



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



MARIO ANTONIO BRAGA

**Preparo, caracterização e avaliação farmacológica de  
complexos de clonidina em hidroxipropil-beta-ciclodextrina  
para uso associado com bupivacaína**

Campinas  
2013

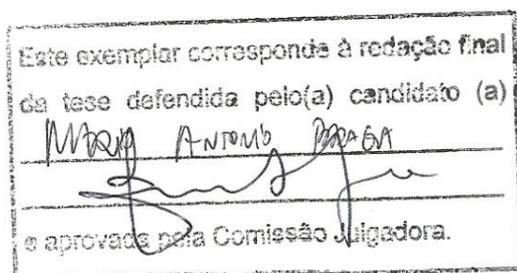


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**MARIO ANTONIO BRAGA**

**“PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO  
FARMACOLÓGICA DE COMPLEXOS DE CLONIDINA EM  
HIDROXIPROPIL-BETA-CICLODEXTRINA PARA USO  
ASSOCIADO COM BUPIVACAÍNA”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Eneida De Paula

CAMPINAS,  
2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B73p Braga, Mario Antonio, 1983-  
Preparo, caracterização e avaliação farmacológica de complexos de clonidina em hidroxipropil-beta-ciclodextrina para uso associado com bupivacaína / Mario Antonio Braga. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Eneida de Paula.

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

1. Clonidina. 2. Ciclodextrinas. 3. Sistemas de liberação de medicamentos. 4. Anestesia. I. De Paula, Eneida, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Preparation, characterization and pharmacological evaluation of a clonidine hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex designed to be used in association with bupivacaine

**Palavras-chave em inglês:**

Clonidine

Ciclodextrins

Drug delivery systems

Anesthesia

**Área de concentração:** Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

**Titulação:** Mestre em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

**Banca examinadora:**

Eneida de Paula [Orientador]

Angélica de Fátima de Assunção Braga

Leonardo Fernandes Fraceto

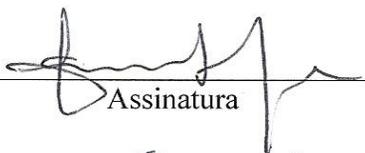
**Data de defesa:** 08-05-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 8 de maio de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

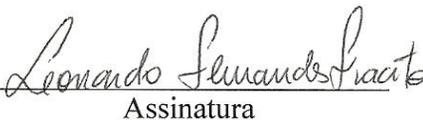
Profa. Dra. Eneida De Paula (orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Angélica De Fátima De Assunção Braga

  
Assinatura

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

  
Assinatura

Dra. Cíntia Maria Saia Cereda

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro De Araujo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*“Tudo tem seu tempo e até certas  
manifestações mais vigorosas e  
originais entram em voga ou saem  
de moda. Mas a sabedoria tem uma  
vantagem: é eterna”  
Baltasar Gracián*

*À minha mãe, que mesmo sem estudo,  
me ensinou muito mais do que se aprende  
em qualquer curso*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que guia meus passos e não me desampara nunca, por permitir a concretização deste trabalho.

Aos meus pais, Edna e Décio, pelo amor, cuidado, educação, orações e por acreditarem em mim em todos os momentos.

À minha esposa Camila, amor da vida inteira, por, acima de tudo, ter sonhado meus sonhos desde o primeiro dia que nos conhecemos.

À minha irmã Marina pelo carinho e por torcer sinceramente pelas minhas conquistas.

Ao carinho da minha sobrinha Isadora e das minhas afilhadas Ana e Luisa.

À minha querida tia Ivani, minha mãe de coração, por ter me apoiado em absolutamente tudo que fiz e ter zelado pela minha educação.

À Cassia, prima que tenho como irmã, pelo apoio e incentivo em seguir sempre em frente.

Aos meus tios, primos e sogros, que sempre me recebem com muito carinho quando “volto pra casa” e me incentivam a continuar na busca pelos meus ideais.

Aos meus amigos que torcem sinceramente pelas minhas conquistas.

Ao Biomembranas (Eneida, Cintia, Cleyton, Michele, Viviane Guilherme, Viviane Vieira, Viviane Queiroz, Camila, Ana Lais, Bruna, Raquel, Verônica, Cintia Matsumoto, Livia, Marina, Jaqueline, Andressa, Juliana, Márcio e Maribel) por todo apoio na realização deste trabalho. Aprendi muito com todos!

À Viviane e Dalton pela amizade e momentos de descontração e oração.

A Ana Lais pela amizade, ajuda com os espectros e tantas outras dúvidas. O doutorado está de pé!

A Viviane Guilherme pela imensa ajuda com os ensaios *in vivo*, e à Cintia Cereda e Cintia Gomez pela disponibilidade de sempre.

Ao Dr. Fabiano Yokaichiya (Laboratório Nacional de Luz Síncroton), Dr. Luis Fernando Cabeça (Universidade Tecnológica do Paraná, campus Londrina), Prof. Dr. Tiago Venâncio e Lorena Mara Alexandre e Silva (UFSCAR) pela disponibilidade de uso do difratômetro de raios-X e espectrômetro de RMN.

À Dra. Giovana Tofoli e Dra. Michelle Franz-Montan pelas contribuições com este trabalho por ocasião da qualificação do projeto de pesquisa. Novamente à Dra. Giovana, que me acompanhou na qualificação final, à Dra. Angélica Braga e Dr. Marcelo Bispo de Jesus, que completaram a equipe de avaliadores, pelas colocações pertinentes que engradeceram esta dissertação. Agradeço ainda aos professores que participaram da banca de defesa, além de minha orientadora, Dra Eneida de Paula; Dra. Angélica Braga e Dr. Leonardo Fraceto, bem como a disponibilidade dos membros suplentes Dra. Cintia Cereda e Dra. Daniele Araújo.

À Libbs Farmacêutica, de maneira muito especial ao Dr. Miller Nunes de Freitas e ao Cassio Yamakawa, que permitiram que eu me ausentasse no início do mestrado para frequentar as aulas. À Medley Farmacêutica, que de igual maneira me apoiou na continuidade e conclusão do curso.

À Unicamp pela excelência no ensino e por toda a estrutura disponível.

À FAPESP pelo auxílio financeiro ao Laboratório de Biomembranas, cuja disponibilidade de recursos possibilitou não só a execução do meu trabalho, mas de todos os demais.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à Profa. Eneida de Paula pela oportunidade e por todos os ensinamentos. Sinto-me muito honrado de fazer parte do Biomembranas e tenho em você meu maior exemplo de profissional dedicada, competente e entusiasmada pelo ensino. Se não fosse a sua abertura e a oportunidade que me deu, o sonho jamais estaria realizado. Muito obrigado!!

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	01
1.1.	<b>Dor: aspectos fisiológicos e contribuição noradrenérgica como mecanismo de controle</b>	01
1.1.1.	<i>Dor nociceptiva: aspectos periféricos e centrais</i>	01
1.1.2.	<i>Dor neuropática</i>	06
1.1.3.	<i>Controle da dor: modulação noradrenérgica e contribuição do sistema <math>\alpha_2</math></i>	07
1.2.	<b>Clonidina: da ação vasoconstritora à adjuvante na anestesia</b>	09
1.2.1.	<i>Propriedades físico-químicas da Clonidina</i>	12
1.2.2.	<i>Relação com anestésicos locais</i>	12
1.3.	<b>Bupivacaína</b>	13
1.4.	<b>Ciclodextrinas</b>	14
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	19
2.1.	<b>Objetivos gerais</b>	19
2.2.	<b>Objetivos específicos</b>	19
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	20
3.1.	<b>Materiais</b>	20
3.1.1.	<i>Fármacos, sais e solventes</i>	20
3.1.2.	<i>Equipamentos</i>	20
3.1.3.	<i>Animais</i>	20
3.2.	<b>Métodos</b>	21
3.2.1.	<b>Caracterização físico-química da clonidina</b>	21
3.2.1.1.	<i>Caracterização do Cloridrato de Clonidina por espectrometria UV-VIS</i>	21
3.2.1.2.	<i>Determinação da absorvidade do Cloridrato de Clonidina em diferentes meios</i>	21
3.2.1.3.	<i>Determinação do comportamento óptico em meios de diferentes constantes dielétricas</i>	22
3.2.1.4.	<i>Determinação da solubilidade do Cloridrato de Clonidina em diferentes meios</i>	22
3.2.1.5.	<i>Determinação do pK do Cloridrato de Clonidina</i>	22
3.2.1.6.	<i>Determinação do coeficiente de partição octanol-água</i>	23
3.2.1.7.	<i>Determinação da partição em lipossomas</i>	24
3.2.1.8.	<i>Determinação da partição em membranas artificiais imobilizadas (IAM)</i>	24
3.2.2.	<b>Preparação do complexo</b>	25
3.2.2.1.	<i>Determinação da estequiometria de complexação</i>	25
3.2.2.2.	<i>Preparo do complexo de inclusão</i>	27
3.2.3.	<b>Caracterização do complexo</b>	27

3.2.3.1.	<i>Calorimetria exploratória diferencial</i> .....	27
3.2.3.2.	<i>Difração de Raios-X</i> .....	28
3.2.3.3.	<i>Ressonância magnética nuclear</i> .....	28
3.2.3.3.1.	<i>Coefficiente de difusão e determinação da constante de afinidade</i> .....	29
3.2.3.4.	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	31
3.2.3.5.	<i>Ensaio de liberação in vitro</i> .....	31
<b>3.2.4.</b>	<b>Avaliação farmacológica</b> .....	31
3.2.4.1.	<i>Ensaio de toxicidade in vitro: cultura de células 3T3</i> .....	31
3.2.4.2.	<i>Ensaio in vivo: teste de Tail-flick</i> .....	32
<b>3.2.5.</b>	<b>Avaliação e tratamento estatístico dos dados</b> .....	34
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>4.1.</b>	<b>Caracterização físico-química do Cloridrato de Clonidina</b> .....	35
4.1.1.	<i>Avaliação das propriedades ópticas e da solubilidade do Cloridrato de Clonidina</i> .....	35
<b>4.2.</b>	<b>Determinação da estequiometria de complexação do Cloridrato de Clonidina</b> .....	38
4.2.1.	<i>Determinação da estequiometria pelo método de Job</i> .....	38
4.2.2.	<i>Determinação da estequiometria por Benesi-Hildebrand</i> .....	40
<b>4.3.</b>	<b>Caracterização do complexo de inclusão</b> .....	42
4.3.1.	<i>Caracterização do complexo por medidas de calorimetria: DSC e TG</i> .....	42
4.3.2.	<i>Caracterização do complexo por difração de raios-X</i> .....	44
4.3.3.	<i>Caracterização do complexo por MEV</i> .....	45
4.3.4.	<i>Caracterização do complexo por RMN <sup>1</sup>H</i> .....	46
4.3.5.	<i>Caracterização do complexo por cinética de liberação</i> .....	51
<b>4.4.</b>	<b>Avaliação farmacológica do complexo de inclusão e associação ao anestésico local Bupivacaína</b> .....	52
4.4.1.	<i>Determinação da lipofilicidade por diferentes técnicas</i> .....	53
4.4.2.	<i>Ensaio de toxicidade in vitro: cultura de células 3T3</i> .....	54
4.4.3.	<i>Ensaio in vivo: teste de Tail-flick</i> .....	57
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	60
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	74

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de transmissão e interpretação de impulsos dolorosos .....	03
Figura 2: Sequência de eventos que leva a sensibilização central dos neurônios .....	05
Figura 3: Estrutura química da Clonidina ou 2-[2,6-diclorofenilimino] imidazolidina (a) e representação do tautômero imina (b). Conformações de mínima energia da forma básica (c) .....	10
Figura 4: Estrutura química das ciclodextrinas naturais e representação do anel macrocíclico, em formato toroidal .....	15
Figura 5: Representação esquemática da partição de solutos em bicamadas lipídicas (a) e em superfície de membranas artificiais imobilizadas (b) e do cálculo de fator de capacidade em colunas IAM .....	25
Figura 6: a – representação esquemática de inserção de agulha no espaço intervertebral (L5-L6) para injeção intratecal em ratos; b – equipamento utilizado nos ensaios farmacológicos (teste de Tail-flick) .....	34
Figura 7: Espectro de absorção UV/VIS da CND em água, 25°C .....	35
Figura 8: Espectro de absorção do cloridrato de clonidina (1mM) em suas formas protonada (em água e tampão acetato pH 5,0), neutra (tampão carbonato, pH 12) e em pH fisiológico, 25°C .....	36
Figura 9: Determinação do pKa da CND por método potenciométrico de titulação com soluções de HCl e NaOH, 25°C .....	36
Figura 10: Curvas de calibração para determinação da absorvidade molar da CND em diferentes pHs: a) 5,5 b) 7,4 c) 12,0 .....	37
Figura 11: Espectro de absorção da CND em excesso de HP-β-CD (a), varreduras em diferentes constantes dielétricas (b), espectro em constantes dielétricas extremas e em excesso de HP-β-CD (c) .....	39
Figura 12: Gráfico de Job evidenciando estequiometria 1:1 CND:HP-β-CD .....	40
Figura 13: Variação da absorção da CND na presença de concentrações crescentes de HP-β-CD (a). Aplicação da equação de Benesi-Hildebrand para estequiometria 1:1 CND:HP-β-CD (b) ou 1:2 CND:HP-β-CD (c) .....	41

Figura 14: Curvas de DSC obtidas para clonidina (preto), HP-β-CD (verde), complexo (vermelho) e mistura física (azul), na razão molar de 1:1. Taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera inerte, em cadinho hermeticamente fechado .....	42
Figura 15: Curvas termogravimétricas para HP-β-CD (a), CND (b) e complexo CND:HP-β-CD (c) na razão molar 1:1 .....	44
Figura 16: Difrátogramas de raios-X para CND; HP-β-CD, complexo e mistura física .....	44
Figura 17: Fotomicrografias da HP-β-CD (a), clonidina (b), mistura física (c) e complexo (d).....	45
Figura 18: Espectros RMN <sup>1</sup> H para CND, HP-β-CD e complexo CND:HP- β-CD .....	47
Figura 19: Espectros pseudo-bidimensionais de <sup>1</sup> H-RMN: experimentos de DOSY para clonidina (a), HP-β-CD (b), complexo CND:HP-β-CD (d) e mistura física (c), na razão molar 1:1 .....	49
Figura 20: Espectro de ROESY do complexo CND:HP-β-CD (a) e ampliação da região de 3,2 a 4ppm (b) para identificação de interações intra e intermoleculares envolvendo hidrogênios pertencentes à HP-β-CD .....	51
Figura 21: Perfil de liberação da CND e complexo CND:HP-β-CD em tampão Hepes pH 7,4; 25°C .....	52
Figura 22: Ensaio de viabilidade celular para determinação do IC <sub>50</sub> para a CND em cultura de células 3T3 .....	55
Figura 23: Testes de viabilidade celular em fibroblastos 3T3, realizados em concentrações abaixo (A) e acima (B) do IC <sub>50</sub> da CND, associada a BVC em concentração de 1,67mM .....	56
Figura 24: Avaliação do bloqueio sensorial do nervo caudal de ratos Wistar após administração intratecal dos fármacos clonidina (30μg, livre ou complexada com HP-β-CD), bupivacaína (0,125 e 0,25 %) e associação de ambas.....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de fibras sensitivas, sua mielinização e velocidade de condução de impulsos .....	02
Tabela 2: Gradiente de polaridade água-álcool utilizado para obtenção de soluções de diferentes constantes dielétricas .....	22
Tabela 3: Concentrações de CND e HP- $\beta$ -CD utilizadas no experimento de <i>Job plot</i> .....	26
Tabela 4: Grupos utilizados em ensaios de avaliação farmacológica <i>in vivo</i> .....	33
Tabela 5: Solubilidade e absorvidade molar da CND em diferentes meios, 25°C .....	38
Tabela 6: Deslocamentos químicos ( $\Delta\delta$ , em ppm) e atribuição de hidrogênios para as amostras de CND, HP- $\beta$ -CD e complexo CND:HP- $\beta$ -CD .....	48
Tabela 7: Coeficientes de Difusão (D) da CND, HP- $\beta$ -CD e do complexo CND:HP- $\beta$ -CD, fração molar do complexo e constantes de associação ( $K_{as}$ ) da CND:HP- $\beta$ -CD .....	50
Tabela 8: Tempo de recuperação ( $T_{rec}$ ) e área sob a curva em função do tempo ( $ASC_{0-600}$ ) para o efeito anestésico medido para os fármacos clonidina e bupivacaina, mais associações, mostrados na figura 24 .....	59

## ABREVIATURAS

AL	Anestésicos locais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BVC	Bupivacaína
CDME	Corno dorsal da medula espinhal
CGRP	peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina
CND	Clonidina
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium, Nutricell
DIN	Dinorfinas
ENC	Encefalinas
F.BRAS	Farmacopéia Brasileira
Glu	Glutamato
HP- $\beta$ -CD	2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina
HPLC	Cromatografia a líquido de alta eficiência
IAM	Membranas artificiais imobilizadas
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
LC	Leucotrieno
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio
NMDA	Receptores N-metil-D-aspartato
NMR	Núcleo magno da rafe
NOS	Óxido nítrico
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PC	Fosfatidilcolina
PG	Prostaglandina
PIP <sub>2</sub>	4,5-bifosfato de fosfatidilinositol
PKC	Proteína cinase C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RVM	Medula ventromedial rostral
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
UV/VIS	Ultra-violeta/Visível

## RESUMO

A clonidina (CND) é um composto imidazólico que foi sintetizado em 1960 e utilizado inicialmente como descongestionante nasal por sua ação vasoconstritora. Após o início do uso clínico deste fármaco, foram observados efeitos sistêmicos surpreendentes como hipotensão arterial, sedação e bradicardia. Como consequência de seu efeito hipotensor, este fármaco foi utilizado com eficácia no tratamento da hipertensão arterial durante 25 anos. Com a elucidação do seu mecanismo de ação, outras indicações foram sendo propostas na prática clínica e assim o fármaco ganhou expressivo interesse na anestesiologia, sendo utilizado como medicação pré-anestésica, adjuvante na anestesia geral, anestesia regional e pós-operatória, inclusive em pacientes pediátricos. Apesar da amplitude de indicações no tratamento da dor e anestesia, o fármaco apresenta reações adversas, tornando-se necessário manipular suas propriedades físico-químicas no intuito de aperfeiçoar seu efeito terapêutico e diminuir reações adversas. Neste trabalho objetivamos veicular a CND em hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), com o intuito de otimizar a ação do fármaco, reforçando seu uso na prática clínica como analgésico e adjuvante na anestesia infiltrativa. Para este fim complexos de inclusão da CND com o carreador proposto foram preparados e caracterizados; além disso, o efeito anestésico *in vivo* da CND livre e complexada, associada ao anestésico local bupivacaína, foi avaliado pelo teste de *tail-flick*, após injeção intratecal em ratos Wistar. Uma relação estequiométrica 1:1 (CND:HP- $\beta$ -CD) foi determinada e o tempo de equilíbrio foi de 24 horas. O complexo foi caracterizado por medidas de calorimetria exploratória diferencial, difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e cinética de liberação. Estes ensaios forneceram indícios da associação da CND com a HP- $\beta$ -CD, haja vista a diferença entre os picos endotérmicos, padrões de difração, padrão de cristalinidade e retardo em liberação, respectivamente. Os ensaios de ressonância magnética nuclear de hidrogênios mostraram baixa afinidade entre a CND e a HP- $\beta$ -CD ( $K_a = 20 \text{ L/M}^{-1}$ ), porém foi possível evidenciar os detalhes moleculares da inserção do anel aromático na cavidade da HP- $\beta$ -CD. Apesar disso, o efeito anestésico do complexo CND:HP- $\beta$ -CD, avaliado em animais, foi pronunciadamente superior ao dos fármacos CND e bupivacaína, isoladamente, indicando a viabilidade desta formulação para uso associado a anestésicos locais, na anestesia operatória.

**Palavras chave:** clonidina, ciclodextrina, bupivacaína, anestesia, complexo de inclusão

## ABSTRACT

Clonidine (CND) is an imidazole compound synthesized in 1960 and originally used as a nasal decongestant for its vasoconstrictor action. After initial clinical use, unexpected systemic effects were observed as hypotension, bradycardia and sedation. As a consequence of its hypotensive effect, this drug has been successfully used in the treatment of hypertension for over 25 years. With the elucidation of its mechanism of action, other indications were proposed in clinical practice. CND has gained significant interest in anesthesiology, being used as an adjuvant to general and regional anesthesia, during surgery or in the postoperative period, even in children. Despite its breadth of indications in the treatment of pain and anesthesia, CND has adverse reactions, making it necessary to manipulate its physicochemical properties in order to improve the therapeutic efficacy and decrease adverse reactions. In this work we proposed to complex clonidine with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) in order to optimize drug action enhancing its use as an analgesic adjuvant in infiltration anesthesia. For that, in addition to the preparation and characterization of a CND:HP- $\beta$ -CD, inclusion complex, we evaluated the *in vivo* anesthetic effect of free and complexed CND, associated with the local anesthetic bupivacaine. A 1:1 stoichiometric ratio (CND:HP- $\beta$ -CD) was determined after an equilibrium time of 24 hours. The complex was characterized by differential scanning calorimetry, X-ray diffraction, scanning electron microscopy and release kinetics. These trials provided evidences for the inclusion complexation of CND in HP- $\beta$ -CD, considering the differences between endothermic peaks, diffraction patterns, standard crystallinity and sustained release, respectively. Nuclear magnetic resonance experiments revealed a low binding constant between clonidine and HP- $\beta$ -CD ( $K_a = 20 \text{ L/M}^{-1}$ ) but provided molecular details on the insertion of the aromatic ring inside the HP- $\beta$ -CD macromolecular cavity. Despite that, the anesthetic effect of clonidine:HP- $\beta$ -CD complex in animals was considerably higher than that evoked by clonidine and bupivacaine alone, pointing out the future use of this drug delivery formulation in association with local anesthetics, for surgical anesthesia procedures.

**Keywords:** clonidine, cyclodextrin, bupivacaine, anesthesia, inclusion complex

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Dor: aspectos fisiológicos e contribuição noradrenérgica como mecanismo de controle

A dor é um fenômeno dinâmico. Das áreas periféricas ao cérebro, os sinais nociceptivos são modulados em todos os níveis pelo sistema nervoso central (SNC) (Marchand, 2008). A dor é o sintoma mais comum nas doenças humanas e é definida como uma sensação desagradável que pode, primariamente, estar associada ou não a lesão tecidual (Lampl, 2012). 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 passa a ser uma consequência insuportável às desordens refratárias aos tratamentos (Stevens, 1992). Do ponto de vista do mecanismo fisiopatológico a dor pode ser classificada como nociceptiva ou neuropática (Schestatsky & Nascimento, 2009). Já em relação à duração pode ser classificada como aguda ou crônica (Vadivelu *et al.*, 2009).

#### 1.1.1. *Dor nociceptiva: aspectos periféricos e centrais*

A transdução e transmissão de estímulos nocivos em tecidos periféricos ocorrem através de neurônios especializados que se projetam para o sistema nervoso central, onde este estímulo periférico é processado e transmitido para que haja a percepção da dor (Price & Geranton, 2009). Um impulso nociceptivo é conduzido através de um neurônio aferente primário que entra no tronco encefálico e faz sinapse com um neurônio de segunda ordem para ser transmitido ao tálamo. A fibra que carrega esse impulso aferente primário pode ser do tipo A $\delta$ , mais grossa, ou C, mais fina (Patel, 2010). O corno dorsal da medula espinhal, local onde os neurônios fazem suas sinapses, é subdividido em camadas (lâminas) distintas de acordo com as características citológicas de seus neurônios. As fibras C não-mielinizadas terminam nas lâminas I, II e V do corno dorsal, enquanto as fibras mielinizadas A $\delta$  terminam na lâminas I e II e também penetram mais profundamente nas lâminas V e X (Carvalho & Lemonica, 1998; Purves *et al.*, 2005). Embora haja também as fibras do tipo A $\beta$ , apenas as fibras A $\delta$  e C possuem capacidade para transmitir estímulos nociceptivos (Belmonte & Cervero, 1996). A tabela 1 descreve os tipos de fibras sensitivas.

