de incômoda, a dor desempenha uma função biológica essencial. É a resposta do organismo a um trauma real ou potencial. Porém, em algumas situações, o sofrimento doloroso perde sua função biológica e começa a representar uma consequência insuportável às desordens refratárias aos tratamentos (Stevens, 1992). Mesmo com os recentes avanços na pesquisa de novos agentes terapêuticos, a capacidade de instituir outros métodos de tratamento com o objetivo de produzir analgesia, isto é, aliviar ou eliminar a dor é um desafio atual.

Existem alguns métodos que induzem analgesia, sendo o tratamento farmacológico o mais utilizado. Substâncias químicas ao serem introduzidas no organismo alteram mecanismos periféricos ou centrais de detecção e elaboração da informação dolorosa, reduzindo a reação emocional à dor ou ainda interferindo no estado de consciência necessário à percepção dolorosa. Os medicamentos responsáveis por esses efeitos são denominados analgésicos-antiinflamatórios (como a aspirina), analgésicos opióides (morfina e derivados), anestésicos gerais e locais (Sudo-Havashi & Bersani-Amado, 2001).

Os analgésicos/antiinflamatórios reduzem a dor por atuarem essencialmente na diminuição da hiperalgesia consequente à liberação de interleucinas, interferons e prostaglandinas. Esses fármacos são bastante úteis no controle da dor de

intensidade baixa ou moderada, associada à inflamação ou lesão tecidual como na artrite, bursite, cefaléias e dismenorréias. Já os analgésicos opióides, são úteis contra dores viscerais intensas - cólicas renais, infarto do miocárdio, câncer - e agem através da ligação a receptores específicos, em neurônios aferentes e eferentes primários (Way *et al.*, 1998; Sudo-Havashi & Bersani-Amado, 2001).

Os anestésicos gerais também têm propriedade analgésica, mas a esta são adicionadas a inconsciência, a amnésia e a perda da motricidade, mantendo-se apenas as funções vitais como circulação sanguínea e respiração. Já os anestésicos locais (AL), objetos desse estudo, evitam ou aliviam a dor por bloquearem reversivelmente o processo de excitação-condução em nervos periféricos, podendo abolir a motricidade e sensações como tato e temperatura, mas sem a perda de consciência inerente aos anestésicos gerais (Collins, 1993; de Jong, 1994; Catteral & Mackie, 1996).

Embora o tratamento da dor esteja baseado na utilização desses fármacos ditos “antigos”, no caso da dor causada por injúria nervosa direta estão sendo também empregados, mais recentemente, antidepressivos e anticonvulsivantes fármacos nunca antes designados como analgésicos (Carpenter & Dickenson, 2002).

2. ANESTÉSICOS LOCAIS

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

Os AL produzem seus efeitos por impedirem o rápido influxo de íons sódio para o interior do axônio. Essa ação interrompe a formação e deflagração do potencial de ação. Acredita-se que a diminuição da permeabilidade da membrana aos íons sódio ocorra por dois mecanismos: alterações gerais na fluidez da membrana (levando a modificações conformacionais na proteína-canal de sódio voltagem-dependente) e/ou pela interação específica dos compostos AL com os canais de sódio (Ragsdale *et al.*, 1994, 1996; Ragsdale & Avoli, 1998; Li *et al.*, 1999). Por outro lado, a correlação direta entre hidrofobicidade e potência anestésica indica que a partição inespecífica de grande quantidade do AL na bicamada lipídica é importante para facilitar o acesso da molécula ao(s) sítio(s) de ligação no canal de sódio voltagem-dependente (de Paula & Schreier, 1996).

O primeiro composto a ser utilizado como AL foi a cocaína, um alcalóide isolado das folhas de *Erithroxylon coca*, que teve sua ação demonstrada por Köller em 1884, ao utilizá-la como anestésico oftálmico. Apesar de ter sido empregada na clínica durante um longo tempo, a cocaína foi sendo substituída por outros compostos devido aos seus efeitos tóxicos como dependência física e psíquica (Ruetsch *et al.*, 2001), possibilitando o surgimento de vários outros compostos sintéticos como: benzocaína, procaína, prilocaína, lidocaína, mepivacaína, bupivacaína, ropivacaína, levobupivacaína entre outros (Strichartz, 1987; de Paula & Schreier 1995;1996; Malamed, 2001).

2.1. BUPIVACAÍNA, MEPIVACAÍNA & ROPIVACAÍNA: TRÊS ANÁLOGOS COM PROPRIEDADES DIFERENTES

Os compostos AL possuem, em geral, três características distintas em sua estrutura: um grupo aromático, uma cadeia intermediária e um grupo amino ionizável. Os AL podem ser classificados de acordo com o tipo de ligação entre o grupo aromático e a cadeia intermediária. Os agentes que possuem uma ligação éster entre o grupo aromático e a cadeia intermediária são denominados amino-ésteres e incluem compostos como a procaína e a tetracaína (Figura 1).

Já os AL com uma ligação amida entre a cadeia intermediária e o grupamento aromático são conhecidos como amino-amidas. Como exemplo dessa família tem-se a lidocaína, mepivacaína, bupivacaína, ropivacaína, prilocaína, etidocaína, dibucaína, etc. É interessante notar que o grupo amina, ionizável em pH próximo ao fisiológico, pode fazer parte de um anel piperidínico, na subfamília dos anestésicos amino-amida cíclicos (Figura 1) (Strichartz, 1987).

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

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

O grupamento amino é a porção ionizável da molécula sendo influenciado pelo pH do meio. Para a maioria dos AL os valores das constantes de dissociação, K_a , estão na faixa de pH entre 7,8 e 8,2 (Covino, 1986). A desprotonação deste grupo amina, em pH acima do pK_a , também aumenta a hidrofobicidade do AL uma vez que a forma neutra (ou não carregada) tem maior coeficiente de partição, P , em membranas biológicas (Wildsmith *et al.*, 1987; Gupta, 1991; de Paula & Schreier, 1996).

Em geral, o grupo aromático é a unidade estrutural responsável pelas propriedades lipofílicas do anestésico pois facilita a partição deste em membranas neurais. Adições de átomos de carbono nos grupamentos aromático e amina ou aumento no comprimento da cadeia intermediária também interferem na natureza lipofílica do composto (Strichartz, 1987; Gupta, 1991; de Jong, 1994).

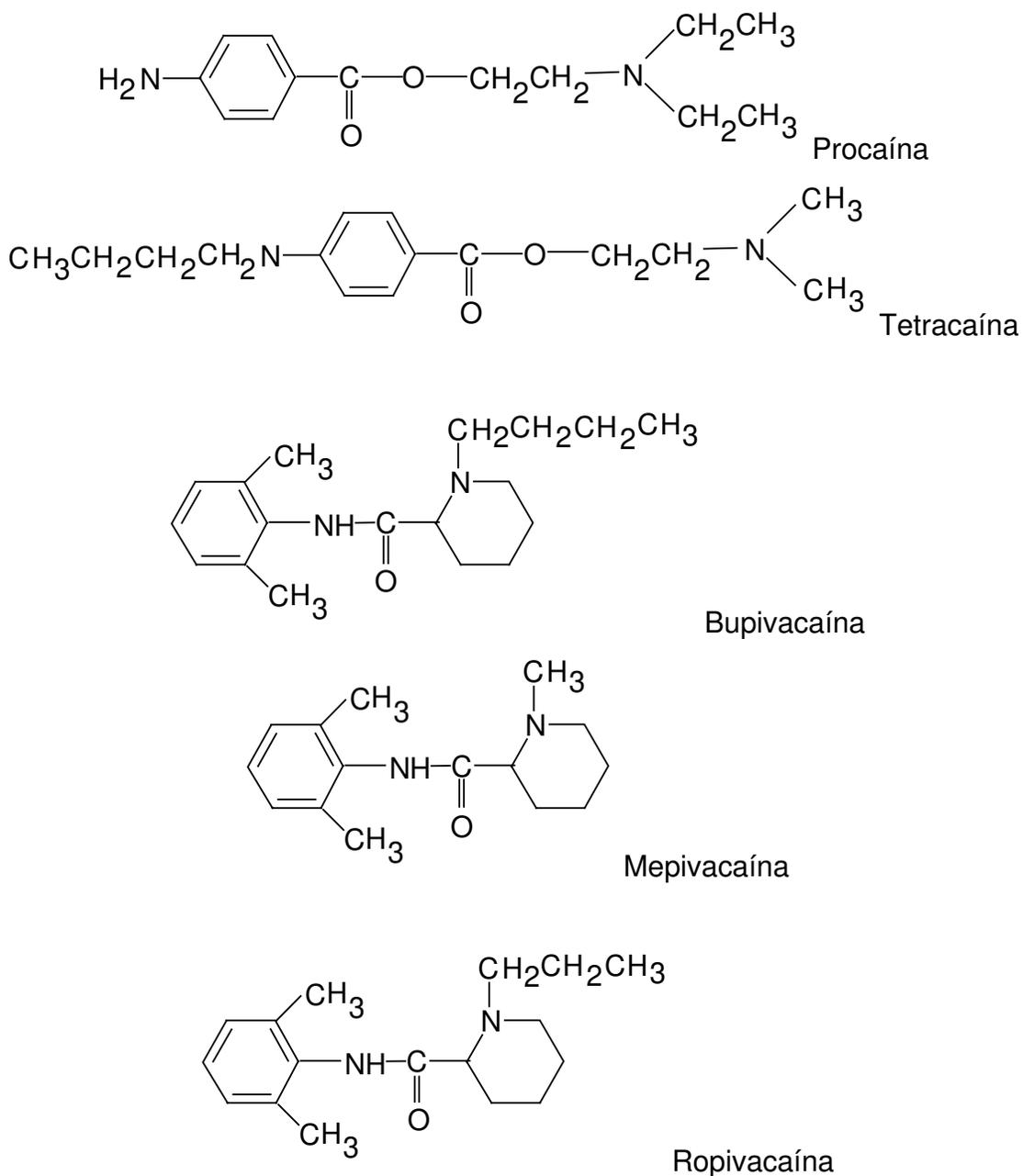


Figura 1- Estrutura química de alguns AL do tipo amino-ésteres (procaína e tetracaína) e amino-amida cíclicos (bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína).

O perfil clínico dos agentes AL é determinado por três características importantes: potência, velocidade de início de ação e duração da atividade anestésica. A propriedade dessa classe de fármacos que é intrínseca à atividade

anestésica e relacionada à potência é a lipossolubilidade. Vários estudos mostram que há uma clara correlação entre o coeficiente de partição do AL e a concentração mínima necessária para o bloqueio da condução nervosa (Covino, 1986; de Jong, 1994). Porém é preciso salientar que a solubilidade em água é essencial para o transporte do fármaco até as fibras nervosas, enquanto a solubilidade lipídica é necessária para a penetração na membrana sendo a existência de um balanço entre essas duas propriedades (caráter anfifílico) um fator essencial para a atividade dos AL (Gupta, 1991; de Paula & Schreier, 1995,1996).

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

A bupivacaína (BVC) é o AL, pertencente à classe das amino-amidas, mais utilizado em procedimentos cirúrgicos, principalmente para bloqueios regionais prolongados. Este agente foi o primeiro AL que combinou propriedades como início de ação moderada, longa duração, bloqueio da condução e separação significativa entre bloqueio sensorial e motor. A BVC é aproximadamente três a quatro vezes mais potente que a mepivacaína (MVC) e sua duração de ação pelo menos duas a três vezes maior (Covino, 1986; Collins, 1993; Malamed, 2001). No entanto, a MVC induz um rápido início de anestesia, mas com duração de ação moderada; sendo útil em procedimentos cirúrgicos de curta duração, especialmente em Odontologia (Malamed, 2001).

Os efeitos adversos (toxicidade para os sistemas nervoso central e cardiovascular) associados ao uso de BVC levaram à pesquisa por um novo anestésico local com perfil de bloqueio semelhante, mas com cardiotoxicidade relativamente menor. Nesse contexto surgiu a ropivacaína (RVC), um AL quimicamente relacionado à BVC e à MVC (Figura 1) cuja síntese estereoseletiva produziu o enantiômero na forma S(-) (diferentemente dos outros anestésicos, que são misturas racêmicas). Apesar de mudanças na estrutura tridimensional indicarem diferenças na atividade, sabe-se que a RVC e a BVC possuem potência e duração de ação equivalentes (McClure, 1996). Além disso, estudos apontam a RVC como uma alternativa ao uso de BVC por induzir menor toxicidade sistêmica e promover um maior grau de dissociação entre o bloqueio motor e sensorial sendo útil na administração epidural, infiltração e alívio da dor pós-operatória (Markham & Faulds, 1996; Cederholm, 1997; Knudsen *et al.*, 1997; Emanuelsson *et al.*, 1997; O’Keeffe & Healy, 1999; Bennett *et al.*, 2000; Whiteside & Wildsmith, 2001).

A eficácia clínica da RVC e BVC tem sido comparada sob as mais diversas formas de anestesia regional, tanto em animais de laboratório quanto em humanos, mostrando que os dois anestésicos possuem início de ação, potência e duração de efeito muito similares (McCrae *et al.*, 1992; Knudsen *et al.*, 1997; Malinovsky *et al.*, 2000; Whiteside & Wildsmith, 2001). Com relação à toxicidade, estudos indicam que a RVC apresenta menor capacidade arritmogênica que a BVC (potencial cardiotoxíco 2:1, RVC:BVC). Comparando-se os efeitos neuro e cardiotoxícos, as convulsões induzidas por RVC tendem a se manifestar mais lentamente que aquelas por BVC e são anteriores às arritmias cardiovasculares; fato este não observado após o tratamento com BVC, onde a toxicidade cardiovascular manifesta-se antes de qualquer sinal de neurotoxicidade (Dony *et al.*, 2000; Ohmura *et al.*, 2001; Heavner, 2002).

Como observado na Tabela 1, as propriedades físico-químicas desses três análogos são relativamente diferentes. A presença do radical butil na estrutura química da BVC confere-lhe um alto coeficiente de partição em lipídios e maior

capacidade de ligação às proteínas plasmáticas quando comparada à MVC e à RVC (de Jong, 1994).

Com relação à farmacocinética, esses AL distribuem-se da corrente sangüínea para os órgãos mais perfundidos como cérebro, coração, rins e fígado, neste último, sofrem ação de enzimas microsossomais do sistema P450 (reações de hidroxilação) sendo o 2-6-pipecolililidida (PPX), o principal produto de biotransformação. Os rins constituem a principal via de eliminação e somente cerca de 1 a 2% desses fármacos são excretadas na forma inalterada (Strichartz, 1987; O'Keefe & Healy, 1999).

Tabela 1- Parâmetros físico-químicos e farmacológicos de AL da série amino-amida cíclicos (adaptado de: de Jong, 1994 e Sociedade de Anestesiologia do Chile <http://www.socanestesia.cl/>).

Anestésico Local	PM**	pKa	Potência	T _{1/2}	Coeficiente de Partição *					Tempo de anestesia (h)
					λa	λb	λc	λd	λe	
Bupivacaína	324,88	8,2	16	3,5	130	10	314	-	0,92	4-6
Mepivacaína	282,80	7,7	2	1,9	21	-	17	1	0,69	1-3
Ropivacaína	310,88	8,1	10	1,9	-	3	-	2	0,73	2-4

*Determinado entre as fases: λa = óleo/H₂O; λb = n heptano/H₂O; λc = álcool oleico/H₂O; λd = octanol/H₂O; λe = células sanguíneas/plasma

** AL na forma de cloridrato

3. ANESTÉSICOS LOCAIS NA TERAPIA DA DOR: COMO AUMENTAR A DURAÇÃO DE AÇÃO E REDUZIR A TOXICIDADE SISTÊMICA?

Os avanços nas pesquisas básica e clínica têm expandido as opções na farmacoterapia da dor. Para pacientes com câncer e dor neuropática, por exemplo, a farmacoterapia é a principal, senão a única saída para mantê-la sob controle. Atualmente, em relação à dor neuropática, têm sido utilizados muitos fármacos como anticonvulsivantes, agonistas GABAérgicos, neurolépticos e AL (Portenoy, 2000).

A combinação de AL e analgésicos opióides (bupivacaína-morfina) também tem sido sugerida para o tratamento da dor em pacientes que não respondem ao tratamento com opióides, pois a liberação intratecal dessa combinação resulta em um ritmo mais lento no aparecimento da tolerância aos opióides. No entanto, pesquisas ainda são necessárias para a determinação de concentrações efetivas e dos limites de toxicidade (Åkerman *et al.*, 1988; Ossipov *et al.*, 1988; Bennett *et al.*, 2000).

Uma outra combinação ainda bastante utilizada, especialmente em Odontologia, é a associação de AL com vasoconstritores. Os vasoconstritores reduzem o fluxo sangüíneo (perfusão) para o local da injeção; retardam a absorção (o que resulta em níveis plasmáticos menores e redução do risco de toxicidade); aumentam a permanência do fármaco na região do nervo bloqueado (aumentando a duração de ação), além de reduzir o sangramento no local da administração, sendo muito úteis quando se prevê hemorragia (Sisk, 1992; Malamed; 2001). Embora causem grandes benefícios, a utilização de vasoconstritores é contra-indicada em algumas situações como: doenças cardiovasculares (angina instável, infarto do miocárdio recente, arritmias refratárias, hipertensão severa), hipertireoidismo e diabetes não controlados, além de pacientes usuários de antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase, fenotiazínicos e β -bloqueadores (Pérusse *et al.*, 1992a,b; Goulet *et al.*, 1992).

A dor também pode ser controlada pelo uso de AL para o bloqueio de nervos periféricos específicos, embora esses fármacos apresentem limitações dada sua duração de ação relativamente curta (2 a 4 horas). Entre os AL, a lidocaína, bupivacaína e, mais recentemente, ropivacaína e levobupivacaína têm sido os compostos de escolha na terapia da dor aguda e crônica. As características desejáveis em um anestésico local são: a longa duração de ação, baixa toxicidade local e/ou sistêmica e grande seletividade para o bloqueio sensorial (maior que para o bloqueio motor) (Covino, 1986; Kuzma *et al.*, 1997).

Com a alteração de algumas propriedades físicas e químicas da molécula do AL, alguns desses objetivos têm sido atingidos, mas uma alternativa que atualmente vem promovendo os efeitos desejáveis é a liberação controlada, pela encapsulação desses fármacos em lipossomas e/ou outros veículos (Kuzma *et al.*, 1997; Grant & Bansinath, 2001; Grant, 2002). Pacientes submetidos à cirurgias (no alívio da dor pós-operatória) e com dor crônica (que necessitam de administrações repetidas de AL, seja para bloqueio de nervos periféricos, centrais ou autonômicos) seriam os principais beneficiados pelo desenvolvimento dessas formulações, denominadas de longa duração ou de liberação controlada, que possibilitariam um aumento na duração da anestesia, diminuindo a frequência de administrações diárias e reduzindo a toxicidade sistêmica (Araujo *et al.*, 2003).

4. FORMULAÇÕES ANESTÉSICAS LOCAIS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

4.1. LIPOSSOMAS

O interesse na aplicação de lipossomas nas mais diversas áreas do conhecimento tem crescido cada vez mais. Em Física e Físico-Química, lipossomas representam um sistema para estudar as interações entre moléculas anfifílicas; para a Biofísica e a Bioquímica, são modelos de membranas no qual podem ser inseridas proteínas para o estudo de sistemas reconstituídos e enfim, para a Farmacologia e a

Tecnologia Farmacêutica, lipossomas são potenciais carreadores de fármacos (Paternostre *et al.*, 1996).

Os lipossomas foram descobertos por Bangham, em 1963, ao demonstrar que fosfolipídios sob agitação em meio aquoso, formavam vesículas. Lipossomas consistem de esferas microscópicas com uma ou mais bicamadas lipídicas onde as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior da bicamada e as cabeças polares para o exterior da mesma, em contato com a fase aquosa (Lichtenberg & Barenholz, 1988; Ranade, 1989).

A natureza da interação entre os lipídios, a composição dos lipossomas e o método de preparação determinam o padrão, tamanho e o número de bicamadas formadas podendo ser classificados, de forma independente, de acordo com o padrão estrutural ou com o método de preparação, como observado na Tabela 2.

Tabela 2- Classificação de lipossomas de acordo com os parâmetros estruturais ou métodos de preparação (adaptado de: Lichtenberg & Barenholz, 1988; Grant, 2002; Santos & Castanho, 2002).

PARÂMETROS ESTRUTURAIS	MÉTODOS DE PREPARAÇÃO
Vesículas Multilamelares (>1 μ m) - MLV	Evaporação de fase reversa
Vesículas Oligolamelares (0,1-1 μ m) - OLV	Extrusão
Vesículas Unilamelares (todos os tamanhos) - UV	Congelamento e Descongelamento
Vesículas Unilamelares Pequenas (20-100nm) - SUV	Fusão ou Sonicação
Vesículas Unilamelares Grandes (>100nm) - LUV	Desidratação-Reidratação, extrusão
Vesículas Unilamelares Gigantes (>1 μ m) - GUV	

A encapsulação de fármacos em vesículas multi (MLV, Figura 2A) ou unilamelares grandes, (LUV, Figura 2B) ou pequenas (SUV), afetam diretamente a absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e perfil de toxicidade dos mesmos (Lichtenberg & Barenholz, 1988; Grant, 2002).

O tamanho do lipossoma influencia, especialmente, em sua biodistribuição, pois após administração subcutânea, lipossomas menores que 120 nm (SUV) atravessam rapidamente os capilares enquanto que lipossomas maiores (como as LUV) tendem a permanecer no sítio de injeção (Grant & Bansinath, 2001).

Já a encapsulação de fármacos é orientada pela hidro ou lipofilicidade dos mesmos; já que fármacos hidrofílicos têm tendência a permanecer no (s) compartimento (s) aquoso (s) e fármacos hidrofóbicos na bicamada lipídica (Figura 2A) (Sharata & Katz, 1996).

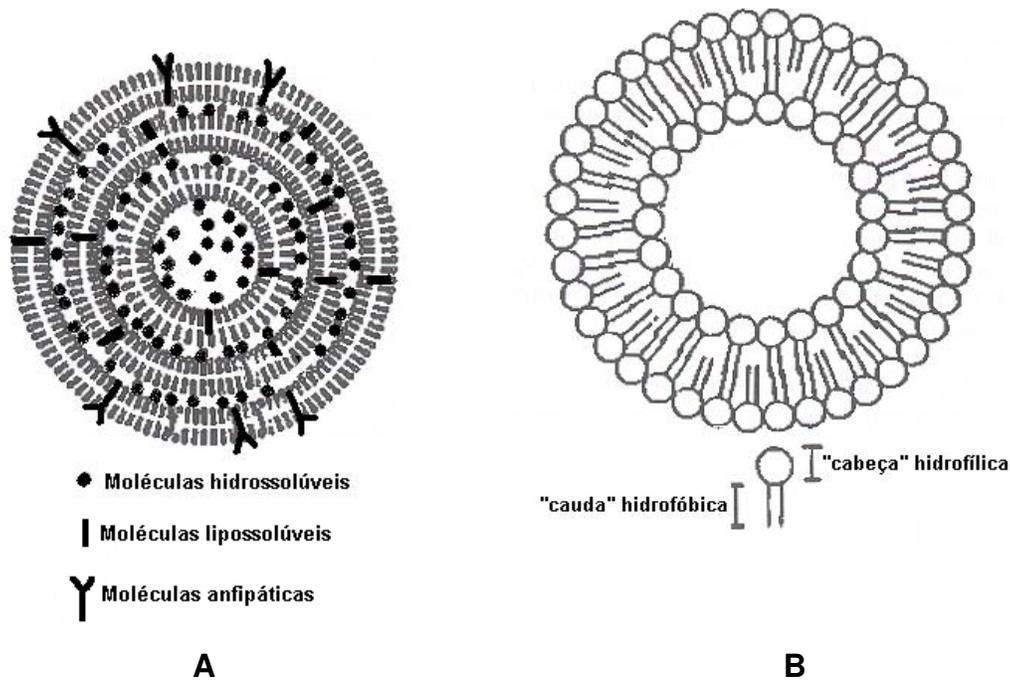


Figura 2- Representação esquemática de lipossomas: multilamelar (A) e unilamelar (B) (Araujo et al., 2003).

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

A função dos lipossomas como veículos é liberar determinadas concentrações de fármacos em alvos teciduais através de mecanismos específicos (Figura 3) evitando a toxicidade sistêmica, já que somente uma fração do fármaco está disponível para o local de ação (Grant & Banssinath, 2001). Lipossomas têm sido extensivamente utilizados em imunoenaios (Rongen *et al.*, 1997; Zanin, 2001), como sistemas de liberação controlada de opióides (Bethune *et al.*, 2001; Nishiyama *et al.*, 2000), antiinflamatórios (Paavola *et al.*, 2000) e também para melhorar as propriedades terapêuticas de AL.

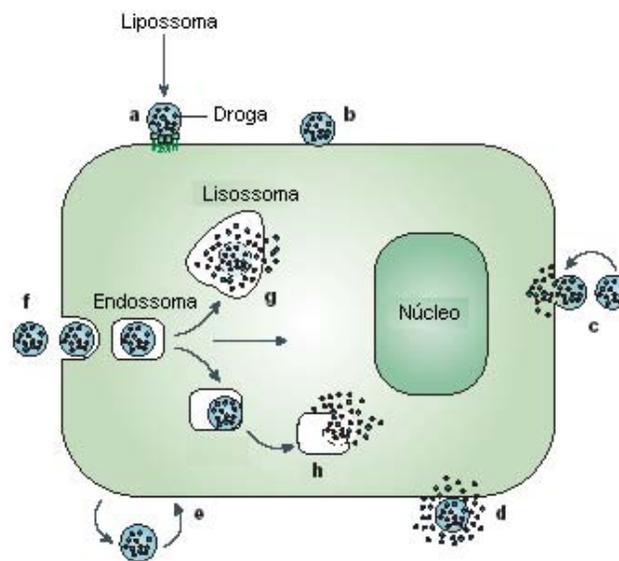


Figura 3- Representação esquemática dos mecanismos de interação celular e liberação de fármacos carregados por lipossomas. **a-** interação não-específica, **b-** adsorção à superfície celular, **c-** fusão com a membrana celular, **d-** pinocitose do fármaco, **e-** endocitose específica, **f-** formação de endossoma, **g-** incorporação em lisossoma, **h-** liberação do fármaco no citoplasma (Adaptado de Torchilin, 2005).

O uso de AL encapsulados em lipossomas tem como vantagens a liberação lenta do fármaco, prolongando a duração da anestesia e reduzindo a toxicidade para os sistemas cardiovascular e nervoso central (Gesztos & Mezei, 1988; Langerman *et al.*, 1992; Boogaerts *et al.*, 1993a,b; Mowat *et al.*, 1996).

Trabalhos realizados com animais de laboratório (Boogaerts *et al.*, 1993a,b; 1995; Yu *et al.*, 1998; 2002; Malinovsky *et al.*, 1997a,b; 1999) e em humanos (Boogaerts *et al.*, 1994; Lafont *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 2001) mostraram o uso de

BVC encapsulada em MLV, obtendo resultados satisfatórios com relação ao aumento na duração da anestesia, potencialização do bloqueio nervoso e controle dos níveis sistêmicos do fármaco.

4.2. CICLODEXTRINAS

A hidrólise enzimática do amido usualmente resulta na formação de glicose, maltose e em diferentes tipos de dextrinas lineares e ramificadas. No entanto, alguns microorganismos e plantas, que produzem enzimas denominadas ciclodextrinas glicosiltransferases, são capazes de degradar o amido em produtos cíclicos chamados ciclodextrinas (CD) (Matioli, 2000; Biber *et al.*, 2002).

As três CD naturais são a alfa (α -CD), a beta (β -CD) e a gama (γ -CD) compostas de seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopirranose, respectivamente. Esses agentes têm em sua estrutura grupos hidroxil primários e secundários orientados para o exterior. Portanto, possuem um exterior hidrofílico, enquanto a cavidade interna é relativamente hidrofóbica o que, por sua vez, permite que as CD se complexem com moléculas que apresentam dimensões compatíveis com esta cavidade interna em diferentes estequiometrias (Figura 4). A complexação altera propriedades físico-químicas como a solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade dos fármacos complexadas (McCormack & Gregoriadis, 1998).

A habilidade das CD de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e de polaridade entre a CD e o fármaco. Além disso, as forças que dirigem a complexação têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água da cavidade das CD, às interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Bibby *et al.*, 2000). As moléculas complexadas permanecem normalmente orientadas em uma posição onde há máximo contato entre sua porção hidrofóbica e a cavidade apolar (Figura 4), estando sua porção hidrofílica em contato com os grupos hidroxil da CD ou expostas ao meio aquoso (Frömmling & Szejtli, 1994).

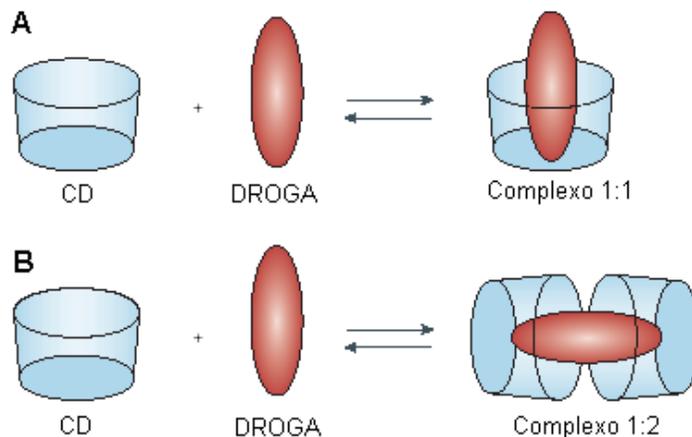


Figura 4 - Formação de complexos de inclusão entre fármacos e ciclodextrina, nas proporções de 1:1 e 1:2 (A) e representação da complexação 1:2 (B) (Adaptado de Davis & Brewster, 2004).

As β -CD são as mais utilizadas para a complexação de fármacos como: agentes antitumorais (doxorubicina, Ishida *et al.*, 2001), antidiabéticos (tolbutamida, Veiga *et al.*, 2000) antiinflamatórios (piroxicam, Dalmora *et al.*, 2001) e opióides (Meert & Mellis., 1992; Jang *et al.*, 1992) que podem ser administrados pelas vias intratecal, epidural, intravenosa, intramuscular, oral, nasal e dérmica (Irie & Uekama, 1997; Loftsson & Masson, 2001). Sua cavidade tem um diâmetro de cerca de 7Å, sendo grande o bastante para acomodar um hexanel aromático (Kalinkova, 1999).

A β -CD tem solubilidade aquosa de 16,6 mM (18,8 g/L) limitando a solubilização de compostos lipofílicos até essa concentração. Dentre as CDs naturais, a β -CD apresenta a menor solubilidade aquosa, atribuída à presença de ligações de hidrogênio formadas entre as hidroxilas que estão voltadas para o interior da cavidade hidrofóbica, o que diminui a interação com a água (Davis & Brewster, 2004). A precipitação dos complexos sólidos contendo β -CD é comumente observada se o limite de solubilidade da β -CD for atingido. Assim, numerosas modificações na estrutura química das β -CD têm sido feitas, originando derivados mais solúveis e menos tóxicos como 2,6-dimetil- β -ciclodextrina (DM β -CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD) e CD sulfatadas como sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE β -CD) (Rajewski & Stella, 1996) (Figura 5).

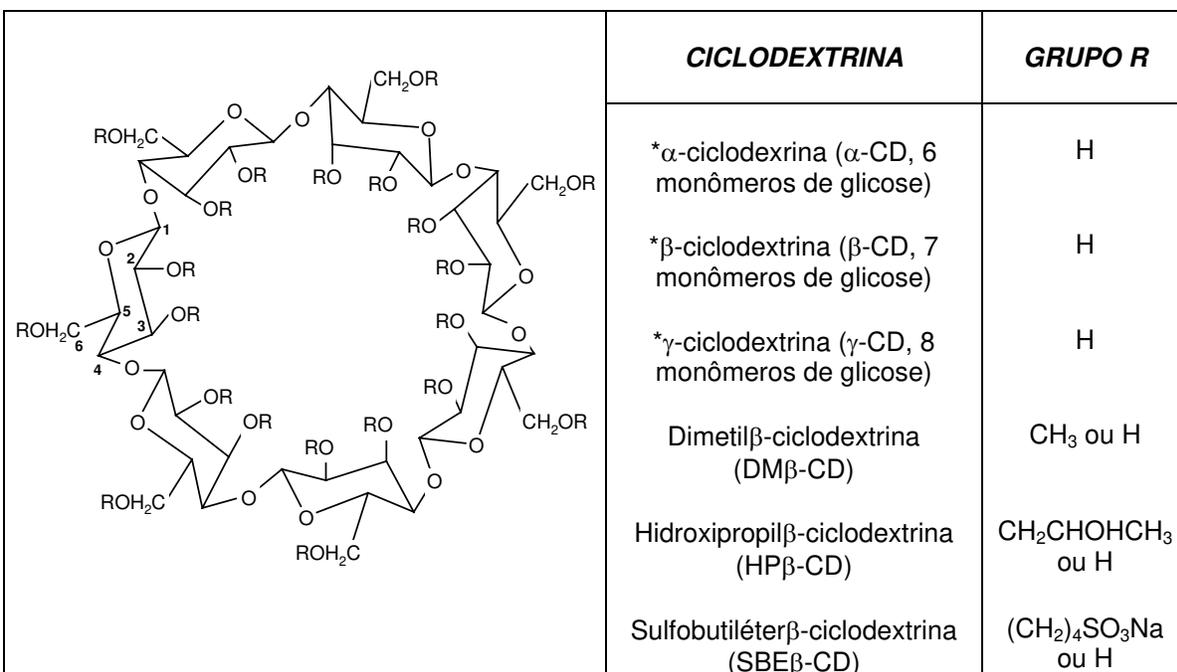


Figura 5- Estrutura geral das ciclodextrinas naturais* e alguns dos derivados da β -CD (adaptado de Rajewsky & Stella, 1996).

Além da estabilização, a modificação da farmacocinética e das propriedades biofarmacêuticas dos fármacos são os efeitos mais significantes da complexação com CDs. Esses efeitos são observados especialmente na solubilidade e na liberação do fármaco complexado. Como conseqüência disso, a administração de fármacos complexados com β -CD altera a intensidade e a duração de seus efeitos (Frömming & Szejtli, 1994). Essa propriedade das CD torna bastante promissor seu uso para a complexação com AL. Além disso, estudos de caracterização indicam que a utilização de β -CD e alguns derivados (DM β -CD, HP β -CD e SBE β -CD) aumentam a solubilidade de AL como etidocaína, lidocaína, prilocaína, mepivacaína e, especialmente, bupivacaína (Dollo *et al.*, 1996a,b); bem como melhoram os índices terapêuticos dos fármacos (Dollo *et al.*, 1998; 2000; Estebe *et al.*, 2002). De fato, a síntese de ciclodextrinas hidroxiladas, metiladas e sulfatadas reduziu alguns problemas quanto ao uso farmacêutico das mesmas, especialmente, com relação à solubilidade aquosa e toxicidade sistêmica. A administração parenteral (i.v.) de HP β -CD não induziu efeitos adversos em humanos, em até 8 anos de observação (Carpenter *et al.*, 1987; 1995).

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos preparar, caracterizar (quanto à encapsulação, complexação, estabilidade e permeabilidade), avaliar *in vitro* (toxicidade celular) e *in vivo* (latência, intensidade, duração de ação e toxicidade local) a atividade farmacológica de formulações anestésicas de liberação controlada, sistemas nanotecnológicos inovadores, comparando-as com os fármacos disponíveis no mercado e atualmente utilizados na clínica.

Os anestésicos locais de escolha foram as amino-amidas cíclicas: Bupivacaína, Mepivacaína e Ropivacaína, bastante utilizados em clínica médica e odontológica. Os sistemas carreadores de fármacos utilizados foram lipossomas unilamelares grandes (extrudados), β -CD e hidroxipropil β -CD.

Para as formulações lipossomais foram realizados testes de estabilidade como determinação da peroxidação lipídica e permeabilidade da bicamada. Já com relação aos complexos AL:CD, a utilização de uma ciclodextrina hidroxilada, a hidroxipropil β -CD (mais solúvel em água e mais apropriada para administração parenteral do que a β -CD), possibilitou a comparação com os complexos formados entre os anestésicos locais e β -CD.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparação de formulações contendo os anestésicos locais bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína, encapsulados em lipossomas e/ou complexados com ciclodextrinas;
- Caracterização das formulações preparadas, através do uso de técnicas físico-químicas para avaliar a eficácia da encapsulação e da complexação;

- Avaliar as formulações lipossomais quanto à estabilidade química e permeabilidade das bicamadas;
- Testar a liberação de fármacos encapsulados ou complexados, utilizando um modelo de difusão *in vitro* e comparando-as com os fármacos livres;
- Realizar ensaios *in vitro* para avaliar o efeito direto dos veículos, dos fármacos livres, complexados ou encapsulados sobre eritrócitos humanos (interação com membranas) e em cultura de células (efeitos na viabilidade celular);
- Realizar ensaios *in vivo*, para avaliar a atividade anestésica das formulações, comparando os bloqueios motor e sensorial induzidos pelos anestésicos locais, bem como o tempo de instalação dos mesmos, através do uso de concentrações clinicamente relevantes em camundongos (via intramuscular) e ratos (via intratecal e bloqueio do nervo infraorbital);
- Avaliar a presença ou ausência de neurotoxicidade e nefrotoxicidade local, através de técnicas histológicas, após tratamento de ratos (por via intratecal) com os veículos, os fármacos livres e as formulações.

III. MATERIAIS & MÉTODOS

1. DROGAS, SAIS E SOLVENTES

- *AL*: cloridrato de bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína (Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda), cloridrato de mepivacaína com levonordefrina (1:20.000, DFL Ind. Com.)
- *Lipídios*: fosfatidilcolina de ovo e colesterol (Sigma Chem. Co.)
- *Ciclodextrinas*: β -CD (Sigma Chem. Co.) e hidroxipropil β -CD (Roquette Serv. Tech. Lab.)
- *Soluções*: tampão HEPES 20mM com NaCl 0,9%, tampão fosfato de Na⁺ 0,1M (pH 7,4)
- *Outros*: acetato de α -tocoferol, rodamina B, tetraetoxipropano, ácido tiobarbitúrico, glicina, butil-hidroxi-tolueno, dodecilsulfato de sódio (Sigma Chem. Co.), ácido acético glacial, clorofórmio, cloreto férrico, dimetilsulfóxido, formaldeído, (Labsynth Ltda.), etanol, xilol, (Ecibra Reag. Anal.), tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália Ind. Quím. Farm.), DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Nutricell), soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina (Cultilab), MTT (Calbiochem), parafina (Histosec-Merck), heparina (Liquemine[®] Roche).

2. EQUIPAMENTOS

- Analgesímetro (Ugo Basile-Itália).
- *Calorímetro Universal (V2.3D TA Instruments), Instituto de Química – USP e Unicamp*
- *Espectrofotômetro (Beckman DU-70)*
- Extrusor (Lipex Biomembranes Inc.)
- Fluorímetro (F-4500, Hitachi)
- Light Scattering (*Malvern Instruments*), *Fac. de Engenharia Química -Unicamp*
- Liofilizador (Labconco-freeze dry system/Freezone[®])

- Microscópio Eletrônico de Varredura (JSM 5800LV, JEOL), Lab. de Microscopia Eletrônica – IB/Unicamp
- Ultracentrífuga (Beckman®)
- Micrótomo, Microscópio óptico e Fotomicroscópio (Zeiss), Departamento de Histologia, IB-Unicamp.

3. ANIMAIS

Durante a realização deste trabalho foram utilizados camundongos albinos *Swiss* e ratos *Wistar* adultos, machos e com peso variando entre 30-35g e 250-350g, respectivamente. Os animais, provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da Unicamp), foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada a $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, alojados coletivamente (5 animais por gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos 7 dias.

Todos os experimentos encontravam-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEA)-IB-Unicamp (protocolos nº 288-1, 289-1, 322-1, 557-2 e 537-1).

4. ERITRÓCITOS HUMANOS

Para realização dos ensaios hemolíticos foi utilizado sangue humano, obtido de bolsas provenientes do Hemocentro da Unicamp (Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, nº 396 e 398/2003).

5. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

5.1. LIPOSSOMAS

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

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

As LUV foram obtidas por extrusão das MLV, sob pressão de N₂, à temperatura ambiente (acima da temperatura de transição de fases dos lipídios usados); passando-se a amostra de MLV por um disco de drenagem e duas membranas de policarbonato (Poretics) com poros de tamanho controlado (neste caso, 0,4 μ m). Foram realizadas 15 passagens da amostra para que o tamanho das vesículas obtidas fosse homogêneo. Os lipossomas obtidos eram deixados em repouso por pelo menos 2h para o intumescimento (*swelling*) das vesículas. A concentração de lipídio estabelecida para todas as formulações foi de 5mM. A incorporação do AL nas vesículas foi realizada após a preparação das mesmas e sem posterior separação, tal que a concentração total dos AL fosse a mesma encontrada nas preparações comerciais.

5.2. CICLODEXTRINAS

Os complexos sólidos foram obtidos misturando-se quantidades apropriadas de β -CD ou HP β -CD e AL em água, tal que a razão molar fosse 1:1. As amostras foram deixadas sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Após isso, a

solução foi liofilizada e guardada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior uso (Dollo *et al.*, 1998; Loftsson e Masson, 2001).

Os complexos foram preparados em quantidades suficientes para obter as concentrações de fármacos desejadas e, posteriormente, foram dissolvidos em tampão (HEPES 20mM pH 7,4 com NaCl 150mM).

6. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

6.1. LIPOSSOMAS

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

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

Foram realizadas medidas contínuas do raio hidrodinâmico das vesículas na presença e ausência de AL com o objetivo de verificar o tamanho médio e a homogeneidade das suspensões antes e após a encapsulação. As medidas foram realizadas à 25°C com um ângulo de detecção de 90° e a concentração das preparações utilizadas foi de 1mM de lipossomas.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos (Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana) da Faculdade de Engenharia Química-Unicamp.

6.1.2. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

A percentagem de AL encapsulado foi determinada em suspensões lipossomais (MLV), na concentração de 4 mM, onde foram adicionadas soluções para que fosse obtida uma concentração final de 2 mM de AL. Todas as amostras foram preparadas em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 150 mM e deixadas em repouso por pelo menos duas horas, para que houvesse a restauração do equilíbrio. Posteriormente, as suspensões foram submetidas à ultracentrifugação (120.000 x g) por duas horas à temperatura de 10°C, obtendo-se o pellet lipossomal e o sobrenadante.

Após separação, alíquotas do sobrenadante foram analisadas por espectrofotometria UV em 260nm, onde o coeficiente de extinção molar dos anestésicos é cerca de 500 M⁻¹ cm⁻¹ (de Paula & Schreier, 1995).

A percentagem de AL encapsulado em MLV foi calculada a partir da medida da % do AL não encapsulado no sobrenadante. A absorbância do sobrenadante-teste (MLV:AL), subtraída daquela do sobrenadante de uma amostra-controle contendo somente lipossomas (MLV) foi dividida pela absorbância da solução inicial do anestésico (AL), como mostrado na equação 1.

$$\% \text{ Não Encapsulada} = \frac{\text{Absorbância (MLV:AL)} - \text{Absorbância (MLV)}}{\text{Absorbância (AL)}} \times 100 \quad (1)$$

Os valores de porcentagem de encapsulação podem também ser expressos em termos de coeficiente de partição (P) do anestésico entre duas fases imiscíveis, pela razão das concentrações desse entre a fase membranar (m) e a aquosa (a):

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

onde n é o número de moles do AL e V é o volume das fases e $n_m + n_a = n_t$ (número de moles total do AL).

As transformações para os dados de P consideram a concentração de membrana no sistema (4 mM ou 2,3 mg/mL) e tomando-se o valor da densidade lipídica igual a 1 (de Paula & Schreier, 1996).

6.1.3. ESTABILIDADE E PERMEABILIDADE DE LIPOSSOMAS: LIBERAÇÃO DE RODAMINA

A espectroscopia de fluorescência é um poderoso método para examinar a estrutura e função de membranas biológicas. Diversos marcadores têm sido utilizados para estudos em lipossomas devido sua estabilidade, baixo custo e por apresentarem boa sensibilidade. Por isso, representam um bom método, juntamente com a microscopia de fluorescência, para medir a dinâmica da interação de lipossomas com células. Dentre os marcadores hidrofílicos mais utilizados encontram-se a carboxifluoresceína, a calceína e a rodamina, havendo diversos trabalhos que descrevem as vantagens dessas substâncias para o estudo das propriedades de membranas biológicas (Ralston *et al.*, 1981; Kirjavainen *et al.*, 1996; Kachel *et al.*, 1998; Takeushi *et al.*, 1998; Zignani *et al.*, 2000; Pramanik *et al.*, 2000).

Os altos rendimento de fluorescência e coeficiente de extinção molar fazem da rodamina, RDM, (Figura 6) um dos fluoróforos mais úteis para os estudos de

permeabilidade e de incorporação de fármacos em vesículas lipídicas (Pramanik et al., 2000). A avaliação da permeabilidade de lipossomas é feita pela encapsulação de um fluoróforo hidrofílico, em altas concentrações e mensuração da intensidade de fluorescência dessas suspensões lipossomais, antes e após rompimento das vesículas com Triton X-100, um detergente não iônico clássico. Com a lise desaparece a supressão no interior aquoso da vesícula lipossomal e mede-se o aumento na intensidade de fluorescência da RDM (Wittung *et al.*, 1995).

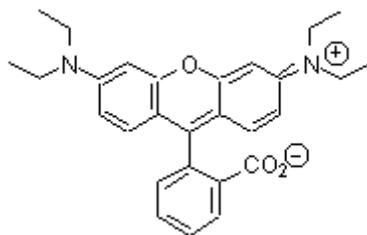


Figura 6 - Estrutura química da rodamina B.

O coeficiente de extinção molar da RDM foi previamente determinado em pH 7,4 (tampão HEPES 20 mM em NaCl 150 mM), utilizando concentrações de 1 a 5 μM que foram analisadas por espectrofotometria VIS (554 nm). Nos estudos de fluorescência, caracterizaram-se os espectros obtidos para as concentrações de 1 a 3 μM ($\lambda_{\text{excitação}} = 554 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 574 \text{ nm}$).

As medidas de porcentagem de encapsulação do fluoróforo também foram realizadas utilizando-se 2 mM de RDM adicionada em uma concentração final de 4 mM de MLV. Utilizou-se os mesmos parâmetros para encapsulação de AL, ou seja, as suspensões foram submetidas à ultracentrifugação (120.000 x g) por duas horas à temperatura de 10°C, obtendo-se o pellet lipossomal (RDM encapsulada) e o sobrenadante (RDM livre). A determinação da porcentagem de encapsulação foi realizada de acordo com a equação 1 (ver item 6.1.2).

Posteriormente, adicionou-se ao pellet lipossomal 1 mL de tampão e retirou-se alíquotas de 20 μL que foram diluídas para um volume final de 2 mL. Avaliou-se a

intensidade de fluorescência em intervalos de tempo (0 a 60 min.) para verificar a liberação de RDM. Após 60 min. adicionou-se Triton X-100 (2% ou 32mM) em quantidades acima da concentração micelar crítica do detergente ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M; Preté et al., 2002) para romper as vesículas, obtendo-se um controle indicativo da liberação total do conteúdo encapsulado. Além disso, avaliou-se também a liberação de RDM de lipossomas na presença e ausência de Triton X-100 variando-se a temperatura das amostras (4, 25 e 37 °C, com 10 min. de incubação).

Todas essas medidas (cinética de liberação, suscetibilidade ao detergente e variação de temperatura) foram realizadas em amostras contendo AL e RDM encapsulados, apenas RDM encapsulada e, finalmente, AL em solução aquosa. A concentração utilizada para o AL e RDM foi de 2mM. Esses experimentos foram necessários para verificar se o AL poderia interferir na permeabilidade das vesículas, variando-se o tempo ou a temperatura de armazenamento.

6.1.4. CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS QUANTO À ESTABILIDADE QUÍMICA DE SEUS COMPONENTES ESTRUTURAIS: ESTIMATIVA DA OXIDAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS

Apesar de ser uma conseqüência do metabolismo celular normal, a produção de radicais livres influencia em vários processos biológicos desde o envolvimento em patologias até a interação com lipídios séricos e tissulares, provocando sua peroxidação. As membranas celulares são, em geral, constituídas por misturas de lipídios contendo ácidos graxos com uma ou múltiplas insaturações onde, na ausência de agentes antioxidantes, ocorre peroxidação por mecanismos que envolvem a formação de radicais livres. A etapa inicial da oxidação, retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia acila, pode ser o resultado de exposições à radiação eletromagnética ou à contaminação por metais de transição. Portanto, por apresentarem constituição semelhante às membranas celulares, os lipossomas também são suscetíveis aos efeitos da peroxidação lipídica (Estepa *et al.*, 2001; New, 1990).

Devido à natureza instável dos produtos da peroxidação lipídica, a avaliação dos níveis desse dano é realizada através da determinação de metabólitos dos lipoperóxidos, sendo necessário considerar alguns fatores no processo de oxidação como: conjugação de duplas ligações; formação de peróxidos e produção de aldeídos de alta capacidade reativa, especialmente o malondialdeído (MDA) (New, 1990).

Entre a variedade de métodos analíticos desenvolvidos para determinar o dano oxidativo dos lipídios (quantificação de hidroperóxidos, dienos conjugados e endoperóxidos ou peróxidos cíclicos) o mais comumente utilizado baseia-se na reação, em altas temperaturas, do MDA com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formando um cromóforo vermelho que pode ser detectado por espectrofotometria de absorção VIS (532 nm) ou por fluorescência, sendo o método específico para determinação de endoperóxidos (Ohkawa *et al.*, 1979).

A estabilidade química e física dos lipossomas é um importante fator a ser considerado para sua utilização eficaz como veículos de formulações farmacêuticas. Quaisquer alterações na natureza de seus componentes refletem mudanças de propriedades como a permeabilidade da bicamada e interações entre vesículas (agregação e/ou fusão, ver Figura 7). Algumas medidas preventivas devem ser utilizadas para evitar a peroxidação lipídica dos lipossomas como: estocagem ao abrigo da luz (proteção contra fotoperoxidação) e em baixas temperaturas (preferencialmente a 4 °C), redução dos níveis de oxigenação na amostra (utilização de vácuo ou substituição do ar por nitrogênio), além de evitar a exposição à irradiação (Lichtenberg & Barenholz, 1988).

Para a realização do teste, inicialmente determinou-se uma curva de calibração com o padrão tetraetoxipropano (TEP, 0,2 mM) em concentrações que variaram de 0,5 a 6 nM. Posteriormente, retirou-se alíquotas das amostras a serem analisadas (LUV ou MLV) e adicionou-se os seguintes reagentes:

- cloreto férrico (0,3%, reagente catalizador)

- solução etanólica de butil-hidroxi-tolueno (BHT 0,2%, reativo antioxidante)
- tampão glicina (0,2 M, pH 3,6)
- ácido tiobarbiúrico (TBA 0,5%, reativo cromogênico) em solução de dodecilsulfato de sódio (SDS 0,3%)

As amostras foram colocadas em banho fervente por 15 min. e posteriormente esfriadas em banho gelado, após adição de ácido acético glacial e clorofórmio (1:2 v/v) foram centrifugadas (500xg, 20min., 4°C) até separação das duas fases. A absorbância do sobrenadante foi medida (532 nm) e comparada com a curva padrão de TEP.

A análise de endoperóxidos, expressos em concentração de MDA (nM), foi realizada para avaliar a estabilidade dos lipossomas preparados em nosso laboratório sob diversas condições como tempo e temperatura de armazenamento, encapsulação de diferentes anestésicos locais e sensibilidade à radiação ionizante (para possível uso como método de esterilização).

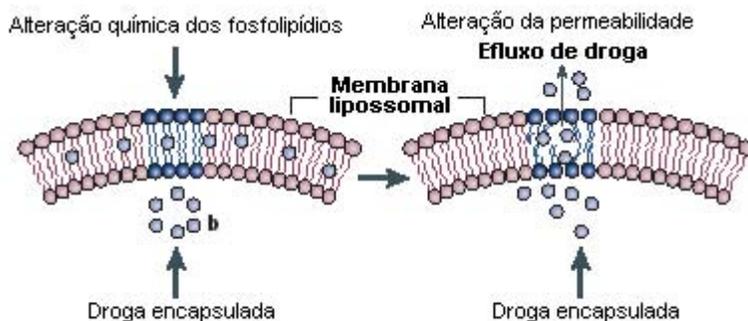


Figura 7- Representação esquemática das alterações químicas em fosfolípidios com conseqüente variação na permeabilidade dos lipossomas (Adaptado de Torchilin, 2005).

6.2. CICLODEXTRINAS

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

As medidas calorimétricas são bastante utilizadas na indústria com a finalidade de caracterizar princípios ativos e excipientes de formulações farmacêuticas, moléculas orgânicas, inorgânicas, monômeros, polímeros, proteínas e alimentos (Thompson, 2000). Entre as muitas técnicas calorimétricas, a DSC é bastante aplicável ao estudo de sistemas de liberação controlada como complexos fármaco/CD (Dollo *et al.*, 1996 a,b; Loftsson & Másson, 2001), possibilitando uma análise qualitativa da complexação pela variação da temperatura relacionada à transição dos compostos, que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos. Algumas das vantagens desse método são: a facilidade de preparação da amostra, a rápida análise e a grande aplicabilidade (Verdonck *et al.*, 1999).

Os resultados de DSC são apresentados como termogramas que indicam a diferença de calor absorvido por um material de referência, em comparação com a amostra em questão. Foram analisadas amostras (10 mg) de AL puros, misturas físicas (AL+CD) e complexos AL:CD (na razão molar de 1:1). A velocidade de aquecimento das amostras foi de 10°C / min. em uma faixa de 0 a 450°C.

6.2.2. CINÉTICA DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS: MODIFICAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS AL

Após inclusão na cavidade das CD, a molécula complexada sofre mudanças em suas propriedades físico-químicas, fornecendo meios para detectar o fenômeno da complexação. Em solução, há um equilíbrio entre as moléculas complexadas e as não complexadas; se ocorrer complexação há uma alteração no espectro de absorção UV/VIS (deslocamentos ou aumento/diminuição no pico de absorção máxima) similares aos efeitos causados por solventes com diferentes polaridades.

Isso sugere que a molécula "convidada" está sendo transferida de um meio polar para a cavidade apolar das CDs (Bekers et al., 1991).

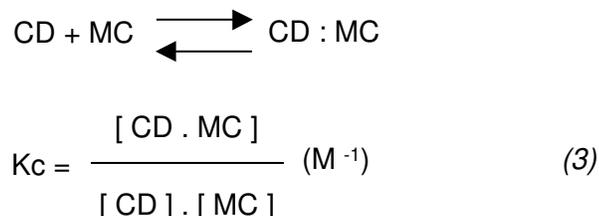
Essas mudanças podem ser devido às perturbações eletrônicas na molécula complexada causadas pela interação direta com as CD, pela exclusão de moléculas de água da cavidade ou por uma combinação desses dois efeitos. Embora seja difícil a detecção dessas alterações espectrais (quando observadas no UV as variações podem ser pequenas), este método ainda é bastante utilizado (Bekers et al., 1991; Frömmling & Szejtli, 1994).

Para a avaliação da cinética de formação dos complexos, misturou-se quantidades apropriadas de CD e AL (razão molar 1:1) em solução aquosa sob agitação. Posteriormente, alíquotas foram retiradas e analisadas por espectrofotometria UV (260 nm, absorção máxima dos AL em estudo) durante 24 horas (intervalos de 10 min. na primeira hora, 30 min. para segunda e terceira horas, 60 min. até 8 horas de experimentação e, finalmente, a cada 12 h).

6.2.3. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS AL: ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE

Sabe-se que a formação de complexos de inclusão com CDs pode exercer alguns efeitos sobre a molécula complexada como melhorar a solubilidade, acelerar ou retardar a absorção e estabilizar o fármaco em solução. Porém, todos esses efeitos são dependentes da estabilidade e da solubilidade do complexo formado (Davis & Brewster, 2004). Essas duas propriedades são independentes, pois um complexo muito estável pode ser muito solúvel e, portanto, difícil de ser obtido em sua forma cristalina. Por outro lado, um complexo de baixa solubilidade pode ter também uma baixa estabilidade e ser facilmente isolado. Existe uma correlação direta entre a estabilidade do complexo e o melhoramento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água. O estado de equilíbrio de um sistema formado pela CD e a molécula "convidada" (MC) com estequiometria de 1:1 pode ser descrito

pela constante de associação, estabilidade ou formação do complexo (K_c) (equação 3) (Frömning & Szejtli, 1994; Másson et al., 1999).



A constante de estabilidade do complexo é dependente da temperatura (o valor de K_c tende a diminuir rapidamente com o aumento da temperatura devido à dissociação do complexo) e do pH do meio (especialmente quando a molécula complexada é ionizável, podendo alterar a afinidade da molécula complexada pela cavidade das CD) (Bekers et al., 1991).

Dentre os métodos utilizados para determinação do valor de K_c estão as isotermas de solubilidade, onde a molécula “convidada”, ao encontrar-se em um sistema composto por CD e água, pode mudar sua solubilidade. Esta mudança pode ser representada por um aumento até certo limite ou, até mesmo, uma diminuição da solubilidade inicial, como mostra a figura 8 (Másson et al., 1999).

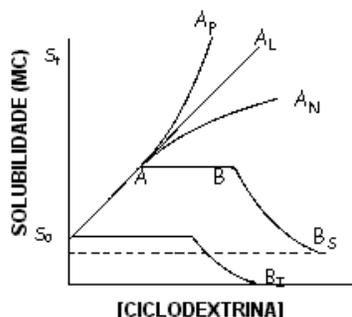


Figura 8- Tipos de isotermas de solubilidade. Onde: S_0 = solubilidade da molécula “convidada”, S_t = concentração da molécula “convidada” dissolvida (livre e complexada), S_c = limite de solubilidade do complexo pouco solúvel em água. A_p , A_L e A_N = complexos muito solúveis (solubilidade limite determinada pela solubilidade da CD), B_s = complexo de solubilidade limitada, B_t = complexo insolúvel (adaptado de Frömning & Szejtli, 1994).

Os experimentos de solubilidade foram determinados adicionando-se quantidades em excesso de AL (30 mM) em sistemas contendo β -CD (4, 8, 12, 16 e 20 mM) ou HP β -CD (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 80 mM) em solução aquosa (HEPES 20 mM em NaCl 150 mM, pH 7,4). As suspensões formadas foram submetidas a agitação à temperatura ambiente por 24 h, filtradas e a concentração de fármacos analisadas por espectroscopia UV (260 nm). Todos os experimentos foram executados em triplicata, para cada complexo testado.

A K_c foi então calculada a partir da solubilidade inicial das drogas (S_0) e da inclinação da reta, em gráficos como o da figura 11, de acordo com a equação 4 e considerando-se uma estequiometria de 1:1 (Higuchi & Connors, 1965).

$$K_c = \frac{\text{inclinação}}{S_0 (1-\text{inclinação})} \quad (4)$$

6.2.4. MORFOLOGIA DA COMPLEXAÇÃO: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica foi utilizada para analisar diretamente a estrutura e a distribuição dos cristais formados pelas amostras de AL puros, misturas físicas (AL/CD) e complexos de inclusão AL:CD (1:1). Esta técnica nos permitiu avaliar variações estruturais nos cristais das moléculas de AL e CD (moléculas guest e host) que acompanham a formação do complexo. O processo de preparação das amostras consistiu da metalização com ouro das mesmas, sob vácuo, durante 180 s.

Para eliminar possíveis artefatos de técnica, relacionados ao processo de preparação dos complexos, todas as amostras foram submetidas à liofilização antes das avaliações por MEV.

7. TESTES *IN VITRO*: LIBERAÇÃO DE DROGAS

Um sistema de dois compartimentos foi utilizado para observar a liberação das drogas livres e complexadas. Nesse sistema, uma membrana de celulose (Spectrapore, com poros para exclusão molecular de 12 a 14.000 e 1000 Da.) separou a amostra (1 mL no compartimento doador) do compartimento receptor, contendo tampão HEPES 20 mM em NaCl 150 mM (pH 7,4, 37 °C) sob agitação leve (Paavola *et al.*, 1995) (Figura 9). Amostras foram retiradas do compartimento receptor (em intervalos de 15, 30 e 60 min., durante 5 h) e analisadas por espectrofotometria UV (260 nm). As medidas de absorvância foram convertidas em % de droga liberada utilizando como padrão uma solução da droga livre em tampão HEPES pH 7,4.

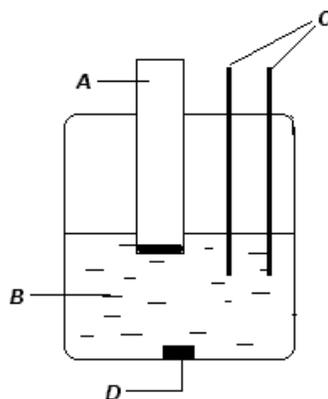


Figura 9- Representação do sistema para liberação de drogas. A= Compartimento doador (amostra+membrana), B= compartimento receptor (solução tampão), C= local de retirada das alíquotas, D= barra magnética para agitação.

8. TESTES DE ESTERILIZAÇÃO

Todas as amostras foram preparadas em câmara de fluxo laminar (com material e soluções autoclavadas a 1 atm e 121°C por 20 min.) e esterilizadas por filtração - filtros de 0,22 µm e 0,45 µm, para AL livres ou complexados e encapsulados em lipossomas, respectivamente ou expostas à radiação gama (Farmacopéia Brasileira, 1988; Farmacopea Internacional, 1996). Após isso, as

amostras foram semeadas em meios de cultura específicos como: TSB (*Tryptone Soya Broth*) mantido estático ou sob agitação (150 rpm) em estufa a 37°C e BHI (*Brain Heart Infusion*) a 37°C para detectar a presença e/ou crescimento de microorganismos.

As amostras foram observadas durante 1 semana e comparadas com um controle negativo (TSB e BHI sem amostras). Os resultados foram analisados por comparações com o meio de cultura (controle), sendo que o meio límpido representou um resultado negativo (ausência de microorganismos) e o meio turvo um resultado positivo (crescimento de microorganismos). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Antígenos Bacterianos (Prof. Dr. Tomomasa Yano) no Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB-Unicamp.

9. TESTES FARMACOLÓGICOS

ENSAIOS IN VITRO: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

ENSAIOS EM CULTURA DE CÉLULAS: VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada através do teste de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) (Figura 10). O princípio do teste consiste na captação do MTT pelas células e redução a formazan (composto púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais; resultando em acúmulo desse composto em células viáveis. A solubilização das células possibilita a liberação do formazan, que pode ser facilmente detectado por espectrofotometria VIS (570 nm) (Denizot & Lang, 1986; Welder, 1992).

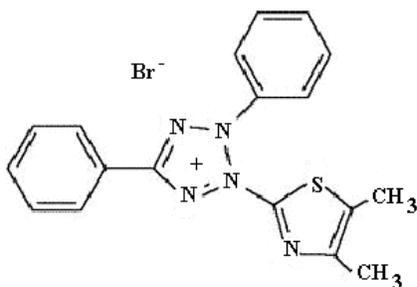


Figura 10 – Estrutura química do MTT.

9.1. CULTIVO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS

Os ensaios foram realizados em células da linhagem 3T3 (fibroblastos de camundongos Balb/c) mantidas em cultura contínua (meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, pH 7,2-7,4, 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂) através de repiques periódicos. O plaqueamento foi realizado inoculando-se 2 x 10⁴ células viáveis em placas de 48 cavidades, incubadas por 48 horas, até atingirem a semiconfluência.

As células foram incubadas por 2 horas com:

- veículos: LUV (5mM), β-CD ou HPβ-CD (4, 8 e 16 mM)
- AL: BVC ou RVC (4, 8 e 16 mM), MVC (17, 35 e 70 mM)
- formulações lipossomais: MVC_{LUV} (17, 35 e 70 mM) e RVC_{LUV} (4, 8 e 16 mM)
- formulações complexadas: BVC_{β-CD}, BVC_{HPβ-CD}, RVC_{β-CD}, RVC_{HPβ-CD} (4, 8 e 16 mM)

Em seguida, o meio de cultura foi substituído e as células incubadas com MTT (1mg/mL) por 1 hora. Ao final desse período, o meio contendo MTT não reduzido foi removido cuidadosamente e a cada placa foi adicionado 0,1 mL de HCl:isopropanol (1:24 v/v), a fim de dissolver os cristais de formazan produzidos pela redução do corante. As placas foram agitadas vigorosamente por cerca de 20 min. para garantir a solubilização do formazan. A absorbância da solução em cada cavidade foi medida por espectrofotometria VIS (570 nm).

Todos os experimentos foram executados no Lab. de Cultura de Células, Depto. de Bioquímica, IB-Unicamp.

ENSAIOS EM ERITRÓCITOS HUMANOS: INTERAÇÃO COM MEMBRANAS

O processo hemolítico pode ser observado quando proteínas ou outros componentes intracelulares passam pela membrana celular podendo ser monitorados (por espectrofotometria, condutividade, etc) no meio extracelular. Vários fatores contribuem para a ocorrência de hemólise como: temperatura, pH, concentração de eritrócitos, concentração de drogas ou natureza dos íons presentes no meio (Gloxhuber, 1980). De acordo com Helenius et al (1975) o processo lítico de eritrócitos pode ser dividido em 5 estágios: (i) adsorção de monômeros de drogas na membrana; (ii) penetração desses monômeros na bicamada; (iii) indução de alteração na organização molecular, alterando a permeabilidade da membrana; (iv) mudanças no equilíbrio osmótico; (v) liberação do conteúdo intracelular, facilitando a utilização de eritrócitos como modelos de estudo da interação de fármacos com membranas biológicas (Malheiros *et al.*, 2000, 2004), o que torna o teste hemolítico um importante método na avaliação da toxicidade (Okamoto *et al.*, 1999).

9.2. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ERITRÓCITOS E DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE HEMÓLISE

O sangue foi centrifugado (10 minutos a 500xg) sendo o plasma, células brancas e gorduras removidos por aspiração. Posteriormente, as hemáceas foram ressuspensas em tampão PBS 5 mM (NaH₂PO₄ 1mM, Na₂HPO₄ 4mM e NaCl 154 mM, pH 7,4) e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Este procedimento foi repetido por 3 vezes mantendo-se o concentrado de hemáceas sob refrigeração (4°C). Todos os testes hemolíticos foram realizados através da ressuspensão do concentrado de hemáceas para um hematócrito de 0,15%.

As alíquotas contendo suspensões de hemácias humanas foram incubadas com concentrações crescentes de:

- veículos: β -CD (0,25 μ M a 15 mM), HP β -CD (0,25 μ M a 30 mM)

- AL: BVC ou RVC (0,25 μ M a 10 mM),
- complexos: BVC $_{\beta}$ -CD, RVC $_{\beta}$ -CD, RVC $_{HP\beta}$ -CD (0,25 μ M a 20 mM)

Os veículos, AL e complexos foram dissolvidos em Tampão HEPES (20 mM, pH 7,4) contendo NaCl (154 mM) e DMSO (5%). A utilização de DMSO (em uma concentração não lítica) foi necessária para facilitar a solubilização das drogas.

As amostras e controles (tampão e água) foram incubados durante 15 minutos (37 °C) antes de serem submetidas à centrifugação (4 min., 500xg) e o sobrenadante utilizado para determinação espectrofotométrica da hemoglobina (pico de absorção em 412 nm). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas sendo:

- Controle 1 (C₁) → eritrócitos em PBS (controle de hemólise mecânica)
- Controle 2 (C₂) → eritrócitos em H₂O destilada (controle da hemólise total)

Os resultados foram expressos em % de hemólise, de acordo com a equação 5:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{Aa - AC_1}{AC_2 - AC_1} \times 100 \quad (5)$$

onde Aa = absorbância da amostra, AC₁ = absorbância do C₁ e AC₂ = absorbância do C₂.

ENSAIOS IN VIVO: AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO NERVOSO

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

- Grupos controle

- veículos: LUV, β -CD e HP β -CD

- Formulações livres

- BVC
- RVC
- MVC e MVC associada a vasoconstritor (MVC_{VASO})

- Formulações de liberação controlada:

- Lipossomais* : RVC lipossomal (RVC_{LUV}) e MVC lipossomal (MVC_{LUV})
- complexadas com β -CD* (1:1): BVC complexada (BVC _{β -CD}) e RVC complexada (RVC _{β -CD})
- complexadas com HP β -CD* (1:1): BVC complexada (BVC_{HP β -CD}) e RVC complexada (RVC_{HP β -CD}).

As concentrações das formulações livres, lipossomais e complexadas (durante a avaliação dos bloqueios motor e sensorial) foram:

- 0,5, 1 e 2% para MVC (bloqueio do nervo infraorbital)
- 0,125 , 0,25 e 0,5% para RVC e BVC (bloqueio do nervo ciático e bloqueio do nervo infraorbital, via infiltrativa)
- 0,5% para BVC (bloqueio caudal, via intratecal)

* As formulações BVC_{LUV}, MVC _{β -CD} e MVC_{HP β -CD} não foram avaliadas devido à baixa biodisponibilidade detectada anteriormente (Araujo, 2002; Araujo et al., 2004).

BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL EM RATOS

O nervo trigêmeo, composto por uma raiz motora (pequena) e uma raiz sensitiva (tripartida), é responsável pela inervação dos dentes, ossos e a maior parte da cavidade oral. O nervo infraorbital pertence à divisão maxilar da raiz sensitiva do nervo trigêmeo e inerva a pele da face, nariz, pálpebra inferior e lábio superior; sendo, portanto, de grande interesse em Odontologia (Malamed, 2001).

A avaliação do bloqueio do nervo infraorbital foi realizada de acordo com método descrito por Ready & Fink (1980), observando-se a resposta aversiva (movimentação brusca da cabeça, membros superiores e/ou inferiores) do animal ao pinçamento do lábio superior.

BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO EM CAMUNDONGOS

A técnica do bloqueio do nervo ciático em camundongos foi realizada de acordo com o método descrito por Leszczynska & Kau (1992). Inicialmente, mediu-se a habilidade de cada camundongo em caminhar normalmente, com os quatro membros, por uma tela metálica (de 5 mm de diâmetro) na posição normal e invertida. Somente os animais que preencheram tal requisito, foram submetidos à experimentação. As formulações, inclusive os veículos, foram administrados por infiltração intramuscular (0,1mL) na pata posterior direita, na região próxima ao nervo ciático.

BLOQUEIO CAUDAL EM RATOS (INJEÇÃO INTRATECAL)

Para injeção intratecal, os animais foram contidos firmemente enquanto uma agulha conectada a uma seringa de Hamilton foi inserida perpendicularmente no espaço entre as vértebras L5 e L6 (Figura 11). O sítio de injeção selecionado estava restrito à região onde a medula espinhal termina e a cauda eqüina começa, de forma a reduzir a possibilidade de dano espinhal e facilitar a acessibilidade intervertebral.

No momento em que a agulha foi inserida no espaço subaracnoidal, observou-se um súbito movimento da cauda, reflexo este que foi utilizado como indicativo de punção correta. As formulações foram injetadas em um volume máximo de 20 μ L (Mestre *et al.*, 1994).

O treinamento para execução da técnica foi realizado no Laboratório de Dor (Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira), Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da USP-Ribeirão Preto.

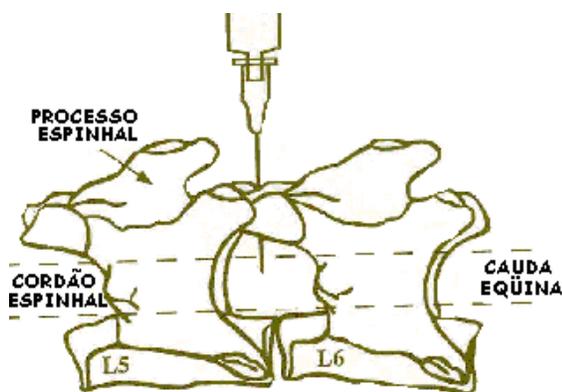


Figura 11- Inserção da agulha no espaço intervertebral (L5-L6) para injeção intratecal em ratos (adaptado de Mestre *et al.*, 1994).

9.3. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL

Para a realização do teste, os animais foram inicialmente anestesiados com tiopental sódico (25mg/kg, dose suficiente para promover sedação sem interferir na resposta do animal os teste). Em seguida, o AL foi injetado (0,1 mL) na região infraorbital (situada no espaço entre o molar posterior e o incisivo anterior) de um dos lados da face (Figura 12), sendo o outro lado utilizado como controle. O efeito analgésico foi avaliado por observação da resposta aversiva do animal ao pinçamento do lábio superior de acordo com os valores de escore: 0 – presença de resposta aversiva e 1 – ausência de resposta aversiva. Os animais foram testados em intervalos de 5 minutos até que o primeiro sinal de resposta fosse detectado (Cereda *et al.*, 2004).

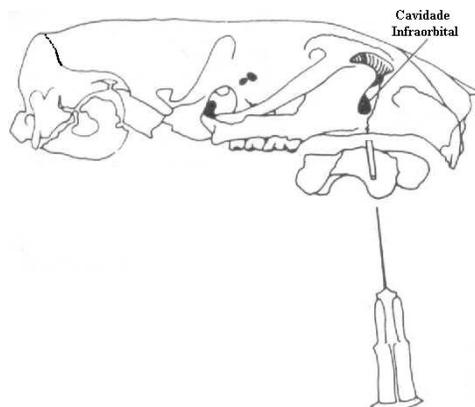


Figura 12- Representação esquemática da região do nervo infraorbital e local de injeção das formulações anestésicas em ratos (adaptado de Fink et al., 1975).

9.4. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO E CAUDAL – BLOQUEIO MOTOR

A presença da anestesia foi definida como a perda do controle motor da pata injetada (ou de ambos os membros posteriores, após injeção intratecal) sendo evidenciada pelo “arrastamento” do membro posterior e/ou fechamento dos dedos (Feldman & Covino, 1988) (Figura 13A).

A intensidade do bloqueio motor foi avaliada de acordo com valores de *score*: 0 (uso normal da pata injetada), 1 (incapacidade de flexionar completamente o membro injetado) e 2 (impossibilidade do uso da pata injetada) (Gantenbein *et al.*, 1996, 1997). A avaliação foi feita a cada minuto durante os 5 primeiros min. após a administração e, posteriormente, em intervalos de 5-10 min. até que fosse verificada a total recuperação dos movimentos do animal (pelo menos 1 h de observação).

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

9.5. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO E CAUDAL – BLOQUEIO SENSORIAL

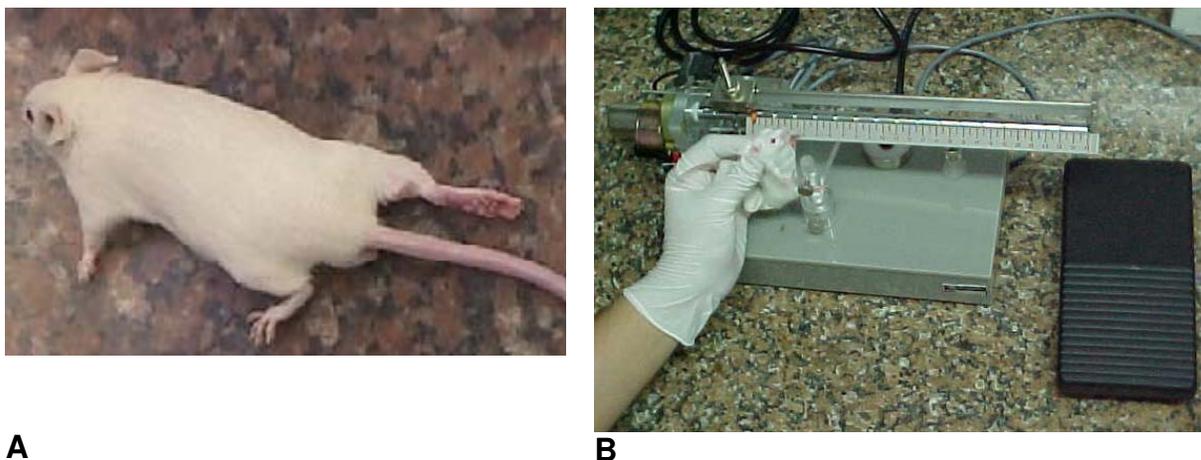
O bloqueio sensorial foi medido pelo limiar de remoção da pata dos animais frente a um estímulo mecânico, como descrito por Randall & Selitto (1957). Para a execução do teste utilizou-se um equipamento apropriado, chamado analgesímetro, que gera um aumento gradual da força (em gramas) exercida por uma extremidade plástica sobre a superfície dorsal da pata do animal (Fletcher *et al.*, 1997) (Figura 13 B).

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

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

Estabeleceu-se um valor máximo de pressão (*cut-off*) de 150 g e 350 g (camundongos e ratos, respectivamente) para evitar lesões nas patas e estimulação excessiva dos nociceptores. As medidas foram realizadas durante 5 h., com intervalos de 15 min. durante a primeira hora, 30 min. durante a segunda e terceira horas e, finalmente, 60 min. nas últimas duas horas de teste.

As medidas de pressão exercida para cada grupo experimental foram relacionadas graficamente em função do tempo.



A

B

Figura 13- Visualização do bloqueio motor induzido pelos AL (A) e procedimento realizado durante o teste PWTP (Araujo et al., 2004).

10. AVALIAÇÃO NEURO & NEFROHISTOLÓGICA

Anestésicos administrados por via espinhal podem induzir lesões histopatológicas e/ou alterações hemodinâmicas na medula espinhal. Dentre as numerosas causas que podem induzir traumas encontram-se a punção, inserção do cateter ou a ação da própria droga (altas concentrações, exposição a AL de longa duração e adjuvantes como vasoconstritores) que comprometem o fluxo sanguíneo para a medula espinhal. Para reduzir a incidência de neurotoxicidade são necessários alguns critérios de segurança como administrar doses menores de AL e evitar reinjeções (Malinovsky & Pinaud, 1996). A administração de novos compostos por via espinhal deve ser sustentada por dados de avaliação neurohistológica para detectar quaisquer alterações como hemorragias, migração de leucócitos ou degeneração neuronal (Taoka & Okajima, 1998).

Um estudo, realizado por Rajewsky *et al* (1995) em animais, forneceu muitas informações sobre a toxicidade da β -CD e seus derivados. Esses resultados indicaram como um dos principais efeitos tóxicos a nefrotoxicidade. As alterações renais, induzidas pela β -CD, ocorrem especialmente na região dos túbulos proximais

e são acompanhadas por vacuolização citoplasmática, desintegração celular e mineralização. Estudos histológicos revelaram a presença de microcristais de β -CD nos túbulos proximais, indicando que a nefrose seria um resultado da reabsorção tubular da β -CD intacta que, após ser concentrada em vacúolos, precipita devido a sua baixa solubilidade aquosa e baixa susceptibilidade à hidrólise (Frank et al., 1976). Por outro lado, há indícios de que esses cristais também possam ser constituídos de complexos formados com colesterol e/ou ésteres de colesterol podendo facilmente atravessar a membrana basal glomerular (Frijlink *et al.*, 1990; 1991; Bekers *et al.*, 1991; Davis & Brewster, 2004).

A avaliação morfológica foi realizada em cortes histológicos obtidos de secções da medula espinhal (ME) (L5-L6) e rins de ratos. Para tal, os animais foram divididos quatro grupos:

- Grupo A – animais que não receberam injeção (n = 5);
- Grupo B – animais tratados com veículo (HP β -CD, via intratecal, n = 5);
- Grupo C – animais tratados com BVC (n = 5, via intratecal);
- Grupo D – animais tratados com BVC_{HP β -CD} (n = 5, via intratecal).

Decorrido o período de tratamento (48 horas), os animais foram perfundidos por via intracardíaca, através do ventrículo esquerdo/átrio direito, com 100 mL de solução salina 0,9% contendo heparina 0,01%, seguida de 250 mL de solução fixadora de Formol 10% em PBS 0,1M pH 7,4. Finalizada a perfusão, os animais foram mantidos inertes, sob refrigeração à 4 °C, durante 12-16 h. Só então, a medula espinhal, na altura das vértebras L5-L6, e os rins foram removidos e submetidos à fixação por imersão. Tal procedimento foi efetuado com o objetivo de diminuir os artefatos observados nos tecidos *post mortem*, decorrentes da manipulação de amostras insuficientemente fixadas (Cammermeyer, 1960; 1961).

Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série etanólica crescente (etanol 70%, 80%, 95% uma imersão de 30 minutos cada, e duas vezes de 30 minutos em etanol 100%), diafanizadas, e incluídas em parafina. Cortes histológicos foram obtidos em micrótomo, corados com hematoxilina e eosina (H&E) e em seguida analisados e fotografados em microscópio de luz convencional.

Todos os experimentos, inclusive a preparação das amostras, foram realizados no Laboratório de Ultraestrutura Celular e no Laboratório de Animais Ectotérmicos (Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling e Profa. Dra. Sarah Arana, respectivamente), Departamento de Histologia e Embriologia, IB, Unicamp.

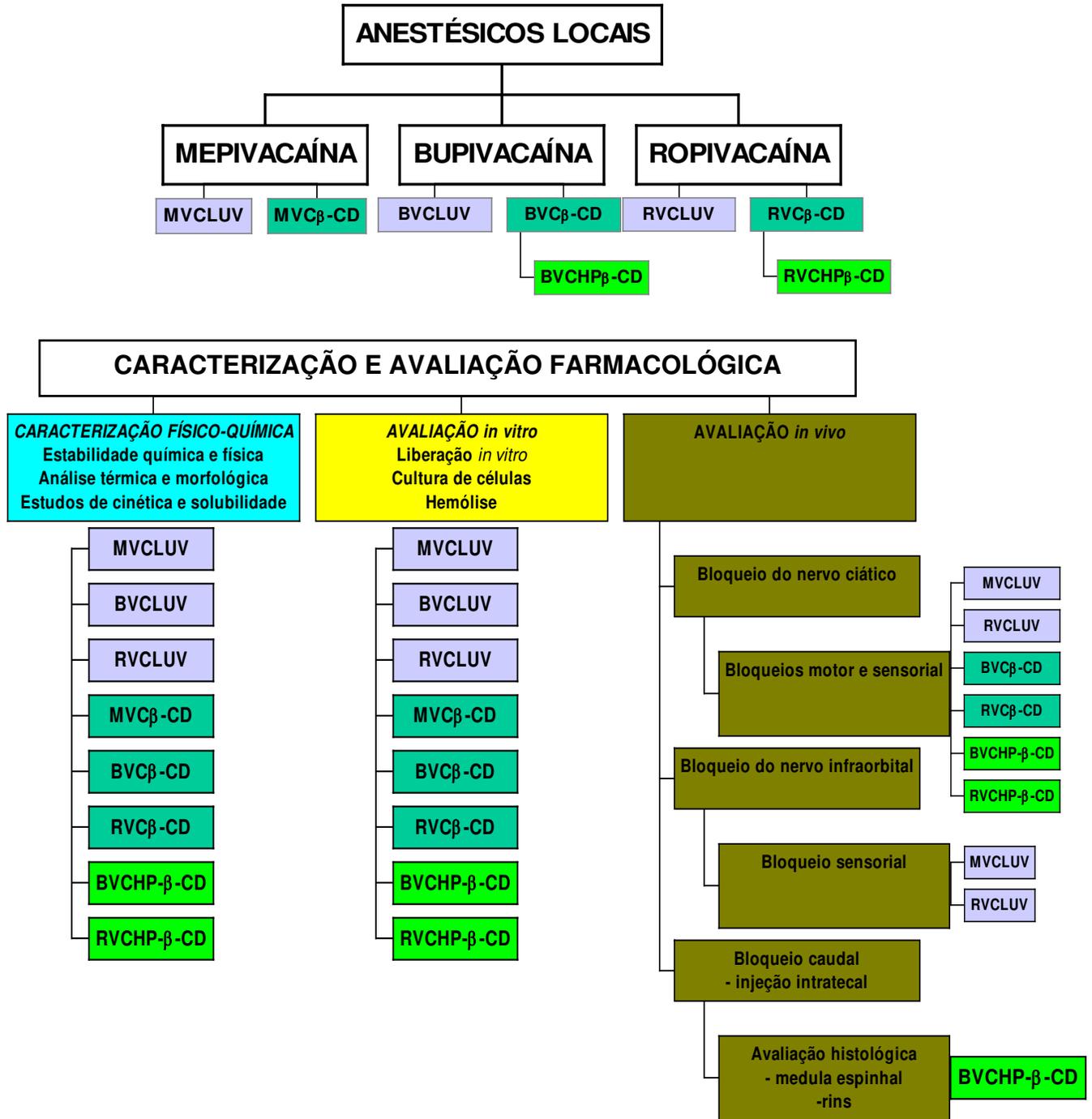
11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os grupos experimentais no teste PWTP (análises entre valores de tempos individuais) foram comparados por análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) com teste posterior de Tukey-Kramer. Os dados foram apresentados como médias e desvio padrão (SD) dos experimentos realizados. Para a avaliação do bloqueio motor (latência, $T_{máx}$, tempo de recuperação, AUC) e do bloqueio do nervo infrorbital (AUC, tempo de recuperação) os valores foram expressos em mediana (limites mínimo e máximo) e comparados utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Nos testes *in vitro*, os valores de percentagem foram transformados em proporções e analisados também pelo teste de Kruskal-Wallis (Zar, 1996).

Os softwares utilizados foram: Graph Pad InStat e Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., versão 3.0, 1997 – 1998).

IV. RESULTADOS & DISCUSSÃO

As análises dos sistemas de liberação controlada, apresentadas nesta seção, seguiram os fluxogramas abaixo:



1. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

LIPOSSOMAS

1.1. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO: DIÂMETRO MÉDIO DOS LIPOSSOMAS E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

As medidas do raio hidrodinâmico das vesículas por espalhamento de luz mostraram a presença de uma população majoritária com diâmetro médio de cerca de 400 nm, com polidispersidade entre 0,14 e 0,19. Observou-se também que a encapsulação dos AL não modificou o diâmetro médio, de forma significativa, quando comparada às vesículas vazias (Tabela 3). Todas as medidas foram realizadas a 25 °C, em até 30 dias após a preparação.

Tabela 3- Diâmetro médio das LUV após encapsulação com AL trinta dias após preparação (n = 4).

LIPOSSOMAS	DIÂMETRO MÉDIO (nm)		PROPORÇÃO (%)	
	(média ± d.p.)		(média ± d.p.)	
	Inicial	30 dias	Inicial	30 dias
LUV	371,0 ± 7,9	350,8 ± 4,6	81,6 ± 5,1	87,8 ± 2,8
	128,0 ± 6,3	154,6 ± 0,2	18,4 ± 1,2	12,2 ± 2,5
RVC_{LUV}	356,0 ± 8,3	335,5 ± 0,8	84,2 ± 3,8	93,1 ± 4,8
	138,0 ± 7,8	131,8 ± 8,9	15,9 ± 5,2	6,9 ± 3,2
MVC_{LUV}	346,0 ± 10,3	355,5 ± 23,3	81,2 ± 3,3	86,7 ± 8,9
	154,0 ± 5,8	164,4 ± 13,2	18,8 ± 3,2	14,6 ± 7,1

Após análise por espectrofotometria, a eficiência de encapsulação determinada para a RVC em 4 mM de lipossomas, foi de $23,8 \pm 3,52$ % (média \pm erro do processo de encapsulação) ($n = 7$).

Os valores da eficiência de encapsulação para BVC e MVC ($24,8 \pm 4,2$ % e $18,4 \pm 3,9$ %, respectivamente) (Araujo et al., 2004) quando comparados ao encontrado para RVC, refletem as diferentes propriedades físico-químicas desses AL, determinadas pelos substituintes do anel piperidínico (ver Figura 1) e em concordância com medidas de solubilidade aquosa e do coeficiente de partição dos mesmos em lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina de ovo (de Paula & Schreier, 1995; 1996).

Devido ao seu caráter anfifílico, todos os anestésicos encontram-se distribuídos, parte na bicamada lipídica e parte no interior aquoso dos lipossomas. A alta partição em membranas da BVC e da RVC (Tabela 1) permitiu a encapsulação de maiores concentrações dos fármacos; já a MVC apresenta a menor partição em membranas e boa solubilidade aquosa, justificando a percentagem de encapsulação mais baixa.

Transformando os valores de porcentagem de encapsulação em coeficiente de partição, pode-se determinar, segundo a equação 2 (ver item Materiais & Métodos), o valor de P para RVC ($132 \pm 25,8$) entre lipossomas e água, em pH 7,4.

Considerando-se os valores de P para a BVC e MVC (136 e 93, respectivamente) determinados no mesmo sistema (Araujo et al., 2004) pode-se mais uma vez comprovar a seguinte escala da hidrofobicidade: BVC>RVC>MVC. Dessa forma, a RVC encontra-se em uma posição intermediária entre a BVC e a MVC, havendo uma tendência maior para um “comportamento” semelhante à BVC.

De fato, a presença de um radical propil como substituinte no anel piperidínico da RVC permite à molécula uma menor hidrofobicidade em relação à BVC (radical butil) sendo porém, mais lipofílica que a MVC (radical metil) (Figura 1). Por outro lado, essas características definem fatores importantes em termos de anestesia como início e duração de ação e toxicidade sistêmica; colocando a RVC como um possível substituto para a BVC, já que a primeira apresenta perfil de bloqueio nervoso semelhante, porém com toxicidade menor (McClure, 1996; Wang *et al.*, 2001).

1.2. ESTABILIDADE E PERMEABILIDADE: LIBERAÇÃO DE RODAMINA

O coeficiente de extinção molar ($\epsilon^M = 9,2 \cdot 10^4$) da RDM, a caracterização dos comprimentos de onda de excitação e emissão ($\lambda_{\text{excitação}} = 554 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 574 \text{ nm}$) e a porcentagem de encapsulação ($11 \pm 0,84\%$, média \pm erro do processo de encapsulação, $n=4$) deste fluoróforo, foram parâmetros importantes determinados para posterior estudo da estabilidade e permeabilidade dos lipossomas (Figura 14).

Experimentos para avaliação da permeabilidade das vesículas foram executados na presença de RVC, representando um modelo de AL com partição em membranas intermediária à BVC e à MVC, o que justifica seu uso como modelo para esses outros AL nos experimentos de fluorescência.

Observou-se a variação da intensidade de fluorescência da RDM em intervalos de 0 a 60 min (tempo superior ao início de ação dos AL em geral) nos sistemas contendo RVC encapsulada e RVC em água (adicionada ao sistema no momento do teste) comparando-se com um sistema-controle (sem o AL). Durante esse período não foi observada qualquer variação na permeabilidade das vesículas, apenas a restauração do equilíbrio da molécula do fluoróforo em solução, nos três sistemas. A lise total das MLV (liberação de RDM encapsulada) foi determinada por

adição de Triton X-100 a 2%; como acompanhado pelo aumento da intensidade de fluorescência da RDM (Figura 15). Além disso, o maior rendimento quântico de fluorescência após ruptura das vesículas deve-se à eliminação do efeito supressor que existe quando a RDM está encapsulada no interior aquoso das MLV.

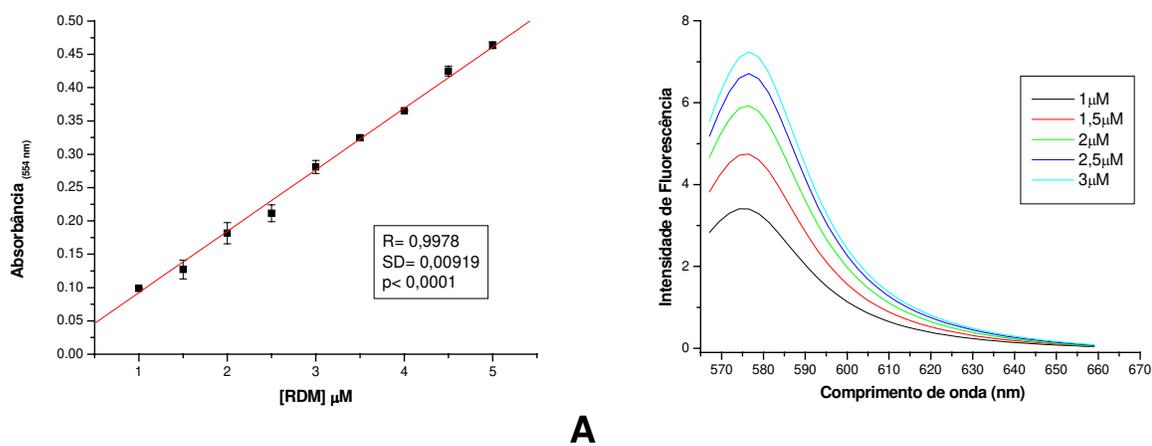


Figura 14- Caracterização espectrofotométrica (A) e espectros de fluorescência para RDM, entre 1 e 3 µM (λ_{exc} . 554 nm e λ_{emis} 574 nm) (B) em pH 7,4 (HEPES 20 mM em NaCl 150 mM).

A permeabilidade das MLV também foi caracterizada em relação à variação da temperatura tanto na presença e na ausência de Triton X-100. Observou-se um decaimento da intensidade de fluorescência da RDM com o aumento da temperatura nos três sistemas (Figura 16), o que pode ser explicado pelo aumento da supressão de fluorescência ou da transferência de energia por maior colisão entre as moléculas, favorecida pelo aumento da temperatura tanto do fluoróforo encapsulado quanto do livre (após adição de Triton X-100) (Lakowicz,1983).

As medidas da estabilidade física dos lipossomas são de grande interesse para sua aplicação como veículos de formulações farmacêuticas. A estabilidade física é definida como a estabilidade do sistema lipossomal em relação à estrutura dos componentes lipídicos e, principalmente, à integridade do sistema em questão (controle da permeabilidade das vesículas e, portanto, do conteúdo encapsulado) (Lichtenberg & Barenholz, 1988). Com a utilização de um fluoróforo como marcador,

já que os AL utilizados nesse trabalho não fluorescem, foi possível avaliar a permeabilidade das vesículas em diversas condições: com variação de tempo, temperatura e exposição a agentes líticos (detergentes).

De acordo com os resultados apresentados, não ocorreram mudanças significantes na intensidade de fluorescência nos três sistemas testados, indicando que a presença do AL em membrana ou em água não interfere na permeabilidade das vesículas tanto em função do tempo (como observado nos estudos de cinética) quanto após a variação de temperatura das amostras. Esse fato é de grande interesse na estimativa do tempo e temperatura de armazenamento das formulações lipossomais para que não haja variação do conteúdo encapsulado.

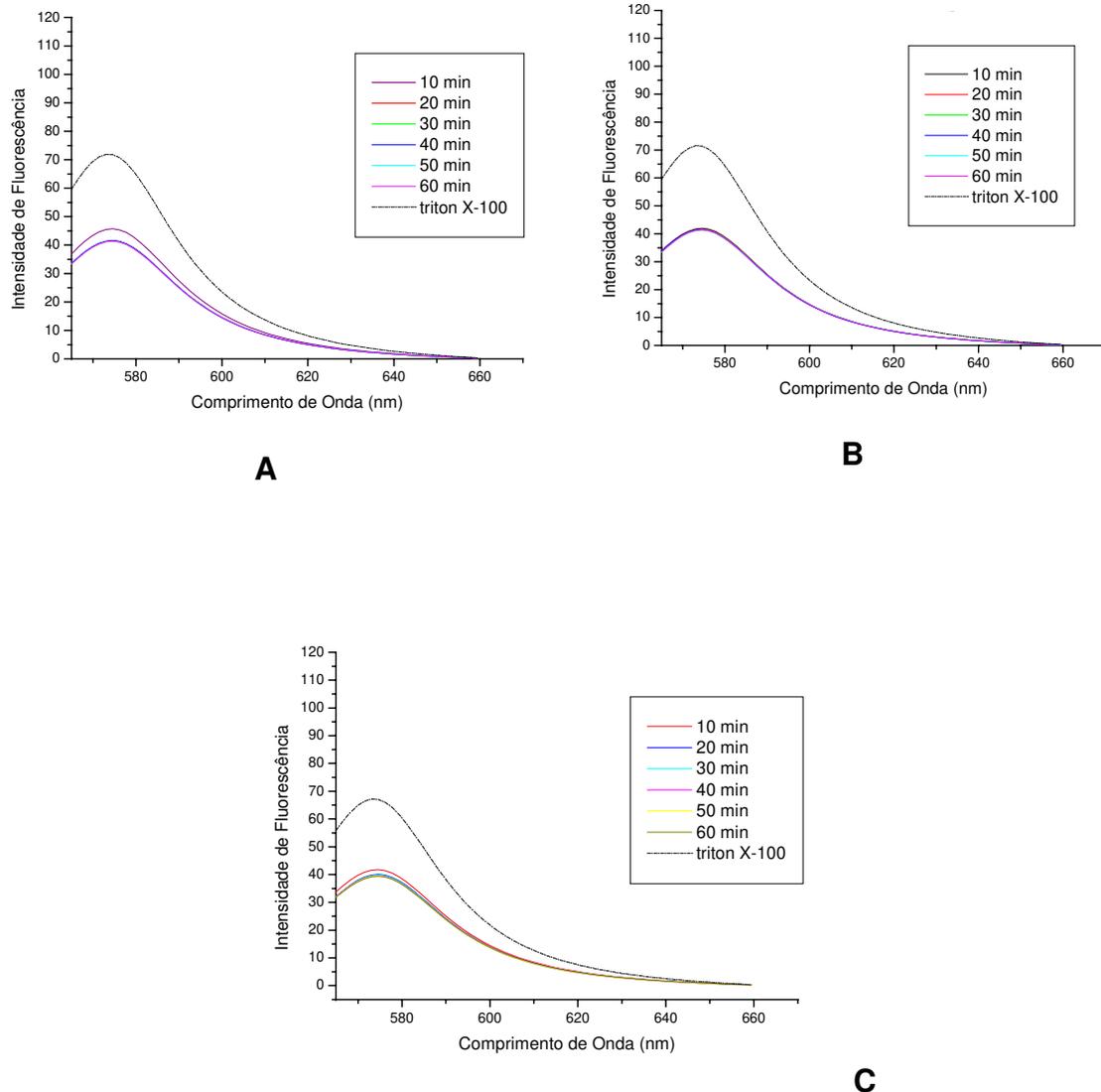


Figura 15- Cinéticas de permeabilidade das MLV à RDM durante em função do tempo (60 min) antes e após adição de Triton X-100 (2 %). A- Sistema contendo RDM encapsulada em MLV; B- Sistema contendo RDM encapsulada em MLV com presença de RVC (em água), C- Sistema contendo RDM e RVC encapsuladas em MLV. rdm= rodamina em água; rdmrvc= rodamina e ropivacaína em água (n=4).

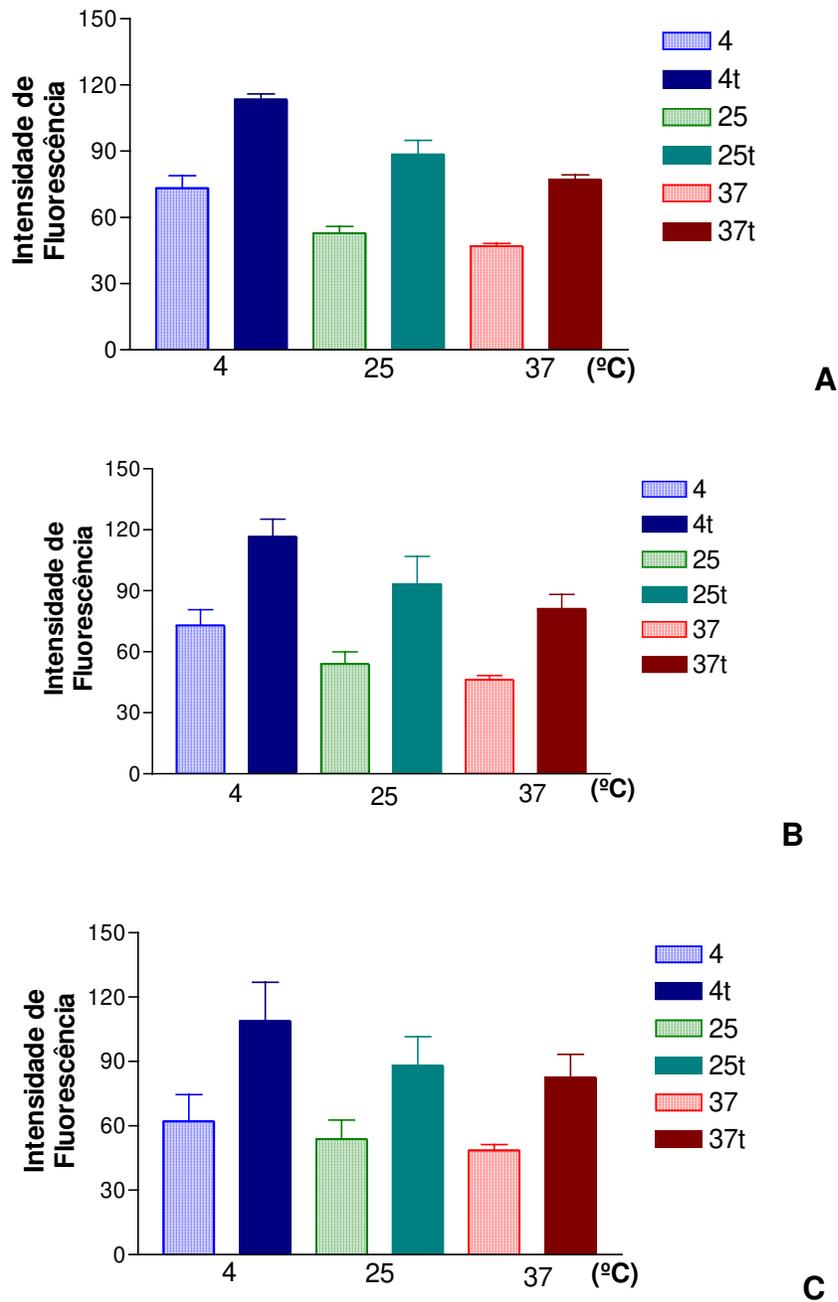


Figura 16- Liberação de RDM encapsulada em MLV com variação de temperatura (4, 25 e 37°C) antes e após (t) adição de Triton X-100 (2%). A- Sistema contendo RDM encapsulada em MLV; B- Sistema contendo RDM encapsulada em MLV na presença de RVC (em água), C- Sistema contendo RDM e RVC encapsulados em MLV. Dados representados como médias±SD (n=4).

1.3. CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS QUANTO À ESTABILIDADE QUÍMICA DE SEUS COMPONENTES ESTRUTURAIS: ESTIMATIVA DA OXIDAÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS

De uma forma geral, as concentrações de malondialdeído (MDA) em LUV armazenadas durante o período de um ano cresceram com o tempo de estocagem, sendo os níveis máximos de endoperóxidos atingidos após 6 meses de estocagem a 4 °C, como observado na figura 17. Porém, deve-se ressaltar que, apesar da manutenção na estabilidade química dos lipossomas durante ca. quatro meses, análises de espalhamento de luz demonstraram que após sessenta dias de preparação nota-se alterações no tamanho dos lipossomas, o que limita sua utilização até esse período (Tabela 4).

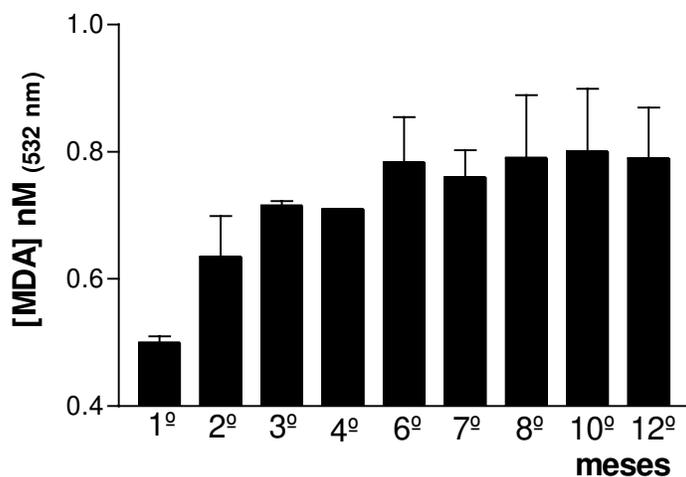


Figura 17 – Concentração de MDA (nM, 532 nm) em lipossomas unilamelares (LUV 5mM) armazenados a 4 °C e protegidos da luz (n=3-4).

Com relação à encapsulação de AL, não foram observadas mudanças nos níveis de peroxidação lipídica mesmo após a variação das temperaturas de armazenamento (Figura 18). Outro parâmetro de estabilidade das formulações, o tamanho das vesículas, foi acompanhado em função do tempo de armazenamento. A tabela 4 mostra que há aumento no diâmetro médio dos lipossomas após cerca de 60 dias de estocagem (observar também tabela 3). Dessa forma, o período de 30

dias de estocagem foi considerado seguro, uma vez que não houve alterações no tamanho das vesículas e nem na composição das mesmas.

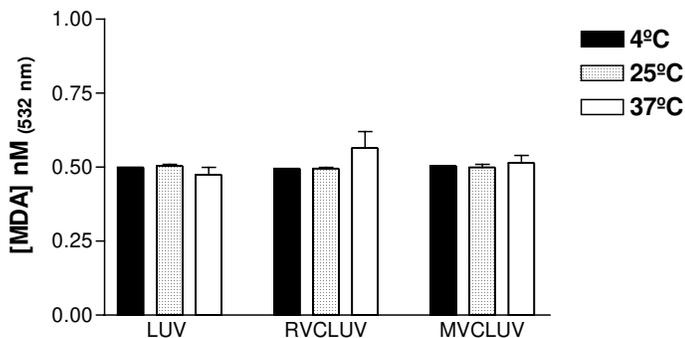


Figura 18 – Concentração de MDA (nM, 532 nm) em lipossomas unilamelares (LUV 5mM) armazenados em três diferentes temperaturas (4, 25 e 37 °C) durante 30 dias e protegidos da luz (n=3).

Tabela 4- Diâmetro médio e proporção dos sistemas LUV, RVC_{LUV} e MVC_{LUV} 30 e 60 dias de preparação (n = 3).

LIPOSSOMAS	DIÂMETRO MÉDIO (nm) (média ± d.p.)		PROPORÇÃO (%) (média ± d.p.)	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
LUV	350,8± 154,6	903,3±28,5	87,8±2,5	94,4±1,7
	154,6±30,2	257,8±12,16	12,1±2,5	5,7±1,6
RVC _{LUV}	335,5±40,8	610,0±54,6	93,1±4,8	92,4±1,3
	131,8±8,9	281,3±27,8	6,9±3,2	7,6±1,2
MVC _{LUV}	355,5±23,3	495,7±90,6	81,2±3,3	90,6±5,1
	164,4±13,12	291,2±11,2	18,8±3,2	9,4±1,2

CICLODEXTRINAS

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

A análise de DSC mostrou evidências da complexação entre os AL (BVC e RVC) e β -CD ou HP β -CD, na razão molar 1:1. As Figuras 19, 20, 21 e 22 apresentam os termogramas para os compostos: β -CD (19A e 20A), HP β -CD (21A e 22A), BVC (19B e 21B), RVC (20B e 22B), misturas físicas - BVC/ β -CD (19C), RVC/ β -CD (20C), BVC/HP β -CD (21C), RVC/HP β -CD (22C) - e dos complexos sólidos BVC $_{\beta$ -CD (19D), RVC $_{\beta$ -CD (20D), BVC $_{HP\beta$ -CD (21D) e RVC $_{HP\beta$ -CD (22D). A Tabela 5 apresenta as temperaturas e a variação de entalpia (ΔH) dos picos endotérmicos relativos à fusão, no caso do AL puros, e a perda das moléculas de água (dessolvatação) da cavidade das CD.

As CDs, β -CD e HP β -CD, apresentam picos endotérmicos característicos em 141,8 °C e 336,0 °C. Para BVC e RVC, os picos endotérmicos determinados foram em 133,5 °C e 117,6 °C, respectivamente. Já as misturas físicas, BVC/ β -CD e RVC/ β -CD, mostraram picos endotérmicos a 135,7°C e 129,54°C, em temperaturas mais elevadas do que as observadas para BVC e RVC puras (Figuras 19 e 20); e inferiores à temperatura de dessolvatação da β -CD (Tabela 5). A análise térmica das misturas físicas (BVC/HP β -CD e RVC/HP β -CD) com HP β -CD, mostrou picos endotérmicos, com um pequeno deslocamento, relativos à transição dos AL e (Figuras 21 e 22, Tabela 5) um segundo pico (ca 245 °C, Tabela 5) referente à dessolvatação da HP β -CD, bastante deslocado em relação ao pico da HP β -CD pura.

Nos termogramas para os complexos sólidos de BVC $_{\beta$ -CD e RVC $_{\beta$ -CD (na razão molar 1:1, AL: β -CD), os picos são quase imperceptíveis: há pequenos picos de transição a 107,2°C e 118,9°C, cuja entalpia é mínima ou não detectável (Tabela 5).

Igualmente, nos complexos sólidos de $BVC_{HP\beta-CD}$ e $RVC_{HP\beta-CD}$ (na razão molar 1:1, AL:HP β -CD), o pico de transição dos AL desaparece observando-se, uma única transição a 264,5 °C com relação ao complexo $BVC_{HP\beta-CD}$, e 248,2 °C com $RVC_{HP\beta-CD}$, revelando o favorecimento da dessolvatação da cavidade da HP β -CD (menor temperatura e menor entalpia, Tabela 5) com a complexação.

Além disso, observou-se que os complexos de inclusão com os AL (BVC e RVC) tendem a apresentar um pico entálpico cuja temperatura é próxima (inferior) à do pico de dessolvatação da CD envolvida na complexação, ou seja, os complexos $BVC_{HP\beta-CD}$ (264,5 °C) e $RVC_{HP\beta-CD}$ (248,2 °C) mostraram picos endotérmicos em temperaturas próximas à observada para a dessolvatação da cavidade da HP β -CD (336,0 °C), enquanto nos complexos, $BVC_{\beta-CD}$ (107,2 °C) e $RVC_{\beta-CD}$ (118,9 °C), os picos ficaram mais próximos aos da dessolvatação da β -CD (141,8 °C).

Todos esses resultados indicam sinais de complexação molecular, já que os complexos apresentaram picos pouco definidos ou alargados e de menor entalpia quando comparados aos compostos puros (AL ou CD). Em particular, destaca-se que o pico relativo à transição do AL (visível no termograma do composto isolado ou da mistura física) já não é detectado pela análise térmica do complexo, evidenciando a complexação molecular.

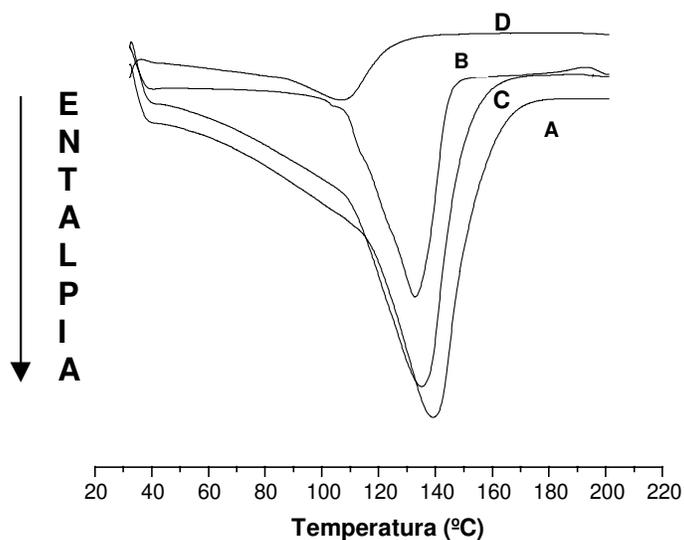


Figura 19- Termogramas de DSC para o sistema de BVC com β -CD. (A) β -CD, (B) BVC, (C) mistura física BVC/ β -CD, (D) complexo sólido $BVC_{\beta-CD}$ (razão molar de 1:1 AL: β -CD).

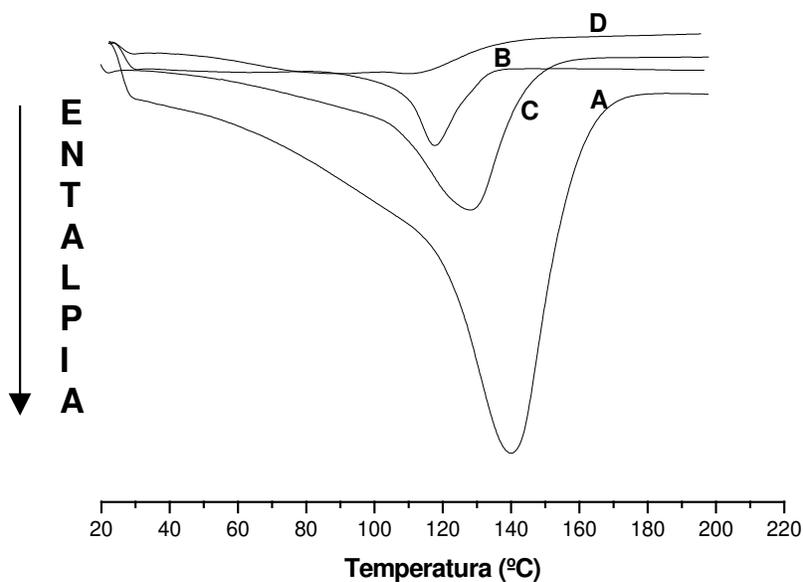


Figura 20- Termogramas de DSC para o sistema de RVC com β -CD. (A) β -CD, (B) RVC, (C) mistura física RVC/ β -CD, (D) complexo sólido $RVC_{\beta-CD}$ (razão molar de 1:1 AL: β -CD).

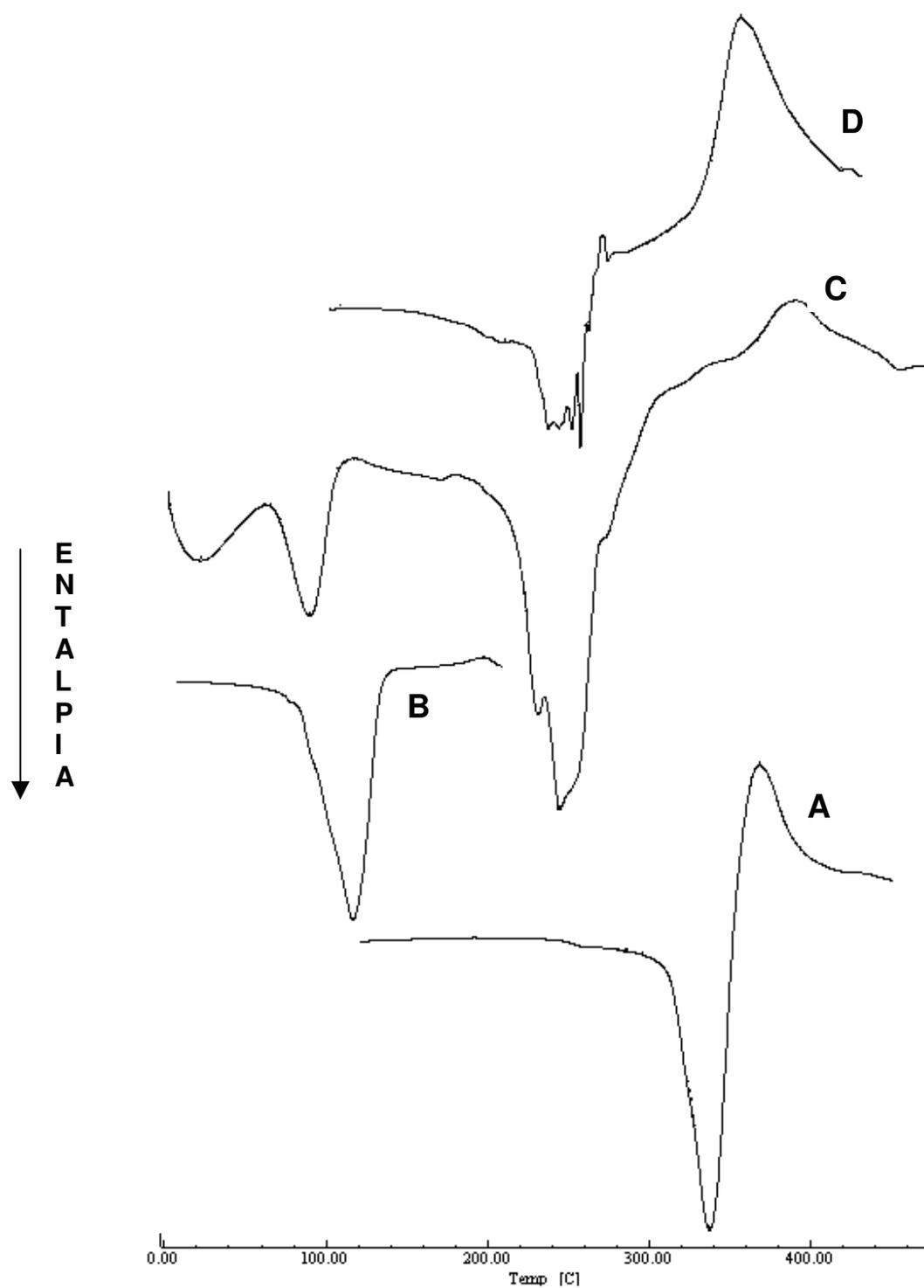


Figura 21- Termogramas de DSC para o sistema de BVC com HPβ-CD. (A) HPβ-CD, (B) BVC, (C) mistura física BVC/HPβ-CD, (D) complexo sólido BVC:HPβ-CD (razão molar de 1:1 AL : HPβ-CD).

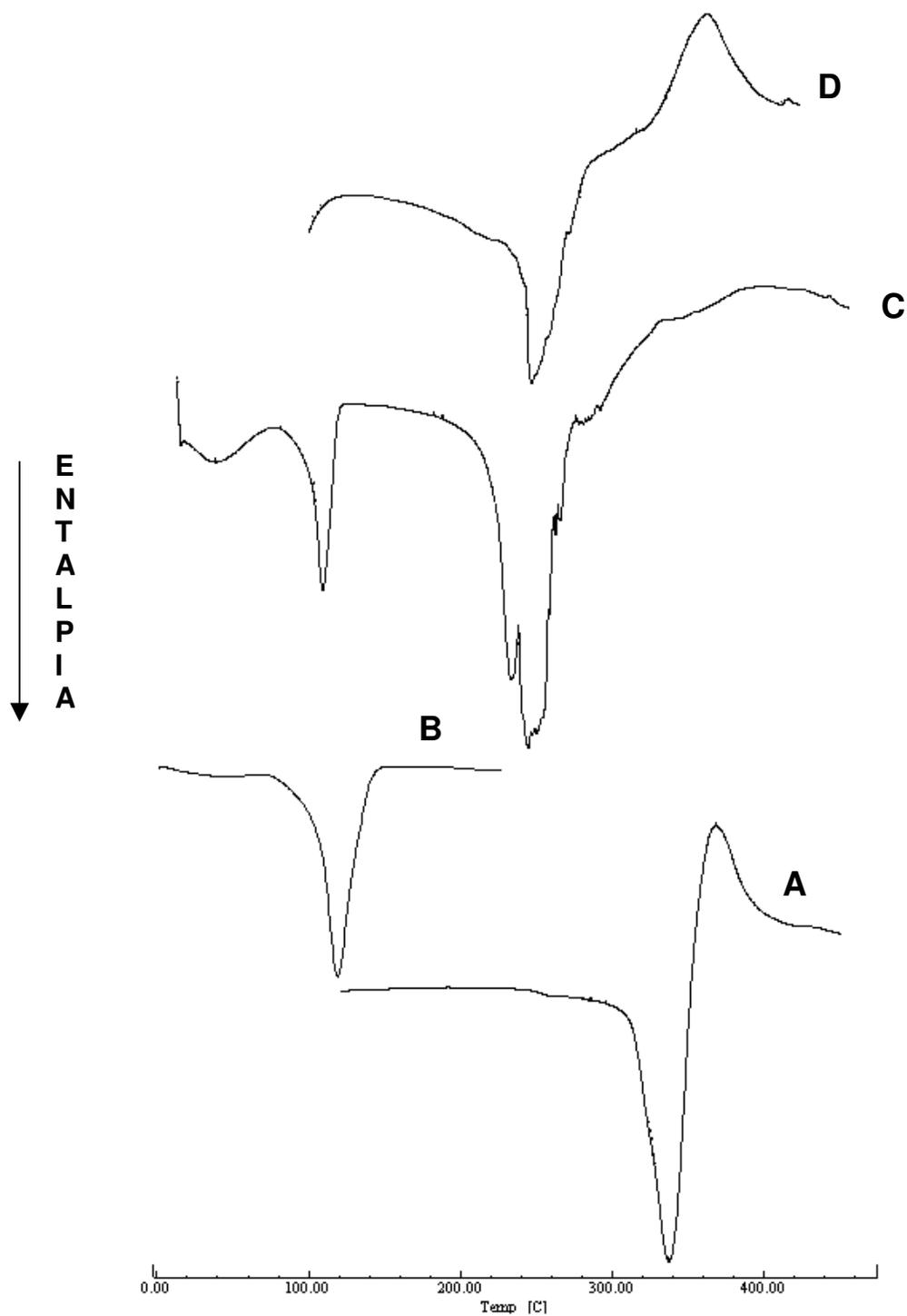


Figura 22- Termogramas de DSC para o sistema de RVC com HPβ-CD. (A) HPβ-CD, (B) RVC, (C) mistura física RVC/HPβ-CD, (D) complexo sólido RV

Tabela 5- Temperatura de transição de fases e ΔH da BVC, RVC, β -CD e HP β -CD, misturas físicas e complexos sólidos determinados através de DSC.

AMOSTRA	TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO	
	DE FASES (°C)	ΔH (J/g)
^b β -CD	141,8	190,1
HP β -CD	336,0	287,3
RVC	117,6	61,2
^a BVC	133,5	140,3
Mistura física RVC/ β -CD	129,5	144,2
Mistura física RVC/HP β -CD	116,0 / 246,5	81,0 / 335,2
^a Mistura física BVC/ β -CD	135,7	269,2
Mistura física BVC/HP β -CD	104,3 / 244,1	76,1 / 367,7
Complexo RVC β -CD	118,9	25,8
Complexo RVC _{HPβ-CD}	248,2	83,7
^a Complexo BVC β -CD	107,2	Nd
Complexo BVC _{HPβ-CD}	264,5	75,19

^a Dados de Araujo, D.R. 2002.

Nd= não determinado.

1.5. CINÉTICA DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS: MODIFICAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS AL

Com os experimentos de cinética procurou-se determinar o tempo necessário para equilíbrio na formação dos complexos de inclusão dos AL com as CDs. A concentração de anestésico utilizada para os experimentos com β -CD ou HP β -CD foi de 1 mM (AL:CD, 1:1). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para esses testes foram estudados, somente os AL mais hidrofóbicos em relação à MVC (que são beneficiados pela complexação com CDs em termos de intensidade e duração do efeito anestésico), ou seja, BVC e RVC. A MVC foi utilizada, inicialmente, por exemplificar a complexação de AL mais hidrofílicos com CD.

Embora a absorvidade molar no UV dos AL estudados seja pequena, ela pode ser usada para acompanhar a formação dos complexos, pois sofre um ligeiro aumento quando os AL estão inseridos na cavidade das CD. Nos complexos com β -CD o equilíbrio foi alcançado após aproximadamente 5 horas (BVC) e em tempos maiores para RVC e MVC (Figura 23 A). Diferentemente dos resultados de cinética obtidos para os complexos de inclusão com β -CD, as variações de absorbância em relação à do tempo zero, para os sistemas de AL contendo HP β -CD foram mínimas desde as primeiras horas do experimento, indicando um início da fase de equilíbrio anterior ao observado para a complexação com β -CD (Figura 23 B).

Mais uma vez, a hidrofobicidade dos AL pode ser apontada como fator determinante na complexação, pois o equilíbrio da complexação com BVC parece ocorrer mais rapidamente em comparação com RVC e MVC em β -CD (Figura 23 A). Este efeito temporal não é tão evidente nos sistemas com HP β -CD em que, tanto para BVC quanto para RVC, a complexação com HP β -CD parece ocorrer ao mesmo tempo, sendo possível a observação apenas da fase de equilíbrio (Figura 23 B).

Para moléculas mais hidrofóbicas, como a base livre dos anestésicos estudados, o tempo necessário para atingir o equilíbrio é cerca de 24 horas (Dollo et al., 1996b).

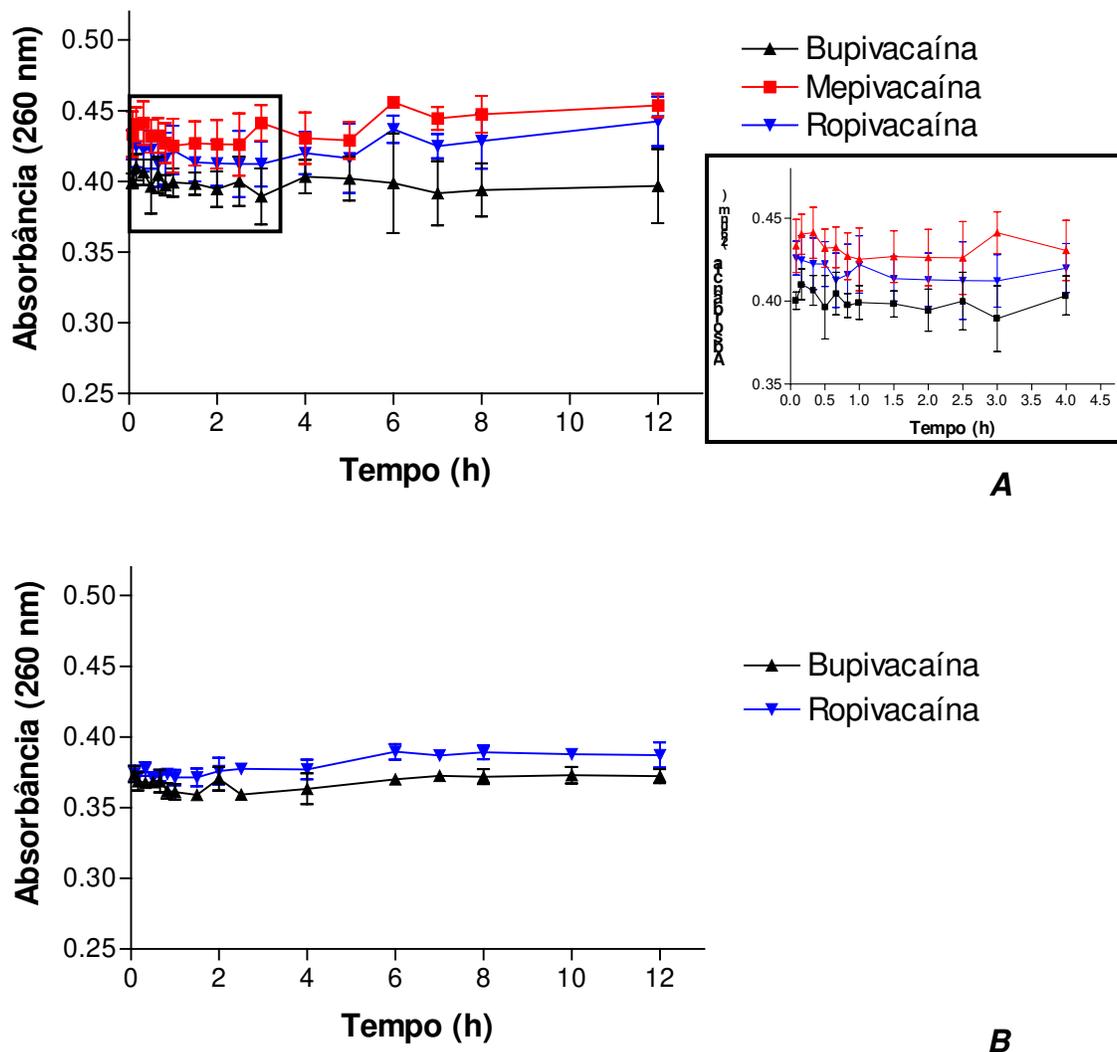


Figura 23- Cinética de formação dos complexos de anestésicos com β -CD (1:1) (A) ou HP β -CD (1:1) (B). Os sistemas foram mantidos sob agitação durante 12 horas. Dados representados como médias \pm d.p. (n=4).

1.6. ESTEQUIOMETRIA DA COMPLEXAÇÃO: ISOTERMAS DE SOLUBILIDADE

Através dos experimentos de solubilidade de fases, foi possível observar a complexação da BVC e RVC com a β -CD e HP β -CD em pH 7,4 (25 °C) (Figura 24 A,B) e calcular as constantes de associação (K_c) (Tabela 6). Os diagramas de solubilidade de fases dos sistemas contendo β -CD ou HP β -CD mostraram que, para BVC e RVC, os tipos de curvas apresentadas são do tipo A (ver item 6.2.3, Materiais & Métodos) implicando na formação de complexos mais solúveis que os AL puros. Curiosamente, nos sistemas com HP β -CD, o aumento na solubilidade da BVC apresenta uma mudança brusca entre 30 e 40 mM de HP β -CD e atinge um platô a 40 mM de HP β -CD enquanto a RVC tem aumento linear da solubilidade em função das concentrações de HP β -CD testadas.

As diferenças observadas entre as concentrações de β -CD (4 a 20 mM) e HP β -CD utilizadas nos experimentos, deve-se à maior solubilidade da HP β -CD (cerca de 2 M) quando comparada à β -CD (16,6 mM) (Rajewski & Stella, 1996, Daves & Brewster, 2004). Todos os experimentos foram realizados para avaliar a solubilidade dos AL em pH 7,4, onde a BVC e a RVC são insolúveis na concentração utilizada (30 mM). Assim, qualquer aumento da concentração do AL no sobrenadante, deve-se à formação de complexos de inclusão com as CD.

A mudança na solubilidade da BVC observada após adição de 30-40 mM de HP β -CD indica uma estequiometria de complexação de 1:1. Isto não é tão evidente para RVC, pois o efeito solubilizador da HP β -CD parece ser mais pronunciado quando há complexação com AL mais hidrofóbicos (como a BVC). As características físico-químicas semelhantes da RVC e BVC direcionaram a complexação com β -CD e HP β -CD e os resultados obtidos indicam um posicionamento favorável dos fármacos dentro da cavidade hidrofóbica das CD (Dollo et al., 1996b).

A partir da determinação dos valores de K_c (Tabela 6) pode-se verificar que há uma interação mais pronunciada da BVC do que da RVC com as CD, sendo essa interação maior com HP β -CD (constantes de associação de 14,7 e 10 para BVC e RVC, respectivamente).

Tabela 6- Valores das constantes de associação (K_c) com β -CD e HP β -CD para a BVC e RVC (pH 7,4 a 25 °C, $n = 4$).

ANESTÉSICO LOCAL	VALORES DE K_c (M^{-1})	
	β -CD	HP β -CD
BVC	8,9	14,7
RVC	7,9	10

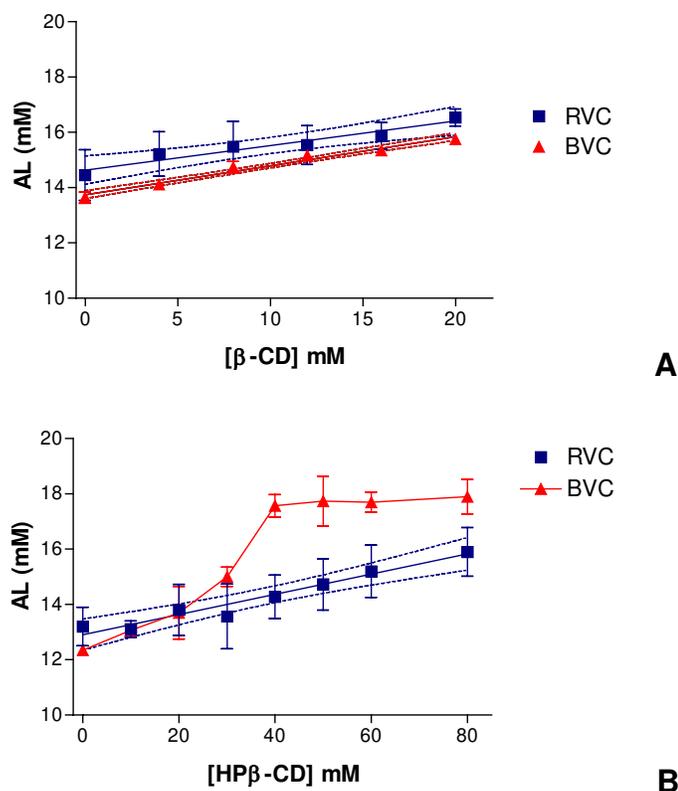


Figura 24- Diagramas de solubilidade de fases para BVC e RVC com β -CD (A) e HP β -CD (B) a 25°C, pH 7,4. Dados representados como médias \pm d.p. ($n=3$). Ensaios realizados com AL em excesso (30 mM) e concentrações crescentes de β -CD e HP β -CD; os valores nas ordenadas referem-se à concentração de AL solúvel após 24 horas de equilíbrio.

1.7. MORFOLOGIA DAS FORMULAÇÕES: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises por MEV facilitaram a observação dos cristais das amostras isoladas normais e submetidas ao processo de liofilização, que é utilizado para obter os complexos de inclusão no estado sólido. Para verificar se as mudanças estruturais observadas nos cristais dos fármacos após a complexação não seriam resultado de artefatos da técnica de liofilização, as CD (β -CD e HP β -CD) e os AL (BVC e RVC) isolados também foram submetidos ao mesmo processo (Figuras 25 e 26).

A Figura 25 mostra os cristais de β -CD (25 A,B) e HP β -CD (25 C,D) em suas estruturas antes (nativas) e após a liofilização. Observou-se a manutenção da estrutura típica e formato (cúbico) dos cristais de β -CD, com dimensões médias de cerca de 50 a 70 μm de diâmetro. Os cristais de HP β -CD têm dimensões próximas aos de β -CD (~60 μm de diâmetro), contornos bem definidos que deram lugar a cristais mais fragmentados, perdendo a forma arredondada, após a liofilização.

Com relação aos AL, a BVC forma cristais pequenos, cúbico – retangulares (~30 μm de comprimento por 10 μm de largura) que, após a liofilização apresentam-se como estruturas maiores (~70 μm de comprimento e 30 μm de altura) e de aspecto aerado (Figura 26 A,B) que parecem representar uma agregação de cristais menores, já que o formato cúbico-retangular é preservado. Já os cristais alongados e ponteados (50 μm por 5 μm) da RVC mostraram-se mais fragmentadas, mas com aspecto semelhante aquele observado antes da liofilização (Figura 26 C,D).

As micrografias das misturas físicas para cada AL com os dois tipos de CDs, mostram a conservação das características dos cristais de BVC ou RVC e β -CD ou HP β -CD, isoladamente, indicando a ausência de complexação (Figura 27).

Em relação ao complexos sólidos, observou-se alterações muito evidentes já que a morfologia original dos cristais das CD e dos AL foi perdida, observando-se aglomerados de menor tamanho ($< 10 \mu\text{m}$) e estrutura pouco definida (Figura 28).

Apesar de algumas mudanças na estrutura dos cristais de BVC e HP β -CD isoladas após o processo de liofilização, a comparação com as micrografias dos complexos de inclusão não indicou qualquer similaridade com as estruturas formadas. Esses resultados indicam que a complexação altera a estrutura original dos cristais dos fármacos, mas não devido ao processo de liofilização.

Segundo revisão recente sobre as CD, utilizadas como sistemas de liberação controlada de fármacos, a forma cristalina das CD naturais pode ser perdida com a substituição molecular (dependendo do grau e precisão), isto é, CD substituídas de maneira pouco uniforme nos carbonos 2,3 e 6 dos resíduos de glicose (como no caso da HP β -CD), podem perder a organização cristalina formando aglomerados amorfos (Davis & Brewster, 2004). Provavelmente, a complexação com AL exerceria um efeito semelhante nos cristais de CD puros, explicando a formação das estruturas amorfas (Figura 28).

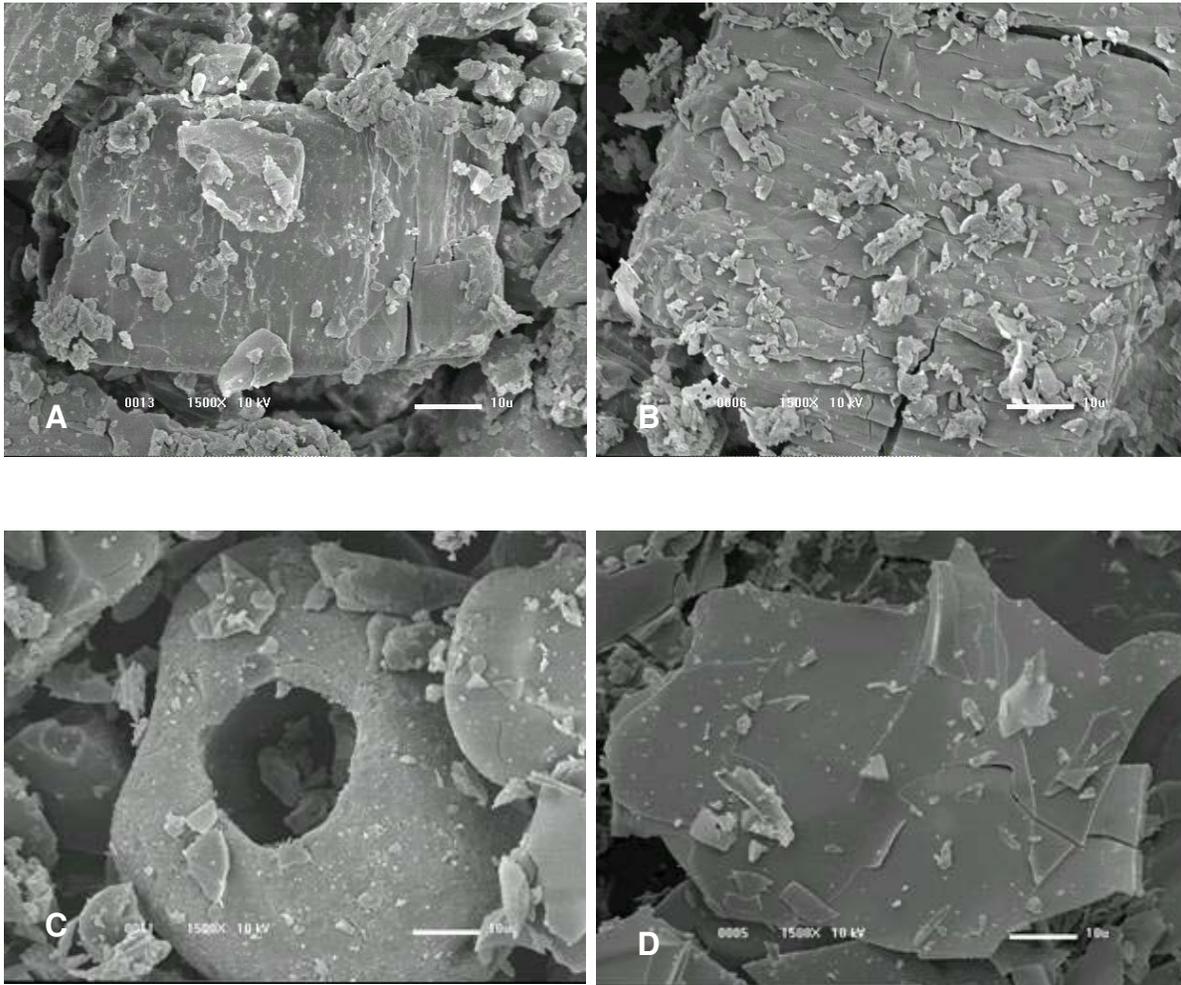


Figura 25- Análise por MEV dos cristais de β -CD nativa (A) e liofilizada (B), HP β -CD nativa (C) e liofilizada (D). Aumento de 1500x.

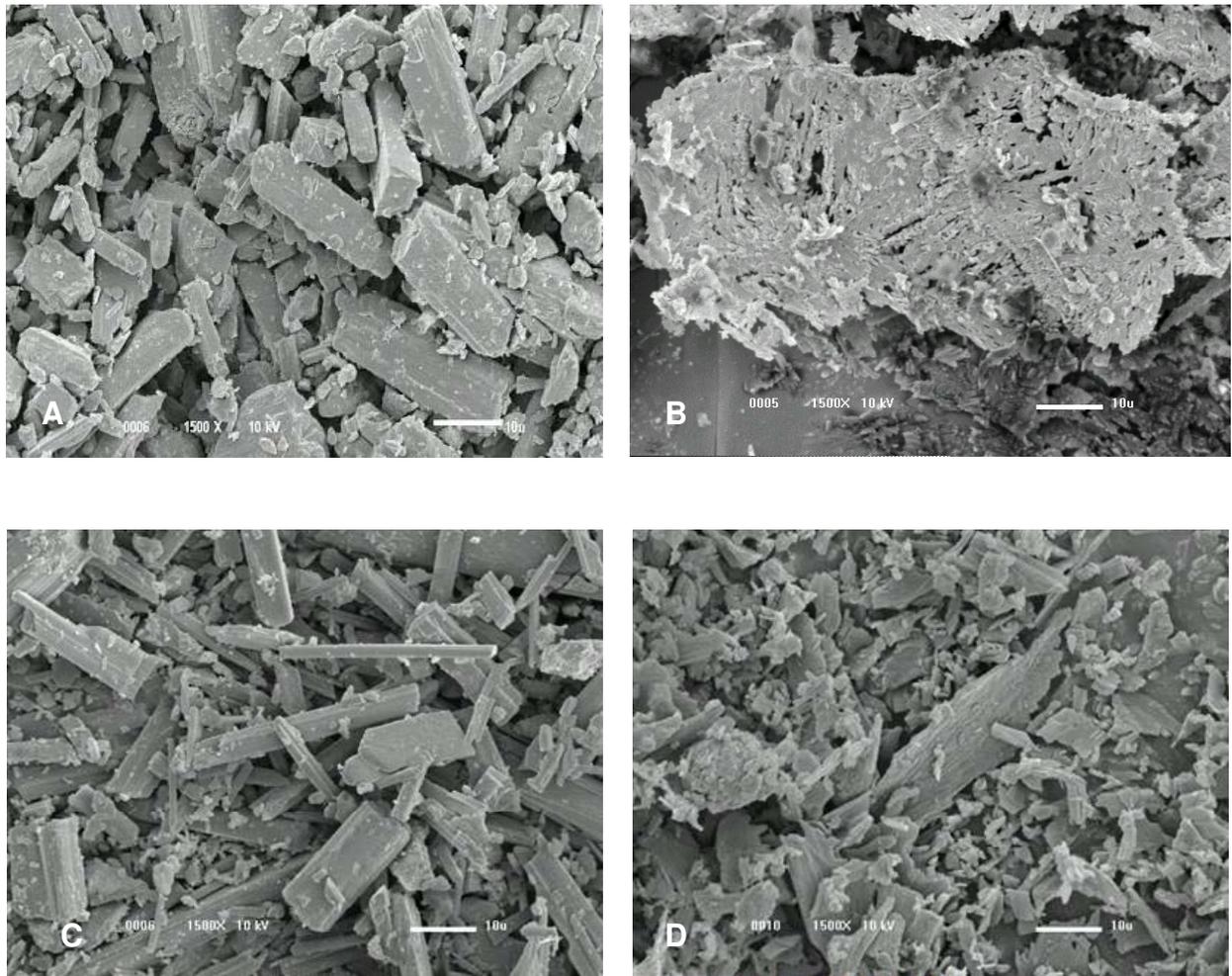


Figura 26- *Análise por MEV dos cristais de BVC nativa (A) e liofilizada (B), RVC nativa (C) e liofilizada (D). Aumento de 1500x.*

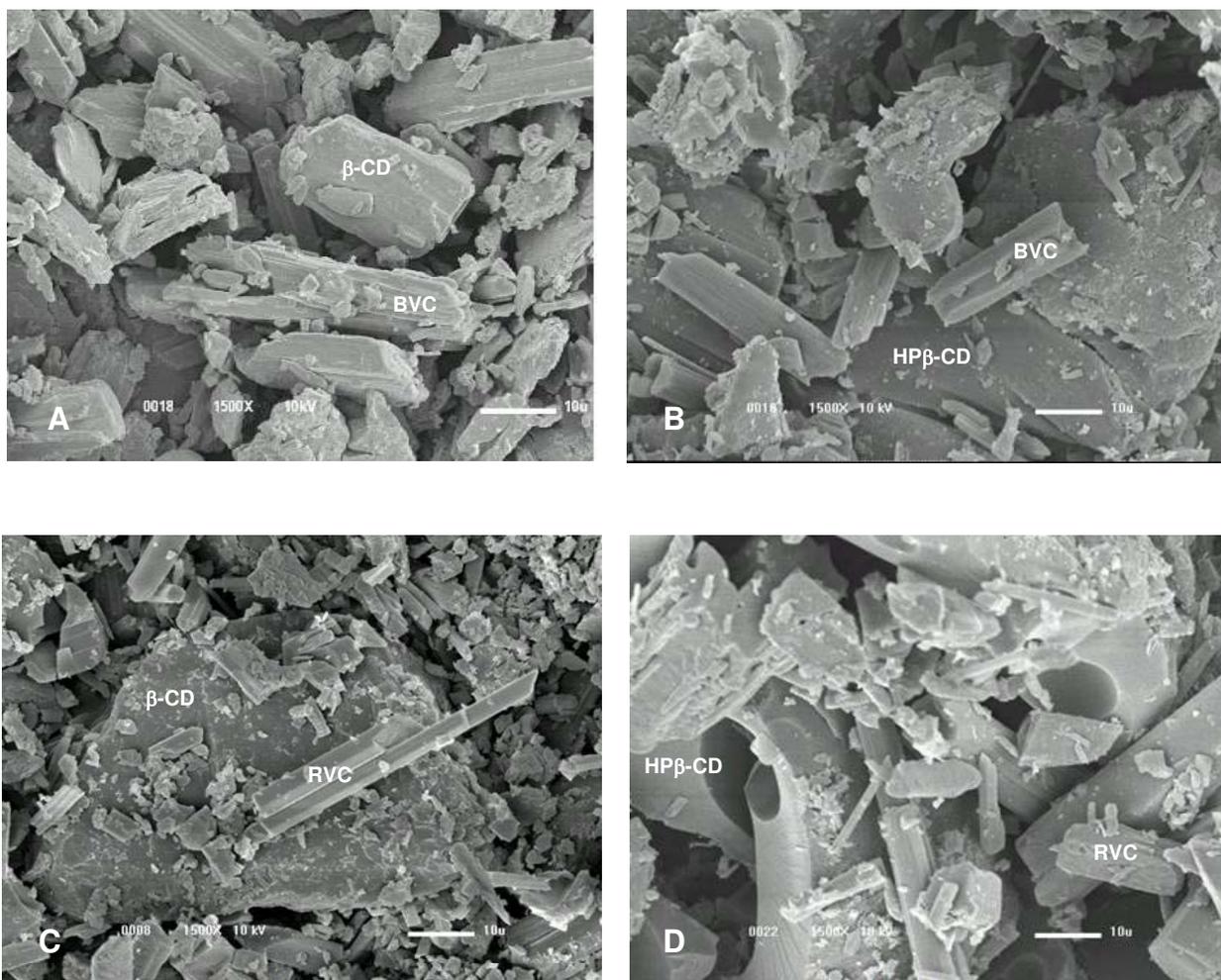


Figura 27- Análise por MEV dos cristais das misturas físicas contendo BVC/ β -CD (A), BVC/HP β -CD (B), RVC/ β -CD (C) e RVC/HP β -CD (D). Aumento de 1500x.

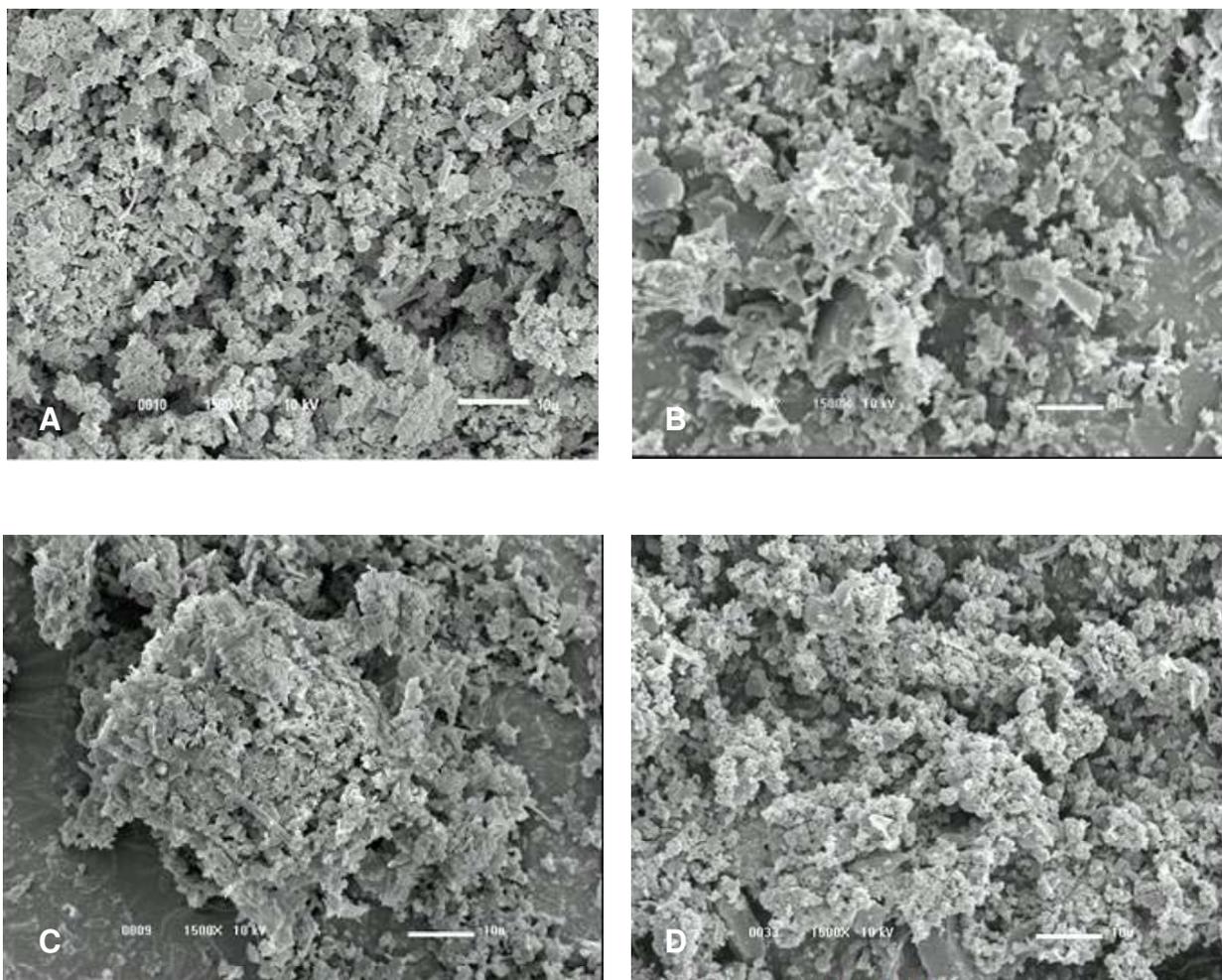


Figura 28- Análise por MEV dos cristais dos complexos de inclusão (AL:CD , 1:1) BVC: β -CD (A), BVC:HP β -CD (B), RVC: β -CD (C) e RVC:HP β -CD (D). Aumento de 1500x.

2. TESTES *IN VITRO*: LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

2.1. ANESTÉSICOS LOCAIS COMPLEXADOS COM CDs

Para os testes de liberação *in vitro* foram realizados experimentos com os sistemas $BVC_{\beta\text{-CD}}$, $RVC_{\beta\text{-CD}}$, $BVC_{HP\beta\text{-CD}}$ e $RVC_{HP\beta\text{-CD}}$ onde os resultados obtidos foram comparados com os perfis de liberação dos fármacos livres (Figura 29 A,B). Em geral, observou-se uma diminuição na liberação dos AL complexados com as CD em relação aos fármacos livres, indicando que o uso de carreadores alterou a cinética de liberação dos fármacos, através de membranas de diálise.

Nos experimentos com BVC observou-se a liberação total do fármaco livre (100%) após 150 min. de diálise. Já os sistemas $BVC_{\beta\text{-CD}}$ e $BVC_{HP\beta\text{-CD}}$ diminuíram, de forma similar, a permeação do fármaco (cerca de 1,8 e 1,6 vezes, respectivamente com cerca de 50 % de liberação) em relação sua forma livre, após 150 min. ($p < 0,001$) e a liberação total não foi atingida até 450 min. de experimento (Figura 29 A).

Para os sistemas contendo RVC, após 180 min. de diálise, 100% do fármaco havia sido liberado na solução receptora; contrastando com os resultados obtidos para $RVC_{\beta\text{-CD}}$ e $RVC_{HP\beta\text{-CD}}$ (75% e 80% de RVC liberada, respectivamente) em 180 min. ($p < 0,001$). Ambos os sistemas, apresentaram perfis de liberação muito semelhantes para RVC (diminuição de 1,5 e 1,3 vezes na liberação do fármaco) (Figura 29 B).

A liberação total da RVC complexada ocorre em menos de 450 min. de experimento, tanto para $\beta\text{-CD}$ quanto para $HP\beta\text{-CD}$, o que é condizente com os menores valores K_c da RVC em relação à BVC (Tabela 6). Além disso, os perfis de liberação obtidos foram importantes para a comparação entre os sistemas de AL em $HP\beta\text{-CD}$ e $\beta\text{-CD}$, evidenciando que a interação dos AL com $HP\beta\text{-CD}$ também não é suficientemente forte (de acordo com os valores de K_c , Tabela 6) para limitar a liberação do fármaco aos tecidos-alvo, o que é desejável.

Estes resultados, obtidos *in vitro*, são bastante promissores mesmo considerando-se as possíveis diferenças entre as cinéticas *in vivo* e *in vitro*, dos AL nessas duas CD.

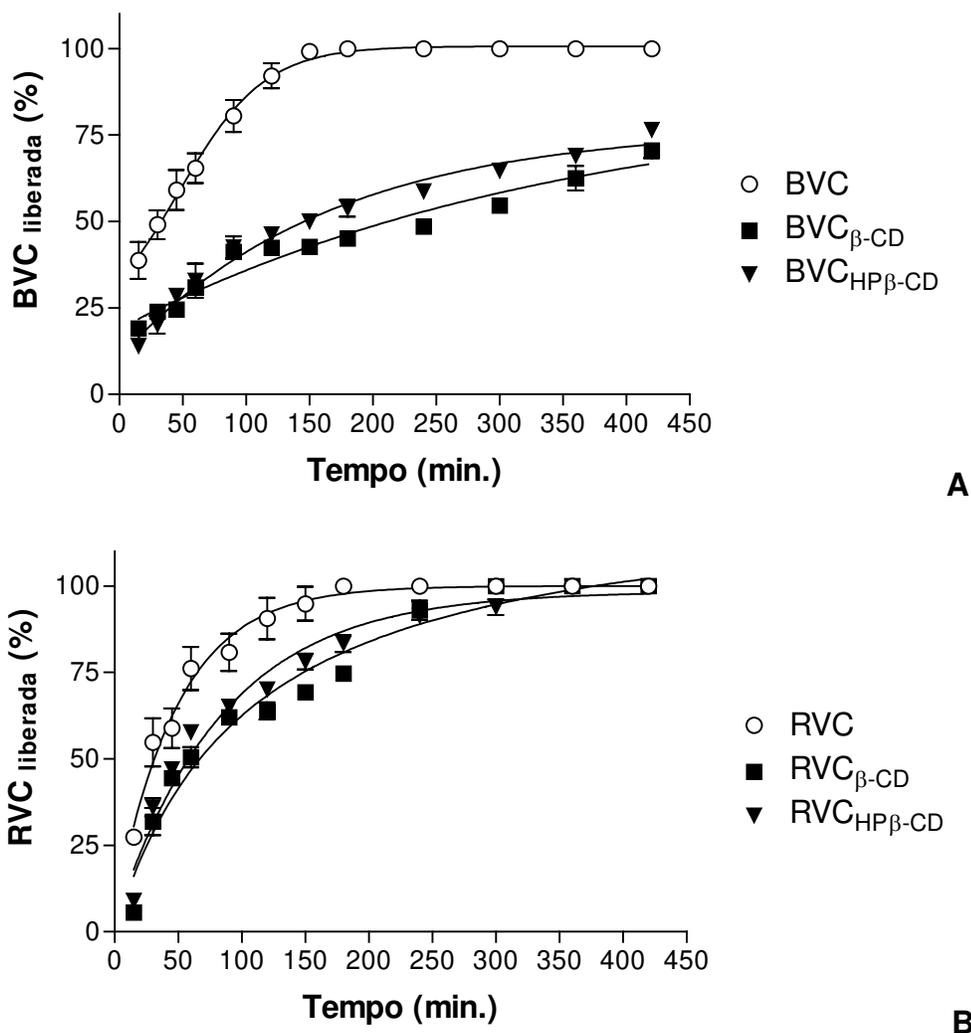


Figura 29- Liberação cumulativa de BVC (A) e RVC (B) (%) a partir de sistemas contendo β -CD e HP β -CD (1:1, razão molar AL:CD), pH 7,4 e 25 °C. Dados representados como médias \pm SD (n=4).

2.2. ANESTÉSICOS LOCAIS ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS (LUV)

A encapsulação de MVC e RVC em lipossomas reduziu significativamente a liberação desses AL (1,5 vezes, $p < 0,001$ para MVC e RVC) após comparações com o fármaco livre (Figura 30). O tempo necessário para liberação total da MVC encapsulada foi de 240 min (sendo o fármaco livre liberado 100% após 150 min. de diálise). Com relação à RVC, o fármaco livre foi liberado completamente após 180 min., ao contrário da RVC encapsulada, cuja liberação total só ocorreu a 420 min. de experimentação.

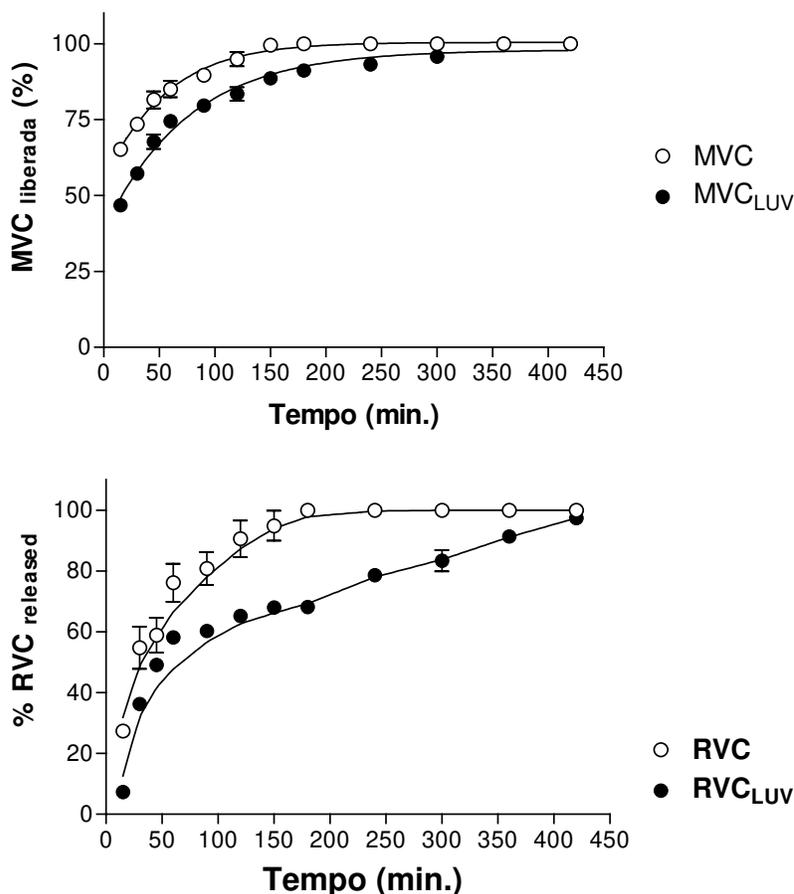


Figura 30- Liberação cumulativa de MVC* e RVC (%) a partir de sistemas contendo lipossomas unilamelares, pH 7,4 e 25 °C. Dados representados como médias \pm SD (n=4). *Dados obtidos de Araujo et al., 2004.