Tabela 1: Tipos de fibras sensitivas, sua mielinização e velocidade de condução de impulsos (Belmonte & Cervero, 1996; Marchand, 2008; Steeds, 2009).

Tipo	Diâmetro	Mielinização	Velocidade de condução
A $\beta$	> 10 $\mu\text{m}$	Grossa	30 – 100 m/s
A $\delta$	2 - 6 $\mu\text{m}$	Fina	12 – 30 m/s
C	0,4 – 1,2 $\mu\text{m}$	Ausente	0,5 – 2 m/s

A fibra A $\delta$  é responsável pela condução do estímulo através do trato neoespinalâmico, que é conduzido de forma rápida diretamente para o tálamo, sendo, portanto, responsável pela dor rápida (Marchand, 2008). Acredita-se que o glutamato (Glu), um dos neurotransmissores excitatórios mais utilizados no SNC, é o neurotransmissor secretado nas terminações destas fibras, tendo, geralmente, uma duração de ação de poucos milissegundos (Serpell, 2005). A fibra C faz sinapse com um neurônio nociceptivo específico que conduz o estímulo para os centros superiores através do trato paleoespinalâmico, que, por sua vez, não ascende diretamente para o tálamo, passando pela formação reticular, onde pode sofrer influência de neurônios moduladores (Carvalho & Lemonica, 1998; Guyton & Hall, 2011). A substância P (SP) é o provável neurotransmissor secretado nas fibras do tipo C, envolvidas na dor crônica. Pesquisas sugerem que as porções terminais das fibras do tipo C secretam tanto Glu quanto SP (Guyton & Hall, 2011). O Glu age instantaneamente e a SP é liberada mais lentamente, tendo ação que dura de segundos a minutos. Acredita-se que a dupla sensação dolorosa, sentida com a picada de uma agulha, por exemplo, é resultado da ação rápida do glutamato enquanto a sensação “tardia” da dor seria provocada pela ação da substância P (Bernacchio *et al.*, 2005; Guyton & Hall, 2011).

Após sofrer as influências de modulação do corno dorsal alguns impulsos nociceptivos passam diretamente ou através de interneurônios para as células do corno anterior e anterolateral onde estimulam neurônios somatomotores e pré-ganglionares simpáticos, provocando resposta nociceptiva segmentar autonômica reflexa. Outros impulsos nociceptivos são transmitidos para neurônios que fazem sinapse com neurônios do trato espinalâmico e outros sistemas ascendentes que então convergem para o tronco encefálico e estruturas supraespinhais onde promovem respostas reflexas suprasegmentares e corticais (Marchand, 2008; Patel, 2010; Ossipov *et al.*, 2010)

Diversos neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídeos são liberados pelos terminais dos neurônios aferentes primários no corno dorsal da medula, onde exercem importante papel na modulação da transmissão nociceptiva. Entre tais substâncias destacam-se os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato e diversos outros neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo as taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B), peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina (CGRP), colecistocinina, somatostatina, óxido nítrico, prostaglandinas, galanina, encefalinas e endorfinas (Carvalho & Lemonica, 1998; Ossipov *et al.*, 2010; Perl, 2011).

Em resumo, há duas vias principais de condução do impulso doloroso chamados de sistemas da via do grupo lateral (trato neoespinalâmico) e de via do grupo medial (trato paleoespinalâmico) da dor. A via do grupo lateral é responsável pela comunicação dos componentes sensório-discriminativos da dor, e a via do grupo medial é responsável pelos componentes afetivo, motivacional e avaliativo do processo doloroso (Fernandes & Gomes, 2011). Observa-se estreita relação topográfica entre a área estimulada na periferia e as regiões talâmicas e corticais ativadas, ou seja, há somatotopia. Isto contribui para que o indivíduo saiba precisar com exatidão o ponto de origem da dor em um trauma (Bear *et al.*, 1996). A figura 1 resume os mecanismos de transmissão e interpretação do estímulo doloroso.

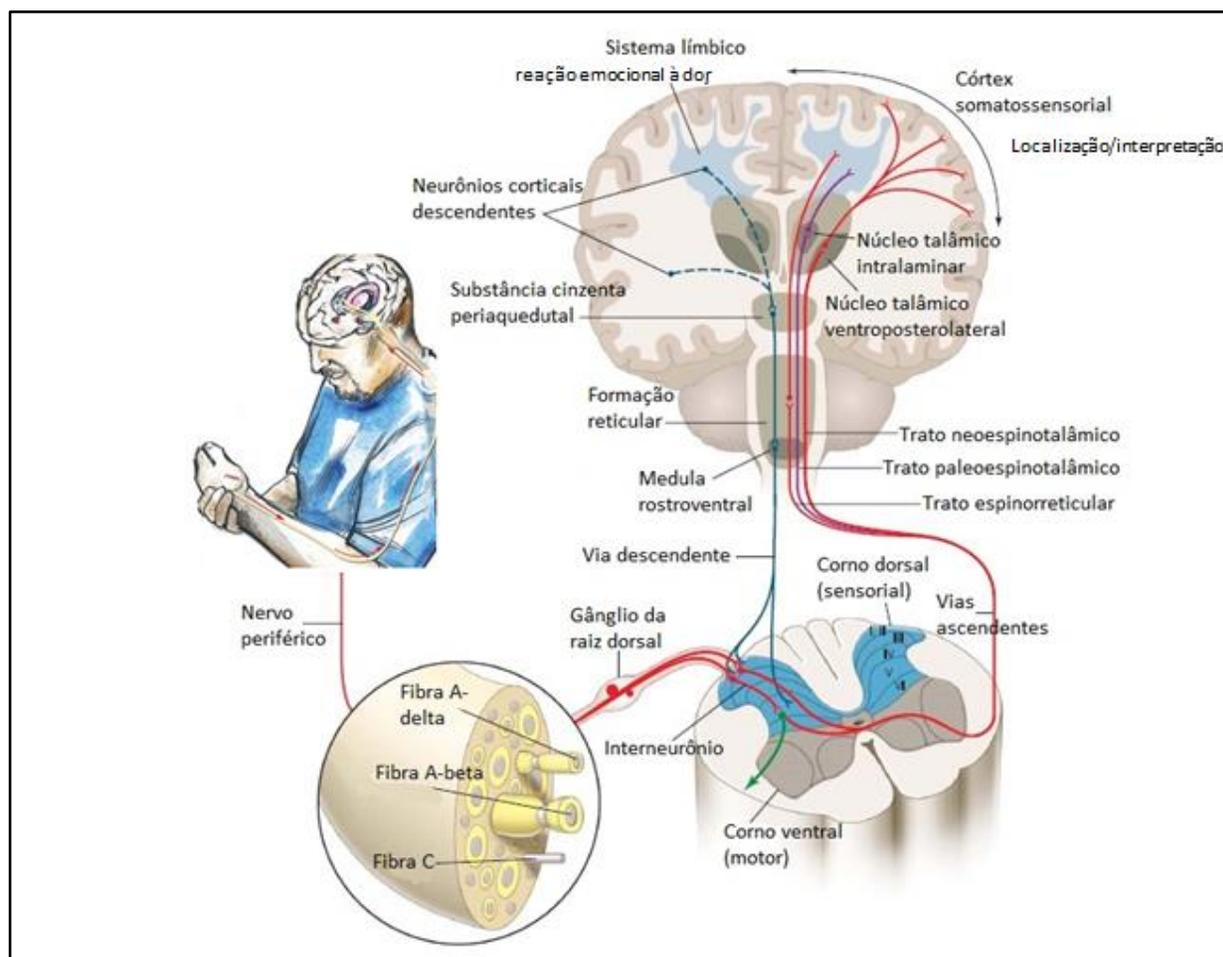


Figura 1: Mecanismos de transmissão e interpretação de impulsos dolorosos

A medula, formada por complexa estrutura contendo grande variedade neuronal e arranjos sinápticos, permite não somente a recepção e transmissão dos impulsos sensoriais como também um elevado grau de modulação central, envolvendo abstração local, integração, seleção e dispersão apropriada dos impulsos sensoriais. Esta complexa forma de processamento medular é ativada através de fenômenos centrais de convergência e somação, bem como através de influências excitatórias e

inibitórias, envolvendo vias neuronais periféricas, interneurônios locais, vias neuronais do tronco encefálico e supraespinhais e córtex cerebral (Carvalho & Lemonica, 1998; Marchand, 2008; Patel, 2010).

Após estimulação repetida os nociceptores podem apresentar resposta aumentada a estímulos nocivos ou adquirir responsividade maior a quaisquer estímulos, incluindo os não nocivos, levando a redução do limiar de sensibilidade e hiperalgesia (Baranauskas & Nitri, 1998). Esta pode ser classificada como hiperalgesia primária e secundária. A hiperalgesia primária é conceituada como sendo o aumento da resposta ao estímulo doloroso no local da lesão, enquanto a hiperalgesia secundária é aquela que se estende para áreas adjacentes (Svendsen *et al.*, 1997; Baranauskas & Nitri, 1998). Estes quadros envolvem tanto a sensibilização das terminações nervosas periféricas, quanto a sensibilização central. Além da hiperalgesia, os fenômenos de sensibilização mediam o processo de alodinia e reflexos do comportamento sensorio-discriminativo da dor (Pedersen *et al.*, 2006).

Sempre que há uma lesão tecidual provocada por um estímulo nóxico, os nociceptores modificam-se lentamente gerando dor prolongada em decorrência da alteração da estrutura subcelular e da funcionalidade do sistema nervoso periférico. São liberadas no meio extracelular substâncias algio gênicas que podem ativar os nociceptores através de receptores ionotrópicos que promovem diretamente a abertura de canais iônicos e a consequente despolarização da membrana dos nociceptores. É o caso, por exemplo, do glutamato (Davidson *et al.*, 1997). Outras substâncias como as prostaglandinas ou a bradicinina, atuam sobre receptores que vão ativar sistemas de transdução intracelulares, levando a modificações na concentração de moléculas como o AMPcíclico, o diacilglicerol, o inositol trifosfato ou cálcio. Estas substâncias vão, por sua vez, modular o funcionamento de canais iônicos ou receptores, através da sua fosforilação por intermédio da ativação de enzimas intracelulares (Wood & Docherty, 1997; Rocha *et al.*, 2007; Marchand, 2008).

Em resumo, a agressão tecidual resulta na acumulação de metabólitos do ácido araquidônico. A produção de prostaglandinas e de leucotrienos leva a desgranulação de mastócitos e a ativação direta de fibras nervosas, macrófagos e linfócitos. Há liberação de mediadores, como potássio, serotonina, substância P, histamina e cininas. Ocorrem alterações na permeabilidade vascular, no fluxo sanguíneo local e produção dos sinais clássicos inflamatórios de rubor, calor, dor, tumor e impotência funcional. Tem início o processo de sensibilização periférica com consequente exacerbação da resposta ao estímulo doloroso (Woolf, 1989; Rocha *et al.*, 2007; Ossipov *et al.*, 2010).

A estimulação persistente de nociceptores provoca dor espontânea, mesmo quando cessam a resposta inflamatória e a dor. Desta forma, a sensibilização periférica não é o único fenômeno responsável por essas mudanças, havendo envolvimento do sistema nervoso central neste processo (Marchand, 2008; Ossipov *et al.*, 2010). A sensibilização central implica em alterações dos impulsos periféricos, com adaptações positivas ou negativas. Além de redução do limiar ou aumento da resposta aos impulsos aferentes, ocorrem descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios do corno dorsal. Neste caso, os neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal tem sua sensibilidade aumentada à estimulação sensorial (Rocha *et al.*, 2007).

A figura 2 resume a sequência de eventos responsáveis pela sensibilização neuronal no SNC. Observa-se que a ativação intensa de neurônios aferentes primários estimula a liberação de Glu e substância P (SP). O receptor NMDA, em função do papel do magnésio ( $Mg^{2+}$ ), é inicialmente não-responsivo ao Glu; mas seguindo a despolarização do receptor AMPA pelo Glu no receptor metabotrópico estimula a ativação de fosfolipase C (PLC) mediada pela proteína G, levando à hidrólise e transformação do 4,5-fosfatidilinositol bifosfato ( $PIP_2$ ) em inositol trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol. O diacilglicerol estimula a produção de proteína cinase C (PKC), a qual é ativada na presença de elevados níveis de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular.  $IP_3$  estimula a liberação de cálcio intracelular de estoques intracelulares no retículo sarcoplasmático. PKC aumentada induz o aumento sustentado da permeabilidade da membrana e, em conjunção com o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular, leva a maior expressão de protoncogenes, como c-fos e c-jun. As proteínas produzidas por esses protoncogenes codificam neuropeptídeos como as encefalinas, dinorfinas e taquicininas. Esse aumento também leva a ativação de fosfolipase A2 ( $PLA_2$ ) e da síntese de óxido nítrico (NOS) por um mecanismo cálcio-calmodulina dependente.  $PLA_2$  catalisa a conversão de fosfatidilcolina (PC) em metabólitos do ácido araquidônico, como prostaglandina (PG), tromboxano (TX) (via cicloxigenase) e leucotrienos (LT) (via lipoxigenase). NOS catalisa a produção de proteína cinase e alterações na expressão gênica. NOS difunde-se do interior da célula para o terminal do aferente primário, onde aumenta a liberação de glutamato (Rocha *et al.*, 2007).

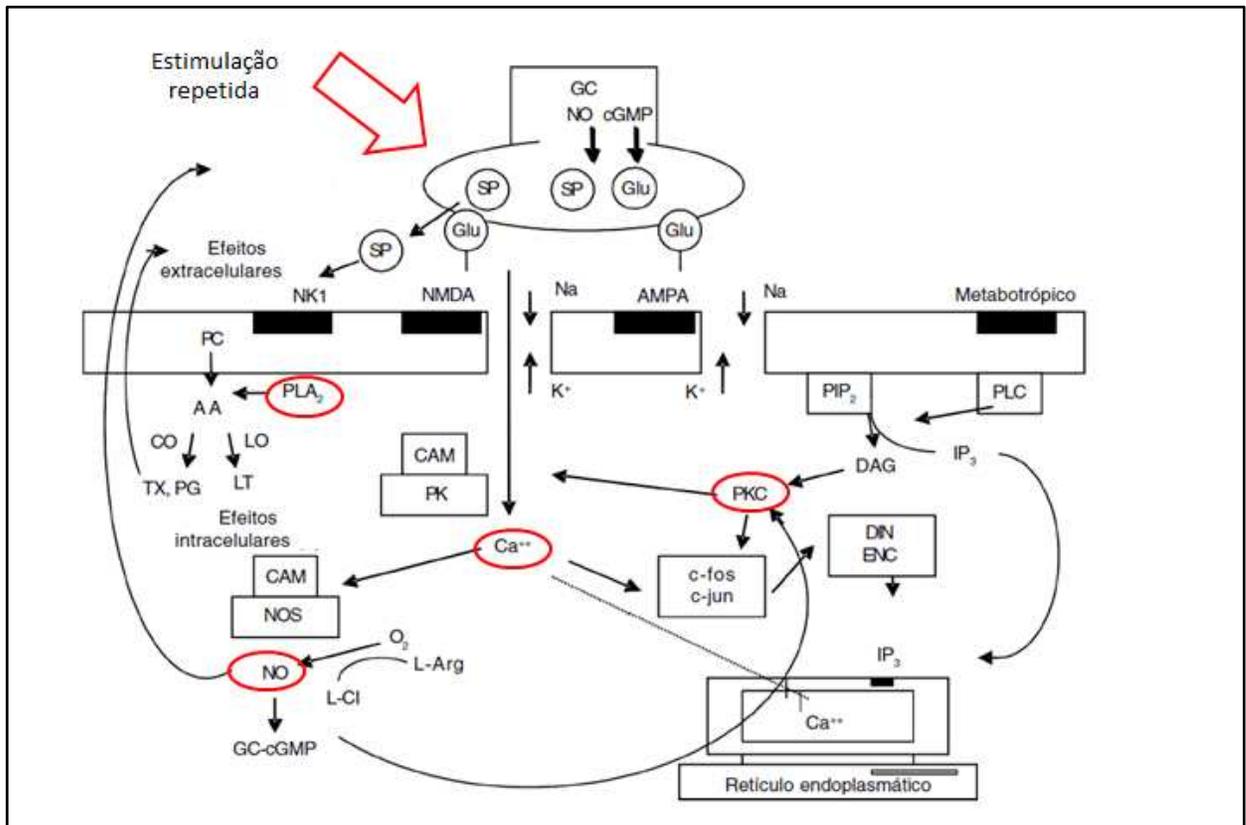


Figura 2: Sequência de eventos que leva à sensibilização central dos neurônios (adaptado de Rocha *et al.*, 2007). DAG (diacilglicerol), ENC (encefalinas), DIN (dinorfinas)

### 1.1.2. Dor neuropática

A dor neuropática, é definida como a dor iniciada por uma lesão ou disfunção do sistema somatossensorial, resultante da atividade anormal das vias centrais e periféricas (Schestatsky & Nascimento, 2009). Ela está entre as síndromes mais prevalentes como causa de dor crônica. Pacientes com dor de origem predominantemente neuropática apresentam idade mais avançada e dor mais grave e frequente que em outros tipos de dor crônica (Resende *et al.*, 2010).

A dor neuropática tem etiologias muito diversas e é classificada, de acordo com a localização da lesão ou inflamação no sistema nervoso, em periférica ou central (Resende *et al.*, 2010). Ela é uma síndrome complexa, com mecanismos biológicos pouco esclarecidos, envolvendo fenômenos inflamatórios e imunes (Kraycheti *et al.*, 2008). Comum na prática clínica, a maior parte dos casos é oriunda de quatro classes principais (Baron, 2006):

- Lesão nervosa periférica e multifocal (traumática, isquêmica ou inflamatória)
- Polineuropatias periféricas (metabólicas, tóxicas, hereditárias ou inflamatórias)
- Lesões no SNC (esclerose múltipla, lesões na coluna vertebral ou acidente vascular cerebral)
- Distúrbios neuropáticos

As principais queixas se dividem em dores espontâneas, que aparecem sem nenhum estímulo detectável, como as parestesias; e dores evocadas, que são respostas anormais ao estímulo, como a hiperalgesia e alodinia (Schestatsky, 2008).

Contribuindo para o desenvolvimento da dor neuropática, ocorrem alterações no sistema nervoso periférico e na medula espinhal, as quais incluem a formação de impulsos ectópicos que sensibilizam os neurônios (Roberts, 1999). As fibras A $\beta$ , normalmente envolvidas na transmissão de impulsos não nocivos, são as que apresentam maior quantidade de impulsos ectópicos na vigência de lesão em nervo periférico. Estas fibras enviam respostas exageradas para a medula espinhal e, associados à sensibilização central, contribuem para o desenvolvimento da dor espontânea, da hiperalgesia e da alodinia (Schaible & Richter, 2004). Estima-se que a sensibilização central seja responsável pela hiperalgesia secundária e pela alodinia tátil, comuns aos processos inflamatórios e neuropáticos (Resende *et al.*, 2010).

No tecido normal o sistema nervoso simpático não ativa fibras aferentes primárias. Em casos de lesão de nervo, porém, estas fibras aferentes tornam-se sensíveis a mediadores adrenérgicos (Schaible & Richter, 2004). Em casos de lesão, neurônios sensoriais apresentam aumento da responsividade à adrenalina circulante ou noradrenalina liberada das terminações simpáticas pós-ganglionares. Adrenoreceptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  participam deste mecanismo. A sensibilidade à noradrenalina é mediada pela expressão de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos nas terminações de nervos lesados. Enquanto esta ativação está relacionada à nocicepção, a ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos induz antinocicepção (Nam *et al.*, 2000; Schaible & Richter, 2004).

Observa-se ainda que em nível pré-sináptico a liberação de glutamato é inibida por ativação de receptores gabaérgicos. A redução ou a falha da função desses receptores podem levar a hiperexcitabilidade neuronal do nervo lesado. Também pode haver aumento das subunidades de canais de cálcio tipo  $\alpha_2\gamma$  no gânglio da raiz dorsal e na medula espinhal, fato que provoca a liberação de neurotransmissores excitatórios. A alteração fenotípica de fibras A $\delta$  na dor neuropática causaria, de maneira semelhante, a liberação pré-sináptica de substância P facilitando a sensibilização do corno dorsal da medula espinhal. Em relação às alterações pós-sinápticas a liberação de substância P e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina além de outros neurotransmissores excitatórios (aspartato e glutamato) na fenda sináptica, causa ativação de receptores NMDA e AMPA com aumento da entrada de cálcio na célula, formação do complexo cálcio-calmodulina, ativação da enzima cálcio-calmodulina cinase II e das vias neuronais do óxido nítrico sintetase, com formação de óxido nítrico. Isso promove ação específica de cinases e de fatores transcricionais que, ao serem fosforilados, se ligam a promotores de c-fos e de c-jun, resultando na síntese de produtos gênicos nucleares que facilitam a excitabilidade neuronal e alterações da neuroplasticidade no corno dorsal da medula espinhal. Por outro lado, após a lesão do nervo, pode existir redução da expressão de receptores inibitórios e a sensibilização neuronal provavelmente será decorrente de mecanismos facilitadores (Schaible & Richter, 2004; Kraycheti *et al.*, 2008).

A dor neuropática ainda é um desafio para os pesquisadores clínicos e experimentais. Os mecanismos, complexos e não completamente elucidados, desenvolvem-se dinamicamente com resultados, por vezes, contraditórios. Entender a neurobiologia da dor neuropática é um passo para melhoria dos resultados no tratamento dessa síndrome. Essa compreensão poderá resultar na elaboração de fármacos que visem a alvos específicos e que proporcionem respostas eficazes (Baron, 2006; Kraycheti *et al.*, 2008; Schestatsky, 2008).

### *1.1.3. Controle da dor: modulação noradrenérgica e contribuição do sistema $\alpha$ -2*

Apesar de haver, desde o início do século, evidências sobre a existência de mecanismos supressores, foi com a apresentação da teoria de comporta, por Melzack e Wall, em 1965, que os sistemas modulatórios da dor passaram a ser reconhecidos (Carvalho, 1999). O conhecimento bioquímico destas vias inibitórias descendentes tem propiciado o surgimento de importantes fármacos, alguns já em uso e outros em fase de ensaios clínicos ou pré-clínicos (Carvalho & Lemonica, 1998).

Segundo Patel (2010), são conhecidos três mecanismos principais de controle endógeno da dor que são: a inibição segmental, o sistema opióide endógeno e a via descendente inibitória. O controle via inibição segmental baseia-se na essência da teoria de comporta, ou sistema portão. Nesta teoria propõe-se que a transmissão de informação através do ponto de contato (sinapse) entre a fibra A $\delta$  e C e as células do corno dorsal da medula espinhal pode ser diminuída ou bloqueada (Patel, 2010). Está associada à esta questão a ativação de fibras A $\beta$ , não nociceptivas, que induzem analgesia e diminuição

da percepção da dor através do recrutamento de interneurônios na substância gelatinosa com liberação de encefalinas, que são neurotransmissores inibitórios; e inibição da liberação de substância P, havendo, assim, bloqueio na transmissão do sinal doloroso (Marchand, 2008).