Para a pesquisa e desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, alguns fatores devem ser considerados: i) o fármaco deve ser encapsulado ou complexado possibilitando a manutenção das concentrações terapêuticas por um longo tempo e ii) a eliminação do sistema carreador/AL (*clearance*) deve ser reduzida o suficiente para que concentrações de fármaco sejam mantidas no local da injeção (importante para fármacos de ação regional, como os AL) (Langerman *et al.*, 1992; Mowat *et al.*, 1996). Nesse sentido, os testes de liberação *in vitro* possibilitaram uma avaliação da permeação dos fármacos através de membranas, onde as formulações que mantiveram os menores níveis de liberação possivelmente apresentam uma maior interação do fármaco com os carreadores.

Para o sistema contendo RVC observou-se que os sistemas RVC_{LUV}, RVC _{β -CD} e RVC_{HP β -CD} atrasaram a liberação de RVC em 1,5 e 1,3 vezes, respectivamente quando comparados à solução controle (RVC) no mesmo tempo de experimentação, indicando que a RVC beneficia-se da utilização de lipossomas e ciclodextrinas como carreadores. Este fato não ocorre com BVC e MVC, já que há uma interação preferencial desses fármacos (direcionada por suas propriedades físico-químicas) pelos carreadores ciclodextrinas e lipossomas, respectivamente.

Analisando dados anteriores pode-se notar que um efeito da complexação com CD é evidenciado pelo aumento da solubilidade aquosa dos anestésicos BVC e RVC (Figura 24), interferindo na cinética de transferência através interface água-membrana. Já na encapsulação há maior fornecimento de AL (como MVC e RVC) incorporado na fase membrana. Em relação às propriedades farmacológicas dos AL, cujo sítio de ação é a membrana do axônio, ambos os sistemas proporcionariam um aumento na concentração de fármaco no local de ação. Os ensaios de liberação sugerem ainda que os carreadores podem proporcionar um benefício adicional aos AL, sendo evidenciado (*in vitro*) pelo aumento no tempo para liberação e pela redução do *clearance* local (*in vivo*), o que determina um aumento na biodisponibilidade desses fármacos.

3. TESTES DE ESTERILIZAÇÃO

Foram realizadas análises de materiais submetidos a diferentes métodos de esterilização como filtração e radiação gama.

Inicialmente, os AL, as CD e as formulações complexadas foram submetidas à filtração (filtros com poros de 0,22 μm) enquanto para os lipossomas e formulações lipossomais foram utilizados filtros com poros maiores como 0,45 μm (devido ao tamanho das vesículas preparadas, $\sim 0,4 \mu\text{m}$).

Em seguida, as amostras filtradas contendo AL (BVC, RVC e MVC), veículos (LUV, β -CD e HP β -CD), formulações lipossomais e complexadas foram semeadas em meios de cultura e mantidos por até 7 dias, não tendo sido detectada a presença de microorganismos nas amostras. Esses resultados indicaram que as formulações encontravam-se aptas à utilização em animais de experimentação.

Os testes de esterilização por radiação gama (produzida pelo radioisótopo Cobalto-60, Companhia Brasileira de Esterilização-CBE, Jarinú-SP) foram feitos com até 3,5 Mrad (Malinovsky et al., 1997b). Embora não tenha sido detectada a presença de microorganismos nos ensaios em meio de cultura, optou-se pelo método de filtração para evitar danos oxidativos às formulações lipossomais, que poderiam ser induzidas pela radiação gama.

4. ENSAIOS *IN VITRO*: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

4.1. ENSAIOS EM CULTURA DE CÉLULAS: VIABILIDADE CELULAR

A avaliação do efeito tóxico dos veículos (LUV, β -CD e HP β -CD), dos fármacos livres (MVC, RVC e BVC), encapsulados em lipossomas (MVC_{LUV}) e complexados (BVC _{β -CD}, BVC_{HP β -CD}, RVC _{β -CD} e RVC_{HP β -CD}), foi realizada através do ensaio de viabilidade por redução do corante MTT sobre culturas de células não metabolizantes (fibroblastos de camundongos, linhagem de células 3T3).

De uma forma geral, o tratamento das células com as CD, AL livres, encapsulados e complexados alterou a porcentagem de células viáveis de maneira dose-dependente em relação ao controle (tratado apenas com o corante MTT). Uma das mais importantes considerações na escolha das concentrações dos AL testados em nosso sistema *in vitro*, foi a correlação com aquelas utilizadas na clínica. Assim, as concentrações dos veículos (no caso das CD), das formulações complexadas e encapsuladas foram as mesmas utilizadas com os AL livres; representando suas concentrações clínicas: MVC 0,5; 1 e 2% (17, 35 e 70 mM), BVC e RVC 0,125; 0,25; 0,5% (4, 8 e 16 mM).

4.1.1. ANESTÉSICOS LOCAIS COMPLEXADOS COM CD

Nas as células incubadas com as CDs (β -CD e HP β -CD nas concentrações de 4, 8 e 16 mM) observou-se uma diminuição da porcentagem de células viáveis após o tratamento, havendo diferenças estatísticas entre β -CD e HP β -CD apenas na maior concentração utilizada (16 mM) (Figura 31).

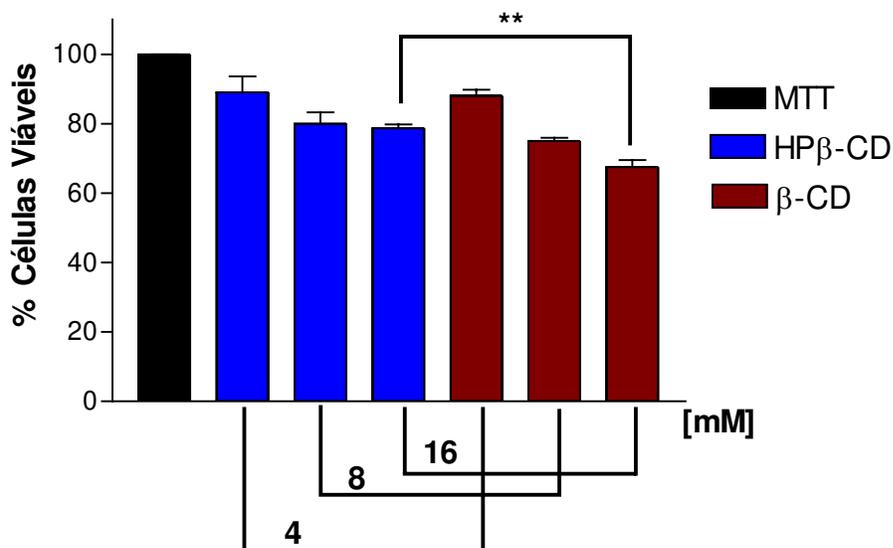


Figura 31 – Efeitos citotóxicos da β -CD e $HP\beta$ -CD (4, 8 e 16 mM), em células 3T3 (incubação por 2 h a 37 °C e 5% CO_2 , pH 7,4) avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT (Médias \pm d.p., n=4 experimentos). ** $p < 0,01$ (ANOVA).

O tratamento das células com os sistemas contendo BVC 4 mM, mostraram que ambos os complexos $BVC_{HP\beta-CD}$ e $BVC_{\beta-CD}$ apresentaram efeitos semelhantes aos veículos (cerca de 90% de células viáveis), reduzindo a citotoxicidade provocada pela mesma concentração do fármaco livre (75% de células viáveis) ($p < 0,05$) (Figura 32 A). Na concentração de 8 mM, apenas o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$ mostrou menor efeito citotóxico do que a BVC livre (85 e 72% de células viáveis, $p < 0,01$) (Figura 32 B). Com a maior concentração de BVC (16 mM), a viabilidade das células também foi aumentada após o tratamento com os complexos $BVC_{HP\beta-CD}$ e $BVC_{\beta-CD}$ em relação ao fármaco livre com $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente (Figura 32 C).

A incubação das células com os complexos contendo RVC, mostrou que a viabilidade celular não foi alterada em relação ao fármaco livre, nas três concentrações utilizadas (Figuras 33 A, B e C). A pequena diferença na citotoxicidade observada com o aumento da concentração de BVC e RVC livres deve-se à limitada solubilidade aquosa desses anestésicos em pH 7,4.

Os AL são utilizados por via intramuscular para o tratamento da dor miofacial e para bloqueio de nervos periféricos (como o nervo ciático, por exemplo) (Hogan *et al.*, 1994). Vários estudos relatam o desenvolvimento de toxicidade local após a injeção de BVC, devido à inibição da síntese de proteínas responsáveis pela manutenção da concentração de cálcio intracelular (Kytta *et al.*, 1986; Zink *et al.*, 2003). Também foi descrita toxicidade local induzida por RVC, mas esta apresentou-se bem menos severa que após o uso de BVC (Zink *et al.*, 2003), o que coincide com os resultados de viabilidade celular após a incubação de fibroblastos com os AL. Dessa forma, os ensaios de citotoxicidade confirmaram o maior efeito tóxico da BVC sobre a RVC, bem como mostraram que a liberação controlada dos AL pelos complexos prevalece sobre o efeito solubilizante dos mesmos (aumento da concentração total de AL disponível), já que não houve aumento da toxicidade nas concentrações testadas.

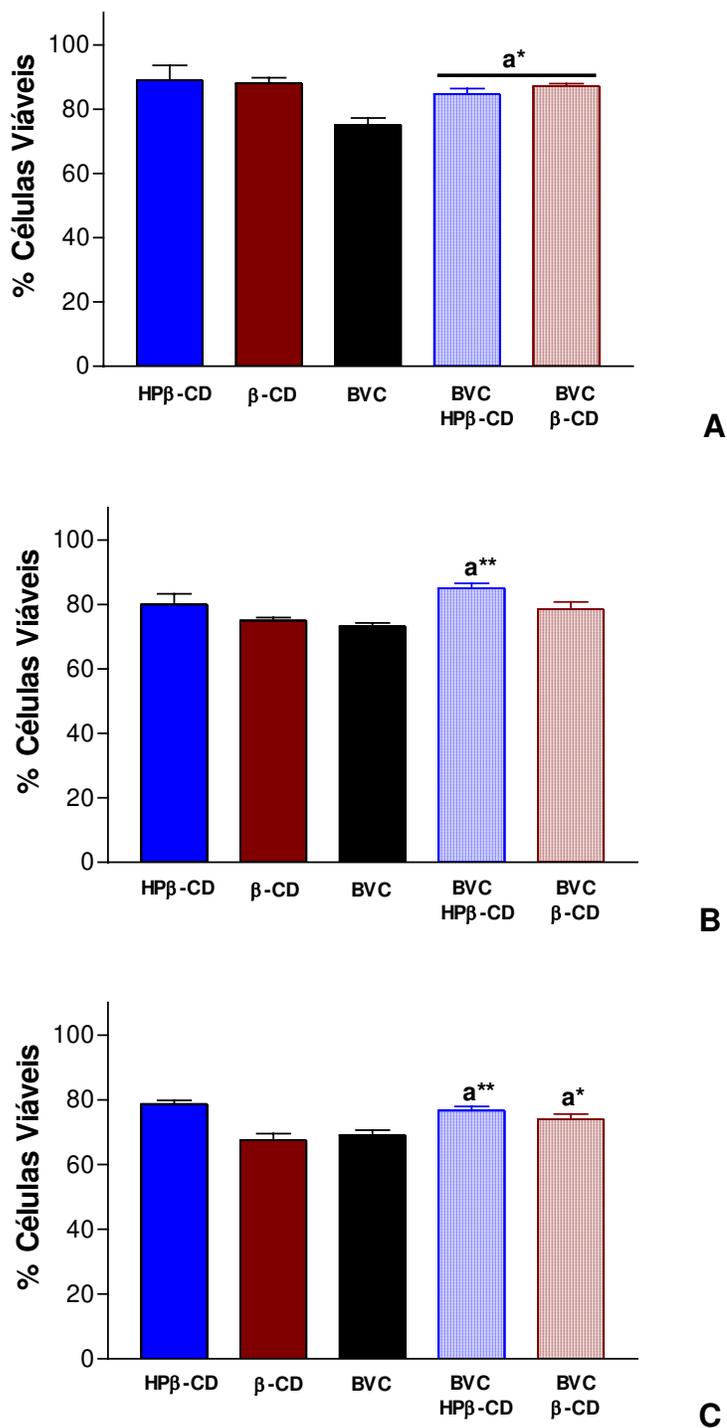


Figura 32 – Efeitos citotóxicos da β -CD, HP β -CD, BVC, BVC_{HP β -CD} e BVC _{β -CD} a 4mM (A), 8mM (B) e 16 mM (C) em células 3T3 (incubação por 2 h a 37 °C e 5% CO₂, pH 7,4) avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT (Médias \pm d.p., n=4 experimentos). **a** BVC_{HP β -CD} ou BVC _{β -CD} e BVC; * p , 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,001 (ANOVA).

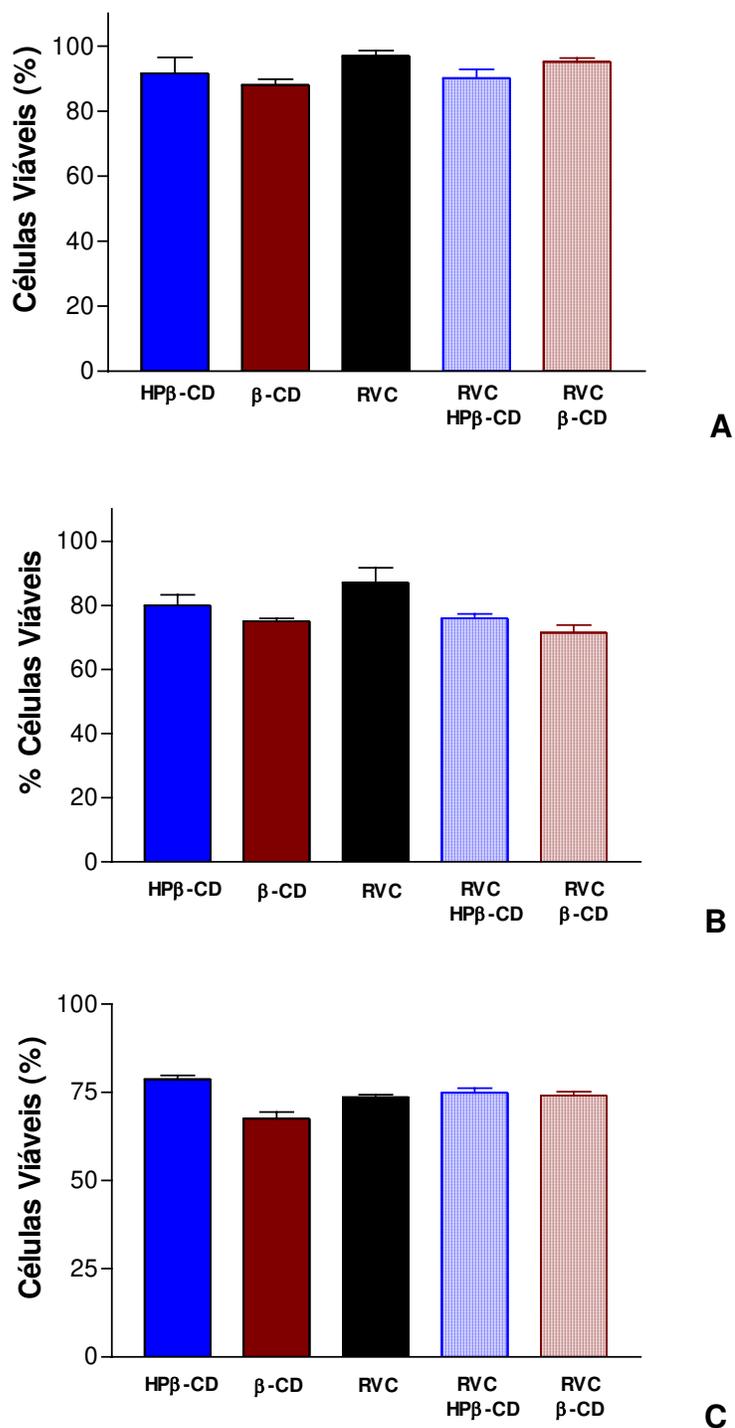


Figura 33 – Efeitos citotóxicos da β -CD, HP β -CD, RVC, RVC_{HP β -CD} e RVC _{β -CD} a 4mM (A), 8mM (B) e 16 mM (C) em células 3T3 (incubação por 2 h a 37 °C e 5% CO₂, pH 7,4) avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT (Médias \pm d.p., n=4 experimentos).

4.1.2. ANESTÉSICOS LOCAIS ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS

(LUV)

Os lipossomas (LUV, 5 mM) não apresentaram efeitos citotóxicos na concentração testada, com 100% de células viáveis após tratamento (Figura 34 A, B).

O tratamento com MVC ou RVC induziu efeitos tóxicos em células 3T3 nas concentrações de 17, 35 e 70 mM (82, 79 e 70% de células viáveis) para MVC e apenas nas maiores concentrações de RVC 8 e 16 mM (com 85 e 75 % de células viáveis, respectivamente). Em contrapartida, a encapsulação de MVC e RVC em LUV reduziu a toxicidade de ambos os anestésicos, em relação ao fármaco livre, em todas as concentrações ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) (Figura 34 A,B).

O efeito da encapsulação BVC na toxicidade celular não foi avaliado, pois estudos anteriores mostram que a formulação lipossomal não apresenta vantagens quanto ao efeito anestésico, em relação à BVC livre (Araujo et al., 2004). No entanto, comparando-se a citotoxicidade induzida por BVC livre (Figura 33) nas concentrações de 4, 8 e 16 mM, com os dados da figura 34 (A,B) pode-se observar a maior toxicidade da BVC em relação à RVC e à MVC também na forma livre, pois a maior porcentagem de células viáveis com os AL na mesma concentração, isto é, 16 mM ou 0,5% é de 70, 75 e 82 %, respectivamente para BVC, RVC e MVC.

Como citado anteriormente para os resultados de citotoxicidade nos complexos com CD, a reversão da toxicidade do fármaco livre observada após a encapsulação em lipossomas reflete a forte interação AL:Lipossoma, cujos valores de P (ligação AL:lipídios) são uma ordem de grandeza maiores que os valores de Kc (entre AL e CDs).

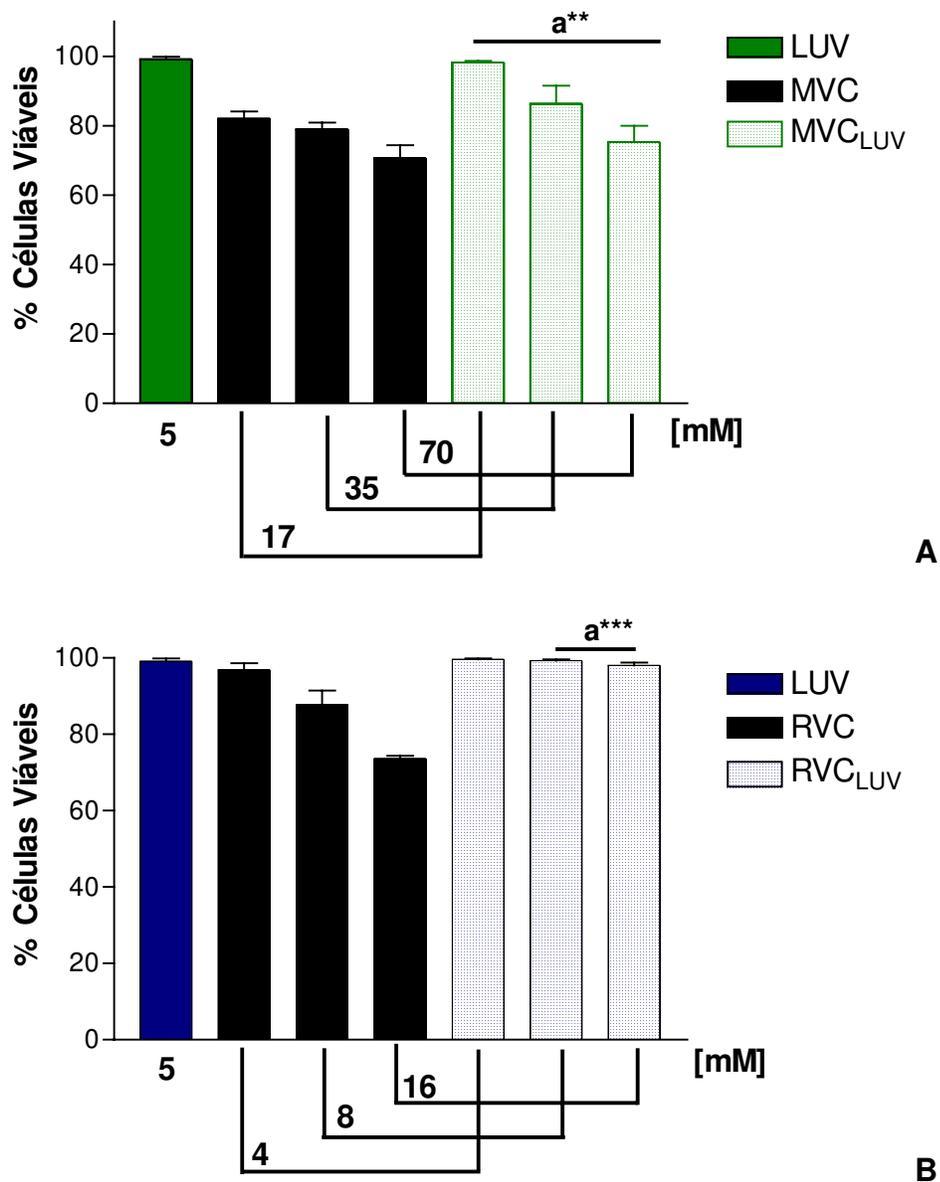


Figura 34 – Efeitos citotóxicos MVC e MVC_{LUV} (17, 35 e 70 mM) (A); RVC e RVC_{LUV} (4, 8 e 16 mM) (B) em células 3T3 (incubação por 2 h a 37 °C e 5% CO₂) avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT (médias ± d.p., n= 3 experimentos). **a** MVC_{LUV} e MVC ou RVC_{LUV} e RVC. **p < 0,01 (ANOVA).

4.2. ENSAIOS EM ERITRÓCITOS HUMANOS: HEMÓLISE

A liberação de hemoglobina é um dos melhores parâmetros para descrever a integridade de membranas de eritrócitos (Frangopol & Mihailescu, 2001). Através dos ensaios com eritrócitos humanos foi possível observar o efeito direto dos AL livres, das CD e dos AL complexados sobre essas membranas, utilizando-os como modelos de citotoxicidade (Figuras 35, 36, 37 e Tabela 7).

O modelo de toxicidade *in vitro* por hemólise não pode ser aplicado à avaliação de LUV e das formulações lipossomais de AL devido à turbidez das amostras, limitando a análise por espectrofotometria. O efeito lítico da MVC complexada com CD também não avaliado, pois esse sistema não potencializou o efeito anestésicos nos estudos *in vivo*. Porém, em relação aos outros AL utilizados (BVC e RVC), a MVC é menos lítica aos eritrócitos humanos nas mesmas condições experimentais ($C_{50\%} = 27,7 \text{ mM}$) (Malheiros et al., 2004).

Inicialmente, os ensaios hemolíticos foram realizados com os dois tipos de CDs em concentrações que variaram de $0,25 \mu\text{M}$ a 15 mM para $\beta\text{-CD}$ e de $0,25 \mu\text{M}$ a 30 mM para $\text{HP}\beta\text{-CD}$. Essas diferenças nas concentrações de CD devem-se à maior solubilidade aquosa e à menor atividade lítica da $\text{HP}\beta\text{-CD}$ descrita na literatura (Bekers et al., 1991; Irie & Uekama, 1997) e confirmada em nossos ensaios. A figura 35 ilustra os perfis hemolíticos obtidos após incubação de eritrócitos humanos com $\beta\text{-CD}$ e $\text{HP}\beta\text{-CD}$.

Utilizou-se como parâmetros de hemólise a concentração para início da lise ($C_{\text{início}}$) e a concentração para 100% de lise ou solubilização total da membrana (C_{sol}) (Lichtenberg, 1985).

A $\text{HP}\beta\text{-CD}$ apresentou a concentração para início da hemólise em $5,0 \text{ mM}$, sendo próxima à da $\beta\text{-CD}$ ($3,7 \text{ mM}$), mas atingiu a concentração para solubilização

total (C_{sol}) a 16,6 mM, que é praticamente o dobro da concentração necessária para a β -CD solubilizar a membrana (C_{sol}= 9,3 mM) (Tabela 7). Essas diferenças mostram a menor capacidade hemolítica da HP β -CD em relação à β -CD, que pode ser explicada pela presença do radical hidroxipropil, que confere maior estabilidade à HP β -CD em água e, conseqüentemente, reduz a atração desta pelos componentes lipídicos da membrana plasmática das hemáceas, necessitando assim, de maiores concentrações para causar a lise das células (Rajewski et al, 1995).

A interação das CD com membranas tem sido descrita em diversos trabalhos que, mostram desde mudanças na forma de eritrócitos (Suwalsky *et al.*, 2002) até a lise em altas concentrações (Rajewski *et al.*, 1995; Tavornvipas *et al.*, 2002), bem como trazem a discussão dos mecanismos de lise induzida por CD e até dos fatores que controlam a associação das mesmas com os componentes lipídicos das membranas (Fauvelle *et al.*, 1997; Debouzy *et al.*, 1997). Acredita-se que processo de solubilização/lise de membranas, provocado pelas CD, ocorre por um mecanismo que envolve o seqüestro de lipídios da membrana (especialmente esfingomiélin e fosfolipídios) que se complexaram na cavidade hidrofóbica da CD. A saída dos esfingo/fosfolipídios (diretamente) ou a remoção do colesterol das membranas (resultando em um aumento da fluidez) resultam na lise membranar (Irie & Uekama, 1997; Fauvelle *et al.*, 1997).

A alta atividade hemolítica das CD naturais, como observado para a β -CD, limita seu uso como carreador em formulações farmacêuticas, principalmente quando o objetivo é o uso parenteral (Debouzy *et al.*, 1997). Por isso, a β -CD tem sido substituída por seus derivados hidroxilados e sulfatados; apesar de ainda ser utilizada como parâmetro em alguns testes hemolíticos. De fato, comparando-se os resultados obtidos em fibroblastos e eritrócitos, os menores efeitos citotóxicos foram observados com a utilização de HP β -CD, em relação à β -CD.

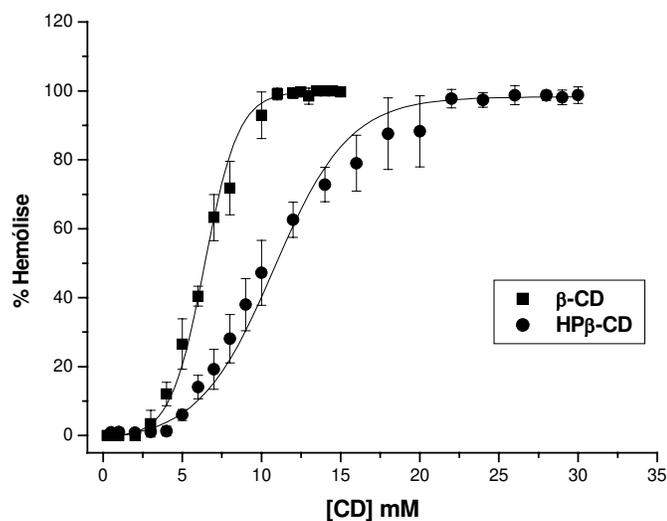


Figura 35- Efeito hemolítico da β -CD e HP β -CD sobre eritrócitos humanos incubados a 37 °C por 15 min. (Hematócrito 0,15%, pH 7,4, n=6).

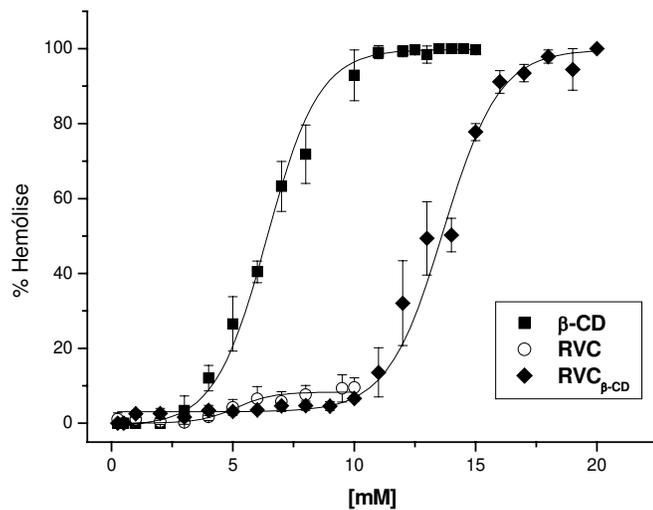
A figura 36 (A e B) mostra as curvas de hemólise induzidas pela β -CD, RVC, e pelos complexos RVC $_{\beta$ -CD e RVC $_{HP\beta$ -CD (AL:CD, 1:1). A máxima concentração de RVC utilizada foi de 10 mM, dada a sua baixa solubilidade em pH 7,4 (mesmo com a utilização de um tampão contendo DMSO 5%, para facilitar a solubilização), o que dificultou a determinação precisa da $C_{início}$.

A RVC livre (a 10 mM) induz cerca de 25% de hemólise, mas após a complexação com β -CD ou HP β -CD, fica menos lítica, mesmo nas maiores concentrações (até 20 mM) obtendo-se os valores de $C_{início}$ e C_{sol} para ambos os complexos (Tabela 7). Observou-se que os complexos induziram um deslocamento da curva de hemólise em relação ao AL e às CDs isoladamente, sendo um forte indicativo de que: i) há a complexação entre AL e as CDs; ii) a complexação AL:CD diminui a interação destes com os componentes da membrana, diminuindo a lise. Assim, os altos valores de concentração hemolítica obtidos com os complexos RVC $_{HP\beta$ -CD ($C_{início}$ = 11,2 mM e C_{sol} = 18,8 mM) e RVC $_{\beta$ -CD ($C_{início}$ = 10,9 mM e C_{sol} =

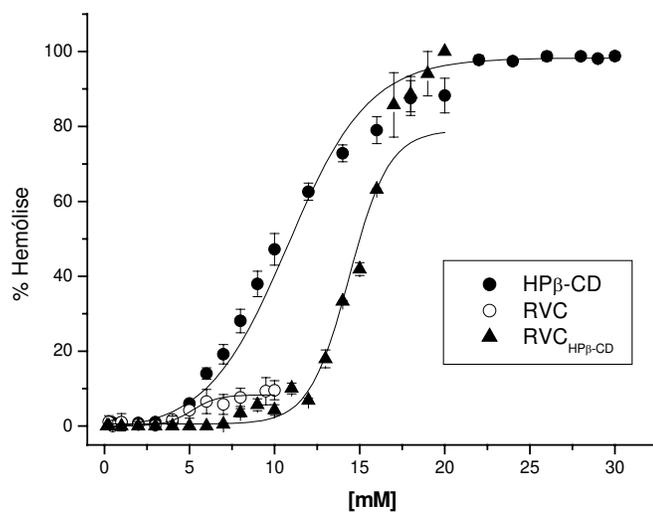
16,2 mM) indicam uma redução da toxicidade do AL e também das CD, causada pela complexação.

A curva de hemólise obtida com a BVC apresentou um perfil semelhante à observada para a RVC, o que era esperado dada à semelhança entre as propriedades físico-químicas (como solubilidade aquosa e pKa, por exemplo) desses anestésicos. A $C_{início}$ determinada para BVC livre foi de 4 mM, enquanto o complexo com β -CD produziu o mesmo efeito hemolítico a 10,3 mM (Figura 37). Assim como para a RVC, também foi observada uma redução da toxicidade da BVC e do carreador após a complexação.

Dessa forma, comparando-se os dois testes de toxicidade *in vitro* adotados (redução do MTT x hemólise) pode-se sugerir que: i) os ensaios de citotoxicidade mostraram-se mais sensíveis ao efeito dos AL, pois evidenciaram a maior toxicidade da BVC em relação à RVC, além de serem mais adequados aos objetivos propostos permitindo a avaliação das formulações lipossomais (cuja turbidez impediu o estudo pelos ensaios hemolíticos); ii) ambos os modelos de toxicidade mostraram que a complexação com CD reduz o efeito tóxico dos AL, *in vitro* e iii) as formulações de AL com HP β -CD são menos tóxicas que em β -CD, *in vitro*.



A



B

Figura 36 - Efeito hemolítico da β -CD, $HP\beta$ -CD, RVC, $RVC_{\beta-CD}$ (A) e $RVC_{HP\beta-CD}$ (B) sobre eritrócitos humanos incubados a 37 °C por 15 min. (Hematócrito 0,15%, pH 7,4, n=4-6).

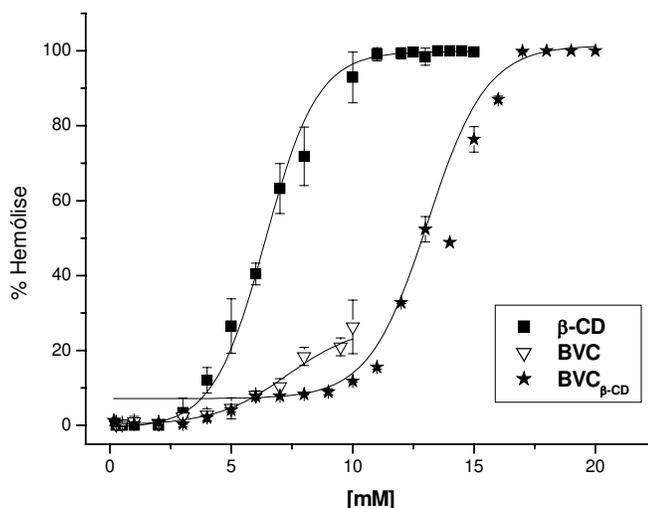


Figura 37 - Efeito hemolítico da β -CD, BVC e $BVC_{\beta-CD}$ sobre eritrócitos humanos incubados a 37 °C por 15 min. em solução (Hematócrito 0,15%, pH 7,4, n=4-6).

Tabela 7 - Concentrações para início ($C_{início}$) e solubilização total da membrana (C_{sol}) determinadas para as CDs (β -CD, $HP\beta$ -CD), AL livres (RVC e BVC) e complexados ($RVC_{\beta-CD}$, $RVC_{HP\beta-CD}$ e $BVC_{\beta-CD}$) em eritrócitos humanos (hematócrito 0,15%, pH 7,4) (n=6).

FÁRMACOS	$C_{início}$ (mM)	C_{sol} (mM)
β -CD	3,7	9,3
$HP\beta$ -CD	5,0	16,6
RVC	~ 3,7	ND*
$RVC_{\beta-CD}$	10,9	16,2
$RVC_{HP\beta-CD}$	11,2	18,8
BVC	~ 4,0	ND*
$BVC_{\beta-CD}$	10,3	16,4

*Concentrações estimadas em soluções de AL em tampão HEPES (20 mM, NaCl 154 mM, contendo 5 % de DMSO) (Malheiros et al., 2004).

**ND= não determinado devido à baixa solubilidade dos AL em pH 7,4

5. ENSAIOS *IN VIVO*: AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO NERVOSO

5.1. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO INFRAORBITAL

O efeito analgésico de formulações lipossomais, contendo os anestésicos RVC e MVC, foi avaliado após injeção na região do nervo infraorbital em concentrações clinicamente utilizadas (Tabela 8, Figuras 38 e 39). Como esperado, a administração do veículo (LUV) não induziu analgesia (dados não mostrados), porém o tratamento com as formulações lipossomais e com vasoconstritor (no caso da MVC) promoveu um aumento considerável no tempo de duração (tempo de recuperação) da analgesia e no efeito total (ASC) dos fármacos em todos os animais tratados (Tabela 8).

Desde sua descrição como método para observar a indução de analgesia em animais, o teste do bloqueio do nervo infraorbital foi bastante utilizado tanto para avaliar AL em suas preparações isoladas (Fink *et al.*, 1975; Ready & Fink, 1980) quanto em associações (com vasoconstritores) e até com novos carreadores como ciclodextrinas e outras dextranas (Hassan *et al.*, 1985a,b) ou lipossomas (Cereda *et al.*, 2004), apesar da difícil observação de parâmetros como latência e tempo para instalação do bloqueio sensorial; que são imediatos devido à proximidade do nervo no local da injeção (diretamente no palato duro). Este teste é de especial interesse para estudos pré-clínicos em Odontologia.

Com relação à RVC, observou-se que a formulação lipossomal também promoveu um aumento na duração (100% de animais com analgesia em 120 min. de experimentação com a formulação lipossomal a 0,5 %) e no efeito total do bloqueio sensorial em relação ao fármaco livre ($p < 0,001$) (Tabela 8, Figura 38).

No caso da MVC, a formulação lipossomal prolongou a duração do bloqueio sensorial (100% de animais com analgesia após 90 min. de injeção com MVC_{LUV} 2%) e aumentou a intensidade do efeito do fármaco (ASC) em relação à MVC livre ($p < 0,001$) em todas as concentrações utilizadas.

No entanto, não foi observada diferença significativa quando se comparou MVC_{LUV} e MVC_{VASO} a 2% (Tabela 8, Figura 39). Esse resultado indica uma equivalência de efeitos entre a MVC_{LUV} e MVC_{VASO} , quando utilizadas na mesma concentração.

Comparando-se os dois anestésicos, pode-se observar que a RVC é mais potente que a MVC, como verificado pelas concentrações utilizadas o que está de acordo com dados de literatura (Covino, 1986). Além disso, por ser um AL de longa duração, a RVC (diferentemente da MVC) não é apresentada em formulações farmacêuticas associada a vasoconstritores, o que explica a não utilização neste teste.

Os AL, atualmente disponíveis na clínica, ainda apresentam uma duração de ação limitada que varia com o tipo de agente anestésico e do local de bloqueio nervoso. A associação de AL com vasoconstritores foi um grande avanço para sua utilização em procedimentos cirúrgicos prolongados, mas para a analgesia pós-operatória sua duração de ação é inadequada; levando a um aumento na frequência de injeção do fármaco, o que pode causar toxicidade sistêmica, taquifilaxia e desconforto para o paciente (Hassan *et al.*, 1985a). Além disso, vasoconstritores também são contra-indicados em algumas situações clínicas o que levou à busca de novas possibilidades para prolongar a ação de fármacos anestésicos, como a utilização de lipossomas e ciclodextrinas. Assim, os resultados apresentados parecem bastante promissores no sentido de tornar formulações de AL encapsulados em lipossomas uma alternativa ao uso de vasoconstritores, especialmente em Odontologia.

Tabela 8-Tempo de recuperação e efeito total do bloqueio sensorial (ASC) induzido pelas formulações de RVC livre e lipossomal; MVC livre, lipossomal e com vasoconstritor durante o bloqueio do nervo infraorbital em ratos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 7-8/grupo). **a** RVC_{LUV} e RVC; **b** MVC_{LUV} e MVC; **c** MVC_{VASO} e MVC;

* p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001. Testes de Kruskal – Wallis (MVC) e Mann – Whitney (RVC).

Grupos	Concentração (%)	Tempo de recuperação (min)	ASC (score/h)
RVC	0,125	22,0 (22,0-27,0)	17,5 (17,5-22,5)
	0,25	38,0 (32,0-40,0)	32,5 (27,5-32,5)
	0,5	81,0 (80,0-96,0)	72,5 (67,5-82,5)
RVC _{LUV}	0,125	32,0 (28,0-37,0) ^{a **}	27,5 (22,5-32,5) ^{a **}
	0,25	50,0 (39,0-50,0) ^{a *}	42,5 (32,5-42,5) ^{a *}
	0,5	115,0 (97,0-122,0) ^{a **}	107,5 (92,5-117,5) ^{a **}
MVC	0,5	12,5 (7,5 – 27,0)	21,5 (17,0 – 27,0)
	1	27,5 (22,5 – 42,5)	36,0 (31,0 – 47,0)
	2	62,5 (50,0 - 80,0)	52,5 (42,5-67,5)
MVC _{LUV}	0,5	21,5 (17,0 – 27,0) ^{b **}	36,5 (31,0 – 43,0) ^{b **}
	1	57,5 (42,5 – 62,5) ^{b **}	66,0 (52,0 – 69,0) ^{b **}
	2	97,5 (80,0 – 110,0) ^{b **}	82,5 (67,5-97,5) ^{b **}
MVC _{VASO}	2	89 (81,0 - 94,0) ^{c **}	82,5 (72,5-87,5) ^{c **}

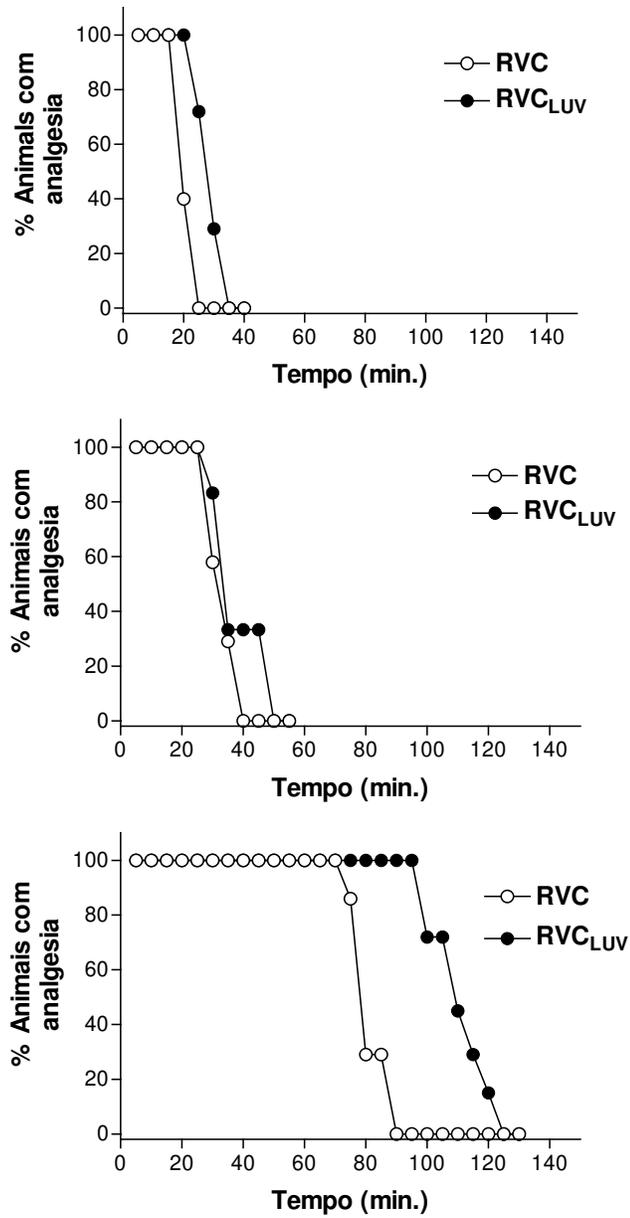


Figura 38- Porcentagem de animais com analgesia x tempo no bloqueio do nervo infraorbital induzido pelas formulações de RVC livre e lipossomal; 0,125 % (A), 0,25 % (B) e 0,5 % C (n=7-8/grupo).

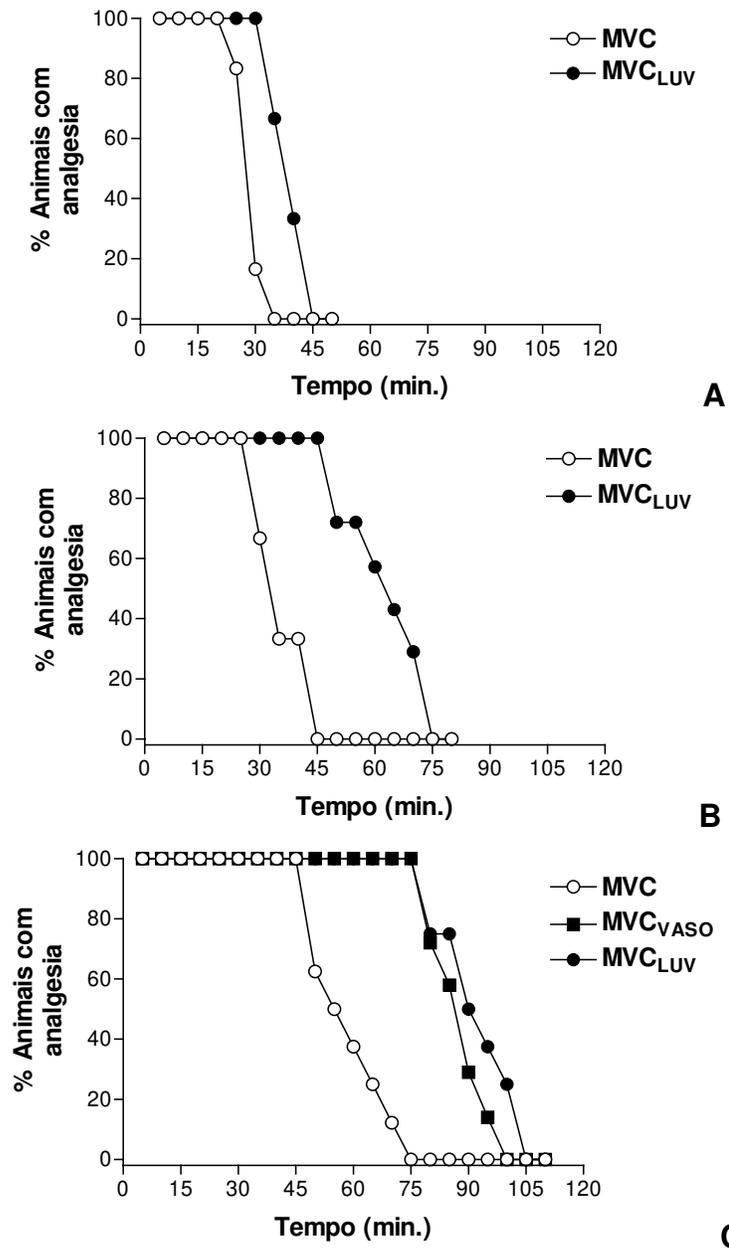


Figura 39- Porcentagem de animais com analgesia x tempo no bloqueio do nervo infraorbital induzido pelas formulações de MVC livre, lipossomal e com vasoconstritor; 0,5 % (A), 1 % (B) e 2 % (C) (n=7-8/grupo).

5.2. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO E CAUDAL - BLOQUEIO MOTOR

A injeção dos anestésicos alterou, de maneira dose-dependente, a função motora dos animais após os bloqueios caudal (injeção intratecal) e do nervo ciático (infiltração) havendo a perda reversível dos reflexos motores em todos os animais tratados.

A latência, o tempo para o efeito máximo ($T_{máx}$), tempo de recuperação e o efeito total (ASC) das formulações de BVC e RVC foram os parâmetros medidos e comparados para todos os grupos experimentais (Tabelas 9 e 10).

A BVC e a RVC (0,125; 0,25 e 0,5%) livres apresentaram perfis de bloqueio similares após a administração em camundongos (bloqueio do nervo ciático), evidenciando a equivalência de alguns efeitos como potência e duração de bloqueio nervoso quando utilizados nas mesmas concentrações. Em relação a outros anestésicos como mepivacaína, essas diferenças teriam sido bastante pronunciadas tratando-se de um fármaco mais hidrofílico e menos potente do que os estudadas (Covino, 1986; Araujo et al., 2004).

O bloqueio do nervo ciático de camundongos com RVC (0,125; 0,25 e 0,5%) mostrou-se equivalente aos efeitos observados com BVC (0,125; 0,25 e 0,5%), porém mais potente que o observado com MVC (0,5; 1 e 2%) (Araujo, 2002). Além disso, o tratamento com as formulações lipossomais ou complexadas de RVC não mostrou diferenças significantes na avaliação do bloqueio motor em relação ao fármaco livre.

De uma forma geral, o tratamento dos animais com as formulações complexadas e lipossomais não alterou parâmetros como duração do bloqueio motor e efeito total anestésico (ASC). Porém, as formulações com HP β -CD reduziram a

latência e tempo para efeito máximo dos anestésicos, quando comparadas ao fármaco livre e aos complexados com β -CD.

Com relação à BVC, os sistemas $BVC_{\beta\text{-CD}}$, $BVC_{\text{HP}\beta\text{-CD}}$ e o fármaco livre, mostraram diferenças estatísticas em relação à latência ($BVC_{\text{HP}\beta\text{-CD}}$ vs BVC e $BVC_{\text{HP}\beta\text{-CD}}$ vs $BVC_{\beta\text{-CD}}$, com $p < 0,001$) e ao $T_{\text{máx}}$, ($BVC_{\text{HP}\beta\text{-CD}}$ vs BVC e $BVC_{\text{HP}\beta\text{-CD}}$ vs $BVC_{\beta\text{-CD}}$ nas concentrações de 0,125 e 0,25% com $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Nos parâmetros tempo de recuperação e ASC, a análise estatística revelou diferenças somente entre as concentrações de uma mesma formulação (mais evidente entre 0,5 e 0,125%) e não entre as formulações testadas (Tabela 9).

Comparações entre as concentrações de RVC mostraram diferenças estatísticas em relação ao tempo de recuperação do bloqueio motor e ASC entre as formulações livres (RVC 0,5 % em relação à RVC 0,125% e RVC 0,25 %; com $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) e lipossomais (RVC_{LUV} 0,5 % e RVC_{LUV} 0,25% com $p < 0,05$; RVC_{LUV} 0,5 % e RVC_{LUV} 0,25%, $p < 0,01$). Os mesmos parâmetros também revelaram diferenças estatísticas entre os complexos $RVC_{\beta\text{-CD}}$ 0,5 % e $RVC_{\beta\text{-CD}}$ 0,125 % ($p < 0,001$) além de $RVC_{\beta\text{-CD}}$ 0,25 % e $RVC_{\beta\text{-CD}}$ 0,125 % ($p < 0,05$).

A única diferença entre as formulações foi registrada para o complexo $RVC_{\text{HP}\beta\text{-CD}}$ que reduziu a latência para instalação do bloqueio motor quando comparado à formulação livre (nas concentrações de 0,25 e 0,5% em relação à 0,125% com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Foram também observadas diferenças estatísticas entre os complexos $RVC_{\text{HP}\beta\text{-CD}}$ 0,5% e $RVC_{\text{HP}\beta\text{-CD}}$ 0,25% em relação à $RVC_{\text{HP}\beta\text{-CD}}$ 0,125% ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Tabela 10). Esses resultados sugerem que as formulações lipossomal e complexada não alteraram o tempo de duração do bloqueio motor e o efeito anestésico total (potência do bloqueio motor) induzido pela RVC, pois as diferenças observadas foram apenas em função do aumento das concentrações do anestésico.

Assim, os resultados aqui apresentados sugerem que as formulações complexadas (tanto com β -CD quanto HP β -CD) e encapsuladas em lipossomas unilamelares não modificaram o tempo de duração e o efeito anestésico total (potência do bloqueio motor) induzido por BVC e RVC, já que as diferenças observadas foram apenas em relação ao aumento das concentrações do anestésico. No entanto, os sistemas BVC_{HP β -CD} e RVC_{HP β -CD}, reduziram de forma significativa o tempo para instalação do bloqueio motor (latência), um parâmetro importante como estimativa do início de ação do anestésico. Provavelmente, esse efeito deve-se às propriedades da HP β -CD como maior solubilidade em água, facilitando o acesso de anestésicos mais hidrofóbicos como a BVC e a RVC, nela complexados, ao sítio de ação.

Tabela 9- Latência, T_{máx}, tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (ASC) induzido pelas formulações de BVC livre e complexada (β -CD e HP β -CD) durante o bloqueio do nervo ciático em camundongos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 8-10/grupo). **a** BVC_{HP β -CD} e BVC; **b** BVC_{HP β -CD} e BVC _{β -CD}; **c** BVC 0,25% e BVC 0,125%; **d** BVC _{β -CD} 0,25% e BVC _{β -CD} 0,125%; **e** BVC_{HP β -CD} 0,25 % e BVC_{HP β -CD} 0,125%; **f** BVC 0,5% e BVC 0,125%; **g** BVC _{β -CD} 0,5% e BVC _{β -CD} 0,125%; **h** BVC_{HP β -CD} 0,5% e BVC_{HP β -CD} 0,125%.

* p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 (Teste de Kruskal – Wallis).

Concentração (%)	Grupos	Latência (seg.)	T _{máx} (min.)	Tempo de recuperação (min.)	ASC (score/h)
0,125	BVC	60,0 (60,0 – 120,0)	3 (2 – 3)	20,0 (-)	22,5 (19,0 – 28,0)
	BVC_{β-CD}	60,0 (60,0 – 120,0)	3 (2 – 5)	20,0 (20 – 30)	25,0 (17,0 – 37,0)
	BVC_{HPβ-CD}	30,0 (30,0 – 60,0) ^{a,b***}	1 (1 – 2) ^{a,b***}	30,0 (20,0 – 40,0)	24,0 (17,0 – 36,0)
0,25	BVC	60,0 (60,0 – 120,0)	2 (2 – 3)	40,0 (30,0 – 40,0) ^{c*}	41,0 (37,0 – 58,0) ^{c**}
	BVC_{β-CD}	60,0 (60,0 – 120,0)	2 (2 – 3)	40,0 (30,0 – 40,0) ^{d*}	56,0 (29,0 – 68) ^{d*}
	BVC_{HPβ-CD}	30,0 (30,0 – 60,0) ^{a,b***}	1 (1 – 2) ^{a,b*}	50,0 (40,0 – 60,0) ^{e*}	60,0 (44,0 – 78,0) ^{e**}
0,5	BVC	60,0 (-)	1 (-) ^{f***}	50,0 (30,0 – 60,0) ^{f***}	58,0 (50,0 – 88,0) ^{f***}
	BVC_{β-CD}	60,0 (-)	1,5 (1 – 2) ^{g**}	50,0 (50,0 – 60,0) ^{g***}	68,0 (58,0 – 98,0) ^{g***}
	BVC_{HPβ-CD}	30,0 (-) ^{a,b***}	1 (-) ^{h*}	60,0 (50,0 – 70,0) ^{h***}	88,0 (78,0 – 98,0) ^{h***}

Tabela 10- Latência, $T_{m\acute{a}x}$, tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (ASC) induzido pelas formulações de RVC livre, lipossomal e complexada (β -CD e HP β -CD) durante o bloqueio do nervo ciático em camundongos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) ($n = 8-10$ /grupo). **i** RVC_{HP β -CD} e RVC; **j** RVC 0,25% e RVC 0,125%; **l** RVC _{β -CD} 0,25% e RVC _{β -CD} 0,125%; **m** RVC_{HP β -CD} 0,25 % e RVC_{HP β -CD} 0,125%; **n** RVC 0,5% e RVC 0,125%; **o** RVC _{β -CD} 0,5% e RVC _{β -CD} 0,125%; **p** RVC_{HP β -CD} 0,5% e RVC_{HP β -CD} 0,125%, **q** RVC_{LUV} 0,25% e RVC_{LUV} 0,125%, **r** RVC_{LUV} 0,5% e RVC_{LUV} 0,25%, **s** RVC_{LUV} 0,5% e RVC_{LUV} 0,125%

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Teste de Kruskal – Wallis).

Concentração (%)	Grupos	Latência (seg.)	$T_{m\acute{a}x}$ (min.)	Tempo de recuperação (min.)	ASC (score/h)
0,125	RVC	55,0 (25,0 – 60,0)	1 (1-2)	30,0 (20,0 – 50,0)	24,0 (13,5 – 42,5)
	RVC _{β-CD}	44,0 (20,0 – 58,0) ^{i*}	1 (-)	20,0 (20,0 – 30,0)	14,0 (14,0 – 38,0)
	RVC _{HPβ-CD}	30,0 (20,0 – 40,0) ^{i*}	1 (-)	20,0 (20,0 – 30,0)	14,0 (14,0 – 24,0)
	RVC _{LUV}	45,0 (24,0 – 60,0)	1 (1-3)	30,0 (20,0 – 40,0)	25,3 (14,0 – 46,0)
0,25	RVC	36,0 (31,0 – 50,0)	1 (1-3)	40,0 (20,0 – 50,0) ^{j*}	35,5 (14,0 – 56,5) ^{j**}
	RVC _{β-CD}	30,0 (17,0 – 48,0)	1 (1-3)	40,0 (30,0 – 70,0) ^{l*}	34,5 (24,0 – 87,5) ^{l*}
	RVC _{HPβ-CD}	20,0 (16,0 – 25,0) ^{i**}	1 (1-4)	35,0 (20,0 – 50,0) ^{m*}	30,0 (14,0 – 50,0) ^{m**}
	RVC _{LUV}	37,0 (20,0 – 60,0)	1 (1-4)	50,0 (40,0 – 80,0) ^{q**}	44,0 (33,5 – 108,0) ^{q*}
0,5	RVC	28,5 (20,0 – 60,0)	1 (1-3)	55,0 (40,0 – 70,0) ^{n*}	66,0 (47,0 – 81,0) ^{n***}
	RVC _{β-CD}	25,0 (17,0 – 37,0)	1 (1-4)	70,0 (40,0 – 70,0) ^{o***}	64,0 (26,0 – 68,0) ^{o***}
	RVC _{HPβ-CD}	15,0 (10,0 – 20,0) ^{i**}	1 (1-3)	50,0 (40,0 – 60,0) ^{p***}	67,5 (40,0 – 77,5) ^{p***}
	RVC _{LUV}	34,0 (26,0 – 48,0)	1 (1-3)	60,0 (40,0 – 70,0) ^{r,s**}	57,0 (34,-108,0) ^{r,s**}

O bloqueio caudal (injeção intratecal) induzido por BVC, também afetou a função motora dos animais tratados com o fármaco livre e com as formulações complexadas. Mais uma vez, observou-se que a latência do bloqueio motor foi reduzida pelo tratamento com BVC_{HPβ-CD}. Porém, os outros parâmetros como tempo de recuperação do bloqueio motor, T_{máx} e efeito total do fármaco, não foram alterados pela complexação da BVC com HPβ-CD (Tabela 11). Esses resultados são condizentes com aqueles obtidos previamente em camundongos através do teste do bloqueio do nervo ciático, indicando que a complexação com HPβ-CD reduz a instalação do bloqueio motor, promovendo um início de ação mais rápido, sem prolongar ou intensificar sua duração.

Tabela 11- Latência, T_{máx}, tempo de recuperação e efeito total do bloqueio motor (ASC) induzido pelas BVC livre e formulações complexada (0,5%) após injeção intratecal em ratos. Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 5/grupo). **a** BVC_{HPβ-CD} e BVC. * p < 0,05.

Concentração (%)	Grupos	Latência (seg.)	T _{máx} (min.)	Tempo de recuperação (min.)	ASC (escore/h)
0,5	BVC	40,0 (30,0 - 45,0)	1 (-)	30,0 (30,0 - 40,0)	26,5 (15,5 - 35,5)
	BVC_{β-CD}	30,0 (30,0 - 40,0)	1 (1-3)	30,0 (30,0 - 50,0)	24,0 (24,0 - 56,5)
	BVC_{HPβ-CD}	20,0 (15,0 - 20,0) ^{a*}	1 (-)	30,0 (30,0 - 40,0)	27,5 (27,5 - 37,5)

5.3. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DO NERVO CIÁTICO – BLOQUEIO SENSORIAL

A avaliação do efeito antinociceptivo, através do teste PWTP, mostrou as relações dose – efeito para os AL livres, lipossomais e complexos de inclusão de BVC e RVC com os dois tipos de CD. Os efeitos da infiltração intramuscular dos veículos (β -CD, HP β -CD e LUV), das formulações de AL livres (BVC e RVC), complexados (BVC $_{\beta$ -CD, BVC $_{HP\beta$ -CD, RVC $_{\beta$ -CD e RVC $_{HP\beta$ -CD) e lipossomal (RVC $_{LUV}$) foram avaliados ao longo do tempo em três diferentes concentrações de AL (0,125%, 0,25% e 0,5%) (Figuras 40, 41 e 42).

A infiltração dos veículos na região do nervo ciático não modificou os valores de linha basal para o limiar da dor em camundongos. Porém, todas as formulações elevaram o limiar de dor dos animais tratados, que é estatisticamente diferente do grupos controle ($p < 0,001$). Além disso, os complexos com β -CD ou HP β -CD e a formulação lipossomal aumentaram a duração e a intensidade do bloqueio sensorial, quando comparados aos fármacos livres.

A infiltração de BVC $_{\beta$ -CD ou BVC $_{HP\beta$ -CD modificou a resposta dos animais ao estímulo mecânico no PWTP, aumentando o limiar da dor e a duração do efeito antinociceptivo em até 5 h após a administração (Figura 40). A injeção dos complexos na concentração de 0,125% mostrou que a BVC $_{HP\beta$ -CD prolongou a duração da analgesia para 4 h e aumentou a intensidade do efeito analgésico quando comparada com a BVC $_{\beta$ -CD (cerca de 1,5 vezes a 180 min., $p < 0,001$) ou com o fármaco livre (2 vezes após 2 h de tratamento, $p < 0,001$) (Figura 40 A).

O tratamento com a concentração de 0,25% também mostrou o sistema BVC $_{HP\beta$ -CD como a formulação mais eficaz em potencializar o efeito analgésico nos animais tratados. Aos 240 min. após administração, a BVC $_{HP\beta$ -CD aumentou a

intensidade do efeito antinociceptivo em relação à $BVC_{\beta-CD}$ (1,8 vezes, $p < 0,001$) (Figura 40 B).

Após a infiltração de $BVC_{HP\beta-CD}$ 0,5%, observou-se um perfil semelhante ao apresentado pelo sistema $BVC_{\beta-CD}$, pois durante todo o período de experimentação as diferenças estatísticas foram somente observadas em relação ao fármaco livre (Figura 40 C). A similaridade com os efeitos da $BVC_{\beta-CD}$ (observados na concentração de 0,5%) provavelmente devem-se a uma limitação do método; já que a duração do experimento (5 horas) e o valor de máximo de pressão aplicada são previamente estabelecidos para evitar danos à pata do animal ou analgesia induzida por stress.

Assim como observado para BVC, os grupos tratados com $RVC_{HP\beta-CD}$ apresentaram os melhores efeitos em relação à duração de ação e à intensidade da analgesia induzida pelo anestésico. O tratamento dos animais com $RVC_{HP\beta-CD}$ 0,125% (Figura 41 A) foi diferente daquele com $RVC_{\beta-CD}$ até 180 min. de observação ($p < 0,001$) e a analgesia foi prolongada por até 240 min. após a injeção.

Como o efeito analgésico da RVC só foi observado até 120 min. de tratamento, ambos os sistemas ($RVC_{\beta-CD}$ e $RVC_{HP\beta-CD}$) mostraram diferenças na intensidade do limiar da dor em relação ao fármaco livre ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Além disso, a $RVC_{\beta-CD}$ e a $RVC_{HP\beta-CD}$ induziram um aumento na potência do bloqueio sensorial de cerca de 1,3 e 1,5 vezes em relação à RVC livre.

A infiltração de $RVC_{HP\beta-CD}$ 0,25% (Figura 41 B) mostrou resultados semelhantes aos obtidos com a concentração de 0,125%. Diferenças estatísticas em relação à $RVC_{\beta-CD}$ e RVC foram observadas durante todo o período de experimentação ($p < 0,01$ em 180 min.).

O ponto final da analgesia induzida por RVC_{HPβ-CD} 0,25% ocorreu 300 min. após a injeção, aumentando a potência analgésica em 1,6 vezes em 180 min. após o tratamento.

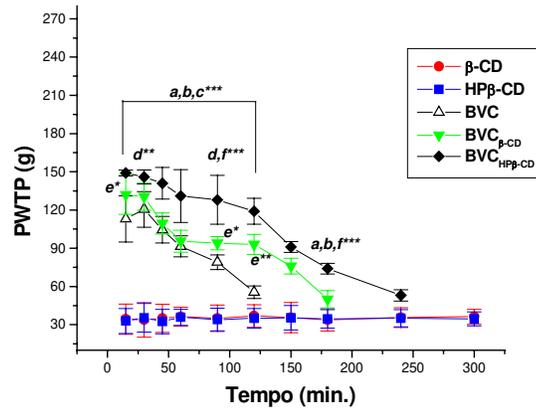
Na maior concentração testada, enquanto o tratamento com RVC_{β-CD} induziu um aumento na duração da analgesia, a administração de RVC_{HPβ-CD} prolongou a analgesia aumentando também a intensidade do efeito durante as 5 horas de experimentação (Figura 41 C). O grupo que recebeu RVC_{HPβ-CD} 0,5% foi diferente daqueles tratados com RVC_{β-CD} e RVC em relação à potência essencialmente até 240 min. após o tratamento ($p < 0,001$) sendo esta, cerca de 1,5 vezes maior.

Com relação ao sistema lipossomal, o tratamento com RVC_{LUV} 0,125 % (Figura 42 A) foi diferente daquele com RVC até 150 min. de observação e a analgesia foi prolongada por até 180 min. após a injeção ($p < 0,01$). Além disso, a RVC_{LUV} induziu um aumento na potência anestésica de cerca de 1,6 vezes em relação à RVC livre.

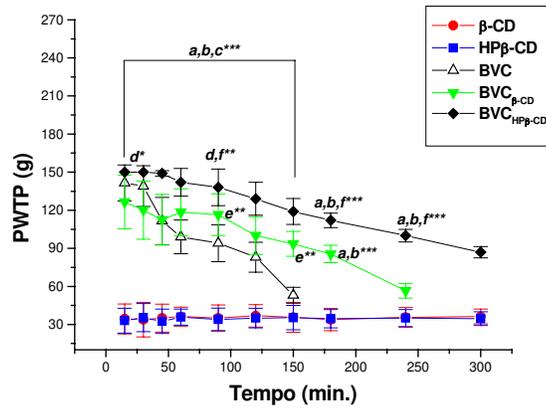
A infiltração de RVC_{LUV} (Figura 42 B) mostrou resultados semelhantes aos obtidos com a concentração de 0,125 %. Diferenças estatísticas em relação à RVC livre, foram observadas até 180 min. ($p < 0,05$), onde a RVC_{LUV} aumentou a potência analgésica em 1,5 vezes, em relação ao fármaco livre. O ponto final da analgesia induzida por RVC 0,25 % ocorreu 240 min. após a injeção.

O grupo que recebeu RVC_{LUV} 0,5 % (Figura 42 C) foi diferente daquele tratado com RVC livre em relação à intensidade da analgesia, especialmente 240 min. após o tratamento ($p < 0,001$) sendo esta, cerca de 1,6 vezes maior que a apresentada pelo fármaco livre na mesma concentração.

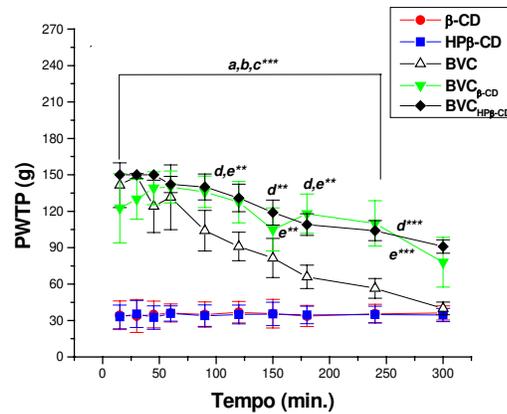
Comparando-se os sistemas com LUV, β -CD e HP β -CD para os anestésicos, observou-se que houve um benefício em relação à duração de ação e à intensidade do bloqueio sensorial em todas as concentrações utilizadas, indicando uma boa interação da BVC com os dois tipos de CDs e da RVC com os dois carreadores testados. Assim, os efeitos analgésicos pronunciados obtidos após a complexação com HP β -CD (tendo em vista a menor toxicidade desse tipo de CD) e a encapsulação em LUV tornaram as formulações, BVC_{HP β -CD}, RVC_{HP β -CD} e RVC_{LUV}, de grande interesse para o alívio da dor no período pós-operatório.



A

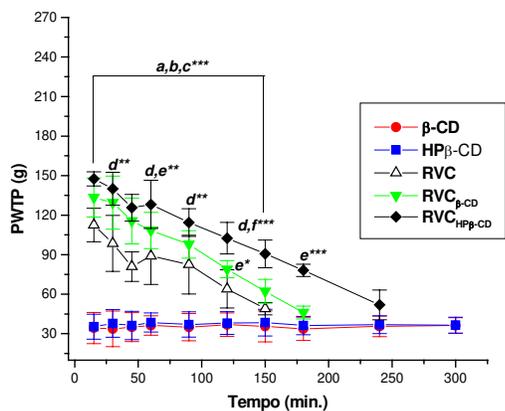


B

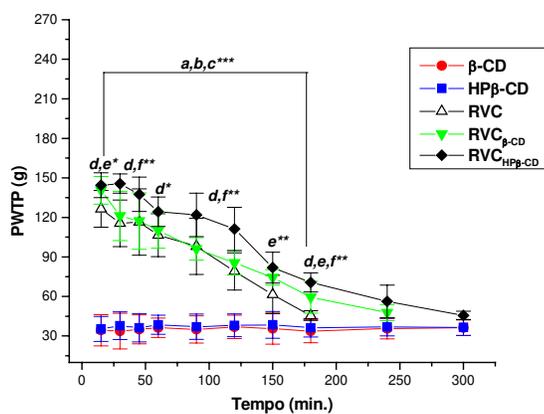


C

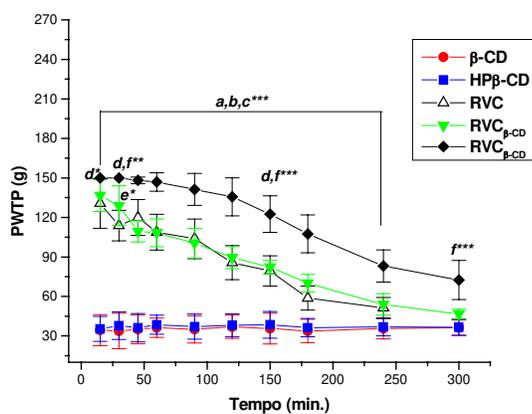
Figura 40- Curvas efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os veículos (β -CD e $HP\beta$ -CD), BVC, BVC_{β -CD e $BVC_{HP\beta$ -CD} a 0,125% (A) , 0,25% (B) e 0,5% (C). Valores expressos em média \pm d.p. (n=8-10). **a**, BVC e β -CD / $HP\beta$ -CD; **b**, BVC_{β -CD e β -CD / $HP\beta$ -CD; **c**, $BVC_{HP\beta$ -CD e β -CD / $HP\beta$ -CD; **d**, $BVC_{HP\beta$ -CD e BVC; **e** BVC_{β -CD e BVC; **f** $BVC_{HP\beta$ -CD e BVC_{β -CD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA).



A

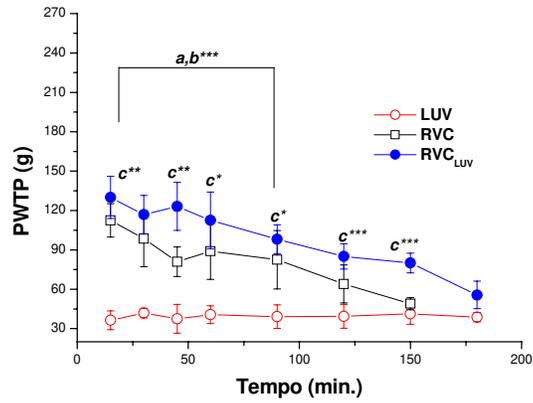


B

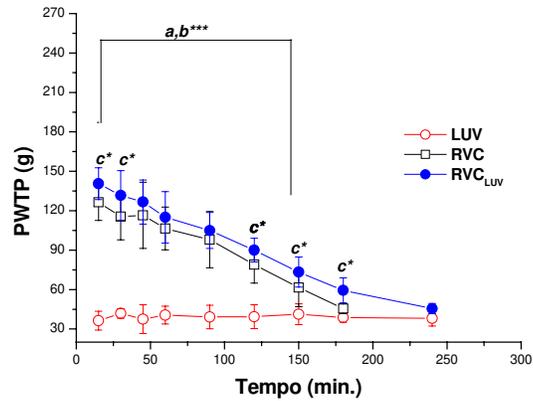


C

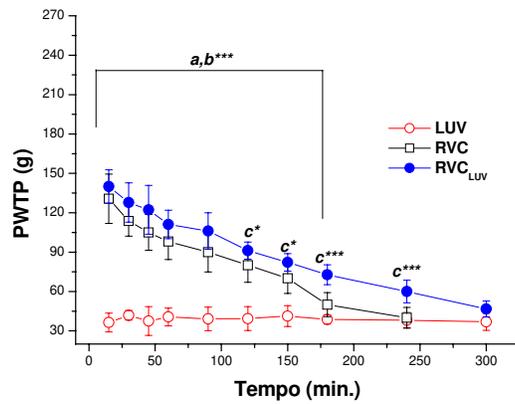
Figura 41- Curvas efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os veículos (β -CD e $HP\beta$ -CD), RVC, RVC_{β -CD e $RVC_{HP\beta$ -CD} a 0,125% (A) , 0,25% (B) e 0,5% (C). Valores expressos em média \pm d.p. ($n=8-10$). **a**, RVC e β -CD / $HP\beta$ -CD ; **b**, RVC_{β -CD e β -CD / $HP\beta$ -CD; **c**, $RVC_{HP\beta$ -CD e β -CD / $HP\beta$ -CD; **d**, $RVC_{HP\beta$ -CD e RVC; **e** RVC_{β -CD e RVC; **f** $RVC_{HP\beta$ -CD e RVC_{β -CD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA).



A



B



C

Figura 42- Curvas efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com o veículo (LUV), RVC e RVC_{LUV} a 0,125% (A) , 0,25% (B) e 0,5% (C). Valores expressos em média ± d.p. (n=8-10). **a**, RVC e LUV ; **b**, RVC_{LUV} e LUV; **c**, RVC_{LUV} RVC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA).

5.4. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO CAUDAL – BLOQUEIO SENSORIAL

De acordo com os resultados obtidos no teste do bloqueio do nervo ciático em camundongos, selecionaram-se as formulações $BVC_{\beta-CD}$ e $BVC_{HP\beta-CD}$, seguindo os mesmos critérios de administração (0,5%, 100 μ g/20 μ L), de modo a favorecer a comparação entre as formulações nos dois modelos de bloqueio nervoso. A intensidade e a duração do bloqueio sensorial induzido pela administração intratecal de $BVC_{\beta-CD}$ e $BVC_{HP\beta-CD}$ foram avaliadas durante 5 horas.

A administração intratecal das formulações aumentou o limiar de nocicepção dos animais tratados em relação à linha basal (90-140 g), o que não foi observado após a injeção dos veículos (β -CD e $HP\beta$ -CD) (Figura 43).

O tratamento com $BVC_{HP\beta-CD}$ 0,5% aumentou o limiar de nocicepção dos animais em relação à $BVC_{\beta-CD}$ e ao fármaco livre durante todo o período de experimentação, onde na fase inicial do teste (até 180 min., ou seja, o ponto final da analgesia induzida pela BVC livre), ocorreu um aumento significativo na intensidade da analgesia (cerca de 1,5 e 1,3 vezes em relação à BVC e $BVC_{\beta-CD}$, respectivamente com $p < 0,001$ e $p < 0,05$). Apesar de ambos os sistemas ($BVC_{\beta-CD}$ e $BVC_{HP\beta-CD}$) prolongarem a duração da analgesia, o efeito do complexo com $HP\beta$ -CD manteve-se maior e praticamente estável nas duas últimas horas do teste (Figura 43), evidenciando sua maior eficiência em relação à $BVC_{\beta-CD}$.

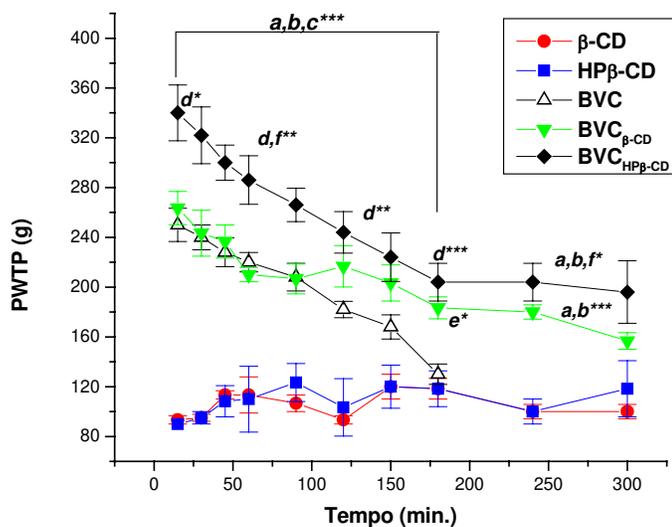


Figura 43 - Curva efeito x tempo no teste PWTP para os grupos tratados com os veículos (β -CD e HP β -CD), BVC, BVC $_{\beta$ -CD e BVC $_{HP\beta$ -CD} a 0,5% (100 μ g/20 μ L). Valores expressos em média \pm d.p. (n=5). **a** BVC e β -CD / HP β -CD; **b** BVC $_{\beta$ -CD e β -CD / HP β -CD; **c** BVC $_{HP\beta$ -CD e β -CD / HP β -CD; **d** BVC $_{HP\beta$ -CD e BVC; **e** BVC $_{\beta$ -CD e BVC; **f** BVC $_{HP\beta$ -CD e BVC $_{\beta$ -CD}. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA).

- **Considerações Finais**

Um AL ideal deve ter uma longa duração de ação, baixa toxicidade sistêmica e maior seletividade para fibras sensoriais que motoras. Essa característica de manter a analgesia sem afetar excessivamente a função motora, tem uma grande relevância clínica (Kuzma *et al.*, 1997). Embora nenhuma das formulações testadas tenha sido capaz de modificar a duração do bloqueio motor de forma significativa, as formulações complexadas com HP β -CD (BVC e RVC) apresentaram um efeito peculiar; enquanto reduziram o tempo para instalação do bloqueio motor, não aumentaram sua duração e, além disso, promoveram um efeito potencializador do bloqueio nervoso diferencial induzido pelos AL. É necessário ressaltar que algumas formulações lipossomais (MVC_{LUV} e RVC_{LUV}) e complexadas com β -CD também aumentaram o bloqueio nervoso diferencial, mas sem afetar a latência do bloqueio motor.

De fato, nossos resultados anteriores mostraram que o sistema MVC_{LUV} aumentou a intensidade e a duração do efeito analgésico (no bloqueio do nervo ciático de camundongos) em relação à MVC livre. No entanto, o sistema lipossomal não induziu qualquer alteração no efeito da BVC (Araujo *et al.*, 2004). A partir disso, foi possível sugerir que haveria um "comportamento" diferencial dos AL em relação a certos tipos de carreadores, ou seja, AL com menor partição em membranas em relação a seus homólogos da mesma série (como a MVC) seriam beneficiados pela encapsulação em lipossomas ao passo que aqueles com solubilidade aquosa limitada (como a BVC) pela complexação com CD. Assim, a fração disponível dos fármacos (em água e em lipídios) necessária à penetração na membrana, bem como a disponibilidade dos anestésicos no sítio de ação ou no local de injeção, seriam aumentadas (Araujo, 2002; Araujo *et al.*, 2004; Patentes Requeridas no INPI, protocolos nº 4.927 e 6.257).

Nos estudos com RVC, observou-se que nem sempre AL com características físico-químicas e farmacodinâmicas semelhantes (como RVC e BVC) são afetados do mesmo modo pela manipulação das formulações farmacêuticas, já que a RVC foi capaz de se beneficiar dos dois sistemas oferecidos, verificou-se que também é possível comparar as vantagens das formulações lipossomais com outras preparações já existentes (AL associados a vasoconstritores, como mostrado no teste de bloqueio do nervo infraorbital), sendo que os resultados obtidos foram satisfatórios com relação ao aumento na duração do bloqueio sensorial utilizando RVC_{LUV} e MVC_{LUV} .

Já os resultados obtidos após bloqueio caudal induzido pela injeção intratecal de BVC complexada com CD em ratos mostram um aumento na potência e a duração da analgesia tanto em relação ao fármaco livre quanto ao sistema contendo β -CD. O aumento do efeito do fármaco promovido pela complexação com as CD pode estar relacionado ao aumento da concentração de BVC total (em água e complexada) disponibilizada pelas formulações e também pela formação de uma barreira que impede ligação com as proteínas do líquido e a captação pela circulação, já que o fármaco livre (especialmente a BVC, por ser bastante hidrofóbica) apresenta uma grande capacidade de ligação às proteínas do líquido, o que reduz sua fração disponível no local de ação.