O sistema opióide endógeno consiste de uma família de neuropeptídeos e receptores opióides distribuídos no sistema nervoso central. Os opióides, embora de uso bastante antigo, tiveram seu mecanismo elucidado somente a partir de 1973 (Carvalho e Lemonica, 1998; Fields, 2004). Até o momento já foram descritos os seguintes receptores opióides: mu ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ), sigma ( $\sigma$ ), delta ( $\delta$ ) e epsilon ( $\epsilon$ ) (Millan, 2002). Sabe-se atualmente que, no nível molecular, a ativação dos receptores  $\mu$  e  $\sigma$  encontra-se associada à elevação na condutância ao potássio (abertura dos canais de  $K^+$ ), hiperpolarizando a célula. O receptor  $\mu$  está funcionalmente acoplado à adenilciclase, um sistema efetor da proteína G. A ativação do receptor  $\kappa$  induz redução na condutância do cálcio. Este efeito é devido ao fechamento dos canais de cálcio tipo N, também associados à proteína G. Acredita-se que o receptor  $\sigma$  esteja associado aos canais iônicos ativados pelo glutamato e pode contribuir para a disforia produzida por alguns opióides (Stacey & Watkins, 1994; Carvalho e Lemonica, 1998; Millan, 2002; Fields, 2004; Ren & Dubner, 2008).

Quanto ao sistema descendente inibitório da dor, é descrito haver quatro partes interligadas do SNC: a) sistemas corticais e diencefálicos; b) substância cinzenta periaquedutal e periventricular, que são ricas em encefalinas e receptores opióides e que podem ser ativadas tanto por estimulação elétrica como por microinjeções de pequenas quantidades de opióides; c) partes do bulbo rostroventral, especialmente o núcleo magno da rafe (NMR) e núcleos adjacentes, que recebem impulsos excitatórios da PAG, e que por sua vez, enviam fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas, via funículo dorsolateral, que se projetam para o corno dorsal da medula e bulbo; d) corno dorsal bulbar e medular que recebe terminais de axônios do NMR e núcleos adjacentes (Carvalho e Lemonica, 1998; Millan, 2002; Yoshimura & Furue, 2006; Ren & Dubner, 2008;). Estas fibras descendentes são serotoninérgicas e noradrenérgicas e terminam entre as células de transmissão nociceptiva nas lâminas I, II e V, onde inibem seletivamente neurônios nociceptivos, incluindo interneurônios e os tratos ascendentes que se projetam rostralmente, como os tratos espinotalâmico, espinoreticular e espinomesencefálico. Os neurônios noradrenérgicos, originários no *locus ceruleus*, representam outro importante grupo de fibras que contribuem para a formação do sistema endógeno da dor (Carvalho e Lemonica, 1998; Millan, 2002; Yoshimura & Furue, 2006).

A noradrenalina é biossintetizada a partir de tirosina. A tirosina é primariamente convertida em dihidroxifenilalanina (DOPA) pela tirosina-hidroxilase, que é, posteriormente, convertida em dopamina através de descarboxilação. A dopamina, por sua vez, é convertida em noradrenalina pela dopamina- $\beta$ -hidroxilase (Pertovaara, 2006). No cérebro, os grupos de células noradrenérgicas são classificados de A1 – A7. O grupo A1 está localizado no nível da área postrema, A2 está distribuído por todo complexo vagal dorsal, A3 está na formação reticular medular e A4 circunda todo o quarto ventrículo. O grupo A5 está na ponte ventrolateral, A6, ou *locus ceruleus*, está localizado dorsalmente a ponte e A7 na parte lateral da ponte, próximo ao lemnisco lateral (Millan, 2002; Pertovaara, 2006). As principais vias ascendentes de projeção noradrenérgica no SNC são os feixes dorsal e ventral e o feixe

periventricular (Cooper *et al.*, 2003). As células do grupo A5-A7 tem projeções noradrenérgicas significativas para a medula espinhal. Na periferia, o sistema nervoso simpático é a principal fonte neural de noradrenalina (Cooper *et al.*, 2003; Pertovaara, 2006).

Os receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  desempenham um importante papel na modulação da dor, especialmente nos casos de dor neuropática (Macpherson, 2000). A estimulação elétrica da região cinzenta periaquedutal do mesencéfalo e da medula ventromedial rostral para induzir a antinocicepção, aumenta os níveis mensuráveis de norepinefrina no fluido cefalorraquidiano. Este achado sugere uma forte contribuição da noradrenalina na antinocicepção associada com inibição descendente. Embora nem a região cinzenta periaquedutal do mesencéfalo nem a medula ventromedial rostral contenham neurônios noradrenérgicos, ambas as regiões comunicam-se com sítios noradrenérgicos importantes para a modulação da dor, incluindo o *locus ceruleus* e o núcleo de Kolliker-Fuse, que são as principais fontes de projeções noradrenérgicas para a medula espinhal, e, provavelmente, podem servir para inibir a resposta pré-sináptica e pós-sináptica da dor nos neurônios espinhais. Numerosos estudos tem demonstrado que a ativação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos na medula exerce forte efeito antinociceptivo (Millan, 2002; Yoshimura & Furue, 2006; Ossipov *et al.*, 2010). Uma série de teorias têm sido propostas para explicar esse efeito, que inclui o aumento da ativação da via descendente inibitória através do *locus coeruleus*, um efeito inibitório direto sobre a ativação neuronal em sítios receptores da substância gelatinosa e uma redução na liberação de substância P (Macpherson, 2000). A ativação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos causa inibição da transmissão nociceptiva ao nível da medula espinhal através de atividade pré-sináptica, inibindo a liberação de neurotransmissores excitatórios a partir de terminais aferentes primários, bem como através de sítios pós-sinápticos (Ossipov *et al.*, 2010).

## **1.2. Clonidina: da ação vasoconstritora à adjuvante na anestesia**

O primeiro não-opióide e analgésico a ser extensivamente estudado e aprovado para administração epidural foi o agonista dos receptores adrenérgicos CND (Crews, 2000). A CND (Figura 3) é uma imidazolidina com ação anti-hipertensiva, que ativa receptores  $\alpha$  adrenérgicos, especificamente os receptores  $\alpha_2$ . Como efeito da ativação destes receptores, tem-se redução do tônus simpático, resultando em queda na pressão sistólica e diastólica e da frequência cardíaca (Martindale, 2011).

Sintetizada em 1960 com indicação terapêutica de descongestionante nasal devido à ação vasoconstritora (Simonetti *et al.*, 1997), a CND foi, posteriormente, introduzida na terapia anti-hipertensiva, quadro para o qual permanece em mercado (Martindale, 2011), para casos refratários. Com a elucidação do mecanismo de ação e observação da ocorrência do efeito sedativo, o fármaco ganhou expressivo interesse em anestesiologia, com indicação também para uma variedade de quadros de dor crônica e neuropática (Lauretti *et al.*, 2002; MacCartney *et al.*, 2007; Feng *et al.* 2009).

O receptor  $\alpha_2$  adrenérgico consiste de uma cadeia polipeptídica e pertence à família dos receptores de membrana de 7 hélices transmembranares. Na face citoplasmática da membrana existem os pontos

de contato para a proteína G, e a resposta elucidada via AMPc inclui efluxo de  $K^+$  e supressão do influxo de  $Ca^{+2}$ , através de seus respectivos canais (Pertovaara, 2006).

Devido a densa participação da noradrenalina na via descendente inibitória da dor, sabe-se que a CND, por ser um agonista dos receptores  $\alpha_2$ , mimetiza a ação da noradrenalina nesses receptores (Simonetti *et al.*, 1997). Uma outra propriedade da CND é sua ação anestésica local própria, que ensejou sua utilização em combinação com anestésicos locais para bloqueio de nervos periféricos. Esta ação foi confirmada por pesquisadores que observaram que além de inibir (Singelyn *et al* 1992), a CND diminui a velocidade de condução de impulsos nas fibras C (Buttner *et al* 1992). Soma-se a isso o mecanismo de vasoconstrição mediado pelos receptores  $\alpha_2$  pós-sinápticos, que reduz a absorção e permite maior tempo de contato de anestésicos locais com o tecido neural (Rhee *et al.*, 2003; Neves *et al.*, 2006).

A CND tem sido utilizada no tratamento profilático da enxaqueca e em associação com opióides no tratamento da dor oriunda de câncer (Martindale, 2011). No manejo da dor do câncer, pode ser administrada com opióides por infusão peridural contínua, em dose de 30 microgramas/hora (Martindale, 2011). Os principais efeitos adversos da CND referem-se ao sistema nervoso central: sedação, boca seca, desânimo e perda de concentração são frequentes e mais intensos no início do tratamento. Com o tratamento mais prolongado, ginecomastia, galactorréia, pesadelos, impotência sexual e hipotensão postural já foram relatados. A CND pode causar aumento exagerado da pressão arterial (efeito rebote), quando da interrupção abrupta do tratamento. O uso concomitante com antidepressivos tricíclicos pode diminuir o efeito hipotensor da CND (Tavares & Plavnik, 1998).

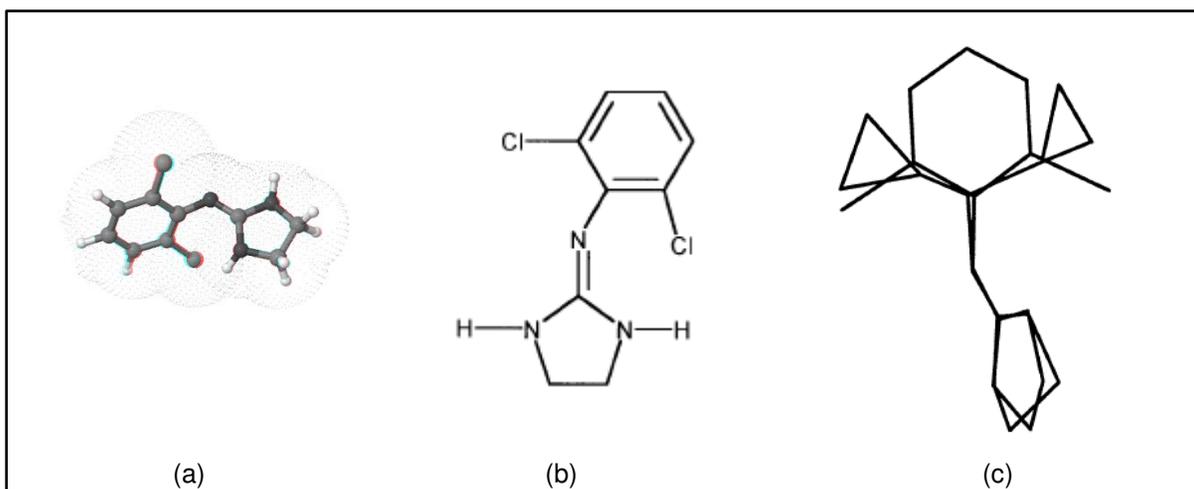


Figura 3: Estrutura química da CND ou 2-[2,6-diclorofenilimino] imidazolidina (a) e representação do tautômero imina (b). Conformações de mínima energia da forma básica (c), de acordo com Remko *et al* (2001).

Este fármaco tem sido também usado sozinho ou em associação com anestésicos gerais, locais ou opióides. A administração epidural em dose de 0,5 – 2,0 $\mu$ g/kg/h por infusão contínua produz analgesia pós-operatória dose dependente, sem maiores efeitos colaterais (Crews, 2000). Na prática anestésica, a CND mostrou reduzir os níveis requeridos de anestésicos para anestesia geral e também é usada na

prevenção de tremores, após a anestesia geral ou local (Macpherson, 2000). Uma vez que produz sedação e reduz a ansiedade sem associação à depressão respiratória, seu uso também é destacado como medicação analgésica em procedimentos pós-operatórios para controle da dor. No entanto, sua duração de ação é relativamente curta, quando comparada com a potencial duração da dor, exigindo várias aplicações para manutenção dos níveis plasmáticos (Nunes *et al.*, 2005).

A CND adicionada aos anestésicos locais promove efeitos benéficos (Columb & Ramsaran, 2010) como: a) redução significativa do tempo de latência para instalação do bloqueio; b) prolongamento da duração e intensificação do bloqueio sensitivo, possivelmente por ação anestésica local própria nas fibras C e A $\delta$ ; c) sedação devido à absorção sistêmica (uma propriedade desejável como medicação pré-anestésica) (Simonetti *et al.*, 1997; Dahmani *et al.*, 2010; Singh *et al.* 2011). A qualidade da analgesia pós-operatória em mulheres submetidas à cesariana foi avaliada pela associação da CND (15 e 30 $\mu$ g) à bupivacaína hiperbárica (12,5mg) e morfina (100 $\mu$ g), onde observou-se que a adição do agonista adrenérgico  $\alpha_2$  melhorou a qualidade da analgesia, sendo a dose mínima recomendada deste fármaco igual a 15 $\mu$ g (Neves *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram relatados por Tuijl e colaboradores (2006), porém em dose de 75 $\mu$ g de CND associada à bupivacaína 0,5%. Apesar disso, é relatado que esta dose (75 $\mu$ g) leva à maior ocorrência de hipotensão arterial quando comparada a menores doses (ex.: 45  $\mu$ g), havendo mesmo efeito anestésico e analgésico para ambas as doses (Braz *et al.*, 2003), fato que reforça a necessidade de menores doses do agonista  $\alpha_2$  com o intuito de evitar os efeitos hemodinâmicos indesejados. Doses de 25 $\mu$ g e 75 $\mu$ g de CND foram empregadas associadas à morfina (250 $\mu$ g) para analgesia pós-operatória de artroplastia total de joelho, tendo sido observada diminuição no consumo de morfina, apesar da maior incidência de hipotensão nos grupos tratados com CND (Sites *et al.*, 2003).

No caso de pacientes não-responsivos aos tratamentos convencionais para dor neuropática, que inclui o uso de antiinflamatórios não-esteroidais, antidepressivos, fisioterapia e opióides, a associação de 90  $\mu$ g/dia de CND com lidocaína 1%, resultou em ação antinociceptiva (Lauretti *et al.*, 2002). Quando administrada por via espinal, a CND foi eficaz para a alodinia e para a dor crônica neoplásica refratária à morfina, particularmente do tipo neuropática, em que os pacientes receberam infusão contínua de CND 30 $\mu$ g/h (Lauretti *et al.*, 2002). Feng *et al.* (2009) demonstraram, em modelos animais com dor neuropática induzida por ligação parcial do nervo ciático, que a administração intratecal de CND tem efeito antialodínico por inibição direta de citocinas pró-inflamatórias. Braga *et al.* (2012) avaliaram a associação de diferentes adjuvantes à bupivacaína hiperbárica em raquianestesia para cesariana e observaram que a dose de 75 $\mu$ g foi adequada para anestesia e analgesia pós-operatória. Braga *et al.* (2013) avaliaram ainda a associação de CND (75 $\mu$ g) e morfina (100 $\mu$ g) à bupivacaína em doses de 8 e 10mg, observando anestesia adequada mesmo nos grupos tratados com menor dose do anestésico. McCartney e col. (2007) revisaram estudos clínicos do uso da associação entre CND e anestésicos locais (lidocaína, mepivacaína, ropivacaína, levobupivacaína e bupivacaína) e concluíram pela maior aplicabilidade da associação para anestésicos de ação intermediária (menos lipofílicos, como lidocaína e mepivacaína), com aumento do tempo de anestesia sem modificação da latência. A revisão indicou ainda que doses

moderadas de CND, i.e., abaixo daquelas capazes de induzir hipotensão, são as mais indicadas para prolongamento do efeito anestésico. De fato outra revisão do uso da CND (Elia *et al.*, 2008), recomenda sua associação aos anestésicos locais.

Desde os relatos iniciais da eficácia analgésica da CND, outras investigações demonstraram seu uso em uma variedade de estados de dor crônica e neuropática. Devido à alta densidade de receptores  $\alpha_2$  na medula espinhal, é difundido o uso da CND por administração epidural. No tratamento da dor aguda, resultados utilizando este método são animadores, com uma série de estudos mostrando redução na necessidade de opióides (Macpherson, 2000). A CND, que vem ocupando uma posição única na anestesiologia, promete se firmar no terreno da analgesia pós-operatória por não apresentar os efeitos colaterais dos opióides. Em contrapartida, essa onipresença da CND na anestesiologia não se faz sentir efetivamente no terreno dos bloqueios de nervos periféricos, embora ela seja importante neste particular. Em razão disto, urge a retomada da valorização da CND como adjuvante nesta modalidade de técnica regional (Simonetti *et al.*, 1997).

### 1.2.1. Propriedades físico-químicas da Clonidina

A CND ou 2-[2,6-diclorofenil]imino]imidazolidina ( $C_9H_9Cl_2N_3$ , massa molecular de 230,1g/mol), é descrita como um fármaco lipofílico ( $\log P$  octanol/água = 1,59), característica que seria responsável pela sua fácil penetração e ação no SNC (Remko *et al.*, 2001).

Remko e colaboradores (2001), por estudos de modelagem molecular, demonstraram que a forma básica da CND assume uma geometria em que seus anéis fenil e imidazolinico são praticamente perpendiculares um ao outro (Figura 3c), sendo esta não coplanaridade um requisito para a interação da CND com os receptores adrenérgicos, para exercer seu efeito biológico. Além disso, a CND prefere a forma tautomérica de imina, com uma dupla ligação exocíclica ( $[rN=C(NHR)R']$ ), o que a torna uma Base de Schiff, representada na figura 3b, como demonstraram experimentos teóricos (Remko *et al.*, 2001) e medidas de RMN (Jackman & Jen, 1975). Cálculos de modelagem molecular indicaram que os sítios primários de protonação da CND estão no grupo imidazolinico (Remko *et al.*, 2001). O pKa da CND é 8,3 (Remko *et al.*, 2006), tal que em pH fisiológico a CND está 80% protonada. Ela é comercializada na forma de cloridrato, e se apresenta como um pó cristalino esbranquiçado, solúvel em água e etanol absoluto (Martindale, 2011; Merck Index, 2001).

### 1.2.2. Relação com anestésicos locais

Assim como para os anestésicos locais (AL), acredita-se que a forma neutra da CND é a responsável pela penetração através das membranas, permitindo que o fármaco atinja o sítio de ação, havendo indicações de que a forma protonada seria a responsável pela interação com os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, i.e., a forma ativa (Remko *et al.*, 2001). A correlação entre hidrofobicidade do composto e

sua habilidade de penetrar domínios hidrofóbicos da membrana celular também é reivindicada para a CND, assim como para os AL (de Paula & Schreier, 1996; de Araújo *et al.*, 2008).

Os anestésicos locais de uso clínico são moléculas que consistem numa parte aromática ligada a uma cadeia lateral básica por uma ligação éster ou amida. São, em geral, bases fracas (de Paula & Schreier, 1996), por possuírem grupo amina ionizável em pH entre 7,6 e 8,9 (de Araújo *et al.* 2008), razão pela qual encontram-se em grande parte ionizados em pH fisiológico. Este aspecto é importante no que concerne à sua capacidade de penetrar na bainha dos nervos e na membrana axônica (Schulman & Strichartz, 2009), sendo necessárias as formas protonada (mais solúvel em água) e neutra (mais lipofílica) para bloquear a condução do impulso nervoso. Os AL podem prover analgesia em várias partes do corpo através de aplicação tópica, injeção nas vizinhanças das terminações nervosas periféricas e troncos nervosos maiores, ou instilação dentro dos espaços peridurais ou subaracnóideos (Strichartz & Covino, 1990). As características desejáveis para uma molécula anestésica são: a longa duração de ação, baixa toxicidade local e/ou sistêmica e seletividade para o bloqueio sensorial em relação ao bloqueio motor (Strichartz & Covino, 1990; de Araujo *et al.*, 2003). Os principais efeitos adversos dos anestésicos locais afetam o SNC e o sistema cardiovascular. Podem ser observados tremores, agitação, vasodilatação e redução da contratilidade miocárdica (Rang *et al.* 2012). Devido a tais eventos, principalmente àqueles que levam às alterações hemodinâmicas, a associação dos AL com fármacos que levem à diminuição da dose requerida deste último para anestesia efetiva, é racionalmente bem-vinda. A CND é um fármaco conhecido por prolongar os efeitos dos anestésicos locais, reduzindo a dose requerida para anestesia, sem maiores eventos adversos (Rhee *et al.*, 2003; Neves *et al.*, 2006; Tuijl *et al.*, 2006; Elia *et al.*, 2008). Devido a tais fatos, a associação entre a CND e o anestésico local bupivacaína, será avaliada no presente trabalho.

### **1.3. Bupivacaína**

A bupivacaína (BVC) é o anestésico local, pertencente à classe das amino-amidas, mais utilizado em procedimentos cirúrgicos, principalmente para bloqueios regionais prolongados. Este fármaco foi o primeiro anestésico que combinou propriedades como início de ação moderada, longa duração, bloqueio da condução e separação significativa entre bloqueio sensorial e motor (Malamed, 2001; de Araujo, 2002). A duração da anestesia com BVC é tal que, para a maioria das indicações, uma dose única é suficiente. É encontrada comercialmente em doses que variam de 0,1 a 0,75% (McLure & Rubin, 2005). Na prática clínica, emprega-se doses de 0,25% e 0,5% (Martindale, 2011).

Nas doses recomendadas, a bupivacaína produz completo bloqueio sensitivo, mas o efeito na função motora difere entre as concentrações mais usuais na clínica:

- 0,25%: quando usada para bloqueio caudal, peridural ou do nervo periférico, produz bloqueio motor incompleto. Deve ser usada em cirurgias em que o relaxamento muscular não é importante, ou quando outro meio de produzir relaxamento muscular for usado simultaneamente. O início da ação pode ser mais lento do que com as concentrações de 0,5% e 0,75% (Martindale, 2011).

- 0,5%: promove bloqueio motor para bloqueio caudal, peridural ou nervoso, mas o relaxamento muscular pode ser inadequado para cirurgias em que o relaxamento muscular é essencial (Martindale, 2011).
- 0,75%: produz completo bloqueio motor. Mais útil para bloqueio peridural em operações abdominais que necessitam de completo relaxamento muscular e para anestesia retrobulbar (Martindale, 2011).

Em relação às propriedades físico-químicas, apresenta-se como pó cristalino branco, com fórmula molecular  $C_{18}H_{28}N_2O.HCl$ . A solubilidade em água é de aproximadamente 100mg/mL a 20°C (como cloridrato), e possui pK de 8,09 (Merck Index, 2001).

A presença de um carbono assimétrico em sua molécula permite a existência de dois estereoisômeros: a dextrobupivacaína (R+) e a levobupivacaína (S-). O advento das pesquisas sobre estereosseletividade possibilitou a modificação das proporções dos estereoisômeros R(+) e S(-) da bupivacaína e a síntese de nova formulação anestésica local, contendo 25% do isômero R (+)-bupivacaína e 75% do isômero S(-)-bupivacaína, melhorando o perfil anestésico do fármaco em relação à levobupivacaína e aumentando sua margem de segurança (de Araújo, 2005).

#### 1.4. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por, pelo menos 6 unidades de glicopirranose. São obtidas a partir do amido por ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) de microorganismos, um tipo de amilase que provoca a clivagem da estrutura do amido, originando uma mistura de dextrinas cíclicas e lineares que contém 6 a 12 unidades de glicose (Fernandes & Veiga, 1999a; Loftsson & Duchene, 2007). As ciclodextrinas naturais que se obtém em maiores percentagens são:  $\alpha$ -ciclodextrina (6 unidades de glicopirranose),  $\beta$ -ciclodextrina (7 unidades) e a  $\gamma$ -ciclodextrina (8 unidades); sendo que as suas quantidades relativas dependem do tipo de microrganismo que produz a enzima e das condições de reação (Fernandes & Veiga, 1999 (b); Al Omari *et al.*, 2006).

Devido a conformação em cadeira da glicopirranose, as ciclodextrinas assumem um formato de cone truncado, ou toroidal, ao invés de um cilindro perfeito (Brewster & Loftsson, 2007). Análises de raios-X revelaram que os grupos hidroxila secundários (C2 e C3) estão localizados nas proximidades da borda maior (cabeça) deste cone truncado, enquanto os grupos hidroxila primários (C6) estão na ponta (cauda) desta estrutura. Além disso, os hidrogênios dos carbonos apolares C3 e C5 e os oxigênios tipo éter estão voltados para o interior destas moléculas de formato toroidal (Figura 4). Isto resulta num arranjo macromolecular com exterior hidrofílico, solúvel em água, e uma cavidade apolar, fornecendo uma matriz hidrofóbica, descrita como um microambiente heterogêneo (de Paula *et al* 2010a).

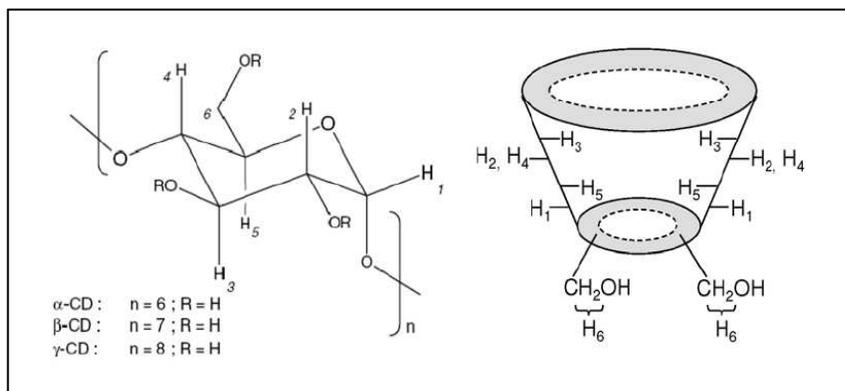


Figura 4: Estrutura química das ciclodextrinas naturais e representação do anel macrocíclico, em formato toroidal (de Paula *et al* 2010 (a)).

A habilidade das ciclodextrinas de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e da polaridade com o fármaco convidado (“guest”). Além disso, as forças que governam a complexação têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água existente na cavidade das ciclodextrinas, às interações de Van-der-Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, já que a cavidade interna das ciclodextrinas naturais tem diâmetros de 5 a 9,5 Å sendo, no caso da  $\beta$ -ciclodextrina (7,8 Å), grande o bastante para acomodar um hexanel aromático (Loftsson & Brewster, 1997; de Araújo *et al.*, 2003; de Paula *et al.*, 2010). As moléculas complexadas permanecem, normalmente, orientadas em posição onde há o máximo contato entre sua porção hidrofóbica e a cavidade apolar do anel macrocíclico, estando sua porção hidrofílica em contato com os grupos hidroxil da ciclodextrina (de Araújo *et al.*, 2003).

As ciclodextrinas sofrem biotransformação no cólon, comparável à do amido, porém com velocidade mais lenta, o que se explica pelo fato de as ciclodextrinas (que são produtos cíclicos) não serem hidrolisadas pelas  $\beta$ -amilases, mas somente pelas  $\alpha$ -amilases, que promovem hidrólise muito lenta. A velocidade de degradação diminui na sequência  $\gamma > \beta > \alpha$ , a tal ponto que a  $\alpha$ -ciclodextrina é excretada praticamente inalterada pelas fezes (Korolkovas, 1992).

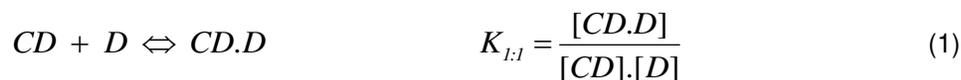
A administração oral de ciclodextrinas naturais não resulta em toxicidade aguda, porém na administração parenteral não se observa o mesmo. Se administradas por via infiltrativa, a excreção é renal, resultando em nefrotoxicidade e eventos hemolíticos (Duchene & Wouessidjewe, 1990a; Loftsson *et al.*, 2005). A atividade hemolítica das ciclodextrinas é devida à ruptura de membranas, causada pela remoção de componentes da mesma, como os fosfolípidos e colesterol que se complexam com o anel macrocíclico. A administração intramuscular pode levar a ulcerações (Duchene & Wouessidjewe, 1990b). As características das ciclodextrinas naturais têm limitado a sua aplicação enquanto carreadores de fármacos, quer devido à sua relativa baixa solubilidade aquosa e em solventes orgânicos, quer devido à toxicidade que apresentam quando utilizadas em preparações parenterais (Brewster & Loftsson, 2007).

Para garantir maior segurança de uso, as ciclodextrinas tem sido modificadas para uso parenteral, preferencialmente nas hidroxilas dos carbonos nas posições 2, 3 ou 6, que são os mais reativos. Os

derivados das ciclodextrinas podem ser obtidos pela substituição de grupos metila, etila, carboximetila, hidroxietila, hidroxipropila, sacarídeos ou através de polimerização. As ciclodextrinas sintéticas de maior representatividade em tecnologia farmacêutica são as ciclodextrinas hidrofílicas (metiladas, hidroxialquiladas e ramificadas), hidrófobas (etiladas) e ionizáveis (Fernandes & Veiga, 1999a). Apenas a hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD), sulfobutil-β-ciclodextrina e γ-ciclodextrina possuem respaldo toxicológico para uso parenteral como carreadores de fármacos (Szejtli, 1998; Loftsson & Duchene, 2007). A HP-β-CD é muito mais solúvel que a β-ciclodextrina natural; é considerada não tóxica e pode ser encontrada numa série de formulações farmacêuticas disponíveis no mercado, com doses orais de até 8g HP-β-CD/dia e parenterais de até 16g HP-β-CD/dia (Sporanox® – Janssen). É bem tolerada em humanos, tendo como efeitos adversos principais a ocorrência de fezes moles e diarreia (em doses de 16-24g HP-β-CD/dia por 14 dias). O tempo de meia vida é de aproximadamente 1,7 horas e o volume aparente de distribuição 0,2 L/kg. Após administração intravenosa é quase que completamente eliminada pelos rins, via filtração glomerular (Brewster & Loftsson, 2007).

Durante as últimas décadas, as ciclodextrinas e seus derivados têm sido cada vez mais investigados na área farmacêutica devido a sua habilidade de acomodar inteiramente, ou pelo menos parcialmente, moléculas de tamanho e polaridade apropriados em suas cavidades (Dollo *et al.*, 1996; Davis & Brewster, 2004). Uma ou duas moléculas-hóspede podem ser complexadas com uma, duas ou três ciclodextrinas (de Paula *et al.*, 2010b). Através desta propriedade, produtos líquidos, como óleos essenciais, podem ser transformados em pó; produtos que são oxidáveis, voláteis ou instáveis na presença de ar, luz ou calor podem ser estabilizados e, em alguns casos, o mesmo resultado pode ser observado para produtos que são susceptíveis a hidrólise (Duchene & Wouessidjewe, 1990). Estes efeitos levam a modificações úteis nas propriedades físicas e químicas da molécula-hóspede (Dollo *et al.*, 1996), permitindo otimização da estabilidade, aumento da solubilidade e taxa de dissolução em água, permeabilidade à membranas e da biodisponibilidade (Dollo *et al.*, 1996; Fraceto *et al.*, 2007a; de Paula *et al.*, 2010).

As moléculas do fármaco livre estão em equilíbrio com as moléculas ligadas à cavidade das ciclodextrinas. A determinação da constante de equilíbrio ou estabilidade do complexo fármaco-ciclodextrina é importante, uma vez que este é um indicador de mudanças nas propriedades físico-químicas do fármaco, no complexo de inclusão (Loftsson, 1996). Em consequência da dissolução dos complexos, um equilíbrio é estabelecido entre as espécies dissociadas e associadas e este fato é expresso pela constante de estabilidade do complexo ( $K_a$ ). A associação da ciclodextrina e da molécula-hóspede e a dissociação do complexo formado são governadas por um equilíbrio termodinâmico (Szejtli, 1998), descrito por:



onde CD = ciclodextrina, D = fármaco e CD.D = complexo, na estequiometria de 1:1.

O método mais usado para a detecção da formação de complexos em solução é o método da solubilidade de fases, descrito por Higuchi e Connors (1965), porém métodos de titulação como o

Beneshi & Hildebrand tem sido bastante empregados, principalmente por permitir discriminar complexos formados com diferentes estequiometrias: 1:1; 1:2 ( Saltão & Veiga, 2001; Banerjee et al., 2004).

Uma variedade de técnicas tem sido usada para analisar os complexos. Dentre eles, a ressonância magnética nuclear (RMN) é a mais indicada por fornecer evidências inequívocas de formação do complexo, como medidas de proximidade espacial entre hidrogênios ou carbonos da molécula anfitriã e convidada (Hedges, 1998; de Paula *et al.*, 2010a). A calorimetria exploratória diferencial também pode ser usada, porém para análise por esta técnica, a molécula hóspede deve ter ponto de fusão abaixo de 300°C, temperatura na qual a ciclodextrina se decompõe (Giordano *et al.*, 2001). Muitas outras técnicas também tem sido usadas para caracterizar complexos como rotação óptica, dicroísmo circular, espectrometria de massas (Hedges, 1998), absorção UV-VIS (Crupi *et al.* 2007), fluorescência, difração de Raios-X (Sinha *et al.*, 2010) e microscopia eletrônica de varredura.

O benefício terapêutico de fármacos administrados na forma tradicional é, algumas vezes, limitado pelas propriedades físico-químicas (solubilidade), toxicológicas, concentração do fármaco, condições e fluxo sanguíneo no local de absorção (Goodman & Gilman, 2007), bem como pelas barreiras fisiológicas (de Araújo *et al.*, 2003). Prolongar o efeito de fármacos através do uso de carreadores é uma estratégia de tecnologia farmacêutica que tem sido extensivamente descrita na literatura. No caso de fármacos com ação anestésica e analgésica, carreadores como lipossomas, biopolímeros e ciclodextrinas têm sido sugeridos, devido sua capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos em um variado percentual (Nunes *et al.*, 2005), alterando suas propriedades físico-químicas limitantes (de Paula *et al.*, 2010b). Através do desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada é possível manipular algumas dessas propriedades além de melhorar os efeitos terapêuticos dos fármacos, favorecendo sua utilização clínica (de Araújo *et al.*, 2003; de Paula *et al.*, 2010b).

Na terapia da dor destaca-se o uso de carreadores do tipo ciclodextrina, para complexação de anestésicos locais e opióides. Jang *et al.* (1992) mostraram, em modelos animais, que a inclusão de morfina, lofantanil, alfentanil e sufentanil em HP- $\beta$ -CD prolongou a duração da anestesia e reduziu a ocorrência de catalepsia. Em revisão literária, Challa *et al.* (2005) demonstraram que a inclusão de morfina com  $\alpha$ -ciclodextrina, veiculada em supositórios, aumentou a biodisponibilidade do fármaco por inibir a circulação da morfina para órgãos onde há impacto pelo metabolismo de primeira passagem. Volobuef *et al.* (2012) mostraram que a complexação de sufentanil com HP- $\beta$ -CD levou a aumento do tempo de anestesia com menor efeito hemolítico, sendo a formulação um alternativa viável para a administração do opióide. O laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da Unicamp tem se destacado no uso destes carreadores, através da publicação de inúmeros trabalhos (Pinto *et al.*, 2005, de Araújo, 2005, 2006, 2008; Moraes *et al.*, 2006, 2007a,b, Arantes *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2012), além de um depósito de patente relacionada à complexação de  $\beta$ -ciclodextrina com AL, como bupivacaína e benzocaína (PI3039846, 2003). De fato, em artigos de revisão recente do grupo (de Paula *et al.*, 2010, 2012), avaliando publicações e patentes para liberação sustentada (drug delivery) de AL, a ciclodextrina é apontada como o carreador mais promissor para uso futuro em anestesia regional. No caso da ropivacaína, por exemplo, a complexação com HP- $\beta$ -CD levou à modulação da liberação, diminuição de

efeitos hemolíticos e aumento da intensidade e duração do bloqueio sensorial deste anestésico (de Araújo *et al.*, 2008).

Estudos de caracterização de complexos lidocaína:HP- $\beta$ -CD evidenciaram a eficiência deste carreador em acomodar o fármaco. Os resultados indicaram diminuição da taxa de liberação da lidocaína após complexação bem como a perda do pico endotérmico característico deste fármaco, observado por DSC, após este processo. Estudos termodinâmicos envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência revelaram a estabilidade do composto formado (Moraes *et al.*, 2007b). Pesquisas com bupivacaína racêmica (S50-R50) e com excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) mostraram que, apesar da eficiência da complexação de ambas com HP- $\beta$ -CD e da potencialização do bloqueio nervoso aferente e diminuição da latência (sem modificação na duração do bloqueio motor), o fármaco com excesso enantiomérico de 50% mostrou-se mais viável clinicamente, pela menor toxicidade que apresenta frente a bupivacaína racêmica (S50-R50) (de Araújo *et al.*, 2006).

Neste trabalho preparamos e caracterizamos o complexo clonidina:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, objetivando que a inclusão da CND levasse à modulação de sua liberação no sítio alvo, bem como diminuisse a incidência de eventos adversos relacionados ao fármaco. A passagem pela barreira hematoencefálica (indesejável) também é outro fator que possivelmente será contornado pelos complexos de inclusão que, por serem mais hidrofílicos, teriam mais dificuldade em atravessar aquela barreira (Monnaert *et al.*, 2004) que é seletiva a moléculas muito hidrofóbicas e de pequeno tamanho (Rojas, 2011). Esta característica, possivelmente, contornaria o efeito central do fármaco (hipotensão) associado ao seu uso como adjuvante em anestesia. Obtido e caracterizado o complexo, testamos a atividade antinociceptiva da CND complexada com ciclodextrina, objetivando seu uso em associação com anestésicos locais (Rhee *et al.*, 2003; Neves *et al.*, 2006; Tuijl *et al.*, 2006; Elia *et al.*, 2008), de forma a prolongar o efeito anestésico em procedimentos cirúrgicos, sem necessidade de aumento da dose do anestésico local, evitando assim efeitos colaterais como repercussões hemodinâmicas desfavoráveis.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Preparar, caracterizar e avaliar a eficácia farmacológica de formulações de liberação modificada contendo cloridrato de clonidina complexado com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, com o intuito de otimizar as propriedades farmacológicas desta.

### 2.2. Objetivos específicos

- Preparar o complexo de inclusão entre clonidina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.
- Caracterizar a interação do cloridrato de clonidina com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, determinando a estequiometria de formação do complexo.
- Caracterizar o complexo formado, comparado ao fármaco não complexado, através de ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de Raios-X, ressonância magnética nuclear, microscopia eletrônica e liberação *in vitro*.
- Avaliar o efeito citotóxico do complexo formado, em comparação com a CND livre, bupivacaína livre e associação de bupivacaína com complexo CND:HP- $\beta$ -CD.
- Avaliar o efeito antinociceptivo do complexo formado, em comparação com a CND livre, bupivacaína livre e associação de bupivacaína com complexo CND:HP- $\beta$ -CD.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

##### 3.1.1. *Fármacos, sais e solventes*

*Fármacos:* Cloridrato de Clonidina (Cristália Ind. Farmacêutica) e Cloridrato de Bupivacaína (Cristália Ind. Farmacêutica)

*Ciclodextrina:* hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (Roquete Tech. Lab.)

*Tampões:* Hepes 20mM pH 7,4; citrato de sódio 5mM pH 5,5; PBS 20mM pH 7,4; tampão universal PBC ajustado em pH 5,5; 7,4 e 12,0; solução carbonato de força iônica 5mM pH 12,0.

*Solventes:* acetonitrila (JT Baker), octanol (JT Baker)

##### 3.1.2. *Equipamentos*

- Liofilizador Labconco-freeze dry system/Freezone
- Espectrofotômetro Varian 50BIO
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Varian 9012 com injetor automático ProStar 410
- Calorímetro Mettler Toledo MultiSTAR HSS7
- Calorímetro TGA Mettler Toledo 851
- Difratorômetro Rigaku – geometria Bragg-Bretano  $\theta$ - $\theta$
- Espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600 MHz
- Microscópio Eletrônico de Varredura JSM 500 LV
- Evaporador de carbono Bal-Tec Med 020 Coating System
- Capela de fluxo laminar Veco

##### 3.1.3. *Animais*

Durante a realização deste trabalho foram usados ratos *Wistar* adultos, machos e com peso variando entre 250-350g. 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 pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e em consonância com a legislação vigente (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009), sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unicamp), sob o protocolo 2708-1 (Anexo I).

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Caracterização físico-química da clonidina

#### 3.2.1.1. Caracterização do Cloridrato de Clonidina por espectrometria UV-VIS

A espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível (UV/VIS) é um método analítico baseado na propriedade das espécies iônicas ou moleculares de absorverem energia de determinados comprimentos de onda na região do UV/VIS (Leal *et al.*, 2008). Quando os compostos absorvem luz, os elétrons são excitados dos níveis de energia mais baixos para os níveis mais altos (Solomons & Frylhe, 2009). Tendo em vista que os níveis energéticos das moléculas são quantizados, a absorção de energia pode ser considerada como um processo específico, relacionado com a estrutura da espécie absorvente, a qual determina a energia envolvida na transição, e a probabilidade com que esta ocorra. A intensidade da radiação que incide na amostra pode ser medida e relacionada com a concentração da espécie absorvente (Rocha & Teixeira, 2004).

Com o intuito de avaliar o comprimento de onda máximo de absorção do Cloridrato de Clonidina, a partir de uma solução estoque, foi preparada uma solução em concentração de 1mM em água deionizada e observado o espectro de absorção desta, na faixa de 200nm a 800nm, utilizando-se uma cela com caminho ótico de 1 cm.

#### 3.2.1.2. Determinação da absorvidade do Cloridrato de Clonidina em diferentes meios

A absorvidade, molar expressa a intensidade de absorção de uma espécie absorvente. É, em suma, a constante de proporcionalidade que relaciona a absorbância (A) registrada em um comprimento de onda específico ( $\lambda$ ) no UV-VIS com a concentração da amostra e a largura (l), em centímetros, do caminho ótico da luz incidente na amostra (Solomons & Frylhe, 2009). Com o intuito de elucidar os valores de absorvidade do cloridrato de clonidina em diferentes pH, a partir de uma solução estoque foram preparadas diluições em triplicata em concentração final de 1mM, as quais foram lidas em triplicata em 271 e 284nm, respectivamente os comprimentos de onda de máxima absorção determinados para a CND em pH 5,5 (tampão acetato 50mM), 7,4 (tampão Hepes 20mM) e 12 (carbonato 20mM). A partir da média dos valores das triplicatas, determinou-se a concentração do fármaco, pela curva de calibração traçada para cada pH.

### 3.2.1.3. Determinação do comportamento óptico em meios de diferentes constantes dielétricas

A polaridade do solvente tem influência direta no comportamento ótico de um composto químico (Reichardt, 2003). Para verificar a influência da polaridade do meio na absorção da CND na região do UV-VIS, foram preparadas amostras em concentração constante do fármaco (1mM) diluído em diferentes proporções de água:etanol, atingindo um volume final de 5mL por tubo (Tabela 2). A quantidade de cada solvente foi ajustada de maneira que fossem obtidas soluções de diferentes constantes dielétricas, de acordo com Deyhimi e col. (2004).

Tabela 2: Gradiente de polaridade água-álcool utilizado para obtenção de soluções de diferentes constantes dielétricas

tubo	% volume água	% volume álcool	Constante dielétrica
1	100	0	78,0
2	90	10	72,8
3	80	20	67,0
4	70	30	61,1
5	60	40	55,0
6	50	50	49,0
7	40	60	43,3
8	30	70	38,0
9	20	80	32,8
10	10	90	28,1
11	0	100	24,3

### 3.2.1.4. Determinação da solubilidade do Cloridrato de Clonidina em diferentes meios

A solubilidade de uma substância pura em dado solvente à temperatura constante é parâmetro característico da mesma, podendo servir para fins de identificação e avaliação de seu grau de pureza (F.BRAS, 2010). A solubilidade máxima do cloridrato de Clonidina em diferentes meios (tampão Hepes 20mM pH 7,4, tampão acetato de sódio pH 5,0 e tampão carbonato pH 12 ou em tampão universal fosfato-borato-citrato (PBC)), foi determinada, conforme metodologia adaptada da Farmacopéia Brasileira 5ª. Edição (ANVISA, 2010). O ensaio consistiu na adição de excesso de amostra (CND) à volumes constantes de solvente, visando à obtenção de solução saturada. Uma vez promovido o equilíbrio do sistema, por agitação prolongada e sob temperatura constante, foi determinado o conteúdo total de soluto na solução sobrenadante (F.BRAS, 2010). Para cada tampão, foi traçada a curva de calibração, sendo considerados apenas os resultados com  $r^2$  maior que 0,99.

### 3.2.1.5. Determinação do pK do cloridrato de Clonidina

O equilíbrio químico envolvendo ácidos e bases, principalmente em meio aquoso, é de fundamental importância, haja vista sua atuação em uma variedade de funções nos organismos vivos. Este equilíbrio pode ser representado pela classificação de Bronsted-Lowry, tal que quanto maior o caráter ácido da substância (i.e. sua tendência de liberar íons H<sup>+</sup> em solução, dada pela constante de equilíbrio K<sub>a</sub>), menor será o valor de seu pKa (Previdello *et al.*, 2006). Assim, a razão de concentrações da forma ácida a básica da substância pode ser controlada pela concentração de íons hidrogênio, de acordo com a equação de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pKa + \log \frac{[forma\ básica]}{[forma\ ácida]} \quad (2)$$

Para determinação do pK da CND, foi preparada uma amostra em concentração final de 1mM em volume final de 200mL. Esta solução foi segregada em quatro porções de 50mL, duas soluções foram tituladas com solução de HCl 1M e as demais com solução de NaOH 1M. As amostras foram deixadas sob agitação magnética constante e a cada adição de 5µL de NaOH ou HCl o pH foi aferido. O experimento foi realizado em duplicata, à temperatura ambiente. As curvas foram coletadas em faixa de pH que variou de 3,0 – 12,0.

### 3.2.1.6. Determinação do coeficiente de partição octanol-água

O coeficiente de partição de uma determinada espécie química é definido como sendo a razão entre as concentrações da mesma, quando dissolvida em sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa, e está associado à mudança de energia livre provocada pela substância sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema (Tavares, 2004). Esta relação pode ser expressa pela equação:

$$P(s) = \frac{[orgânica]}{[aquosa]} \quad \text{ou} \quad P(s) = \frac{no(s)/Vo}{na(s)/Va} \quad (3)$$

Onde P é a partição do composto analisado (s). A concentração do composto na fase orgânica ([orgânica]) e na fase aquosa ([aquosa]) nas condições de equilíbrio deve ser expressa em termos de n, o número de moles do composto. V representa o volume das fases e no + na = nt (número de moles total do fármaco) (de Paula & Schreier, 1996; de Araújo, 2005).

A fim de determinar o coeficiente de partição (P) do cloridrato de clonidina em sistema octanol/tampão Hepes 7,4 uma solução de 25mL de concentração conhecida (pela leitura de absorbância inserida no intervalo contemplado na curva de calibração, de 0,37 a 0,81) foi deixada sob agitação por 2 horas com 25mL de octanol. Após este período a solução foi transferida para um funil de separação para

remoção da fase aquosa, que foi posteriormente filtrada e submetida a leitura em espectrofotômetro, em 271nm. Pela equação da reta determinou-se a concentração final de CND na fase aquosa.

### 3.2.1.7. Determinação da partição em lipossomas

A porcentagem de CND encapsulada foi determinada em suspensões de lipossomas multilamelares (MLV), na concentração de 6mM, onde foram adicionadas soluções para que fosse obtida uma concentração final de 1mM de CND. Todas as amostras foram preparadas em tampão Hepes 20mM pH 7,4 contendo NaCl 150mM e deixadas em repouso por pelo menos duas horas, para que atingisse equilíbrio. Posteriormente, as suspensões foram submetidas à ultracentrifugação (120.000 x g) por duas horas à temperatura de 10°C. Após separação, alíquotas do sobrenadante foram analisadas por espectrofotometria UV em 271nm. A porcentagem de CND encapsulada em MLV foi calculada a partir da medida da porcentagem de fármaco não encapsulado, presente no sobrenadante. Para calcular a absorvância do fármaco encapsulado ( $Abs_{MLV:CND}$ ) a absorvância da solução inicial de CND ( $Abs_{CND}$ ) foi subtraída daquela do sobrenadante teste (CND livre), sendo este último valor corrigido ainda pela subtração da absorvância de uma amostra-controle, contendo somente lipossomas (MLV) (de Paula & Schreier, 1995; de Araújo, 2005).

$$\% EE = \frac{Abs[MLV:CND]}{Abs[CND]} \times 100 \quad (4)$$

Os valores de porcentagem de encapsulação podem também ser expressos em termos de coeficiente de partição (P) do fármaco entre duas fases imiscíveis, pela razão das concentrações desse entre a fase membranar (m) e a aquosa (a), de acordo com a equação 3.