Como ressaltado por Boersma *et al.* (1992) fármacos lipofílicos (como a BVC) quando injetadas intratecalmente apresentam uma rápida distribuição e alto clearance no fluido cerebrospinal. Em consequência disso, há um início de ação mais rápido, mas uma redução na duração de ação. Dessa forma, se a complexação com CDs disponibiliza uma maior fração de BVC (mantendo também o anestésico mais tempo em contato com o nervo), as formulações complexadas seriam de grande utilidade na clínica por potencializar os efeitos analgésicos do fármaco. Nesse contexto, esse raciocínio pode ser aplicado aos dois tipos de CD utilizadas.

Apesar de ambos os sistemas, $BVC_{HP\beta-CD}$ e $BVC_{\beta-CD}$, terem potencializado o bloqueio nervoso diferencial, a formulação com $HP\beta-CD$ diferenciou-se por reduzir a latência de instalação do bloqueio motor sem aumentar sua duração, mas prolongar o bloqueio sensorial. Essa alteração na farmacodinâmica dos AL pode ser um efeito inerente à $HP\beta-CD$ (já que foi observado tanto para BVC quanto para RVC), devido a fatores como diferenças na razão de transferência dos fármacos ou dissociação do complexo (Fréville *et al.*, 1996) em relação à $\beta-CD$. Esses resultados tornam os sistemas $BVC_{HP\beta-CD}$ e $RVC_{HP\beta-CD}$ formulações úteis na clínica para o tratamento da dor aguda ou no período pós-operatório, com a vantagem de serem administrados em menores concentrações.

Nossos resultados mostram que é possível, através de formulações nanoestruturadas, desenhadas especialmente para cada AL, aumentar o bloqueio nervoso diferencial e a duração total da anestesia após administração de MVC, BVC e RVC. Dessa forma, as formulações de AL propostas podem ser utilizadas para diminuir a frequência de administrações ou diminuir a dose do AL necessária para indução de um mesmo efeito, o que é interessante para fármacos com longa duração de ação, mas com toxicidade sistêmica elevada, como a BVC.

6. AVALIAÇÃO NEURO e NEFROHISTOLÓGICA

Tendo em vista os resultados obtidos com $BVC_{HP\beta-CD}$, em termos de intensidade e duração do bloqueio sensorial e a maior aplicabilidade da $HP\beta-CD$ para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas de uso parenteral, utilizou-se o complexo para as análises neuro e nefrohistológicas.

No grupo controle (sem injeção) observou-se boa preservação morfofuncional do tecido nervoso (Figura 44 A, B e C). Neurônios morfológicamente íntegros podem ser observados na substância cinzenta em meio a vasos sanguíneos, células da glia e prolongamentos celulares. Através de colorações convencionais (H&E) pode-se distinguir apenas os corpos celulares dos neurônios, os quais possuem limites nítidos, citoplasma levemente basófilo, núcleo grande e arredondado contendo cromatina frouxa e nucléolo evidente. Com relação aos representantes gliais (astrócitos, oligodendrócitos e micróglias) estas células não possuem citoplasma visível através da coloração por H&E, sendo reconhecidas apenas pela morfologia do núcleo (geralmente pequeno e arredondado com cromatina levemente frouxa). Na substância cinzenta destacam-se as fibras nervosas e núcleos de células gliais. Tais características evidenciam um tecido nervoso sem alterações morfofuncionais.

No grupo tratado apenas com o veículo ($HP\beta-CD$) observou-se, na substância cinzenta, corpos celulares de neurônios íntegros com núcleo bem delimitado e nucléolo evidente; na substância branca constatou-se a presença de fibras nervosas (axônios) com os espaços que foram ocupados pela bainha de mielina e células da glia com núcleos evidentes (Figuras 45 A e B). Todos esses elementos denotam aspectos teciduais sem quaisquer alterações. No grupo tratado com BVC também constatou-se a presença de neurônios sem alterações do ponto de vista morfofuncional, apresentando citoplasma claro (levemente basófilo) núcleo e nucléolo evidentes além de núcleos de células gliais (Figuras 46 A e B).

Nos grupos tratados apenas com $HP\beta-CD$ ou BVC não foram observados quaisquer indícios de sofrimento celular (como necrose ou retração neuronal) ou

infiltrados inflamatórios. Já no grupo tratado com o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$ 0,5% constatou-se que, dos 5 animais tratados, dois apresentaram aspectos teciduais com alterações. Apesar de não terem sido observados edema perivascular, fagocitose pelas micróglias e macrófagos do sangue periférico e nem gliose dos astrócitos; os neurônios apresentaram sinais de sofrimento celular apresentando-se com aspecto necrótico, evidenciado pelo citoplasma roxo escuro e nucléolo pouco visível, além de retração celular (Figuras 47 A e B). As figuras 40A e B mostram aspectos teciduais sem alterações no grupo de animais tratados com o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$.

Embora tenham sido encontradas alterações teciduais no grupo tratado com o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$, é necessário ressaltar que não foram observados sinais de neurotoxicidade nos animais injetados com $HP\beta-CD$ ou BVC isoladas. Geralmente, a incidência de lesões neurológicas desencadeadas por AL nas doses habitualmente utilizadas na clínica, como a utilizada nesse estudo, é pequena; possivelmente porque as concentrações do fármaco em contato com a membrana neuronal dificilmente atinjam níveis que desencadeiem lesões (Ganem *et al.*, 2003). Além disso, a diluição do AL no líquido também reduz a concentração que entrará em contato com a membrana neuronal (Malinovsky *et al.*, 2002).

No entanto, se essas condições forem modificadas (como no caso da complexação com a $HP\beta-CD$), maiores concentrações de fármaco ficarão disponíveis para o local de ação e, conseqüentemente, em contato com a membrana neuronal. Como apresentados nos resultados dos testes de avaliação dos bloqueios motor e sensorial, o sistema $BVC_{HP\beta-CD}$ apresentou efeitos mais pronunciados até do que o complexo $BVC_{\beta-CD}$; indicando uma interação diferencial da BVC com a $HP\beta-CD$. Assim, nossos resultados sugerem que a utilização da formulação $BVC_{HP\beta-CD}$ em concentrações menores, reduziriam o efeito neurotóxico sem modificar a potência anestésica, o que caracteriza um sistema de liberação controlada.

Com relação às análises nefrohistológicas (Figuras 48 e 49), não foram observadas quaisquer alterações no córtex renal dos animais tratados, onde todas as amostras apresentaram boa preservação morfofuncional dos componentes do tecido renal. Em todos os grupos experimentais observou-se a presença de glomérulos delimitados pela cápsula de Bowman, túbulos contorcidos proximais com lúmen reduzido (devido à presença da orla em escova) e células largas, visualizadas em pouco número no corte histológico. Além dessas estruturas, observou-se também túbulos contorcidos distais caracterizados por inúmeras células cúbicas de tamanho menor que as constituintes do túbulo proximal.

As alterações renais induzidas por β -CD, ocorrem especialmente na região dos túbulos proximais e são acompanhadas por vacuolização citoplasmática, desintegração celular e mineralização. Estudos histológicos revelaram a presença de microcristais de β -CD nos túbulos proximais, indicando que a nefrose seria um resultado da reabsorção tubular da β -CD intacta que, após ser concentrada em vacúolos, precipita devido a sua baixa solubilidade aquosa e pouca capacidade de hidrólise (Frank et al., 1976). Por outro lado, há indícios de que esses cristais também possam ser constituídos de complexos formados com colesterol e/ou ésteres de colesterol podendo facilmente atravessar a membrana basal glomerular (Frijlink et al., 1990; 1991; Bekers et al., 1991).

Estudos indicam que os derivados da β -CD como HP β -CD e SBE β -CD, não induzem toxicidade renal, sendo excretados mais rápido e em maiores quantidades do que a β -CD, o que também foi constatado pelos resultados apresentados (Figura 48). Provavelmente, os baixos níveis de eliminação da β -CD provavelmente são causados por uma diminuição na razão de filtração glomerular, sendo seus derivados excretados de maneira similar à inulina (Frank et al., 1976). Esses resultados, embora preliminares, sugerem que o tratamento com a formulação complexada não induz alterações histopatológicas significantes. No entanto, novos testes deverão ser realizados para avaliar concentrações menores de anestésicos livres e complexados.

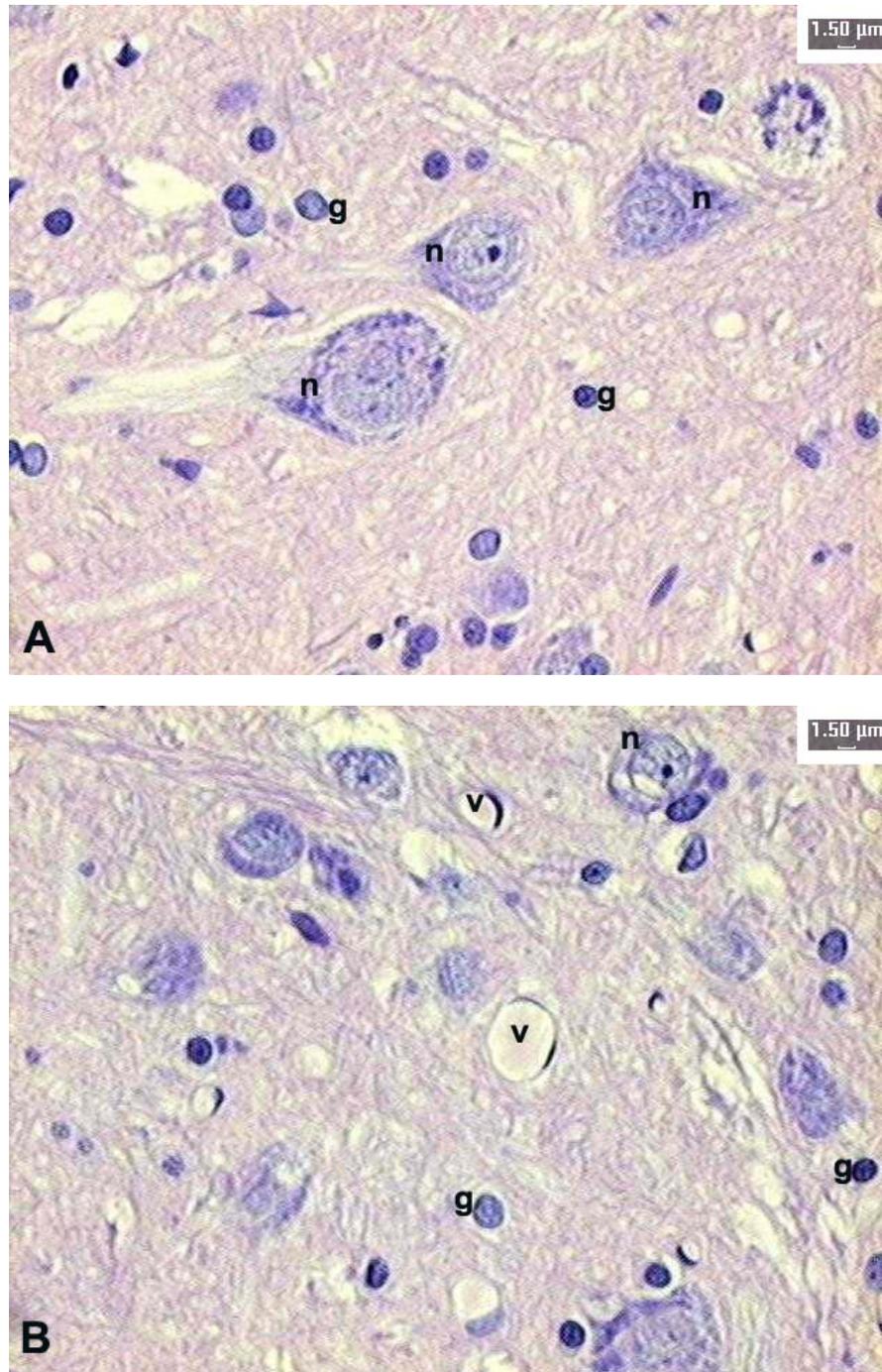


Figura 44 - Fotomicrografias de cortes da medula espinhal (L5-L6) de ratos do grupo sem injeção, corados com hematoxilina e eosina. A- substância cinzenta apresentando corpos celulares de neurônios e núcleos de células gliais (g). B- substância cinzenta com neurônios de aspecto normal: citoplasma basófilo de limites nítidos, núcleo com cromatina frouxa/homogênea e nucléolo evidente. Entre os corpos celulares dos neurônios observar núcleos de células da glia (g) e vasos sanguíneos íntegros (v). (n=5). Objetiva de 40X.

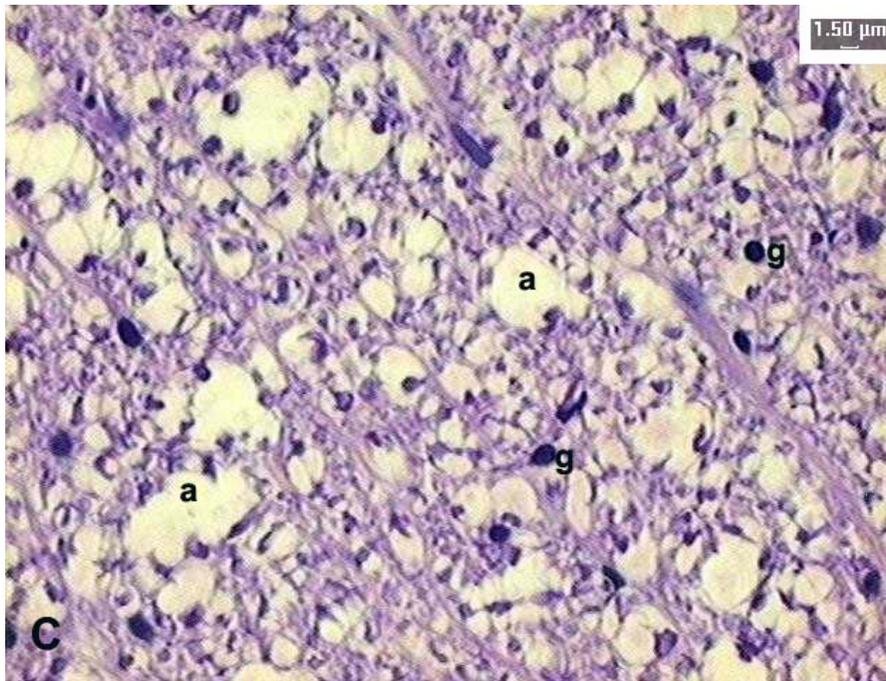


Figura 44 - Fotomicrografia de corte da medula espinhal (L5-L6) de ratos do grupo sem injeção, corado com hematoxilina e eosina. C- substância branca apresentando inúmeros axônios (a) e núcleos de células gliais (g). Observar a preservação dos componentes teciduais (n=5). Objetiva de 40X.

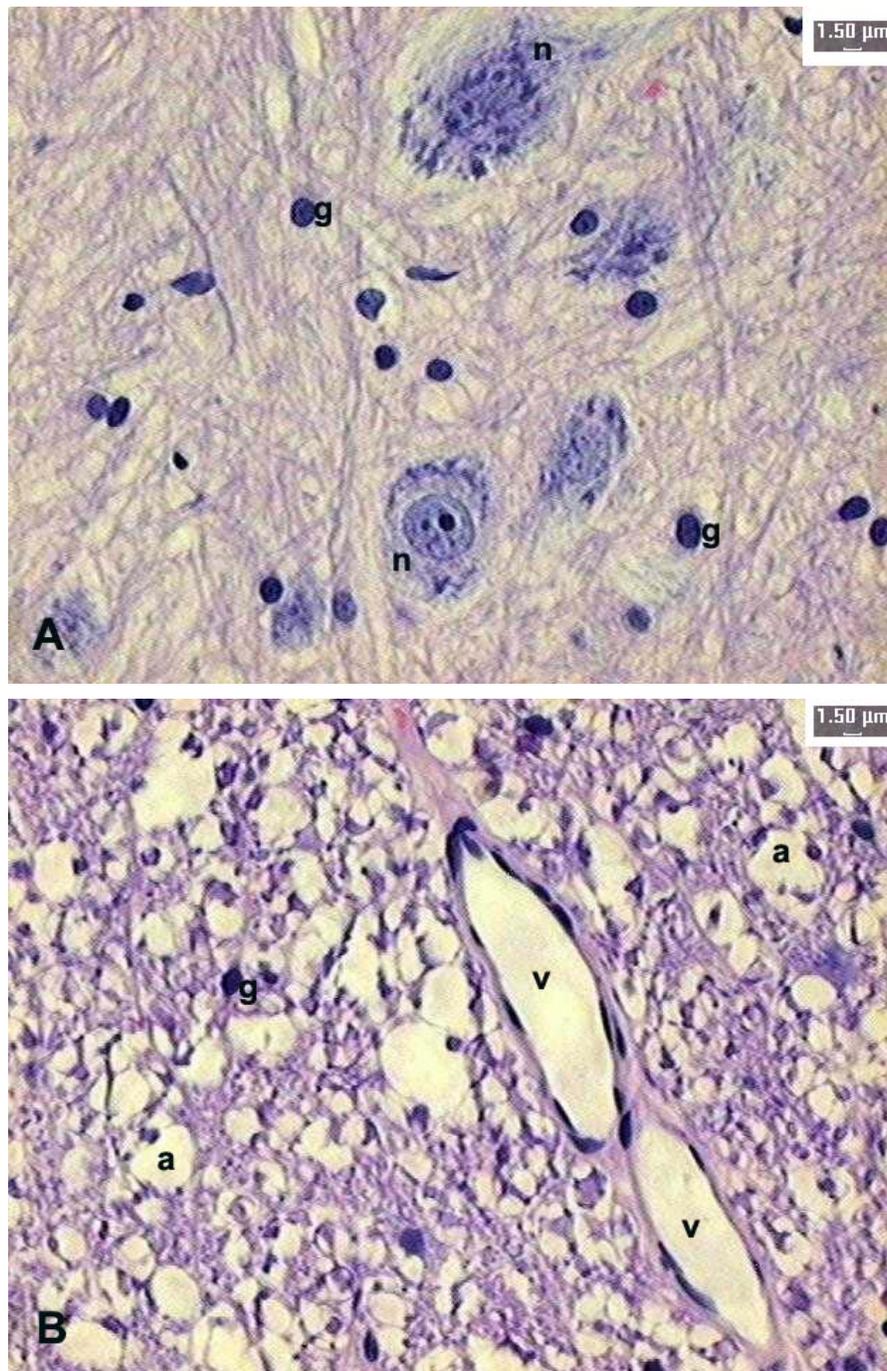


Figura 45 – Fotomicrografias de cortes da medula espinhal de ratos tratados com o veículo HP β -CD (100 μ g/20 μ L). A- notar preservação normal dos componentes do tecido nervoso apresentando neurônios (n) com citoplasma basófilo e nucléolo evidente, núcleos de células gliais (g). B- substância branca, com numerosos axônios (a) e células da glia (g). (n=5). Objetivas de 40X.

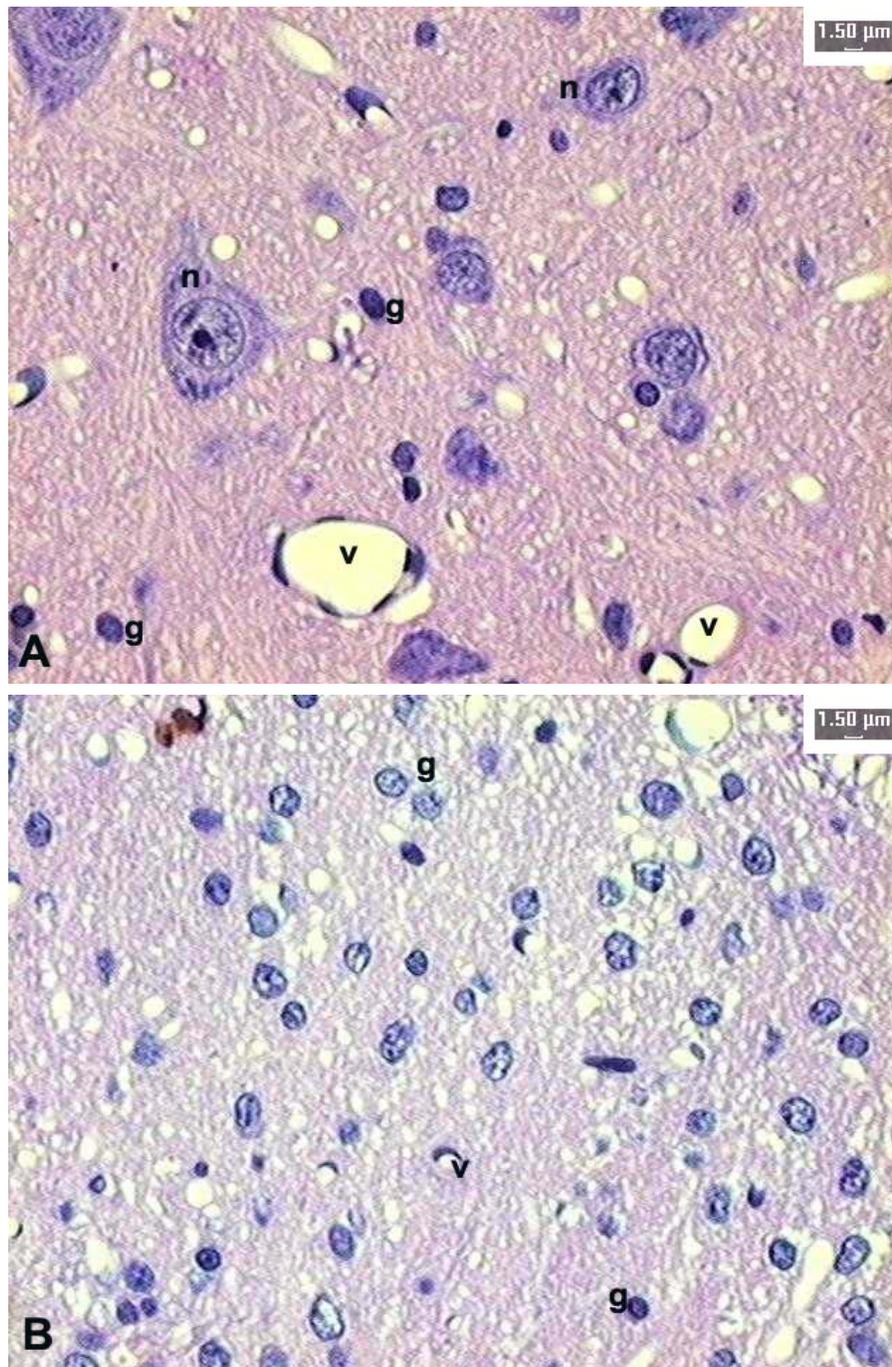


Figura 46 - Fotomicrografias de corte da medula espinhal de ratos tratados com BVC (100µg/20µL). A- Substância cinzenta apresentando corpos celulares de neurônios (n) e núcleos de células gliais (g) morfológicamente íntegros, além de vasos sanguíneos (v). B- Detalhe da substância branca com numerosos núcleos de células gliais (g). (n=5). Objetiva de 40X.

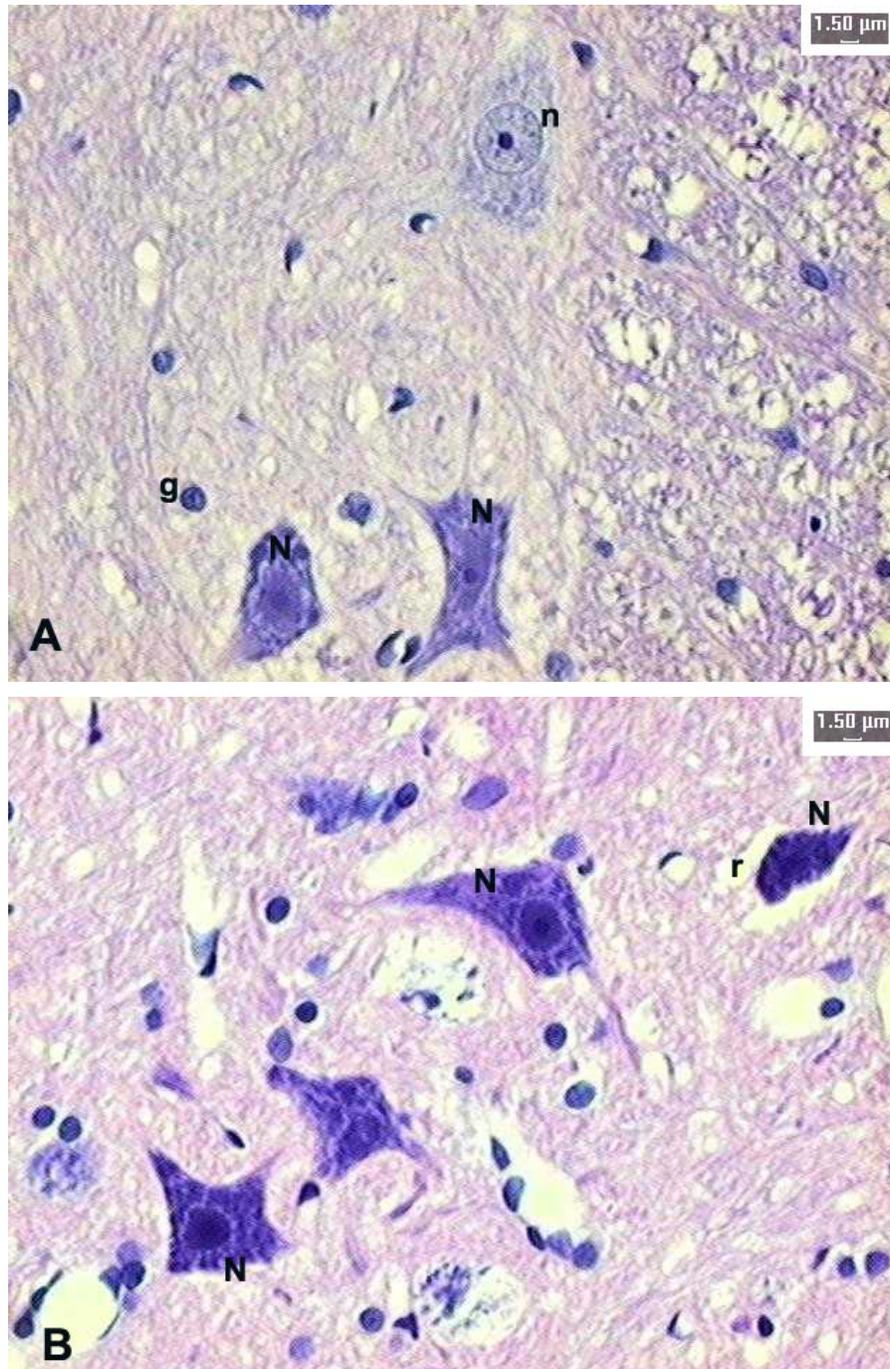


Figura 47- Fotomicrografias de cortes de medula espinhal de ratos tratados com o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$ ($100\mu\text{g}/20\mu\text{L}$). A,B- detalhes da substância cinzenta mostrando neurônios com aspecto necrótico (N) (citoplasma escuro e nucléolo não evidente) em meio a vasos sanguíneos (v) e núcleos de células gliais (g). Observar comparação com neurônio normal (n) em A e sinais de retração celular (r) em B ($n=2$). Objetiva de 40X.

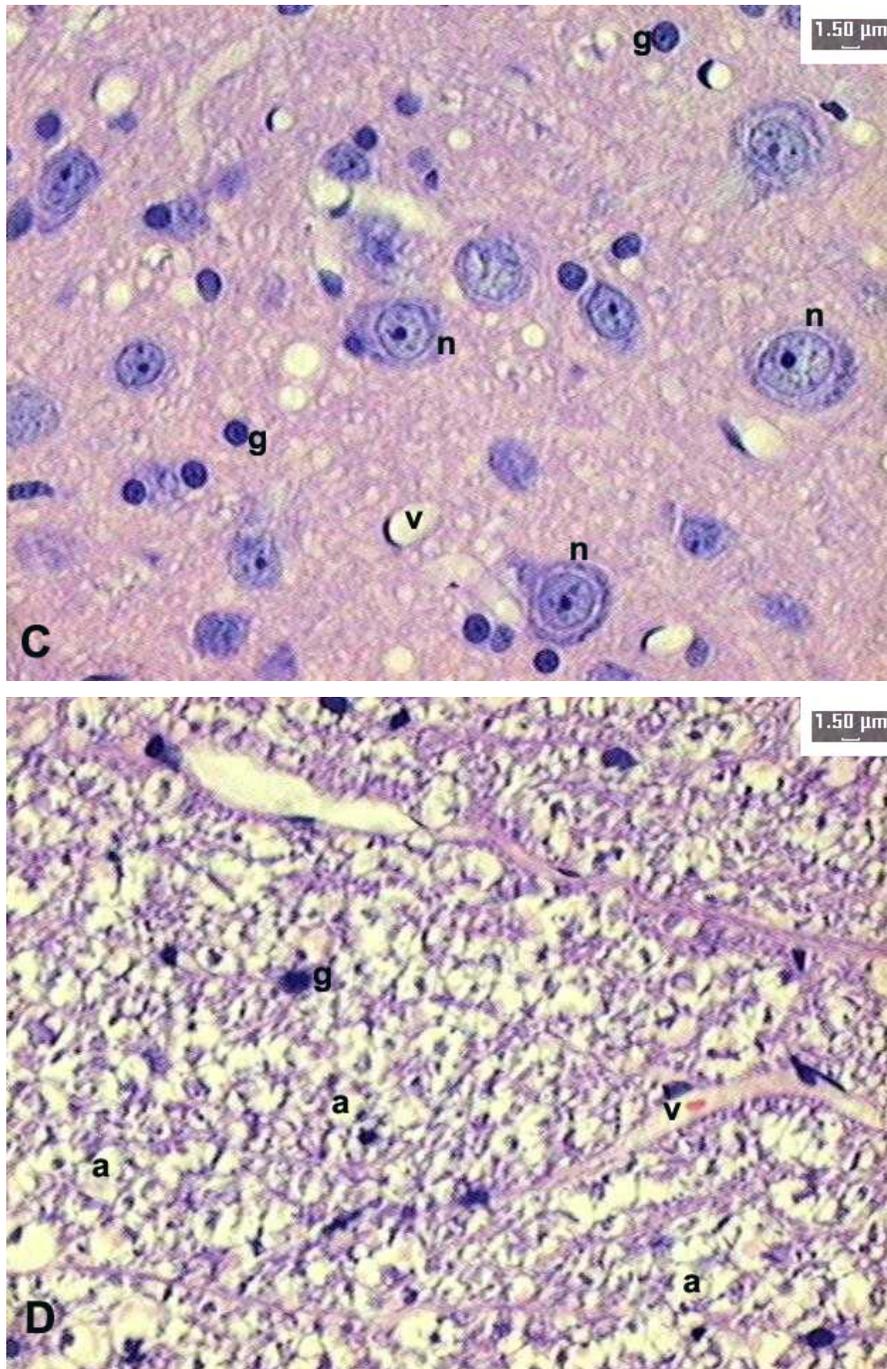


Figura 47 - Fotomicrografias de cortes da medula espinhal (L5-L6) de ratos do grupo tratados com o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$ ($100\mu g/20\mu L$), corados com hematoxilina e eosina. C- substância cinzenta mostrando corpos celulares de neurônios (n), núcleos de células gliais (g) e vasos sanguíneos (v). D- substância branca com numerosas fibras amielínicas (a), observar núcleos de células da glia (g). Notar a preservação morfofuncional dos componentes do tecido nervoso. (n=3). Objetiva de 40X.

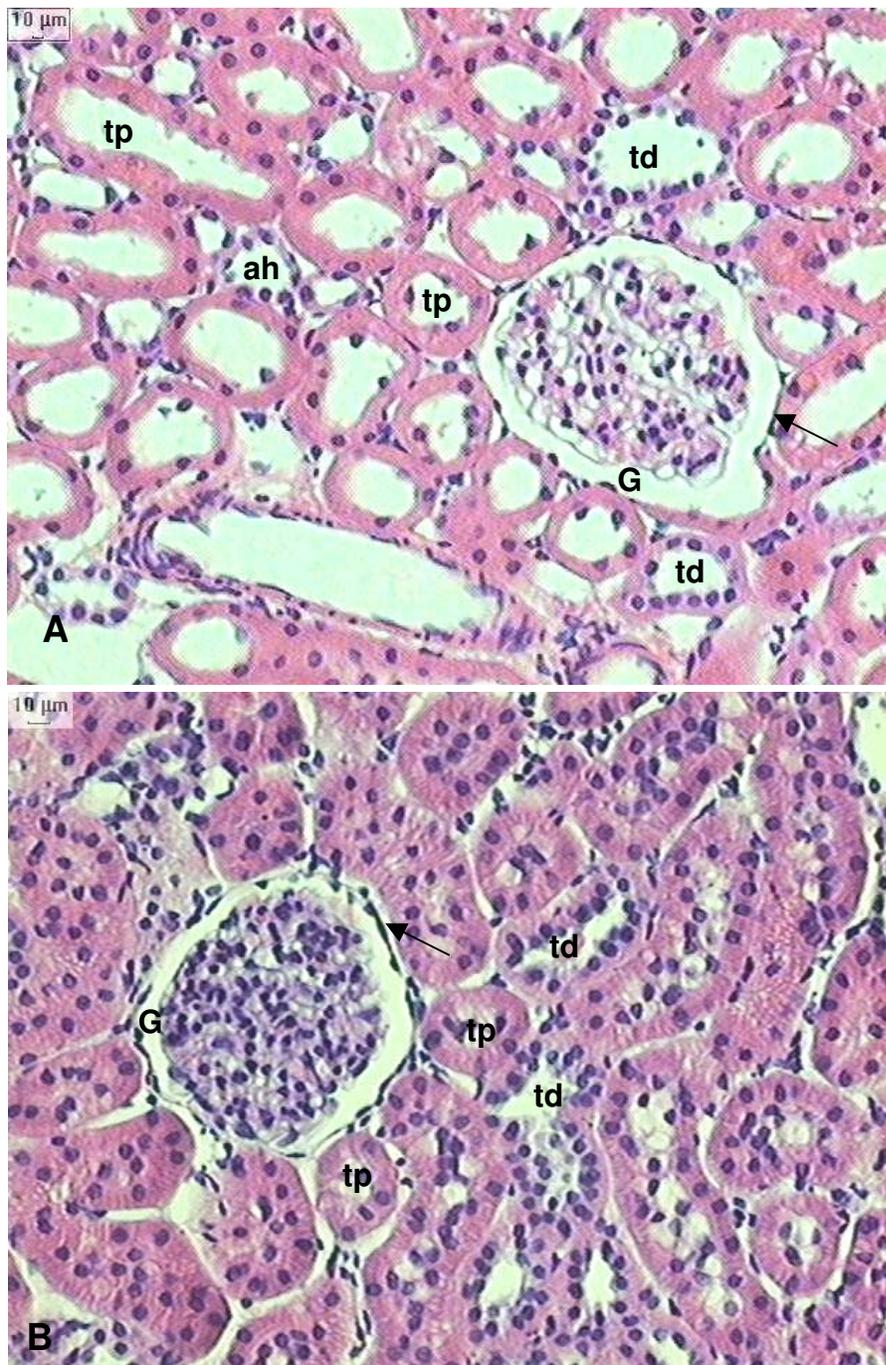


Figura 48 - Fotomicrografias de rim de ratos dos grupos: sem injeção (A) e tratado com HP β -CD (100 μ g/20 μ L) (B), corados com hematoxilina e eosina. A e B- córtex renal mostrando glomérulos (G), túbulos contorcidos proximais (tp) e túbulos contorcidos distais (td). Notar a preservação morfofuncional dos componentes do tecido renal: glomérulo com margens delimitadas pela cápsula de Bowman (seta) e presença de inúmeras células nos túbulos contorcidos distais. (n=5). Objetiva de 20X.

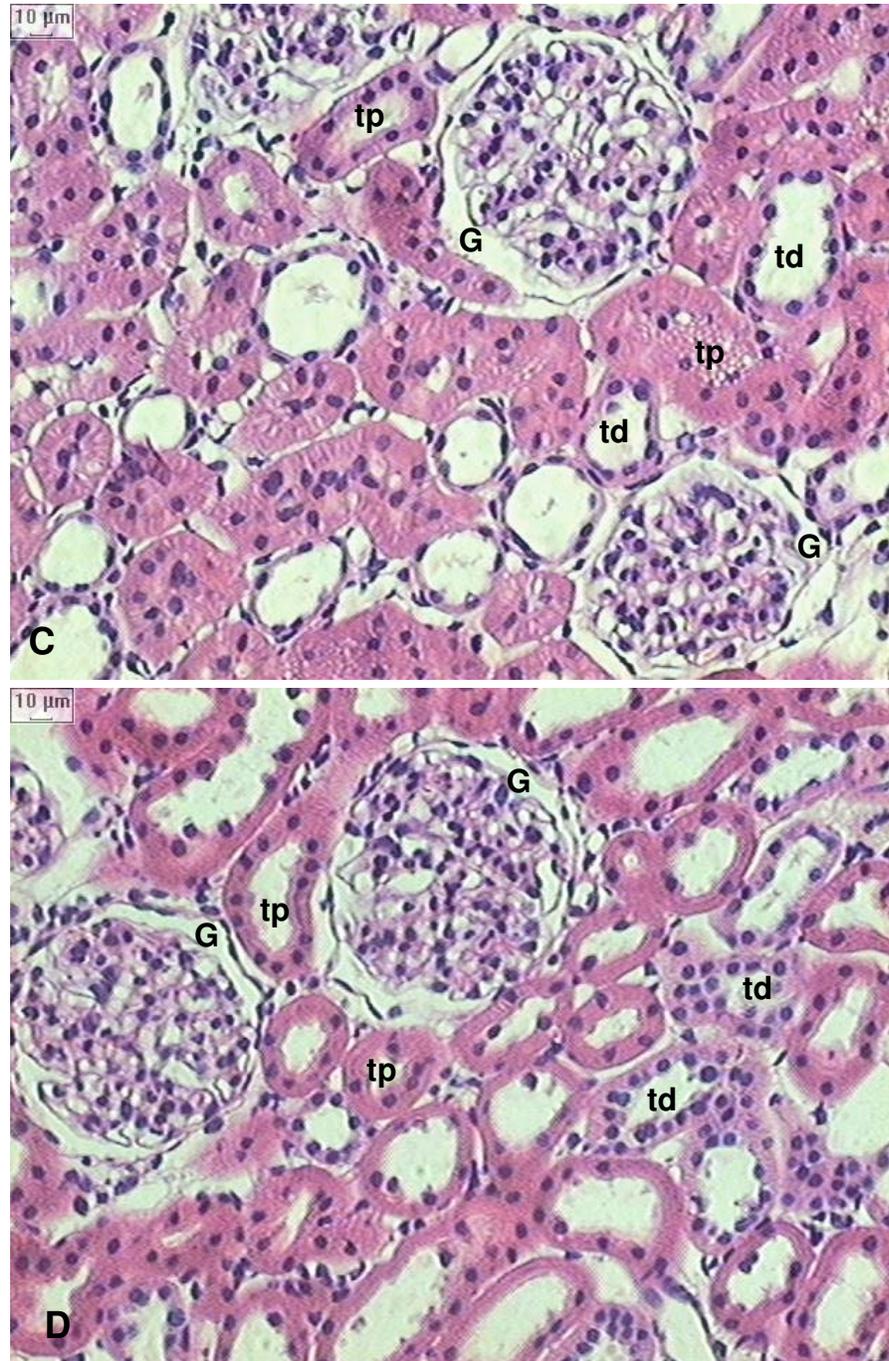


Figura 49 - Fotomicrografias de rim de ratos dos grupos tratados com BVC (C) e com o complexo BVC_{HPB-CD} (100µg/20µL) (D), corados com hematoxilina e eosina. C e D- córtex renal mostrando preservação aspectos morfofuncionais normais de glomérulos (G), túbulos contorcidos proximais (tp) e túbulos contorcidos distais (td) (n=5). Objetiva de 20X.

V. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam os sistemas de liberação controlada, MVC_{LUV}, RVC_{LUV}, RVC_{HP β -CD} e BVC_{HP β -CD}, como novas opções de utilização desses anestésicos para o tratamento da dor aguda ou no período pós-operatório, uma vez que potencializam o bloqueio nervoso diferencial, com a vantagem de serem administrados em menores concentrações pois:

- Os estudos de fluorescência revelaram que não ocorreram mudanças significantes da intensidade de fluorescência nos sistemas lipossomais contendo anestésicos locais e fluoróforo; indicando que a presença do AL em membrana ou em água não interfere na permeabilidade das vesículas tanto em função do tempo quanto após a variação de temperatura das amostras. Esses resultados indicam boa estabilidade física, mantendo o conteúdo encapsulado.
- Os testes de estabilidade química indicaram que os níveis de endoperóxidos observados nas LUV, durante o período de um ano, ocorreram devido a alterações referentes ao tempo de estocagem, sendo os maiores níveis observados após quatro meses de preparação. Porém, análises de espalhamento de luz indicaram que há alterações no tamanho das vesículas após 30 dias de preparação, inviabilizando o uso das mesmas por períodos maiores. A encapsulação de anestésicos locais não induziu mudanças nos índices de peroxidação lipídica (em um prazo de 30 dias), mesmo após a variação da temperatura de armazenamento.
- A caracterização dos sistemas com BVC, RVC, β -CD e HP β -CD por DSC mostrou evidências da formação dos complexos sólidos na razão molar testada (AL:CD) através das diferenças observadas nas temperaturas de transição de fases do anestésico isolado, em mistura física e complexado com os dois tipos de CD. As análises das micrografias obtidas por microscopia eletrônica mostraram perda do padrão morfológico dos cristais

de AL e CDs puros antes e após o processo de liofilização, indicando a formação do complexo AL:CD.

- Os estudos de cinética permitiram analisar o tempo necessário para a formação dos complexos de BVC ou RVC com β -CD e HP β -CD. Para os dois anestésicos locais, a complexação com CDs parece ocorrer ao mesmo tempo, sendo possível a observação apenas da fase de equilíbrio.
- Os experimentos de solubilidade de fases avaliaram a capacidade de complexação da BVC e RVC com a HP β -CD em solução aquosa, mostrando um aumento linear na solubilidade dos AL em função das concentrações de HP β -CD utilizadas. As características físico-químicas semelhantes da RVC e BVC também direcionaram a complexação com HP β -CD (assim como para β -CD), onde os resultados indicam um posicionamento favorável dos fármacos dentro da cavidade hidrofóbica.
- Através dos ensaios in vitro observou-se uma diminuição na liberação de BVC e RVC complexadas com HP β -CD ou com β -CD em relação aos fármacos livres, indicando que a adição de carreadores alterou a permeação das mesmas através de membranas.
- Os ensaios in vitro em cultura de fibroblastos e eritrócitos humanos, demonstraram uma diminuição da toxicidade dos anestésicos locais após complexação com CDs (BVC e RVC) ou encapsulação em lipossomas (MVC); indicando que a utilização de anestésicos locais em sistemas de liberação controlada reduz seu efeito tóxico.
- Nos ensaios in vivo observou-se que após o bloqueio do nervo infraorbital, as formulações lipossomais (MVC_{LUV} e RVC_{LUV}) prolongaram a duração e aumentaram a intensidade da analgesia em relação aos fármacos livres e

associadas a vasoconstritores (no caso da MVC), sugerindo as formulações de anestésicos locais encapsulados em lipossomas como uma alternativa ao uso de vasoconstritores para procedimentos cirúrgicos prolongados e manutenção da analgesia pós-operatória, especialmente em Odontologia.

- A avaliação dos bloqueios motor e sensorial mostrou que injeção dos AL livres e complexados alterou, de maneira dose-dependente, a função motora dos animais após os bloqueios caudal (injeção intratecal) e do nervo ciático (infiltração) havendo a perda reversível dos reflexos motores em todos os animais testados.
- Os resultados indicam que após o bloqueio do nervo ciático de camundongos, as formulações complexadas (tanto com β -CD quanto HP β -CD) não modificaram o tempo de duração e o efeito anestésico total induzidos por BVC e RVC. Porém, os sistemas BVC_{HP β -CD} e RVC_{HP β -CD}, reduziram de forma significativa o tempo para instalação do bloqueio motor (latência), um parâmetro importante como estimativa do início de ação do anestésico. Provavelmente, esse efeito deve-se às propriedades da HP β -CD como maior solubilidade em água do que a β -CD, facilitando o acesso de anestésicos mais hidrofóbicos como a BVC e a RVC.
- O bloqueio caudal (injeção intratecal) induzido por BVC, também afetou a função motora dos animais tratados com o fármaco livre ou com as formulações complexadas. A latência para instalação do bloqueio motor também foi reduzida após o tratamento dos animais com BVC_{HP β -CD}, confirmando os resultados obtidos através do teste do bloqueio do nervo ciático e indicando que a complexação com HP β -CD reduz a instalação do bloqueio motor, promovendo um início de ação mais rápido, sem prolongar ou intensificar sua duração de ação.

- A avaliação do bloqueio sensorial em camundongos, demonstrou que os sistemas $BVC_{HP\beta-CD}$ e $RVC_{HP\beta-CD}$ induziram um aumento na intensidade e duração da analgesia em relação às formulações livres e complexadas com β -CD, tornando-os de grande interesse para utilização no período pós-operatório.
- A injeção intratecal de $BVC_{HP\beta-CD}$ 0,5% aumentou o limiar de nocicepção dos animais em relação à $BVC_{\beta-CD}$ e ao fármaco livre durante todo o período de experimentação, mostrando um aumento na intensidade do bloqueio e duração da analgesia. Esses efeitos pronunciados obtidos após a complexação com CDs, podem estar relacionados ao aumento da concentração de BVC total (em água e complexada) disponibilizada pelas formulações e também por um impedimento na ligação do fármaco com as proteínas do líquido e/ou sua captação pela circulação; mantendo o anestésico mais tempo em contato com a membrana neuronal.
- Com relação à avaliação neurohistológica, os resultados sugerem que embora tenham sido encontradas alterações teciduais nos animais tratados com o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$, é necessário ressaltar que não foram observados sinais de neurotoxicidade após a injeção de $HP\beta-CD$ ou BVC isoladas. A potencialização dos efeitos da BVC após complexação com $HP\beta-CD$ devem-se à maior disponibilidade de fármaco em contato com a membrana neuronal, sugerindo que a utilização do complexo em concentrações menores (como 0,25%), reduziria o efeito neurotóxico sem modificar a potência anestésica. No entanto, a análise nefrohistológica não mostrou quaisquer indícios de alterações morfofuncionais após o tratamento dos animais com o veículo, fármaco livre ou complexada, indicando que o complexo $BVC_{HP\beta-CD}$ não induziu nefrotoxicidade após administração intratecal, confirmando a potencialidade do uso clínico desta formulação anestésica.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (1989). **Farmacopéia Brasileira**. Métodos Gerais. 3. ed. São Paulo: Andrei.
2. Åkerman, B., Arweström, E., Post, C. (1988). Local anesthetics potentiate spinal morphine antinociception. **Anesth. Analg.** **67**, 943-948.
3. Araujo, D. R. (2002). **Formulações de liberação controlada com anestésicos locais- bupivacaína e mepivacaína: preparação, caracterização e ensaios farmacológicos**. Tese de Mestrado-Instituto de Biologia-Unicamp.
4. Araujo, D. R., Pinto, L. M. A., Braga, A. F. A., de Paula, E. (2003). Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. **Rev. Bras. Anesthesiol.** **53**, 663-671.
5. Araujo, D. R., Cereda, C. M. S., Brunetto, G. B., Pinto, L. M. A., Santana, M. H. A., de Paula, E. (2004). Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. **Can. J. Anaesth.** **51**, 566-572.
6. Bekers, O., Uijtendaal, E. V., Beijnen J. H., Bult, A., Underberg, W. J. M. (1991). Cyclodextrins in the pharmaceutical field. **Drug Develop. Ind. Pharm.** **17**, 1503-1549.
7. Bennett, G., Deer, T., Stuart, D. P., Rauck, R., Yaksh, T., Hassenbusch, S. J. (2000). Future directions in the management of pain by intraspinal drug delivery. **J. Pain Symp. Manag.** **20**, 44-50.
8. Bethune, C. R., Bernards, C. M., Bui-Nguyen, T., Shen, D. D., Ho, R. J. (2001). The role of drug-lipids interactions on the disposition of liposome formulated opioid analgesics in vitro and *in vivo*. **Anesth. Analg.** **93**, 928-933.
9. Bianconi, M. L. (1998). Mechanism of action of local anesthetics: a practical approach to introducing the principles of pKa to medical students. **Biochem. Educ.** **26**, 11-13.
10. Bibby, D., Davies, N. M., Tucker, I. G. (2000). Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **Int. J. Pharmac.** **197**, 1-11.
11. Biwer, A., Antrakanian, G., Heinzle, E. (2002). Enzymatic production of cyclodextrins. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **59**, 609-617.
12. Boersma, F. P., Meert, T. F., Vercauteren, M. (1992). Spinal sulfentanil in rats: part I: epidural versus intrathecal sulfentanil and morphine. **Acta Anesthesiol. Scand.** **36**, 187-192.

13. Boogaerts, J., Declercq, A., Lafont, N., Benameur, H., Akodad, E. M., Dupont, J-M. Legros, F.J. (1993a). Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. **Anesth. Analg.** **76**, 553-555.
14. Boogaerts, J. G., Lafont, N. D., Luo, H. C., Legros, F. J. (1993b) Plasma concentrations of bupivacaine after brachial plexus administration of liposome-associated and plain solutions to rabbits. **Can. J. Anaesth.** **40**, 1201-1204.
15. Boogaerts, J. G., Lafont, N. D., Declercq, A. G., Luo, H. C., Gravet, E. T., Bianchi, J. A., Legros, F. J. (1994). Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. **J. Clin. Anesth.** **6**, 315-320.
16. Cammermeyer, J. (1960). The post-mortem origin and mechanism of neuronal hyperchromatosis and nuclear pyknosis. **Exp. Neurol.** **2**, 379-405.
17. Cammermeyer, J. (1961). The importance of avoiding "dark" neurons in experimental neuropathology. **Acta Neuropathol.** **1**, 245-270.
18. Carpenter, T. O., Pettifor, J. M., Russel, R. M., Pitha, J., Mobarhan, S., Ossip, M. S., Wainer, S., Anast, C.S. (1987). Severe hypervitaminosis A in siblings: evidence of variable tolerance to retinol intake. **J. Pediatr.** **111**, 507-512.
19. Carpenter, T. O., Gerloczy, A., Pitha, J. (1995). Safety of parenteral hydroxypropyl β -cyclodextrin. **J. Pharm. Sci.** **84**, 222-225.
20. Carpenter, K. J., Dickenson, A. H. (2002). Molecular aspects of pain research. **The Pharmacogenomics J.** **2**, 87-95.
21. 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.
22. Cederholm, I. (1997). Preliminary risk-benefit analysis of ropivacaine in labour and following surgery. **Drug Safety** **16**, 391-402.
23. Cereda, C. M. S., de Araujo, D. R., Bruneto, G. B., de Paula E., Liposomal prilocaine: preparation, characterization and in vivo evaluation. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, **7**, 235-240, 2004.
24. Collins, V. J. (1993). **Principles of Anesthesiology general and regional.** 3rd.ed. U.S.A.: Lea & Febiger, v.2.
25. Covino, B. G. (1986). Pharmacology of local anaesthetic agents. **Br. J. Anaesth.** **58**, 701-716.

26. Dalmora, M. E., Dalmora, S. L., Oliveira, A. G. (2001). Inclusion complexes of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **Int. J. Pharm.** **222**, 45-55.
27. Davis, M. E. & Brewster, M. E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews.** **3**, 1023-1035.
28. de Jong, R. H. (1994). **Local anesthetics**. U.S.A: Mosby-Year Book.
29. Debouzy, J. C., Fauvelle, F., Crouzy, S., Girault, L., Chapron, Y., Göschl, M., Gabelle, A. (1997). 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.
30. Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for the cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Meth.** **89**, 271-277.
31. de Paula, E., Schreier, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. **Bioch. Biophys. Acta** **1240**, 25-33.
32. de Paula, E., Schreier, S. (1996). Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **29**, 877-894.
33. 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.
34. 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**, 65-174.
35. 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.
36. Dollo G, Le Corre P., Freville J.C., Chevanne, F. and Le Verge, R. (2000). Biopharmaceutics of local anesthetic cyclodextrin complexes following loco-regional administration. **Ann. Pharm. Fr.** **58**, 425-432.
37. Dony, P., Dewinde, V., Vanderick, B., Cuignet, O., Gautier, P., Legrand E., Lavand'homme, P., De Kock, M. (2000). The comparative toxicity of ropivacaine and bupivacaine at equipotent doses in rats. **Anesth. Analg.** **91**, 1489-1492.

38. Emanuelsson, B. M., Person, J., Sadin, S., Alm, C., Gustafsson, L. L. (1997). Intraindividual and interindividual variability in the disposition of the local anesthetic ropivacaine in healthy subjects. **Ther. Drug Monit.** **19**, 126-131.
39. Estebe, J. P., Ecoffey, C., Dollo, G., Le Corre, P., Chevanne, F., Le Verge, R. (2002). Bupivacaine pharmacokinetics and motor blockade following epidural administration of the bupivacaine-sulfobutylether-7- β -cyclodextrin complex in sheep. **Eur. J. Anaesthesiol.** **19**, 308-310.
40. Estepa, V., Ródenas, S., Martín, M. C. (2001). Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. **Anal. Real Acad. Farm.** **67**, 1-17.
41. Fauvelle, F., Debouzy, J. C., Crouzy, S., Göschl, M., Chapron, Y. (1997). Mechanism of α -cyclodextrin-induced hemolysis. 1. The two-step extraction of phosphatidylinositol from the membrane. **J. Pharm. Sci.** **86**, 935-943.
42. Feldman, H. S., Covino, B. G. (1988). Comparative motor-blocking effects of bupivacaine and ropivacaine, a new amino amide local anesthetic, in the rat and dog. **Anesth. Analg.** **67**, 1047-1052.
43. Fink, B. R., Aasheim, G., Kish, S. J., Croley, T.S. (1975). Neurokinetics of lidocaine in the infraorbital nerve of the rat in vivo: relation to sensory block. **Anesthesiology** **42**, 731-736.
44. Fletcher, D., Le Corre, P., Guilbaud, G., Le Verge, R. (1997). Antinociceptive effect of bupivacaine encapsulated in poly(D,L)-lactide-co-glycolide microspheres in the acute inflammatory pain model of carrageenin-injected rats. **Anesth. Analg.** **84**, 90-94.
45. Frank, D. W., Gray, J. E., Weaver, R. N. (1976). Cyclodextrin nephrosis in the rat. **Am. J. Pathol.** **83**, 367-382.
46. Frangopol, P. T., Mihailescu, D. (2001). Interactions of some local anesthetics and alcohols with membranes. **Coll. Surfaces B: Interfaces** **22**, 3-22.
47. Fréville, J.C., Dollo, G., Le Corre, P., Chevanne, F., Le Verge, R. (1996). Controlled systemic absorption and increased anesthetic effect of bupivacaine following epidural administration of bupivacaine-hydroxypropyl β -cyclodextrins complex. **Pharm. Res.** **13**, 1576-1580.
48. Frijlink, H. W., Visser, J., Hefting, N. R., Oosting, R., Meijer, D. K. F., Lerk, C. F. (1990). The pharmacokinetics of β -cyclodextrin in the rat. **Pharm. Res.** **7**, 9-16.
49. Frijlink, H. W., Eissens, A C., Hefting, N. R., Poelstra, K., Lerk, C. F., Meijer, D. K. F. (1991). The effect of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat. **Pharm. Res.** **8**, 1248-1252.

50. Frömmling, K.-H. & Szejtli, J. (1994). **Topics in Inclusion Science - Cyclodextrins in Pharmacy**, Hungria: Kluwer Academic Publishers.
51. Ganem, E. M., Vianna, P. T. G., Marques, M., Castiglia, Y. M. M., Vane, L. A. (2003). Efeitos da administração subaracnóidea de grandes volumes de lidocaína a 2% e ropivacaína a 1% sobre a medula espinhal e as meninges. Estudo experimental em cães. **Rev. Bras. Anesthesiol.** **53**, 351-360.
52. Gantenbein, M., Attolini, L., Bruguerolle, B. (1996). Potassium channel agonists modify the local anesthetic activity of bupivacaine in mice. **Can. J. Anaesth.** **43**, 871-876.
53. Gantenbein, M., Abat, C., Attolini, L., Pisano, P., Empeiraire, N., Bruguerolle, B. (1997). Ketamine effects on bupivacaine local anaesthetic activity and pharmacokinetics of bupivacaine. **Life Sci.** **61**, p.2027-2033.
54. Gesztes, A., Mezei, M. (1988). Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine. **Anesth. Analg.** **67**, 1079-1081.
55. Gloxhuber, C. (1980). **Anionic Surfactants-Biochemistry, Toxicology, Dermatology**. Marcel Dekker, New York, vol. 10.
56. Goulet, J-P., Pérusse, R., Turcotte, J-Y. (1992). Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: part III. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** **74**, 692-697.
57. Grant, G. J., Davidson, E. M., Barenholz, Y. (2001). Liposomal bupivacaine produces prolonged analgesia in humans. **Anesthesiol.** **95**, A926.
58. Grant, G. J., Bansinath, M. (2001). Liposomal delivery systems for local anesthetics. **Reg. Anesth. Pain. Med.** **26**, 61-63.
59. Grant, S. A. (2002). The holy grail: long-acting local anaesthetics and liposomes. **Best Prac. & Res. Clin. Anesthesiol.** **16**, 345-352.
60. Gupta, S. P. (1991) Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. **Chem. Rev.** **91**, 1109-1119.
61. Heavner, J. E. (2002). Cardiac toxicity of local anesthetics in the intact isolated heart model: a review. **Reg. Anesth. Pain Med.** **27**, 545-555.
62. Hassan, H. G., Renck, H., Lindberg, B., Åkerman, B., Hellquiste, R. (1985a). Effects of adjuvants to local anesthetics on the duration. I. Studies of dextrans of widely varying molecular weight and adrenaline in rat infraorbital nerve block. **Acta Anaesth. Scand.** **29**, 375-379.

63. Hassan, H. G., Renck, H., Lindberg, B., Lindquiste, B., Åkerman, B. (1985b). Effects of adjuvants to local anesthetics on the duration. II. Studies of some substituted dextrans and other macromolecules in rat infraorbital nerve block. **Acta Anaesth. Scand.** **29**, 380-383.
64. Helenius, A.; Simons, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**:29-79.
65. Higuchi, T, Connors, K.A. (1965). Phase-solubility techniques. **Adv. Anal. Chem. Instr.** **4**, 117-212.
66. Hogan, Q., Dotson, E., Ericsson, S., Kettler, R., Hogan, K. (1994). Local anesthetic myotoxicity: a case and review. **Anesthesiology**, **80**, 942-947.
67. Irie, T., Uekama, K. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm. Sci.** **86**, 147-162.
68. Jang, J., Yaksh, T., Hill, H. (1992). Use of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as an intrathecal drug vehicle with opioids. **J. Pharm. Exp. Ther.** **261**, 592-600.
69. Kachel, K., Asuncion-Punzalan, E., London, E. (1998). The location of fluorescence probes with charged groups in model membranes. **Biochim. Biophys. Acta.** **1374**, 63-76.
70. Kalinkova, G. N. (1999). Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. **Int. J. Pharm.** **187**, 1-15.
71. Kirjavainen, M., Urtti, A., Jääkaläinen, I., Suhonen, T. M., Paronen, P., Valjakka-Koskela, J., Mönkkönen, J. (1996). Interaction of liposomes with human skin in vitro- the influence of lipid composition and structure. **Biochim. Biophys. Acta.** **1304**, 179-189.
72. Kytä, J., Heinonen, E., Rosenberg, P. H., Wahlström, T., Gripenberg, J., Huopaniemi, T. (1986). Effects of repeated bupivacaine administration on sciatic nerve and surrounding muscle tissues. **Acta Anaesth. Scand.** **30**, 625-629.
73. Knudsen, J., Suurküla, M. B., Bolmberg, S., Sjövall, J., Edvardsson, N. (1997). Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. **Br. J. Anaesth.** **78**, 507-514.
74. Kuzma, P. J., Kline, M. D., Calkins, M. D., Staats, P. S. (1997). Progress in the development of ultra-long-acting local anesthetics. **Reg. Anesth.** **22**, 543-551.
75. Lafont, N. D., Legros, F. J., Boogaerts, J. G. (1996). Use of liposome-associated bupivacaine in a cancer pain syndrome. **Anaesthesia** **51**, 578-579.
76. Lakowicz, J. R. (1983). **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum.

77. Langerman, L., Grant, G. J., Zakowski, M., Golomb, E., Ramanathan, S., Turndorf, H. (1992). Prolongation of epidural anesthesia using a lipid carrier with procaine, lidocaine and tetracaine. **Anesth. Analg.** **75**, 900-905.
78. Lemonica, L., Perreira, S. M. (1992). Dor: bases anatomo-fisiológicas e do tratamento. In: Braz, J. R. C., Castiglia, Y. M. **Temas de Anestesiologia para o curso de graduação em medicina.** São Paulo: UNESP.
79. Leszczynska, K., Kau, S. T. (1992). A sciatic blockade method to differentiate drug-induced local anesthesia from neuromuscular blockade in mice. **J. Pharmacol. Meth.** **27**, 85-93.
80. 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.
81. Lichtenberg, D. (1985). Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. **Biochim. Biophys. Acta.** **821**, 470-478.
82. Lichtenberg, D., Barenholz, Y. (1988). Liposomes: preparation, characterization and preservation. **Meth. Biochem. Anal.** **33**, 337-462.
83. Loftsson, T., Masson, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int. J. Pharm.** **225**, 15-30.
84. 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.
85. 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.
86. Malheiros, S. V. P., Pinto, L. M. A., Gottardo, L., Yockaichiya, D. K., Fraceto, L. F., Meirelles, N., de Paula, E. (2004). A new look at the hemolytic effect of local anesthetics considering their rela membrane/partitioning at pH 7.4. **Biophys. Chem.** **110**, 213-221.
87. Malamed, S. F. (2001). **Manual de anestesia local.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
88. McCrae, A. F., Jozwiak, H., McClure, J. H. (1992). Comparison of ropivacaine and bupivacaine in extradural analgesia for the relief of pain in labour. **Br. J. Anaesth.** **74**, 261-265.
89. Malinovsky, J. M., Pinaud, M. (1996). Neurotoxicité des agents administrés par voie intrathécale. **Ann. Fr. Anesth. Reanim.** **15**, 647-658.
90. Malinovsky, J-M., Benhamou, D., Alafandy, M., Mussini, J-M., Coussaert, C., Couarraze, G., Pinaud, M., Legros, F. J. (1997a). Neurotoxicological assessment after intracisternal injection of liposomal bupivacaine in rabbits. **Anesth. Analg.** **85**, 1331-1336.

91. Malinovsky, J. M., Bernard, J. M., Baudrimont, M., Dumand, J. B., Lepage, J. Y. (1997b). A chronic model for experimental investigation of epidural anesthesia in the rabbit. **Reg. Anesth.** **22**, 80-85.
92. Malinovsky, J-M., Le Corre, P., Meunier, J-F., Cheveanne, F., Pinaud, M., Le Verge, R., Legros, F. (1999). A dose-response study of liposomal bupivacaine in rabbits. **J. Contr. Rel.** **60**, 111-119.
93. Malinovsky, J-M., Charles, F., Kick, O., Lepage, J-Y., Malinge, M., Cozian, A., Bouchot, O., Pinaud, M. (2000). Intrathecal anesthesia: ropivacaine versus bupivacaine. **Anesth. Analg.** **91**, 1457-1460.
94. Malinovsky, J-M., Charles, F., Baudrimont, M., Péréon, Y., Le Corre, P., Pinaud, M., Benhamou, D. (2002). Intrathecal ropivacaine in rabbits: pharmacodynamic and neurotoxicologic study. **Anesthesiology** **97**, 429-435.
95. Markham, A., Faulds, D. (1996). Ropivacaine. A review of its pharmacology and therapeutic use in regional anaesthesia. **Drugs.** **52**, 429-449.
96. Másson, M., Loftsson, T., Másson, G., Stefánsson, E. (1999). Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. **J. Contr. Rel.** **59**, 107-118.
97. Matioli G. (2000). Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. Maringá: Eduem.
98. McClure, J. H. (1996). Ropivacaine. **Br. J. Anaesth.** **76**, 300-307.
99. 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.
100. Meert, T. F., Melis, W. (1992). Interactions between epidurally and intrathecally administered sulfentanil and bupivacaine in hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the rat. **Acta Anaesthesiol. Scand.** **43**, 79-89.
101. Mestre, C., Péliissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., Eschalié, A. (1994). A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **J. Pharm. Toxic. Meth.** **32**, 197-200.
102. Mowat, J. J., Mok, M. J., MacLeod, B. A., Madden, T. D. (1996). Liposomal bupivacaine. **Anesthesiol.** **85**, 635-643.
103. New, R. R. C. (1990). **Liposomes-a practical approach**. Oxford: IRL.
104. Nishiyama, T., Ho, R. J., Shen, D. D., Yaksh, T. L. (2000). The effects of intrathecal morphine encapsulated in L- and D- dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes and acute nociception rats. **Anesth. Analg.** **91**, 423-428.

105. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxids in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** **95**, 351-358.
106. Ohmura, S., Kawada, M., Ohta, T., Yamamoto, K., Kobayashi, T. (2001). Systemic toxicity and resuscitation in bupivacaine, levobupivacaine or ropivacaine – infused rats. **Anesth. Analg.** **93**, 743-748.
107. Okamoto, Y.; Ohkoshi, K.; Itagaki, H.; Tsuda, T.; Kakishima, H.; Ogawa, T.; Kasai, Y.; Ohuchi, J.; Kojima, H.; Kurishita, A.; Kaneko, T.; Matsushima, Y.; Iwabuchi, Y. & Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (3) evaluation of the haemolysis test. **Toxicol. In vitro** **13**, 115-124.
108. O’Keeffe, N. J., Healy, T. E. J. (1999). The role of new anesthetics agents. **Pharm. & Ther.** **84**, 233-248.
109. Organización Mundial de la Salud (1996). **Farmacopea Internacional**. Pruebas, métodos y requisitos generales. Normas de cualidad para substancias farmacéuticas, excipientes y formas farmacéuticas. 3.ed. Genebra.
110. Ossipov, M. H., Suarez, L. J., Spaulding, T. C. (1988). A comparison of the antinociceptive and behavioral effects of intratecally administered opiates, α -2-adrenergic agonists and local anesthetics in mice and rats. **Anesth. Analg.** **67**, 616-624.
111. Paavola, A., Yliruusi, J., Kajimoto, Y., Kalso, E., Wahlström, T., Rosenberg, P. (1995). Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharm. Res.** **12**, 1997-2002.
112. Paavola, A., Kilpeläinen, I., Yliruusi, J., Rosenberg, P. (2000). Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. **Int. J. Pharm.** **199**, 85-93.
113. Paternostre, M., Ollivon, M., Bolard, J. (1996). Liposomes: preparation and membrane reconstitution. *In*: Prasad, R. **Manual on membrane lipids**. Germany: Springer-Verlag.
114. Pérusse, R., Goulet, J-P., Turcotte, J-Y. (1992a). Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: part I. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** **74**, 679-686.
115. Pérusse, R., Goulet, J-P., Turcotte, J-Y. (1992b). Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: part II. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** **74**, 687-691.
116. Portenoy, R. K. (2000). Current pharmacotherapy of chronic pain. **J. Pain Symptom Manage.** **19**, 16-20.
117. Pramanik, A., Thyberg, P., Rigler, R. (2000). Molecular interactions of peptides with phospholipid vesicle membranes as studied by fluorescence correlation spectroscopy. **Chem. Phys. Lipids.** **104**, p. 35-47.

118. Preté, P. S. C., Malheiros, S. V. P., Meirelles, N. C., de Paula, E. (2002). Quantitative assessment of human erythrocyte membrane solubilization by Triton X-100. **Biophys. Chem.** **97**, p. 1-5.
119. Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T., Catterall, W. A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of sodium channels by local anesthetics. **Science** **265**, 1724-1728.
120. Ragsdale, D. S., Avoli, M. (1998). Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. **Brain Res. Rev.** **26**, 16-28.
121. Rajewski, R. A., Traiger, G., Bresnahan, J., Jaberaboansari, P., Stella, V. J. (1995). Preliminary safety evaluation of parenterally administered sulfoalkyl ether β -cyclodextrin derivatives. **J. Pharm. Sci.** **84**, 927-932.
122. Rajewski, R. A., Stella, V. J. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo Drug delivery. **J. Pharm. Sci.** **85**, 1142-1169.
123. Ralston, E., Hjelmeland, L. M., Klausner, R. D., Weintin, J. N., Blumenthal, R. (1981). Carboxyfluorescein as a probe for liposome-cell interactions. Effect of impurities and purification of the dye. **Biochim. Biophys. Acta** **649**, 133-137.
124. Ranade, V. V. (1989). Drug delivery systems. 1. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. **J. Clin. Pharmacol.** **29**, 685-694.
125. Randall, L. O., Selitto, J. J. (1957). A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Archiv. Int. Pharmacodyn.** 409-419.
126. Ready, L. B., Fink, B. R. (1980). Experimental evaluation of local anesthetic solutions using rat infraorbital nerve block. **Can. Anaesth. Soc. J.** **27**, 58-61.
127. Rongen, H. A. H., Bult, A., van Bennekom, W. P. (1997). Liposomes and immunoassays. **J. Immunol. Meth.** **204**, 105-133.
128. Ruetsch, Y. A., Boni, T., Borgeat, A. (2001). From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetics drugs. **Curr. Top. Med. Chem.** **3**, 175-182.
129. Santos, N. C., Castanho, M. A. R. B. (2002). Lipossomas: a bala mágica acertou? **Quím. Nova** **25**, 1181-1185.
130. Sharata, H. H., Katz, K. H. (1996). Liposomes. **Int. J. Dermatol.** **35**, p.761-769.
131. Shaw, D. J. (1991). **Introduction to colloid & surface chemistry**. 4th.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann.
132. Sisk, A. L. (1992). Vasoconstrictors in local anesthesia for dentistry. **Anesth. Prog.** **39**, 187-193.

133. Stevens, C. W. (1992). Alternatives to the use of mammals for pain research. **Life Sci.** **50**, 901-912.
134. Strichartz, G. R. (1987). **Local anesthetics**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
135. Sociedade de Anestesiologia do Chile. **Ropivacaína**. <http://www.socanestesia.cl/> (consultado em 31 de março de 2003).
136. Sudo-Havashi, L. S., Bersani-Amado, C. A. (2001). **Analgésicos e antipiréticos**. In: Oga, S., Tedesco, J. *Farmacologia Aplicada*. <http://www.farmacologia.com.br> (consultado em 15 de outubro de 2001).
137. Suwalsky, M., Schneider, C., Villena, F., Norris, B., Cárdenas, H., Cuevas, F., Sotomayor, C. P. (2002). Structural effects of the local anesthetic bupivacaine hydrochloride on the human erythrocyte membrane and molecular models. **Blood Cells Mol. Dis.** **29**, 14-23.
138. Takeuchi, H., Yamamoto, H., Toyoda, t., Toyobuku, H., hino., T., Kawashima, Y. (1998). Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol. **Int. J. Pharm.** **164**, 103-111.
139. Tavornvipas, S., Hiraiama, F., Arima, H., Uekama, K., Ishiguro, T., Oka, M., Hamayasu, K., Hashimoto, H. (2002). 6-O- α -(4-O- α -D-glucuronyl)-D-glucosyl- β -cyclodextrin: solubilizing ability and some cellular effects. **Int. J. Pharm.** **249**, 199-209.
140. Taoka, Y., Okajima, K. (1998). Spinal cord injury in the rat. **Progress in Neurobiol.** **56**, 341-358.
141. Thompson, K. C. (2000). Pharmaceutical applications of calorimetric measurements in the new millennium. **Thermochemica Acta.** **355**, 83-87.
142. Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews** **4**, 145-160.
143. Veiga, F., Fernandes, C., Teixeira, F. (2000). Oral bioavailability and hypoglycemic activity of tolbutamide/cyclodextrin inclusion complexes. **Int. J. Pharm.** **202**, 165-171.
144. Verdonck, E., Schaap, K., Thomas, L. C. (1999). A discussion of the principles and applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC). **Int. J. Pharm.** **192**, 3-20.
145. Wang, R. D., Dangler, L. A., Greengrass, R. A. (2001). Update on ropivacaine. **Expert Opin. Pharmacother.** **2**, 2051-2063.
146. Way, W. L., Way, E. L., Fields, H. L. (1998). Analgésicos e antagonistas opióides. In: Katzung, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
147. Welder, A. A. (1992). A primary culture system of adult rat heart cells for the evaluation of cocaine toxicity. **Toxicology** **72**, 175-187.

148. Whiteside, J. B., Wildsmith, J. A. (2001). Developments in local anesthesia drugs. **Br. J. Anaesth.** **87**, 27-35.
149. Wildsmith, J. A. W. Gissen, A. J., Takman, B., Covino, B. G. (1987). Differential nerve-blockade: esters vs amides and the influence of pKa. **Br. J. Anaesth.** **59**, 379-384.
150. Wittung, P., Kajanus, J., Edwards, K., Nielsen, P., Nordén, B., Malmström, B. G. (1995). Phospholipid membrane permeability of peptide nucleic acid. **FEBS Letters.** **365**, 27-29.
151. Yu, H-Y., Sun, P., Hou, W-Y. (1998). Prolonged local anesthetic effect of bupivacaine liposomes in rats. **Int. J. Pharm.** **176**, 133-136.
152. Yu, H-Y., Li, S-D., Sun, P. (2002). Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. **J. Pharm. Pharmacol.** **54**, p. 1221-1227.
153. Zanin, M. H. A., (2001). **Preparação e caracterização de lipossomas com a superfície modificada com gangliosídios para uso em imunoterapia.** Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química-UNICAMP.
154. Zar, J. H., Biostatistical analysis, 3rd ed., New Jersey: Prentice Hall, 1996.
155. Zignani, M., Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Leroux, J-C. (2000). In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. **Biochim. Biophys. Acta.** **1463**, p. 383-394.
156. Zink, W., Seife, C., Bohl, J. R. E., Hacke, N., Braun, P. M., Sinner, B., Martin, E., Fink, R. H. A., Graf, B. M. (2003). The acute myotoxic effect of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockade. **Anesth. Analg.** **97**, p. 1173-1179.

VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS

As formulações lipossomais de mepivacaína, ropivacaína (cujo desenvolvimento e análise fazem parte deste trabalho), lidocaína (projeto de Iniciação Científica e, agora, de mestrado desenvolvido por Giovana Brischinni Brunetto) e prilocaína (projeto de doutorado desenvolvido por Cíntia Maria Saia Cereda, bolsista CAPES) continuam sendo pesquisadas quanto a sua aplicação em Odontologia, desenvolvendo-se projetos em conjunto com o Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e Profa. Dra. Maria Cristina Volpato (Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp).

Estudos de Ressonância Magnética Eletrônica seriam bastante úteis para determinar de forma precisa a estequiometria da complexação entre AL e CD. Com relação aos testes *in vitro*, pretende-se avaliar o efeito de outros anestésicos locais como bupivacaína ou levobupivacaína complexadas com HP β -CD, em eritrócitos humanos e cultura de células. Além disso, seria interessante avaliar outras concentrações clínicas de anestésicos locais livres e complexados nos testes histológicos.

Uma outra possibilidade é a colaboração com a Profa. Dra. Andréa Grabe Guimarães (Universidade Federal de Ouro Preto) para avaliação das formulações complexadas quanto à cardiotoxicidade, o que seria de grande importância para determinação da margem de segurança dos complexos.

IX. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

- Trabalhos em Congressos

- XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, Caxambu, MG, 17 a 20 de maio de 2003. **Liposomal system for a new local anesthetic: ropivacaine** (D. R. Araujo, L. M. A. Pinto e E. de Paula).
- XVIII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, Curitiba, PR, 27-30 de agosto de 2003. **In vivo evaluation of drug-delivery systems for two amino-amide local anesthetics: bupivacaine and mepivacaine** (D. R. Araujo e E. de Paula).
- 4th Congress of Pharmaceutical Sciences-CIFARP, Ribeirão Preto, SP, 29 de junho a 02 de julho de 2003. **Ropivacaine and β -cyclodextrin inclusion complex: characterization and permeability studies** (D. R. Araujo e E. de Paula).
- XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, Caxambu, MG, 15 a 18 de maio de 2004.

In vivo efficacy and toxicity studies of two-type cyclodextrin: ropivacaine inclusion complexes (D. R. Araujo, M. E. Hoffmann e E. de Paula).

Ropivacaine and β -cyclodextrin inclusion complex: characterization and hemolytic assays (S. S. Tsuneda, D. R. Araujo, de Paula, E.)

Liposomal lidocaine formulation: development and biological tests in rats (G. B. Brunetto, D. R. Araujo, Cereda, C. M. S., de Paula, E.)

Liposomal prilocaine: *in vitro* release tests and *in vivo* evaluation of the anesthetic effect (C. M. S. Cereda, G. B. Brunetto, D. R., Araujo, de Paula, E.)

- XIX Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, a ser realizado em Águas de Lindóia, SP, 25-28 de agosto de 2004.

Mepivacaína encapsulada em lipossomas: avaliação do bloqueio do nervo infraorbital e efeitos citotóxicos (D. R. Araújo, C. M. S. Cereda, M. E. Hoffmann, E. de Paula).

Avaliação dos efeitos da complexação de ropivacaína com β -ciclodextrina e hidroxipropil β -ciclodextrina sobre eritrócitos humanos (S. S. Tsuneda, D. R. Araújo, Preté, P. S. C., de Paula, E.).

- 51^o Congresso Brasileiro de Anestesiologia, 9^o Congresso Luso-Brasileiro de Anestesiologia e Congresso de Dor da Sociedade Brasileira de Anestesiologia, realizado em Curitiba, PR, 13 a 17 de novembro de 2004. **Sistemas de liberação controlada com bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25): efeitos da complexação com ciclodextrinas no bloqueio do nervo ciático em camundongos** (D. R. de Araujo, L. F. Fraceto, A. F. Assunção Braga, E. de Paula).

- **Co-orientações:**

- Giovana Bruschini Brunetto (Bióloga, UNICAMP), Iniciação Científica (bolsista PIBIC/CNPq), *Desenvolvimento e avaliação in vivo de formulações lipossomais de lidocaína (2002-2004)*.
- Simone Sayuri Tsuneda (Bióloga, UNICAMP), Iniciação Científica (bolsista SAE/UNICAMP), *Preparação, caracterização e avaliação in vitro de complexos de ciclodextrinas e ropivacaína (2002-2004)*.

- **Prêmios & Menções Honrosas:**

- **Prêmio Dr. José Carlos Ferraro Maia**, concedido ao autor do melhor trabalho sobre anestésicos locais do ano de 2004.
Realização & Avaliação: Sociedade Brasileira de Anestesiologia (Departamento Científico).
- **Prêmio Dr. José Carlos Ferraro Maia**, concedido ao autor do melhor trabalho sobre anestésicos locais do ano de 2005.
Realização & Avaliação: Sociedade Brasileira de Anestesiologia (Departamento Científico).

- **Artigos aceitos para publicação e submetidos**

- Araujo, D. R., Pinto, L. M. A., Braga, A. F. A., de Paula, E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas (2003), **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.53, p. 663-671

- Araujo, D. R., Cereda, C. M. S., Brunetto, G. B., Pinto, L. M. A., Santana, M. H. A., de Paula, E. (2004). Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 51, p. 566-572.
- Cereda, C. M. S., Araujo, D. R., Brunetto, G. B., de Paula E. (2004), Liposomal prilocaine: preparation, characterization, and *in vivo* evaluation. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, p. 235-240.
- Araujo, D. R., Fraceto, L. F., Braga, A. F. A., de Paula, E. (2005), Sistemas de liberação controlada com bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25): efeitos da complexação com ciclodextrinas no bloqueio do nervo ciático em camundongos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, p. 316-328.
- Araujo, D. R., Cereda, C. M., Brunetto, G. B., Braga, A. F. A., de Paula, E. Development and evaluation of a liposomal system for ropivacaine. Submetido à publicação no **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**.

- **Processos de Patente**

- Compostos de inclusão entre β -ciclodextrinas e anestésicos locais para formulações anestésicas de longa duração, protocolado no INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI), em 10.10.03, sob nº 4.927.
- Anestésicos locais encapsulados em lipossomas para formulações de liberação controlada, protocolado no INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI), em 15.12.03, sob nº 6.257.