### 3.2.1.8. Determinação da partição em membranas artificiais imobilizadas (IAM)

A correlação entre dados de retenção e propriedades biológicas melhoram quando colunas analíticas possuem maior grau de mimetismo com sistemas biológicos (Diniz, 2007). Neste sentido, o uso da cromatografia em membranas artificiais imobilizadas, IAM, do inglês *Immobilized Artificial Membranes*, tem mostrado ser uma forma eficiente de prever o comportamento lipofílico de moléculas e útil para o estudo de absorção por biomembranas (Leponete & Poole, 2002). É uma alternativa para determinação da partição entre octanol-água e lipossomas-água, visto que une a rapidez do HPLC em um modelo de fosfolípideo (Taillardat-Bertsching *et al.*, 2003). As colunas são constituídas de membranas artificiais ligadas covalentemente a partículas de sílica (Yang *et al.*, 1996; Taillardat-Bertschinger *et al.*, 2002), mimetizando, assim, o ambiente lipídico de uma membrana celular fluida em uma matriz sólida (Ottiger *et al.*, 1999).

A partição de fármacos em membranas é regida pela constante de ligação específica para cada droga (Figura 5A), que pode ser determinado pela cromatografia IAM (Pidgeon *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996). A IAM pode modelar com precisão as interações eletrostáticas e hidrofóbicas que ocorrem quando os fármacos ligam-se a interface da membrana ou particionam-se na mesma (Pidgeon *et al.*, 1995). Valores de partição de solutos, medidos em sistemas lipossomais são, de igual maneira, bem estimados através da cromatografia IAM (Ong *et al.*, 1996) (Figura 5B), porém com maior rapidez e reprodutibilidade (Taillardat-Bertsching *et al.*, 2003). O fator de capacidade é calculado através dos tempos de retenção do analito e de compostos não retidos (Figura 5c) (Taillardat-Bertsching *et al.*, 2002).

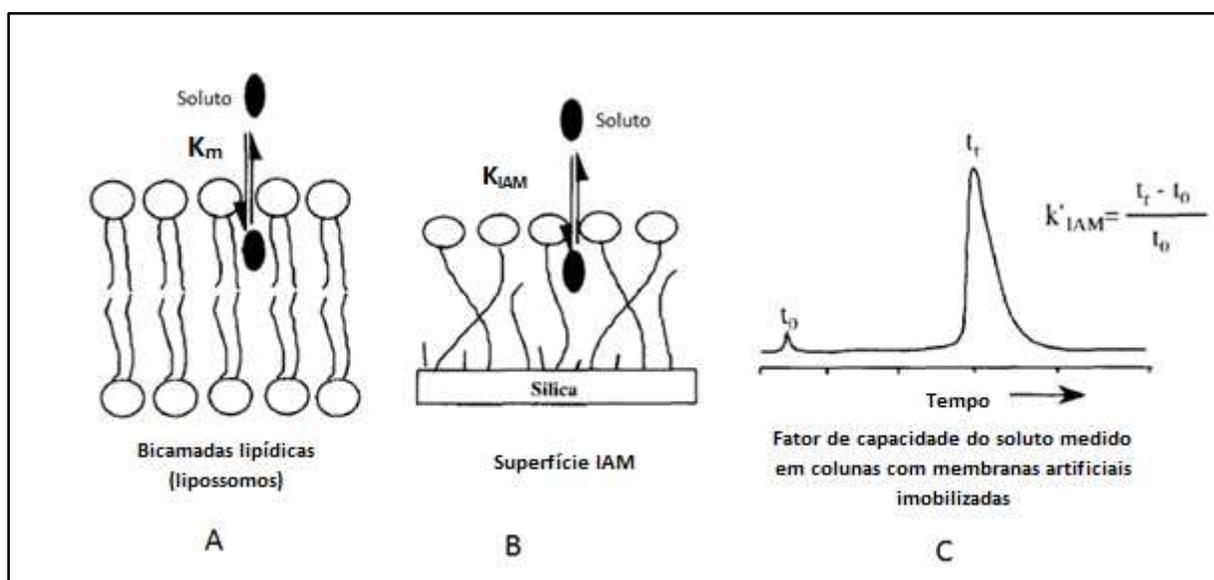


Figura 5: Representação esquemática da partição de solutos em bicamadas lipídicas (A) e em superfície de membranas artificiais imobilizadas (B) e do cálculo de fator de capacidade em colunas IAM. (adaptado de Pidgeon *et al.*, 1995; Ong *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996).

Para determinação da partição em IAM foram preparadas soluções em triplicada de ácido cítrico (1mg/mL), cloridrato de Clonidina 300µg/mL e complexo Clonidina:HP-β-CD com fármaco em concentração final de 300µg/mL. Previamente à injeção de 20µL de cada amostra, foi feito o condicionamento da coluna através da passagem de 10 a 15 volumes (da coluna) de fase móvel composta de tampão PBS:Acetonitrila 95:5, até obtenção de linha de base estável. Foi injetado inicialmente o ácido cítrico para determinação de  $t_0$  e, sequencialmente, cada amostra a analisar.

### 3.2.2. Preparação do complexo

#### 3.2.2.1. Determinação da estequiometria de complexação

A estequiometria de complexação foi determinada através das técnicas de variação contínua (*Job plot*) e de titulação. A técnica de variação contínua *Job plot* baseia-se na variação de um parâmetro físico-químico do composto (CND) observado na presença de CDs e que pode ser medido por técnicas

espectroscópicas (Shafi & Shihry, 2009). Na verdade este método é válido para qualquer técnica experimental que meça uma magnitude diretamente proporcional à concentração do complexo formado. Baseia-se no fato de que qualquer função que dependa diretamente da concentração do complexo, apresenta um máximo referente à fração molar de um dos componentes que formam o complexo. Em função deste máximo pode-se obter o coeficiente estequiométrico da reação de complexação (Lyra *et al.*, 2010).

Experimentos de absorção da radiação UV-VIS e fluorescência permitem a determinação da estequiometria de formação de complexos de inclusão através do emprego da equação de Benesi-Hildebrand (1949) (Sosnowska, 1997; Banerjee *et al.*, 2004). Esta equação é aplicável se a concentração de ciclodextrina estiver em excesso, quando comparada à concentração do fármaco e desde que haja uma variação na intensidade da medida com o aumento na concentração de ciclodextrina (Banerjee *et al.*, 2004; Tablet *et al.*, 2012).

Para o experimento de *Job Plot* foram preparadas soluções estoque de CND e HP-β-CD. A partir delas foram feitas diluições de modo que, em volume final de 5mL (completado com água deionizada), houvesse concentração final constante de 2mM (Tabela 3). Após agitação por 24 horas, o conteúdo de cada tubo foi lido em espectrofotômetro UV-VIS e os resultados de variação de absorbância foram graficados em função de *r*, definido como (Carvalho, 2007):

$$r = \frac{[CND]}{[CND]_{total} + [HP - \beta - CD]_{total}} \quad (5)$$

Onde: [CND] é a concentração de Clonidina, [HP-β-CD] é a concentração de hidroxipropil-beta-ciclodextrina e [CND]<sub>total</sub> é a concentração total de Clonidina

Tabela 3: Concentrações de CND e HP-β-CD utilizadas no experimento de *Job plot*

tubo	Concentração CND (mM)	Concentração HP-β-CD (mM)	Concentração total (mM)
1	0	2,00	2,00
2	0,25	1,75	2,00
3	0,50	1,50	2,00
4	0,75	1,25	2,00
5	1,00	1,00	2,00
6	1,25	0,75	2,00
7	1,50	0,50	2,00
8	1,75	0,25	2,00
9	2,00	0	2,00

Para o experimento de titulação, à uma solução de CND 1mM foram adicionadas concentrações crescentes de HP-β-CD, mantendo-se fixa a concentração do fármaco. As absorvâncias foram lidas nas razões molares 1:1; 1:10; 1:20; 1:30; 1:40; 1:50; 1:75; 1:100 CND:HP-β-CD. Após agitação os espectros foram coletados e os resultados obtidos tratados de acordo com a equação modificada de Benesi-Hildebrand (Banerjee *et al.*, 2004):

$$\frac{[CND]}{A - A_0} = \frac{1}{[HP - \beta - CD]^N} \quad (6)$$

Onde: [CND] é a concentração de Clonidina, [HP-β-CD] é a concentração de hidroxipropil-beta-ciclodextrina, A é a absorvância na presença de HP-β-CD e A<sub>0</sub> a absorvância na ausência de HP-β-CD.

### 3.2.2.2. Preparo do complexo de inclusão

O complexo foi preparado pelo método de co-solubilização (Fraceto *et al.*, 2007b), na razão estequiométrica 1:1, e mantido sob agitação por 24 horas para atingir equilíbrio. Posteriormente, a solução foi liofilizada e armazenada em freezer (-20°C) para posterior uso (de Araújo, 2006).

## 3.2.3. Caracterização do complexo

### 3.2.3.1. Calorimetria exploratória diferencial

Os métodos térmicos são amplamente utilizados na caracterização de complexos de inclusão, principalmente pela precisão e rapidez das análises. Dentre os mais utilizados, tem-se a calorimetria exploratória diferencial (DSC), que permite a detecção quantitativa de todos os processos que requerem energia (Figueiras *et al.*, 2007 (b)). Trata-se de uma técnica bastante utilizada na prática farmacêutica, por fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância; é considerada como um instrumento analítico importante na caracterização de interações de fármacos e CDs no estado sólido (Araujo *et al.*, 2009). A formação do complexo de inclusão pode ser identificada nos perfis de DSC, pelo desaparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos e por variações relevantes na entalpia do fármaco puro ou complexado (Dollo *et al.*, 1996; Figueiras *et al.*, 2007 (a); Ribeiro *et al.*, 2003).

Para viabilizar as análises, foram preparadas amostras de CND, HP-β-CD, do complexo CND:HP-β-CD e mistura física (CND + HP-β-CD, em meio sólido), na razão molar 1:1. Os estudos de DSC e TG foram conduzidos com aproximadamente 5mg de amostra, para avaliação da diferença de calor absorvido pelos materiais numa ampla faixa de aquecimento (0 – 400°C), em velocidade de 10°C/min,

em cadinho de alumínio hermeticamente fechado, sob atmosfera de nitrogênio. Um padrão de índio foi utilizado para calibração do instrumento.

### 3.2.3.2. Difração de Raios-X

A análise de difração de raios X de monocristal é um dos melhores métodos para a investigação de complexos de inclusão no estado sólido pois permite não só detectar a formação do complexo, como também conhecer quer a sua estrutura e as interações que se estabelecem entre a molécula hóspede e a ciclodextrina. Se ocorrer a formação de complexo, o difratograma do complexo de inclusão é completamente diferente da sobreposição dos difratogramas dos componentes isolados (Fernandes & Veiga, 1999 (a), Araújo *et al.*, 2008).

As medidas de difração de raios-X da HP- $\beta$ -CD, CND, do complexo CND:HP- $\beta$ -CD e da mistura física de ambos foram realizados em um difratômetro Rigaku, de geometria Bragg-Bretano  $\theta$ - $\theta$  e pertencente ao Lab. Nacional de Luz Síncrotron. Foi utilizado um tubo de cobre (Cu) e por isso a linha  $K\alpha$  com comprimento de onda típico de  $\lambda(k\alpha) = 1.5406 \text{ \AA}$  foi usada no experimento de difração. Também foi utilizado um detector cintilador SC-50 e a fonte de radiação RINT2100 Rigaku (1.8kW) com tensão e corrente ajustado para 40 kV e 30 mA, respectivamente. Os difratogramas de raios-X foram obtidos utilizando um cristal de grafite pirolítico com filtro para redução de *background*, a uma taxa de  $1^\circ/\text{minuto}$ , entre  $5^\circ$  e  $70^\circ$  em  $2\theta$ , numa configuração  $\theta$ - $2\theta$ .

### 3.2.3.3. Ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear representa uma das ferramentas mais poderosas para caracterização de complexos de inclusão em solução. Esta técnica fornece informações estruturais únicas sobre estequiometria, constantes de estabilidade e orientação molecular do fármaco dentro da cavidade da ciclodextrina (Ernst *et al.*, 1986; Fraceto *et al.*, 2007a; de Paula *et al.*, 2010 (a)). A modificação nos sinais das ciclodextrinas observada nesta técnica é consequência direta das alterações causadas pela associação com o fármaco, que pode alterar o microambiente ao redor dos átomos de hidrogênio no interior da cavidade. Da mesma forma, o fármaco incluído mostra alterações na leitura dos sinais correspondentes aos átomos que penetraram nas cavidades das ciclodextrinas, que constituem um microambiente diferente daquele em que estava originalmente solvatado (Venturine *et al.*, 2008; de Paula *et al.*, 2010).

Em geral, medidas de RMN de hidrogênio ( $H^1$ -RMN) detectam, durante a complexação, variações no deslocamento químico dos hidrogênios H-3 e H-5 da ciclodextrina, localizados no interior da cavidade para valores de campo mais altos, e enquanto que os hidrogênios da superfície externa das ciclodextrinas (H-1, H-2, H-4 e H-6) não são afetados ou mostram desvios mínimos (Veiga *et al.*, 2006; de Paula *et al.*, 2010).  $H^1$ -RMN é sem dúvida a técnica mais utilizada para este tipo de estudo, devido à facilidade de interpretação e sensibilidade para determinar os fenômenos de complexação. Os desvios

químicos nos hidrogênios diretamente envolvidos na encapsulação fornecem importantes informações sobre a geometria de complexação (Cunha-Filho & Sa Barreto, 2007; Figueiras *et al.*, 2007b).

### 3.2.3.3.1. Coeficiente de difusão e determinação da constante de afinidade

O coeficiente de difusão fornece informações importantes sobre organização molecular e estrutura de fases. Há várias maneiras de medir coeficientes de difusão em líquidos, destacando as técnicas de espalhamento de luz, célula de diafragma, interferométrica, por injeção em fluxo, dispersão de Taylor-Aris e ressonância magnética nuclear (Souza & Laverde, 2002). A difusão molecular consiste nos movimentos aleatórios (brownianos) das moléculas devido à energia térmica do sistema e pode ser calculada através da equação 7.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (7)$$

Onde  $D$  é o coeficiente de difusão ( $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ),  $k$  é a constante de Boltzman ( $1,3806 \times 10^{-23}$  J),  $T$  é a temperatura absoluta (K),  $\eta$  é a viscosidade dinâmica (Pas) e  $r$  é o raio da molécula (de Paula *et al.*, 2010).

A sequência de pulsos de  $\text{H}^1$ -RMN chamada de difusão molecular com gradiente de campo (DOSY) permite avaliar esses movimentos brownianos, que dependem basicamente do tamanho da molécula e da resistência que o meio oferece à difusão e que utilizam a energia térmica do sistema.

A técnica de DOSY é uma ferramenta utilizada para determinação da constante de associação, o que é particularmente importante para evidenciar a ligação entre moléculas de diferentes tipos e tamanhos. O conhecimento da constante de associação ( $K_{as}$ ) e dos parâmetros termodinâmicos (entalpia, entropia e energia livre de Gibbs) é crucial para compreensão da interação hospedeiro-hóspede (de Paula *et al.*, 2010). Para complexos de inclusão em ciclodextrinas, a constante de associação pode ser expressa pelas seguintes equações:



$$K_{as} = \frac{[G : CD]}{[G][CD]} \quad (9)$$

Onde  $[CD]$  é a concentração de ciclodextrina,  $[G]$  é a concentração da molécula hóspede (*guest*) e  $[G:CD]$  é a concentração do complexo de inclusão.

Sabendo que há interações moleculares entre a ciclodextrina e a molécula hóspede, o coeficiente de difusão observado ( $D_{\text{observado}}$ ) refletirá os coeficientes das populações da molécula hóspede (livre e ligada) e da ciclodextrina (de Paula *et al.*, 2010).

$$D_{\text{observado}} = f_{\text{ligado}} D_{\text{ligado}} + f_{\text{livre}} D_{\text{livre}} \quad (10)$$

Onde  $D_{\text{observado}}$  é o coeficiente de difusão da molécula hóspede (CND),  $f_{\text{ligado}}$  é a fração ligada à ciclodextrina,  $D_{\text{ligado}}$  é o coeficiente de difusão desta fração,  $f_{\text{livre}}$  é a fração livre do hóspede em solução e  $D_{\text{livre}}$  é o coeficiente de difusão de hóspede livre em solução.

A equação 10 pode ser rearranjada da seguinte maneira (de Paula *et al.*, 2010):

$$f_{\text{ligado}} = \frac{(D_{\text{observado}} - D_{\text{livre}})}{(D_{\text{ligado}} - D_{\text{livre}})} \quad (11)$$

Logo, podemos obter a constante de associação aparente da fração ligada (de Paula *et al.*, 2010), de acordo com:

$$K_{\text{as}} = \frac{f_{\text{ligado}}}{(1 - f_{\text{ligado}}) ([G] - f_{\text{ligado}} \cdot [CD])} \quad (12)$$

Os espectros monodimensionais de RMN, de difusão (DOSY) e de ROESY foram colhidos no equipamento Bruker Avance III 600 MHz (operando em um campo de 11,7 Tesla, frequência para hidrogênio de 499.73 MHz) do Lab. Nacional de Luz Síncrotron. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software (livre de licença) TopSin 3.0. Espectros monodimensionais permitiram a atribuição dos hidrogênios pertencentes à CND e HP- $\beta$ -CD.

Para o ensaio, as amostras de CND, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e complexo CND:HP- $\beta$ -CD foram dissolvidas em água deuterada ( $D_2O$ ). Alíquotas de 500  $\mu$ L foram levadas ao espectrômetro de ressonância, em sondas Cryoprobe® CPTCI de 5mm de diâmetro. Os espectros foram coletados a 25°C usando-se como referência o pico da água residual ajustado em 4,8ppm.

#### 3.2.3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV permite conhecer o estado cristalino resultante do processo de complexação, que é diferente do obtido pela simples mistura da molécula-hóspede com a ciclodextrina. Estas alterações na cristalinidade dos compostos sólidos puros e associados servem de suporte para um melhor conhecimento da complexação (Fernandes & Veiga, 1999 (a)). Em geral, cristais de ciclodextrinas são globulares, medindo de 1 a 180 $\mu$ m, enquanto que os fármacos apresentam-se em forma cristalinas menores, de formatos irregulares e variados, porém com uma distribuição de tamanho de partícula mais homogênea (Ribeiro *et al.*, 2003). Nas misturas físicas é possível distinguir os cristais do fármaco das partículas de ciclodextrina, porém, quando um complexo é formado, o estado cristalino resultante é diferente do obtido pela simples mistura da molécula hóspede com as CDs (Lyra *et al.*, 2010).

As amostras do complexo CND:HP- $\beta$ -CD (liofilizado) e HP- $\beta$ -CD, CND e mistura física (submetidas ao mesmo estresse mecânico de congelamento/sublimação) foram depositadas sobre fita de carbono, previamente coladas a *stub* de alumínio. Os *stubs* foram depositados em evaporador de carbono (Bal-Tec Med 020 Coating System), onde foram realizados 3 ciclos de emissão de carbono de 20 segundos cada um a uma corrente de 75A. Os materiais foram então levados ao microscópio e analisados por meio da emissão de elétrons secundários.

#### 3.2.3.5. Ensaio de liberação *in vitro*

Os efeitos da complexação sobre as propriedades de dissolução podem ser atribuídos a fatores como mudança no estado cristalino do fármaco, aumento da molhabilidade dos sólidos e da solubilidade aparente dos fármacos (Spricigo *et al.*, 2008). Os dados de dissolução podem ser apresentados e tratados utilizando-se vários métodos de análise: perfis de dissolução, tempos de dissolução, fração de fármaco dissolvido num intervalo de tempo e eficiência de dissolução (Rama *et al.*, 2006).

Para avaliar a cinética de liberação da CND complexada com a HP- $\beta$ -CD, foi utilizado um sistema de dois compartimentos separados por membrana de poro para exclusão molecular de 1000 Da, que permitiu observar a liberação da CND livre e complexada, desde o compartimento doador (1mL) até o compartimento receptor (100mL), contendo tampão HEPES 20mM, pH 7,4. As amostras foram coletadas 5 horas e cada alíquota retirada para leitura foi substituída no compartimento receptor por igual volume de tampão (Fraceto *et al.*, 2007b; Grillo *et al.*, 2008).

### 3.2.4. Avaliação farmacológica

#### 3.2.4.1. Ensaio de toxicidade *in vitro*: cultura de células 3T3

A viabilidade celular de células da linhagem 3T3 (fibroblastos de camundongos Balb/c) expostas ou não aos fármacos foi determinada através do teste de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

brometo de difeniltetrazólio). 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 fotometria em 570nm (Denizot & Lang, 1986; Weder, 1992). As células foram 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 CO<sub>2</sub>) através de repiques periódicos.

O plaqueamento foi realizado inoculando-se  $2 \times 10^4$  células viáveis em placas de 96 cavidades, incubadas por 48 horas, até atingirem a semiconfluência. As células foram incubadas por 24 horas com as amostras (CND, HP-β-CD, complexo CND:HP-β-CD, CND + BVC e complexo CND:HP-β-CD + BVC). Em seguida, o meio de cultura foi substituído e as células incubadas com MTT (1mg/mL) por 3 horas. Ao final desse período, o meio contendo MTT não reduzido foi removido cuidadosamente e a cada placa foi adicionado 0,1mL de etanol, a fim de dissolver os cristais de formazan produzidos pela redução do corante. A absorbância da solução em cada cavidade foi medida por fotometria em 570nm e os resultados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (Babich *et al*, 1991; Lee *et al*, 2011).

As amostras de CND e do complexo CND:HP-β-CD foram usadas nas concentrações de 50µM, 100µM, 250µM, 500µM, 1mM, 3mM e 6mM. A BVC foi utilizada em sua concentração de IC50 (1,67mM) e mantida constante em cada tratamento realizado, haja visto que o objetivou-se com o experimento determinar a curva de viabilidade das células em função de diferentes concentrações de CND, sendo que é sabido, devido a experimentos anteriores de nosso grupo (de Araujo, 2002), a viabilidade celular da BVC em células desta mesma linhagem.

#### 3.2.4.2. *Ensaio in vivo: teste de Tail-flick*

O bloqueio sensorial foi medido pelo limiar de remoção da cauda dos animais, frente a um estímulo térmico (D'Amour & Smith, 1941; Dewey *et al.*, 1970; Abbott *et al.*, 1982; AlSharari *et al.*, 2012). Para injeção intratecal, os animais (ratos *Wistar* adultos (6 semanas), machos e com peso variando entre 250-350g) foram contidos firmemente enquanto uma agulha, conectada a uma seringa de Hamilton foi inserida perpendicularmente no espaço entre as vértebras L5 e L6. O sítio de injeção selecionado estava restrito à região onde a medula espinal termina e a cauda equina começa, de forma a reduzir a possibilidade de dano espinal e facilitar a acessibilidade intervertebral (Figura 6A) (Queiroz, 2012). No momento em que a agulha foi inserida no espaço subaracnoidal, foi observado um súbito movimento da cauda, reflexo este que foi utilizado como indicativo de punção correta, assim como descrito por Mestre *et al.*, (1994).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 9 grupos (n = 7) (Tabela 4). Cada fármaco proposto no estudo foi injetado isoladamente, com volume de injeção de 20µL, para posterior avaliação

farmacológica da associação entre BVC e CND (livre ou complexada) em injeções distintas. Após administração do fármaco, os animais foram colocados em contentores e a cauda posicionada em fonte de calor (Figura 6B). O tempo para remoção da cauda foi medido periodicamente, para cada grupo estudado.

As doses de bupivacaína foram selecionadas baseando-se nas concentrações usuais na prática clínica (0,125% e 0,25%), bem como em trabalhos anteriores de nosso grupo (Queiroz, 2012). A dose de CND foi selecionada de modo que estivesse abaixo daquela capaz de induzir hipotensão, ou seja, 100µg, bem como através de revisão da literatura onde o teste de Tail-flick foi empregado. Ponderou-se, ainda, as discussões a respeito da dose já exploradas na introdução deste trabalho. Tejwani & Rattan (2000) empregaram o teste de Tail-flick e avaliaram o uso de CND em ratos (dose 1-30µg) associado ao cetorolaco para elucidação do mecanismo de antinocicepção quando desta associação medicamentosa. A associação entre opióides, anestésicos locais e agonistas  $\alpha$ -2, também foi feita por Ossipov *et al.* (1988) que observaram através do teste de Tail-flick que a dose onde 50% do máximo efeito possível era obtida para a CND foi 46µg. Em trabalho posterior, Ossipov *et al.* (1997) utilizaram da mesma técnica, porém avaliando novas doses do fármaco (3; 30 e 100µg). Post *et al.* (1987) avaliaram também o efeito antinoceptivo da CND através do mesmo ensaios, sendo que foram empregadas doses variáveis do fármaco em cada animal (12,5; 25 e 50µg). Avaliando a resposta antinociceptiva em ratos com dor neuropática, doses de 20µg foram injetadas em cada animal conforme trabalho de Roh *et al.* (2008). Horvarth *et al.* (1990) utilizaram ratos wistar de 200g para o teste de Tail-Flick, sendo utilizado uma dose de 2 a 40µg por animal.

Tabela 4: Grupos utilizados em ensaios de avaliação farmacológica *in vivo*

Grupo	Fármaco / Concentração final
1	BVC 0,125%
2	BVC 0,25%
3	CND 0,15%
4	Complexo CND:HP- $\beta$ -CD 0,15%
5	BVC 0,125% + CND 0,15%
6	BVC 0,125% + Complexo CND:HP- $\beta$ -CD 0,15%
7	BVC 0,25% + CND 0,15%
8	BVC 0,25% + Complexo CND:HP- $\beta$ -CD 0,15%
9	Controle - HP- $\beta$ -CD

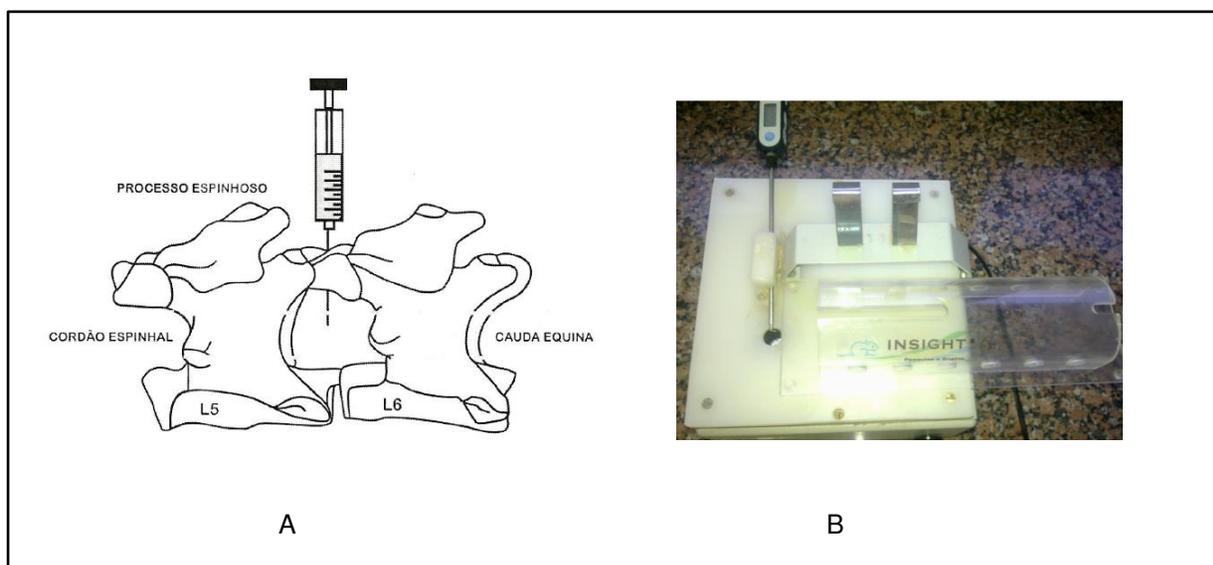


Figura 6: A – Representação esquemática de inserção de agulha no espaço intervertebral (L5-L6) para injeção intratecal em ratos (Queiroz, 2012); B – equipamento utilizado nos ensaios farmacológicos (teste de *Tail-flick*)

### 3.2.5. Avaliação e tratamento estatístico dos dados

O tratamento dos dados foi feito através do software Origin PRO 8 (2007). Os grupos experimentais no teste de *tail flick* foram comparados por análise de variância com posterior teste de Tukey-Kramer. O teste Tukey foi empregado para análise de variância dos grupos experimentais no teste de cultura de células 3T3. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização físico-química do Cloridrato de Clonidina

#### 4.1.1. Avaliação das propriedades ópticas, do pKa e da solubilidade do cloridrato de Clonidina

Para realização dos estudos com a CND, bem como sua interação com a HP- $\beta$ -CD, suas propriedades ópticas foram determinadas. A Figura 7 mostra seu espectro de absorção em água, 25°C.

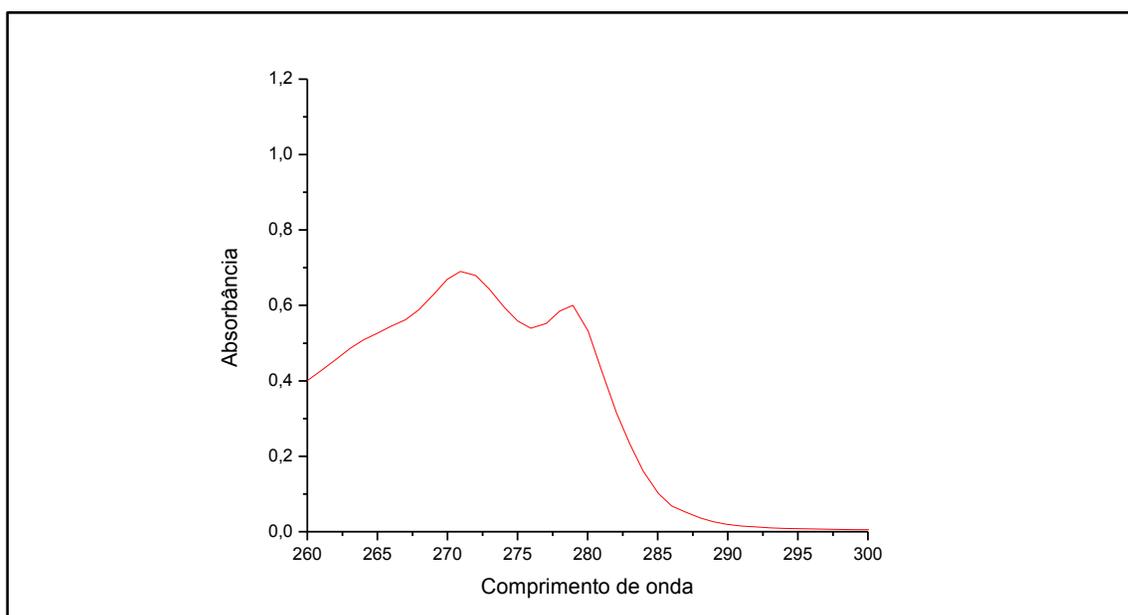


Figura 7: Espectro de absorção UV/VIS da CND em água, 25°C

Assim como evidenciado na Farmacopéia Americana (USP-35), observa-se dois máximos de absorção, em 271 e 279nm. Este resultado também está em consonância com demais compêndios consultados, como a Farmacopéia Britânica (2012) e Japonesa (2011).

A fim de se observar o comportamento do espectro de absorção da CND em diferentes meios, foram preparadas soluções de CND 1mM em diferentes tampões. Assim como esperado, é observada diferença no comportamento óptico, proporcionado pelo meio no qual a molécula está inserida (Figura 8).

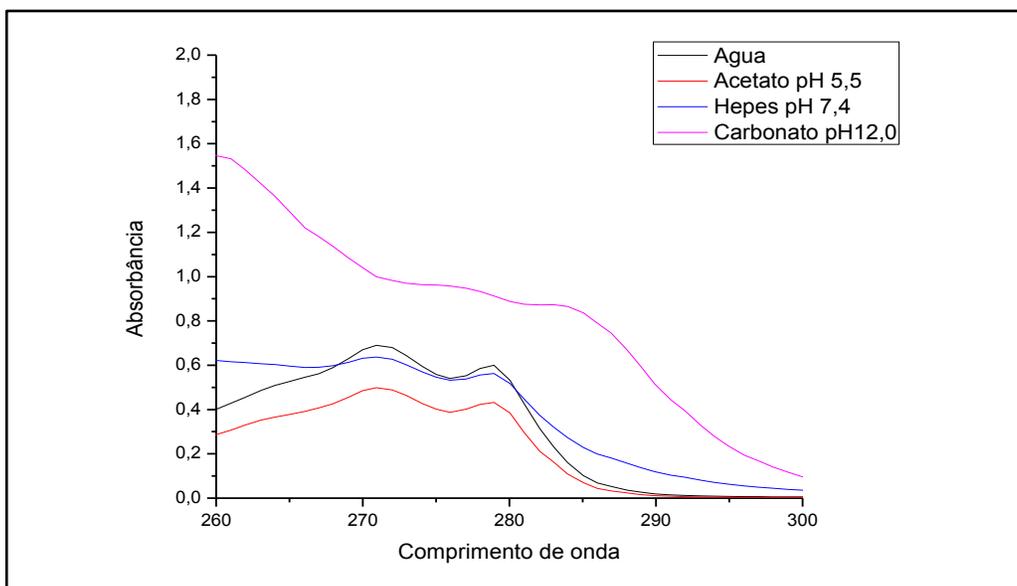


Figura 8: Espectro de absorção do cloridrato de clonidina (1mM) em suas formas protonada (em água e tampão acetato pH 5,0), neutra (tampão carbonato, pH 12) e em pH fisiológico, 25°C.

Os espectros em água e em tampão acetato pH 5,5 referem-se à forma ionizada da CND e mostram dois picos similares, com máximos de absorção em 271 e 279nm. Em meio básico, como no tampão carbonato pH 12,0, registramos efeito hiperacrômico (aumento da absorção) e batocrômico (deslocamento dos picos para comprimentos de ondas maiores, no sentido do infra-vermelho) (276 e 284nm), i.e., uma variação de 5nm para cada máximo da clonidina neutra em relação à forma ionizada da molécula. Como esperado, em pH 7,4 o espectro registrado tem características intermediárias as das formas protonada e neutra da CND, cujo pKa é de 8,0 (Figura 9).

A seguir foi realizada a titulação potenciométrica para determinar a constante de dissociação do grupo imino da CND, como mostra a Figura 9.

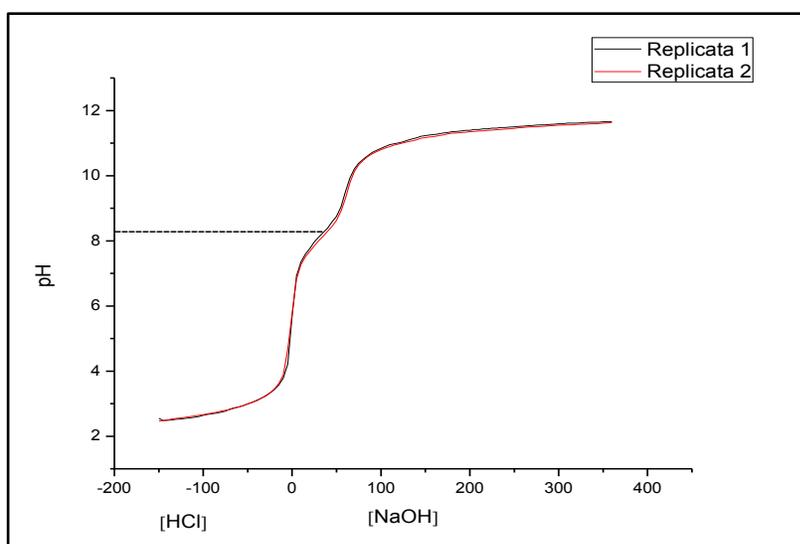


Figura 9: Determinação do pKa da CND por método potenciométrico de titulação com soluções de HCl e NaOH, 25°C

Conforme mostra a figura 9, há uma pequena faixa de pH (entre 7-9), em que as adições de OH<sup>-</sup> não são acompanhadas por grande variação de pH. Segundo Remko e col. (2001) esta região de tamponamento corresponde ao pKa dos nitrogênios do grupo imidazólico, determinado por eles em pH = 8,3. Nossos resultados indicam pKa = 8,0 (figura 10), evidenciando que, em pH fisiológico, predomina a forma protonada da CND (ca. 75%), enquanto que a forma neutra corresponde a 25%.

Nestes mesmos pH, a solubilidade da CND foi determinada (Tabela 5). O cálculo foi feito a partir da leitura do sobrenadante de soluções saturadas do fármaco, como descrito em métodos. Para elucidação deste valor, previamente foram traçadas as curvas de calibração em cada meio estudado (Figura 10), através da leitura de sete soluções diluídas em concentração crescente de CND, em absorbância com intervalo confiável para leitura (0,2 – 0,8nm). As mesmas curvas serviram ainda para determinação da absorvidade molar, onde a concentração das soluções preparadas foram obtidas através do preparo de novas soluções (conforme item 3.2.1.2) com leitura dentro dos intervalos destas curvas (Tabela 4).

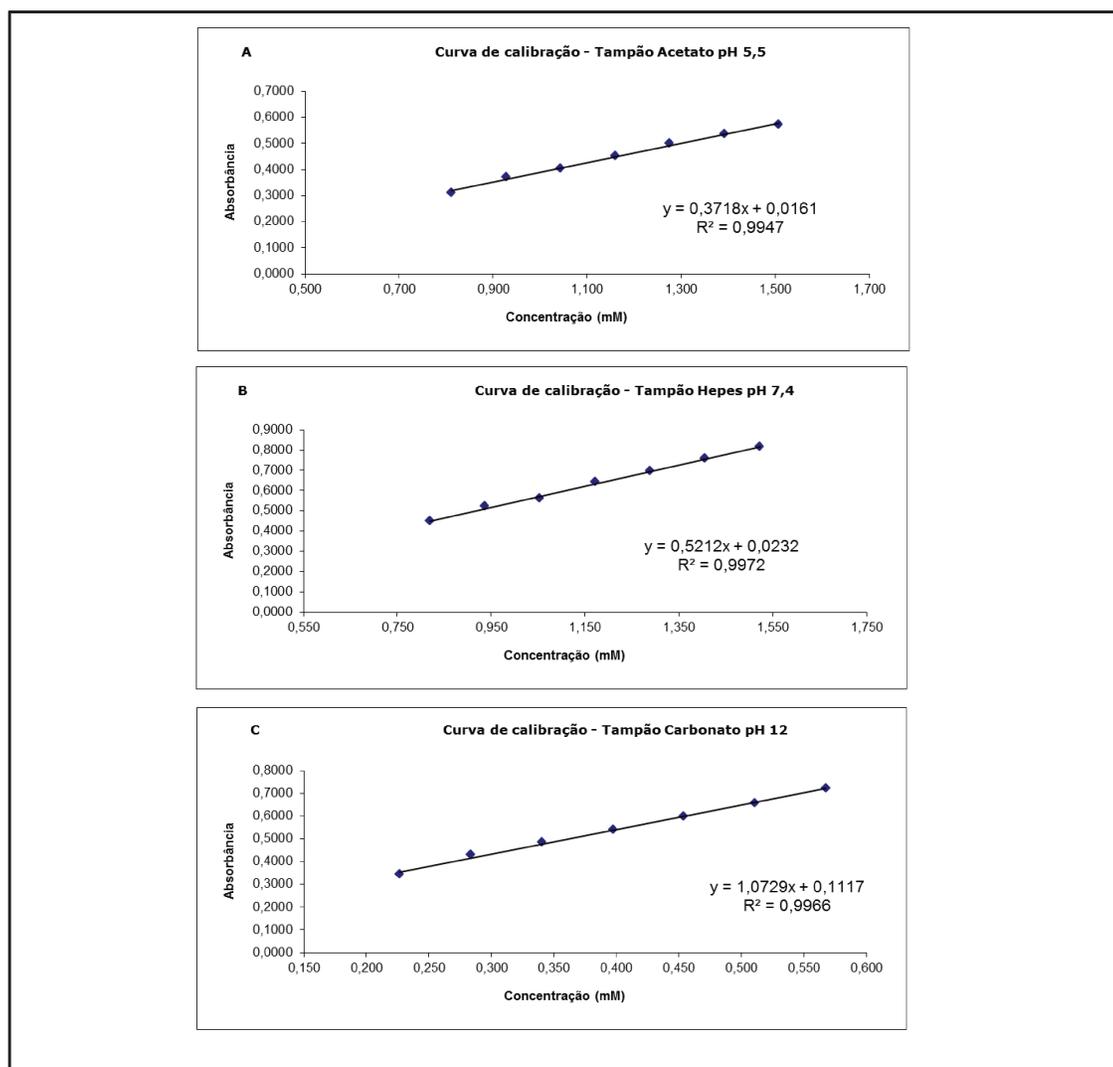


Figura 10: Curvas de calibração para determinação da absorvidade molar da CND em diferentes pHs: a) 5,5 b) 7,4 c) 12,0.

Foi possível observar que, com o aumento do pH do meio há decréscimo na solubilidade da CND. Este achado é condizente quando pondera-se a porcentagem de ionização nos diferentes pHs. Como o fármaco tem  $pK = 8,2$  (Figura 9) espera-se maior solubilidade em pH ácido, i.e, na forma protonada quando comparado a valores de pH superiores. Em contrapartida, com o aumento do pH houve aumento do coeficiente de absorvidade molar (Tabela 5), resultado também coerente com as varreduras iniciais (Figura 10), onde observou-se aumento na intensidade de absorção para a forma neutra da CND.

Tabela 5: solubilidade e absorvidade molar da CND em diferentes meios, 25°C

Meio	Solubilidade (mM)	Absorvidade molar ( $M^{-1}$ )
Tampão Acetato pH 5,5 50mM	$277,0 \pm 0,1$	$\epsilon^M_{271} = 520$
Tampão Hepes pH 7,4 20mM	$221,2 \pm 0,1$	$\epsilon^M_{271} = 528$
Tampão Carbonato pH 12,0 20mM	$3,0 \pm 0,1$	$\epsilon^M_{276} = 1396$

No intuito de verificar a interferência dos sais dos meios testados, os mesmos experimentos foram conduzidos em tampão universal PBC. Resultados similares foram encontrados, isto é, decréscimo de solubilidade e incremento de absorvidade molar com aumento de pH, o que nos permitiu concluir que não houve interferência dos tampões na absorção registrada nos diferentes valores de pH.

## 4.2. Determinação da estequiometria de complexação do Cloridrato de Clonidina

### 4.2.1. Determinação da estequiometria pelo método de Job

Devido ao fato de nossos experimentos terem evidenciado que a CND não possui fluorescência intrínseca, e, sabendo que em técnicas espectroscópicas o principal efeito que provê indícios de complexação é a alteração em intensidade ou deslocamento de bandas (Misiuk *et al.*, 2011; Tablet *et al.*, 2012), o espectro de absorção UV-VIS da molécula foi coletado antes e após adição de excesso de HP- $\beta$ -CD, respeitando-se o tempo de equilíbrio de complexação, de 24hs. Como mostra a Figura 11a, foi observado efeito hipercrômico quando compara-se o espectro da CND na ausência e presença de HP- $\beta$ -CD. Esta alteração no espectro sugere alterações no microambiente imediato do cromóforo, induzidas pela inclusão do mesmo no interior da cavidade da ciclodextrina (Wang & Chen, 1995). De fato, este aumento na absorção de energia é condizente com a transferência da molécula de um meio altamente polar (água, constante dielétrica = 78) para meio menos polar (Warren, 1987) como o da cavidade da ciclodextrina, cuja constante dielétrica estimada é de ca. 30 (Szetlij, 1998; El-Kemary *et al.*, 2002) (Figura 11 b, c).

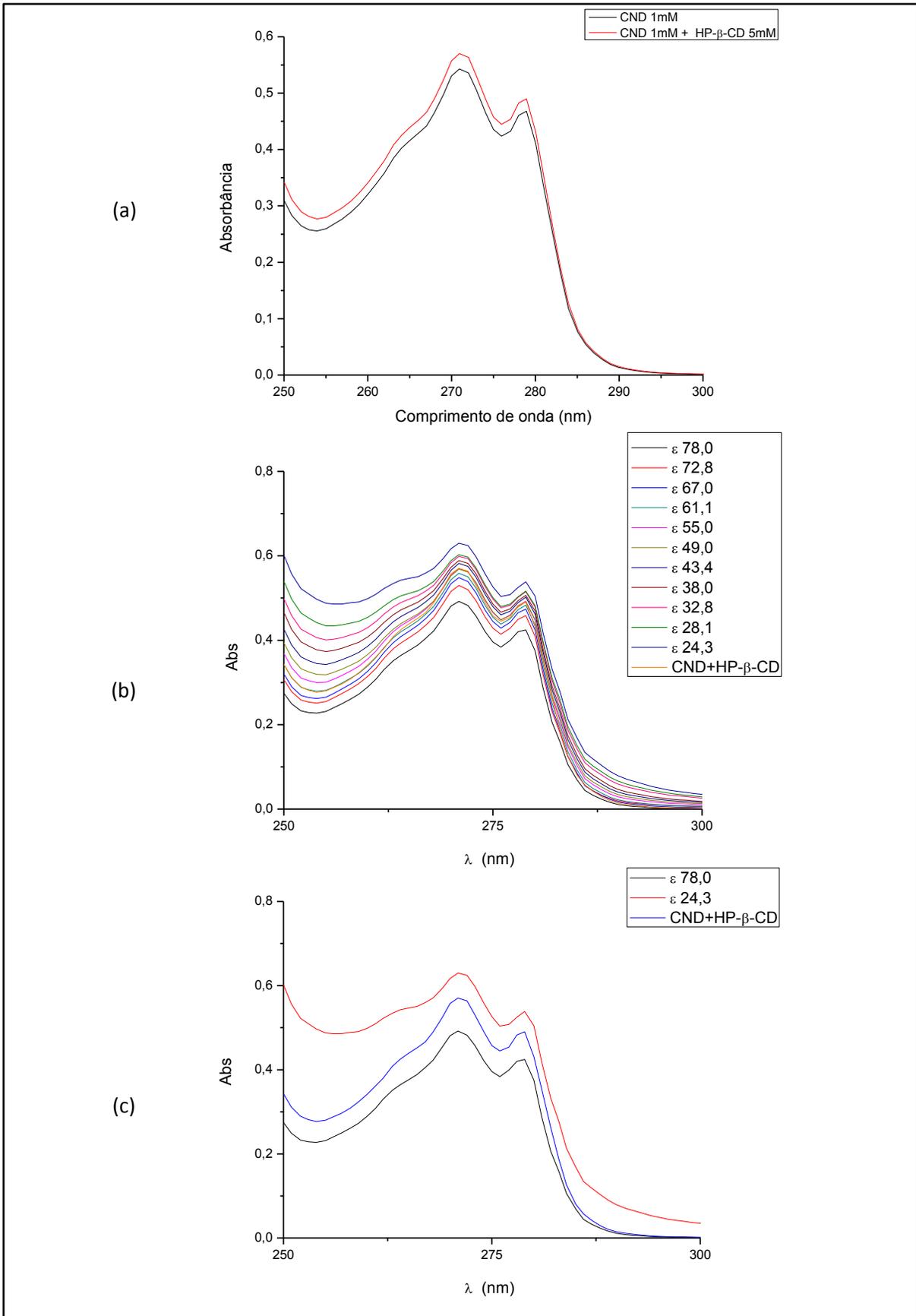


Figura 11: espectro de absorção da CND em excesso de HP-β-CD (a), varreduras em diferentes constantes dielétricas (b), espectro em constantes dielétricas extremas e em excesso de HP-β-CD (c)

As varreduras realizadas com a CND em meios de diferentes constantes dielétricas nos confirmam esta constatação de El-Kemary e col. (2002), i.e., há alteração no comportamento óptico do fármaco nestes diferentes meios. O mesmo efeito hipercrômico observado quando da adição de HP- $\beta$ -CD no meio, foi observado a medida que a polaridade do meio foi diminuída (Figura 11b). É possível verificar ainda, que este efeito hipercrômico manifesta intensidade intermediária quando compara-se meios completamente polares e apolares (Figura 11c). Contudo, o espectro da amostra CND:HP- $\beta$ -CD não se sobrepôs àquele em constante dielétrica 32,8 (proporção 80:20) conforme mencionado por El-Kemary *et al.* (2002), o que pode sugerir que esta interação é rápida. Estes achados constituíram as primeiras evidências de inserção da CND na cavidade da HP- $\beta$ -CD.

Para determinação da estequiometria pelo método de Job, a variação do parâmetro absorbância, relacionada à formação do complexo, foi medida conforme descrito no item 3.2.2.1 e graficado em função de  $r$  ( $r = [\text{CND}_{\text{total}}] / [\text{CND}_{\text{total}}] + [\text{HP-}\beta\text{-CD}_{\text{total}}]$ ). Conforme já descrito na literatura (Connors 1987; Brewster & Loftsson, 2007) a estequiometria 1:1 foi confirmada pela obtenção de valor máximo de  $r = 0,5$  (Figura 12).

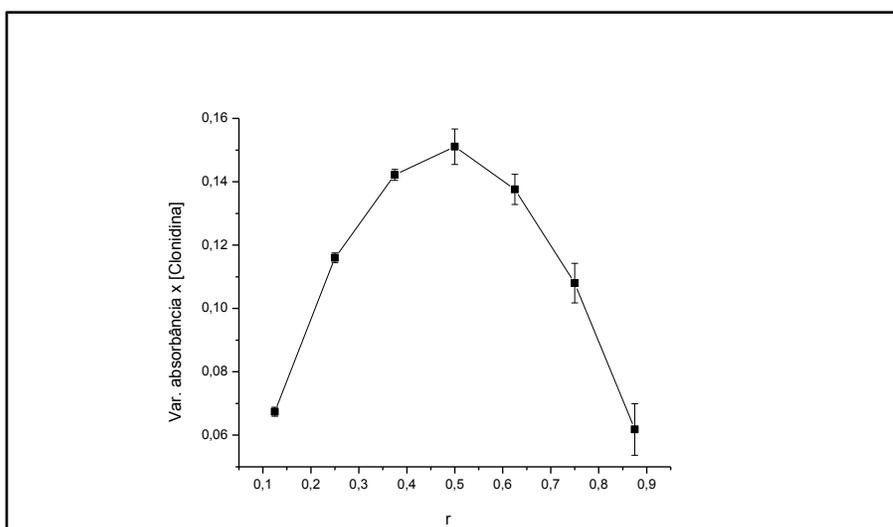


Figura 12: Gráfico de *Job* evidenciando estequiometria 1:1 CND:HP- $\beta$ -CD.

#### 4.2.2. Determinação da estequiometria por Benesi-Hildebrand

Conforme observado na Figura 11a, a intensidade de absorção da CND sofre variação quando da presença de ciclodextrinas. Este evento foi confirmado quando foram adicionadas concentrações crescentes de HP- $\beta$ -CD em soluções com concentração fixa de CND. Os resultados obtidos nos espectros (Figura 13a) foram tratados pela equação modificada de Benesi-Hildebrand (Banerjee *et al.*,

2004), onde duas hipóteses matemáticas foram contempladas (Figura 13b e 13c): de complexação molar 1:1 e 1:2 CND:HP- $\beta$ -CD.

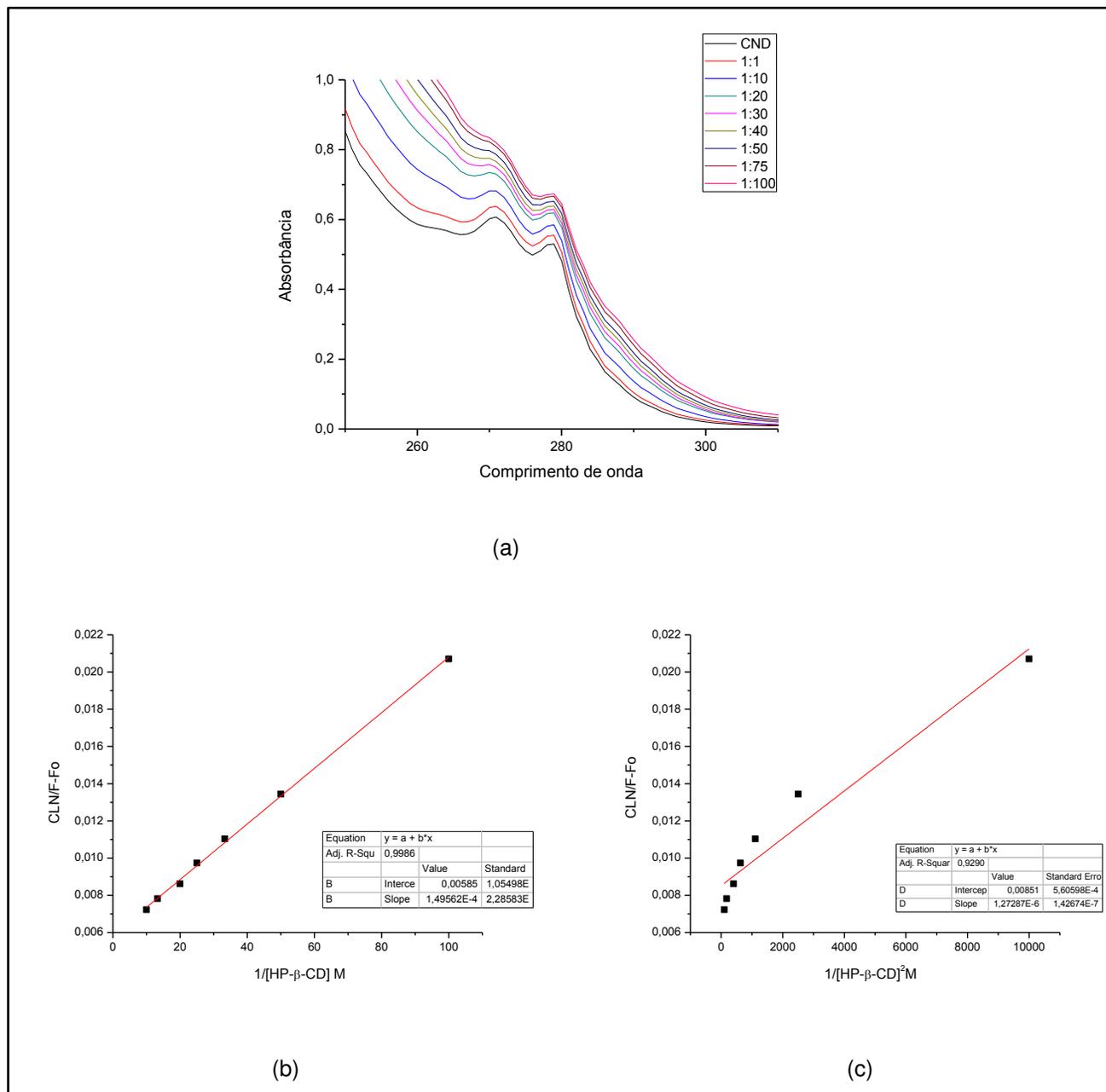


Figura 13: Variação da absorção da CND na presença de concentrações crescentes de HP- $\beta$ -CD (a). Aplicação da equação de Benesi-Hildebrand para estequiometria 1:1 CND:HP- $\beta$ -CD (b) ou 1:2 CND:HP- $\beta$ -CD (c).

Assim como no experimento de Job (Figura 12) o tratamento de Benesi-Hildebrand revelou uma correlação linear quando a estequiometria de complexação 1:1 foi considerada ( $r^2 = 0,9986$ ). Já quando foi considerada a estequiometria 1:2 foi observado que não há correlação linear (Fig. 13c), comprovando que a estequiometria 1:1 é, de fato, a observada em complexos CND:HP- $\beta$ -CD.

A partir desses resultados, a caracterização do complexo foi feita, respeitando-se a razão molar 1:1 CND:HP- $\beta$ -CD no preparo das amostras.

### 4.3. Caracterização do complexo de inclusão

#### 4.3.1. Caracterização do complexo por medidas de calorimetria (DSC e TG)

Confirmada a estequiometria de complexação, o complexo preparado foi caracterizado por diferentes técnicas, que forneceram evidências da associação da CND com a cavidade da HP- $\beta$ -CD. Através de análises comparativas de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria da CND, HP- $\beta$ -CD, complexo e mistura física, na razão molar 1:1, foram observadas diferenças no comportamento calorimétrico de cada amostra (Figuras 14 e 15).

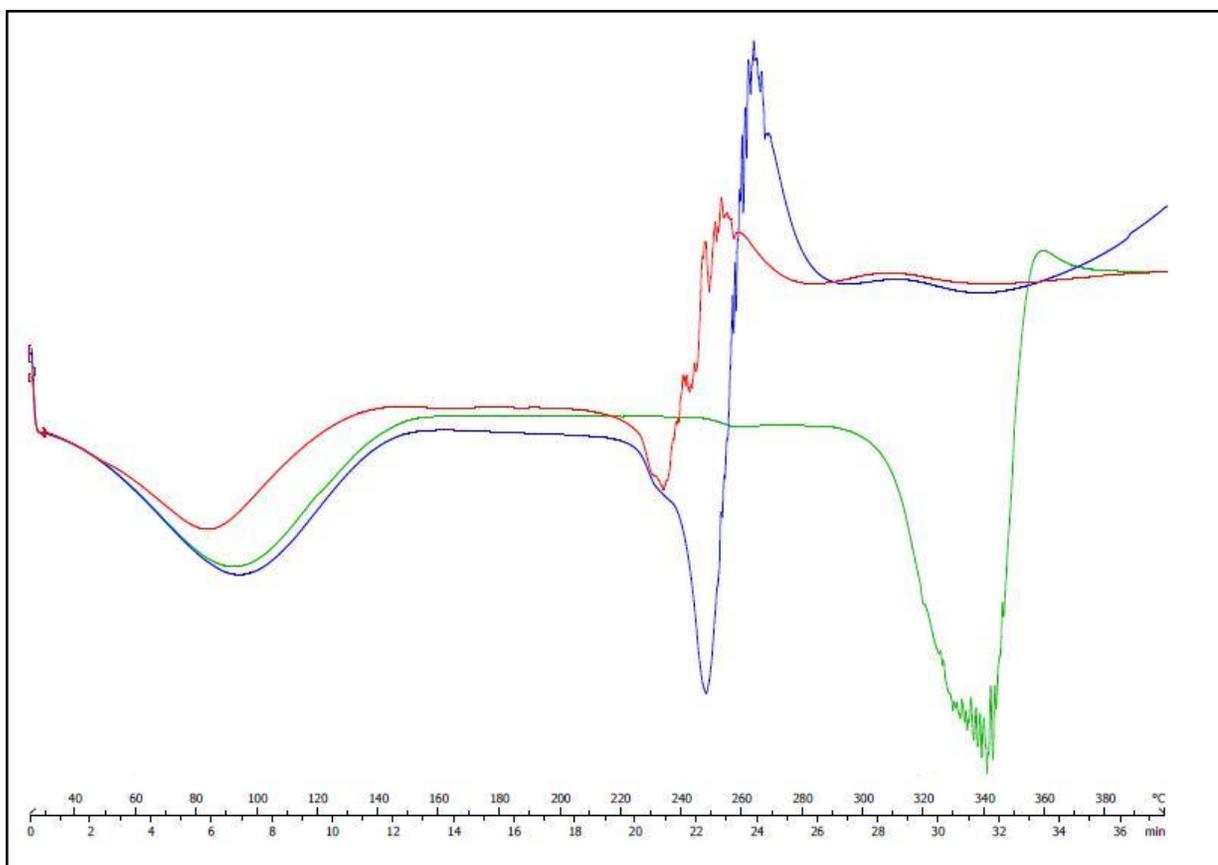


Figura 14: Curvas de DSC obtidas para clonidina (preto), HP- $\beta$ -CD (verde), complexo (vermelho) e mistura física (azul), na razão molar de 1:1. Taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera inerte, em cadinho hermeticamente fechado.

Assim como descrito na literatura (Merck Index, 2001; Martindale, 2011) foi observada fusão da CND próximo a 270°C. Este evento também é relativo à decomposição da amostra de CND, visto que a curva de termogravimetria (Figura 15b) mostra que, nesta temperatura há perda de 44% de massa, indicando fusão seguida de decomposição de parte da clonidina. Já para a HP-β-CD, que não tem estrutura cristalina definida, observam-se a perda de água confinada na cavidade do anel macrocíclico, manifestada por evento endotérmico próximo a 100°C e outro evento próximo a 300°C, correspondente à caramelização da ciclodextrina (Giordano *et al.*, 2001). Para a mistura física, foi observada diminuição do ponto de fusão da CND em aproximadamente 70°C e manutenção do pico endotérmico referente à água da cavidade da HP-β-CD, o que comprova que não houve substituição dessas pela molécula de CND, fato também observado no complexo, onde houve perda de massa de aproximadamente 55,2% em temperaturas acima de 210°C (ver figura 15c). Na amostra do complexo, houve perda parcial do pico endotérmico da HP-β-CD próximo a 100°C, que é indicativa da formação de complexos de inclusão (Dollo *et al.*, 1996; Pinto *et al.*, 2005; Dodziuk, 2006) e foi observada diminuição na temperatura de fusão da CND, como observado para a mistura física. Estes dados consistiram na primeira evidência de complexação molecular entre a CND e a HP-β-CD.

As medidas de TG mostraram que a perda de água da cavidade da HP-β-CD não foi completa. Segundo a literatura, tem-se menos que 10% de água no peso da HP-β-CD (Rowe *et al.*, 2000; USP 35), fato comprovado na curva de TG da Figura 15a, pela perda de 7,56% de água durante aquecimento da amostra da ciclodextrina pura. Já para a amostra do complexo CND:HP-β-CD 1:1 (Figura 15c) esta perda foi de aproximadamente 6,2%, ou seja, 82% daquele da HP-β-CD pura. Desta forma infere-se que a interação da CND com a HP-β-CD não foi total ou ainda que é um processo altamente dinâmico, pois não houve deslocamento completo das moléculas de água da cavidade da ciclodextrina para alojamento da CND visto que a quantidade remanescente de água na amostra, proveniente da cavidade, ainda permanece significativa. A ligação dos fármacos à ciclodextrina não é um processo fixo ou permanente, mas sim um equilíbrio dinâmico (Del Valle, 2003). A principal força motriz para formação do complexo de inclusão é a liberação de moléculas de água da cavidade da ciclodextrina (ricas em energia entálpica), o que diminui a energia do sistema. Contudo, outras forças como ligações de hidrogênio, interações de Van-der-Waals e interações hidrofóbicas estão envolvidas no processo de formação do complexo (Loftsson & Brewster, 1996). Excetua-se a estas as ligações covalentes, razão pela qual este equilíbrio dinâmico é observado entre moléculas no interior e exterior da cavidade (Loftsson & Masson, 2001). Em soluções aquosas complexos de fármaco/ciclodextrina estão em constante formação e ruptura, em taxas muito próximas do limite de difusão (Rajewski & Stella, 1996; Loftsson & Masson, 2001). Estas considerações refletem em muito os achados obtidos nos ensaios de calorimetria, reforçando o dinamismo do equilíbrio de complexos CND:HP-β-CD e podem explicar a maior constante dielétrica (Fig. 11) observada para o complexo.

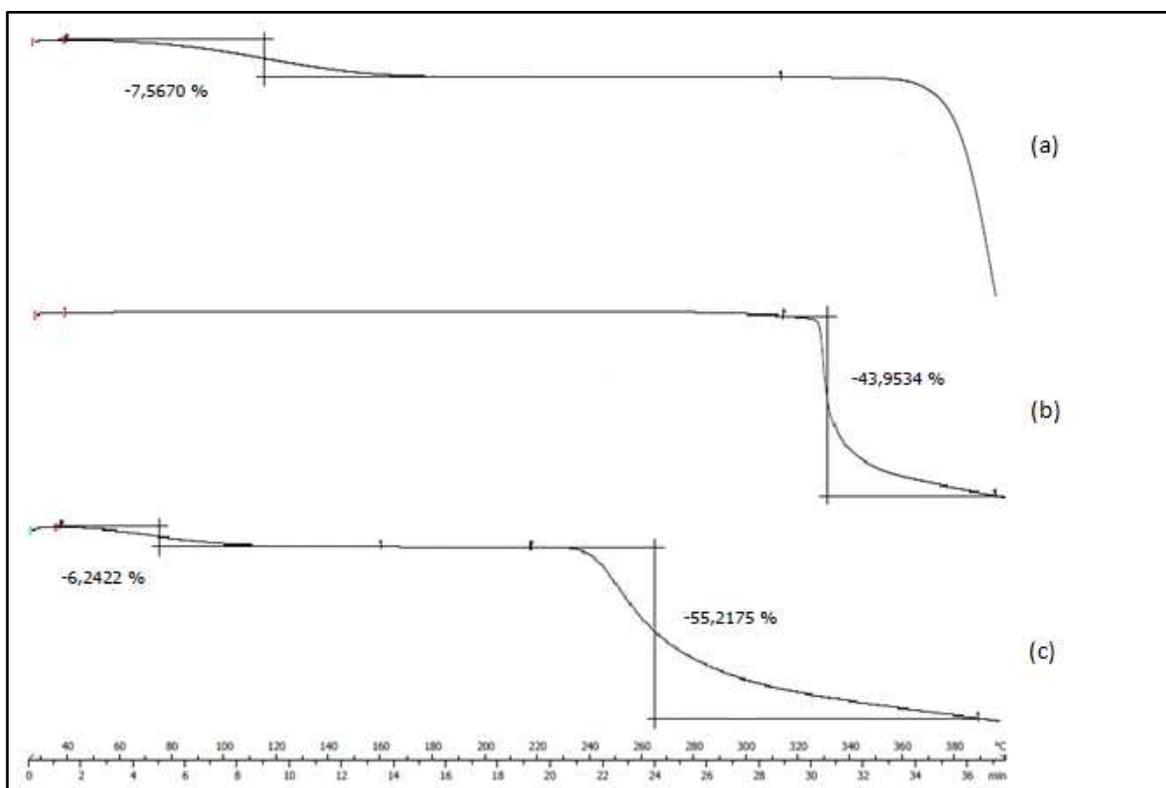


Figura 15: Curvas termogravimétricas para HP-β-CD (a), CND (b) e complexo CND: HP-β-CD (c) na razão molar 1:1.

#### 4.3.2. Caracterização do complexo CND:HP-β-CD, por difração de raios-X

A figura 16 mostra os difratogramas de raios-X obtidos para as amostras em estudo.

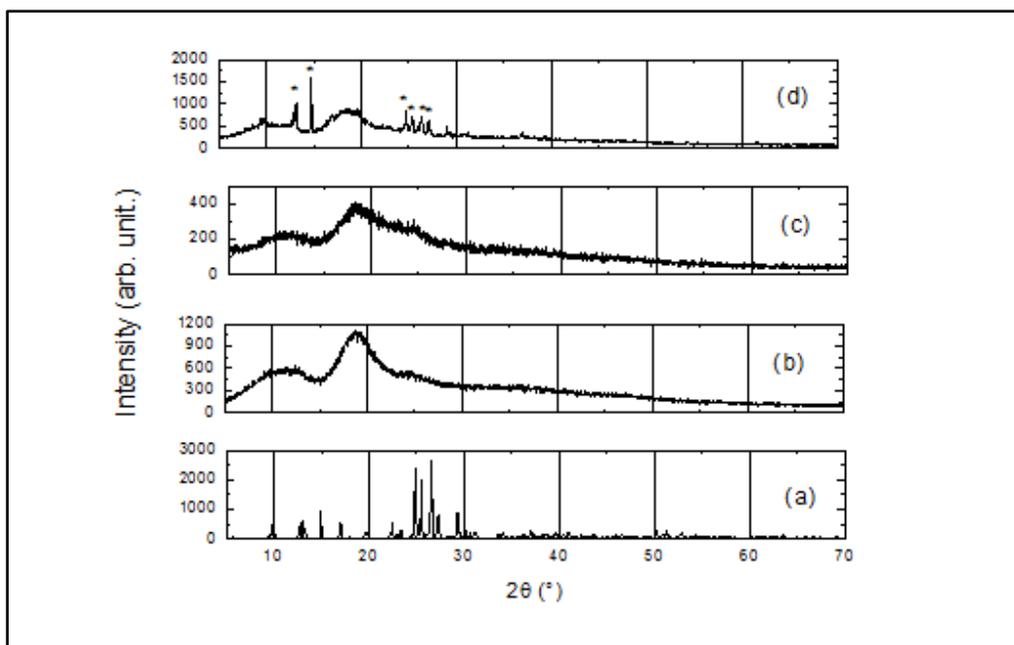


Figura 16: Difratogramas de raios-X para CND (a); HP-β-CD (b), complexo (c) e mistura física (d).

Os padrões de difração confirmam a natureza cristalina da CND caracterizada pelos vários picos estreitos da figura 16a. Este resultado está de acordo com Gaignaux *et al* (2012) que mostra padrão de difração semelhante ao obtido em nossos experimentos. Em contrapartida, a HP- $\beta$ -CD possui estrutura amorfa, ou não cristalina (Figura 16b), conforme já descrito em literatura (Spamer *et al.*, 2002). A análise de Raios-X da amostra do complexo mostrou que o padrão cristalino da CND desaparece com a formação do complexo de inclusão (Figura 16c) enquanto que para a mistura física existe a superposição do padrão cristalino da CND e do padrão amorfo da HP- $\beta$ -CD (Figura 16d). Além disso, as diferenças de intensidade observadas nos difratogramas da CND pura e do complexo (Figuras 16a e 16c) reforçam a teoria de que o fenômeno de complexação realmente ocorreu: houve redução de 75% na intensidade entre os dois padrões de difração indicando a contribuição do arranjo estrutural obtido pela formação do complexo. Este achado vai de encontro ao já descrito por Chadha *et al* (2004), que reportam diferenças nos padrões de difração de nimesulida, ácido retinóico e ibuprofeno complexados com  $\beta$ -ciclodextrina e do oxazepam quando complexado com HP- $\beta$ -CD.

#### 4.3.3. Caracterização do complexo CND:HP- $\beta$ -CD por MEV

Através da análise de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que há diferenças marcantes entre as amostras estudadas, antes e após complexação. A figura 17 mostra as fotomicrografias obtidas para a HP- $\beta$ -CD, clonidina, mistura física e complexo (na razão molar 1:1).

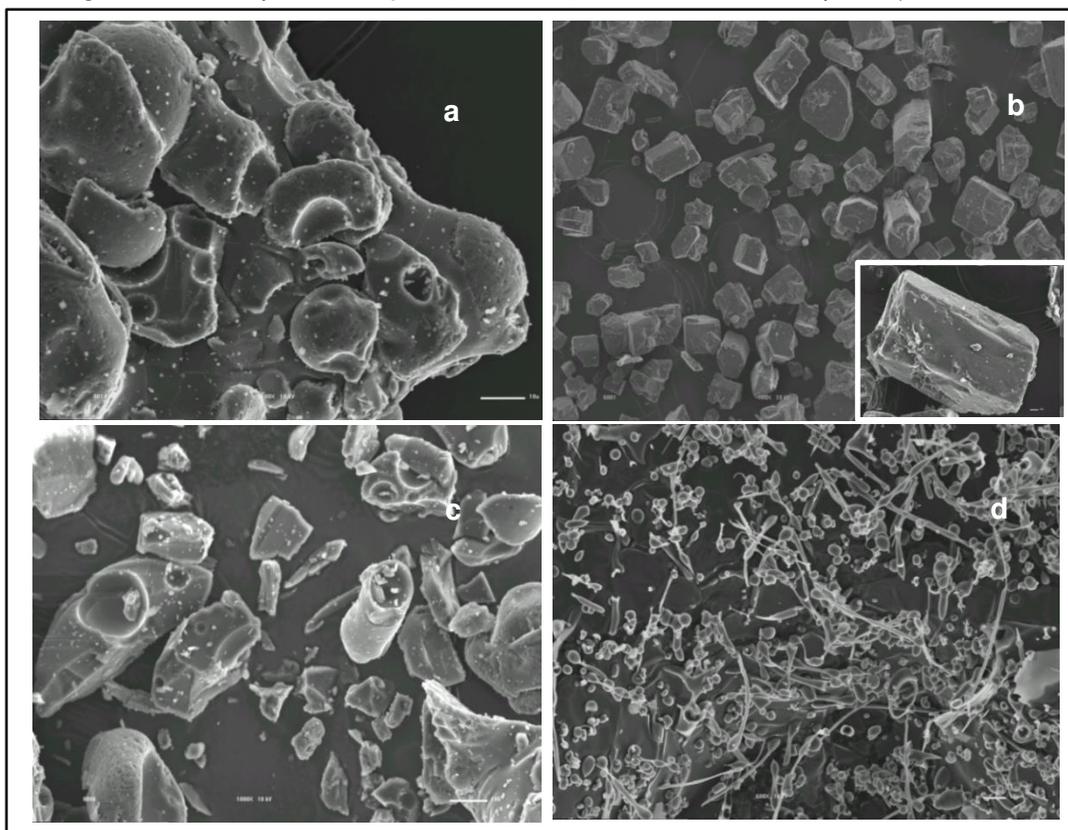


Figura 17: Fotomicrografias da HP- $\beta$ -CD (a), clonidina (b), mistura física (c) e complexo (d). Magnificação de b (CND) de 100x. Magnificação de 1000 vezes para a, c, d e insert da figura b.

É possível observar que cada amostra se organiza de maneira distinta, em meio sólido. Para a HP- $\beta$ -CD foi observada a presença de estruturas amorfas de tamanho aproximado de 50 $\mu$ m. Já a CND apresenta-se como cristais hexagonais de até 100 $\mu$ m com característicos eixos ternários de simetria (*insert* Figura 17b), inerentes a este tipo de cristal. Na mistura física foi possível observar preservação das características estruturas amorfa e cristalina, próprias de cada composto puro (HP- $\beta$ -CD e CND, respectivamente) indicando que a complexação não ocorre pela simples mistura dos compostos hospedeiro e hóspede, em meio sólido. Já na amostra do complexo CND:HP- $\beta$ -CD, é bastante evidente a perda completa da estrutura cristalina da CND, i.e, houve alteração da morfologia original, gerando material amorfo, de estrutura menor (que a dos compostos puros) e pouco definida, evidenciando a formação do complexo de inclusão.

#### 4.3.4. Caracterização do complexo por $^1\text{H}$ -RMN

A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais utilizadas na investigação da estabilidade, estequiometria, energia do processo de complexação e determinação da geometria do complexo de inclusão (Bouquet *et al.*, 2007). Através dos experimentos de DSC, TG, Raios-X e MEV obtivemos evidências da ocorrência da complexação, mas para avaliarmos estas interações em nível molecular, os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN foram coletados para as amostras em estudo (CND, HP- $\beta$ -CD e complexo). A Figura 18 mostra os espectros da CND e da HP- $\beta$ -CD, com atribuição dos picos de absorção, bem como o espectro do complexo CND:HP- $\beta$ -CD. A Tabela 6 reúne os valores de deslocamentos químicos destes espectros.

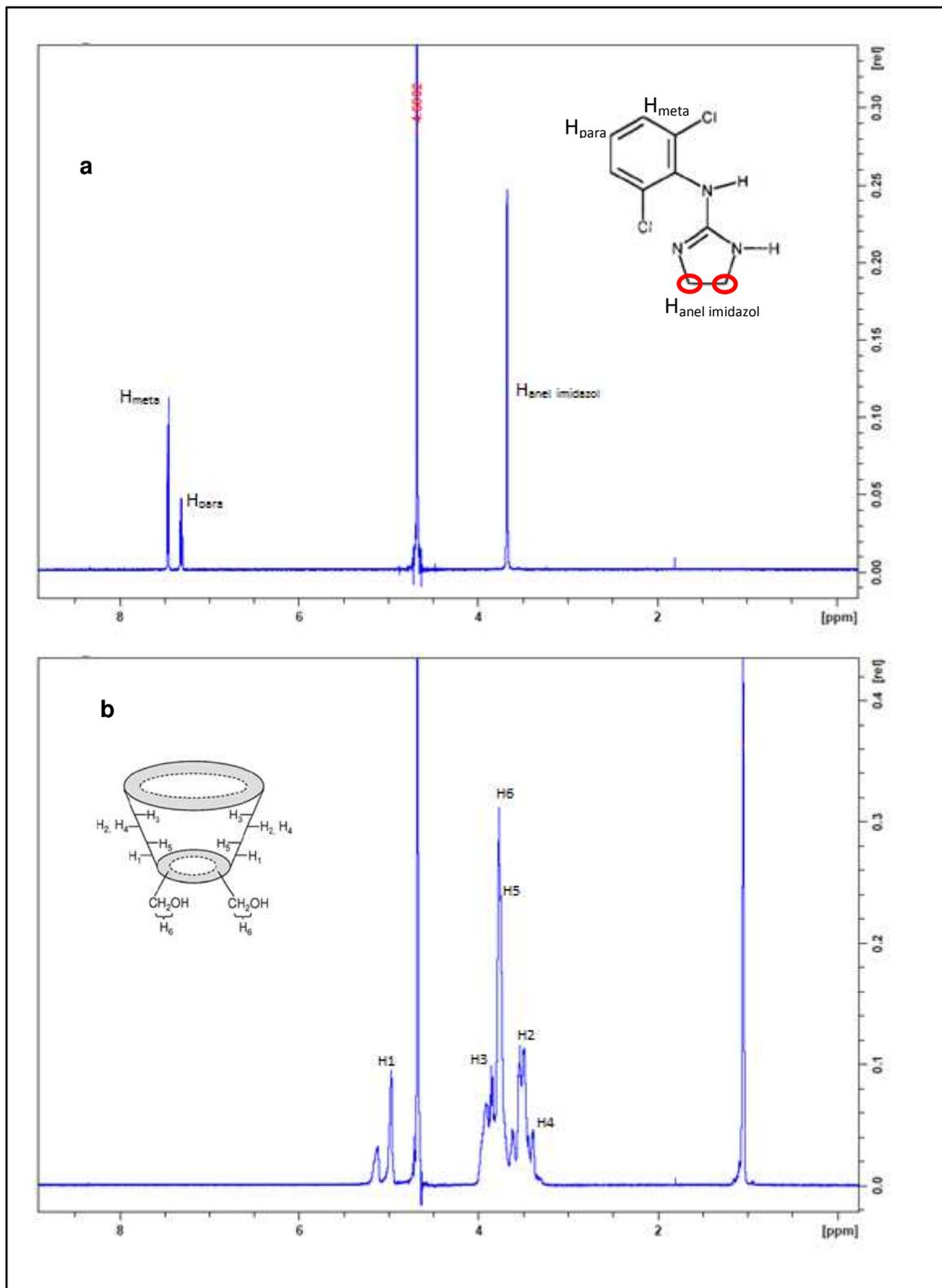


Figura 18: Espectros de  $^1H$ -RMN para a CND (a) e HP- $\beta$ -CD (b), 500 MHz, temperatura 25°C

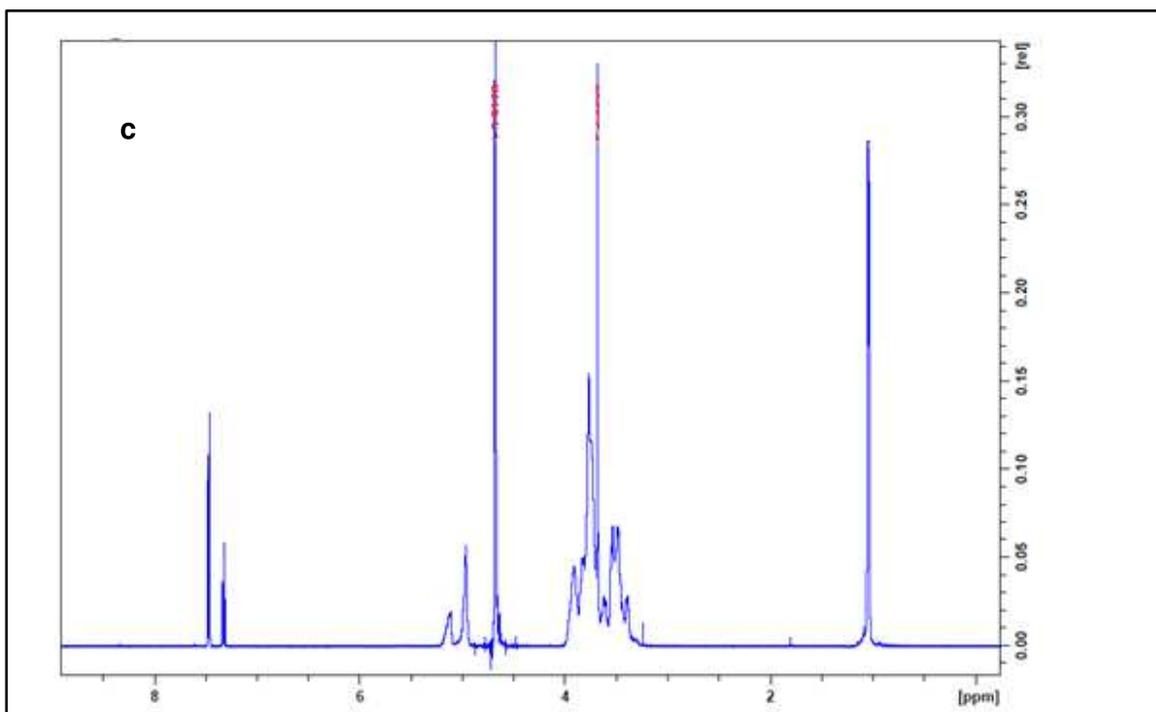


Figura 18 (cont.): Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN complexo CND:HP- $\beta$ -CD (c) na razão molar 1:1. 500 MHz, temperatura 25°C

Tabela 6: Deslocamentos químicos ( $\Delta\delta$ , em ppm) e atribuição de hidrogênios para as amostras de CND, HP- $\beta$ -CD e complexo CND:HP- $\beta$ -CD (de acordo com Figura 18).

HP- $\beta$ -CD	Hidrogênio	$\delta_{\text{ausência}}$	$\delta_{\text{presença}}$	$\Delta\delta$
	H <sub>1</sub>	4,974	4,966	- 0,008
	H <sub>2</sub>	3,542	3,535	- 0,007
	H <sub>3</sub>	3,863	3,837	- 0,026
	H <sub>4</sub>	3,393	3,390	- 0,003
	H <sub>5</sub>	3,757	*	*
	H <sub>6</sub>	3,775	3,770	- 0,005
	CH <sub>3</sub> (hidroxil)	1,055	1,049	- 0,006
CND	H <sub>anel imidazol</sub>	3,6806	3,6860	0,0054
	H <sub>meta</sub>	7,4681	7,4778	0,0097
	H <sub>meta</sub>	7,4548	7,4642	0,0094
	H <sub>para</sub>	7,3193	7,3266	0,0073

\* Deslocamento não mensurado devido à sobreposição espectral

A atribuição dos picos da CND está de acordo com a literatura (Chemical book) e nele (Figura 18a) identificam-se picos correspondentes aos hidrogênios (equivalentes) do anel imidazólico (em 3,68ppm), e do anel aromático: hidrogênio em substituição *para* (7,32ppm) e hidrogênios em *meta* (7,45 e 7,47ppm). Com a complexação não houve variação significativa ( $> 0,05\text{ppm}$ ) para qualquer desses hidrogênios (Tabela 6).

Os picos da HP- $\beta$ -CD estão atribuídos em concordância com trabalhos anteriores de nosso laboratório (Pinto, 2002; de Jesus, 2006; Carvalho, 2007; Lima, 2010) e da literatura (Castelli *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2009; de Paula *et al.*, 2010a; Tsao *et al.*, 2012), porém não houve variação significativa no deslocamento químico ( $\Delta\delta$ ), o que nos sugere pouca ou rápida interação da CND com a cavidade da HP- $\beta$ -CD. Em geral, os hidrogênios 3 (H3) e 5 (H5), situados na cavidade interna do anel macrocíclico da ciclodextrina, são os mais afetados pela complexação, devido a entrada e acomodação da molécula convidada naquela cavidade (Pinto *et al.*, 2005; Grillo *et al.*, 2008; de Paula *et al.*, 2010a). No caso do complexo CND:HP- $\beta$ -CD, observamos que o átomo mais afetado é o H3, com deslocamento superior aos demais. O H5 não é afetado pela inclusão da CND na cavidade da HP- $\beta$ -CD, sendo que a interação com o H3 se dá com o H<sub>meta</sub> da CND. Este fato pode ser explicado pelo impedimento (estérico e de polaridade) gerado pelos volumosos átomos de cloro substituídos em *orto*, no anel aromático da CND. Além disso, os valores baixos em deslocamento químico confirma-nos a fraca interação evidenciada nos experimentos de análise térmica, onde a retirada da água da cavidade da HP- $\beta$ -CD não foi completa (Figura 15), evento esperado devido a complexação (Giordano *et al.*, 2001).

Outro fato que corrobora com a baixa interação é o valor da constante de associação,  $K_a = 20 \text{ L/M}^{-1}$ , determinado pela técnica de DOSY (Figura 19), que evidenciou baixa afinidade CND:HP- $\beta$ -CD (Tabela 7)

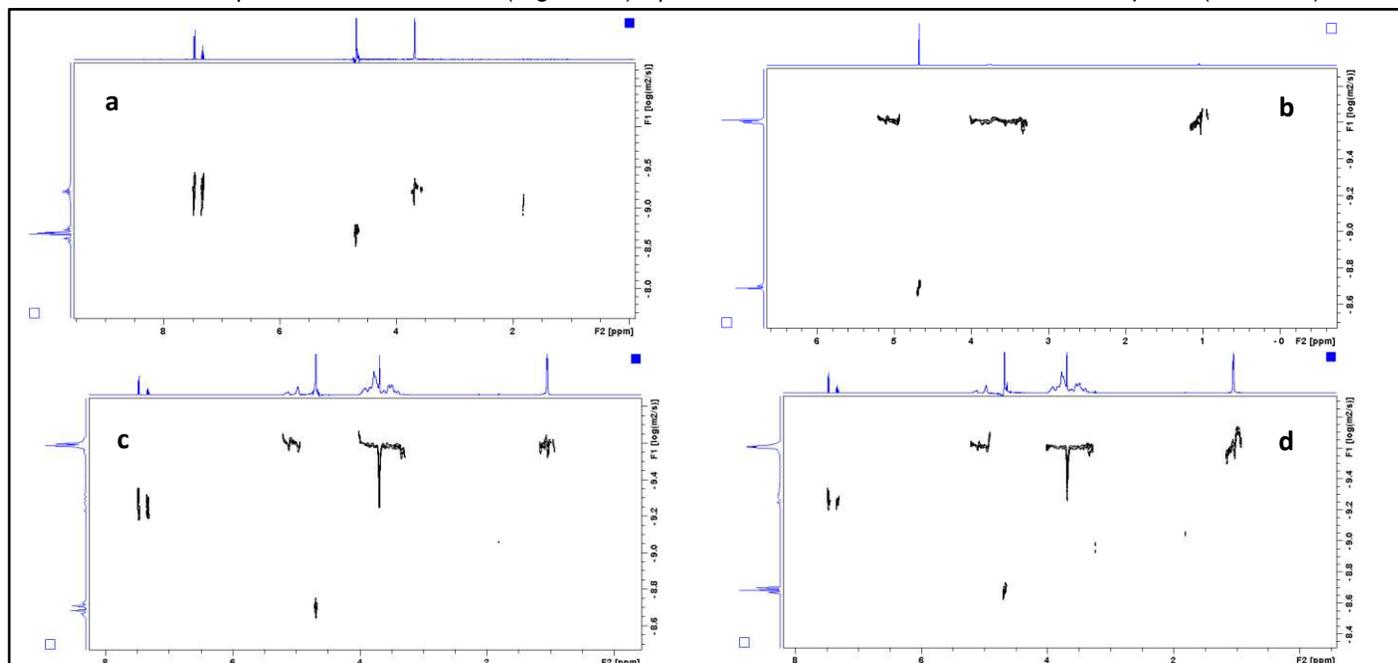


Figura 19: Espectros pseudo-bidimensionais de  $^1\text{H}$ -RMN: experimentos de DOSY para clonidina (a), HP- $\beta$ -CD (b), complexo CND:HP- $\beta$ -CD (d) e mistura física (c), na razão molar 1:1.

O coeficiente de difusão das moléculas pequenas como a água e a CND (Figura 19a) é grande e deve diminuir com a formação do complexo, já que a ciclodextrina apresenta mobilidade reduzida em solução, em comparação com a água. Esta menor difusão permite a determinação da fração da molécula hóspede associada ao anel macrocíclico e da constante de associação, por DOSY. Porém, como pode ser observado nos espectros de DOSY, não houve alteração significativa na mobilidade da CND por ocasião da complexação (Figura 19d), i.e, reflexo da baixa afinidade entre a CND e a HP-β-CD. Loukas *et al* (1998), descreveu que valores de  $K_a$  menores que  $100 \text{ M}^{-1}$  indicam que as forças responsáveis pela manutenção do complexo são fracas, ao passo que valores maiores que  $500 \text{ M}^{-1}$  indicam a formação de complexos estáveis.

Tabela 7: Coeficientes de Difusão (D) da CND, HP-β-CD, e do complexo CND:HP-β-CD, fração molar do complexo e constante de associação ( $K_a$ ) CND:HP-β-CD.

Composto	D ( $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	Fração molar do complexo (%)*	$K_a$ (L/mol)*
CND	$6,20 \pm 0,044$	-	-
HP-β-CD	$2,47 \pm 0,011$	-	-
CND:HP-β-CD	$5,68 \pm 0,023$	<b>14</b>	<b>20</b>

\* Cálculos:

Coeficiente de Difusão da CND:

$$f = D_{\text{CND}} - D_{\text{CND:HP-}\beta\text{-CD}} / D_{\text{CND}} - D_{\text{HP-}\beta\text{-CD}}$$

$$f = 6,20 - 5,68 / 6,20 - 2,47$$

$$f = 0,52 / 3,73$$

$$f = 0,14 \text{ ou } 14\% \text{ de fração complexada}$$

Constante de associação

$$K_a = f / (1 - f) ([\text{HP-}\beta\text{-CD}] - f[\text{CND}])$$

$$K_a = 0,14 / (1 - 0,14) (10 \cdot 10^{-3} - (0,14 \times 10 \cdot 10^{-3}))$$

$$K_a = 0,14 / 0,86 \times 8,6 \cdot 10^{-3}$$

$$K_a = 20$$

Visando confirmar a baixa afinidade observada nos experimentos de DOSY, foram coletados os espectros nas coordenadas giratórias com trava de spin (ROESY) para determinarmos interações intermoleculares e possivelmente dimensionarmos a geometria da interação entre CND e HP-β-CD, informação possível de extrair por estes experimentos de efeito nuclear Overhauser (Günther, 1994; de Paula *et al.*, 2010 (a)). A figura 20 apresenta o espectro de ROESY total (a) e ampliado (b).

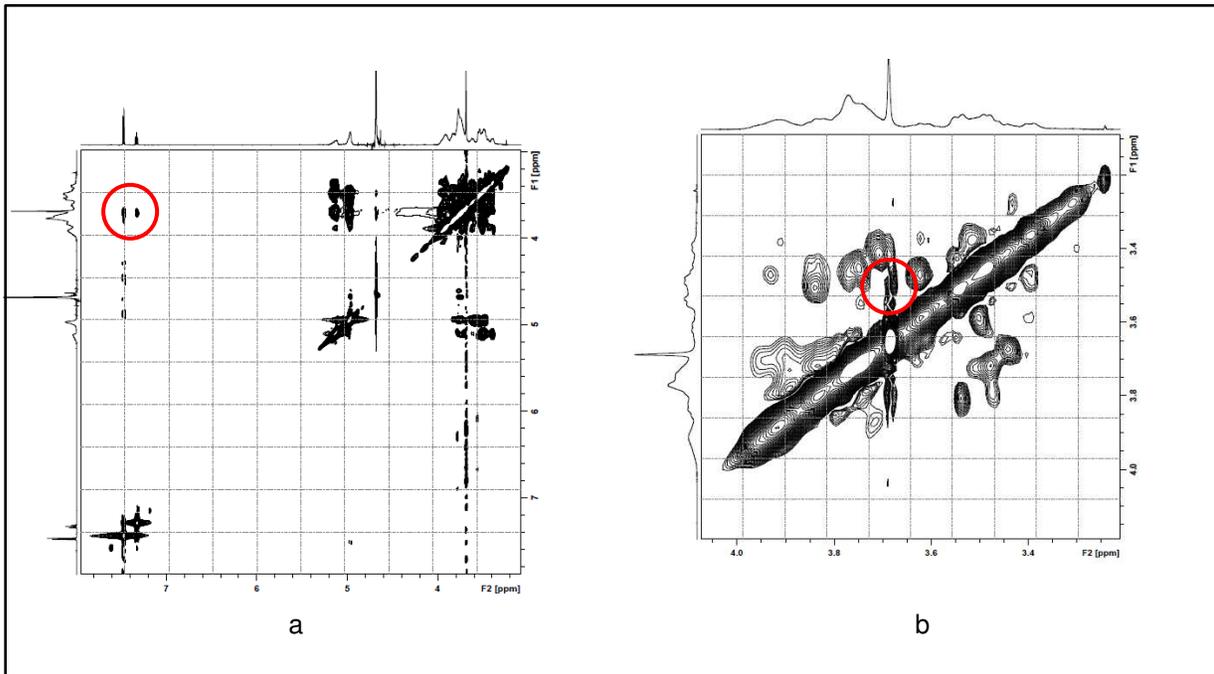


Figura 20: Espectro de ROESY do complexo CND:HP- $\beta$ -CD (a) e ampliação da região de 3,2 a 4ppm (b) para identificação de interações intra e intermoleculares envolvendo hidrogênios pertencentes à HP- $\beta$ -CD.

Os espectros revelam que há uma interação, apesar de fraca, que se dá pelo sinal 7,47ppm da CND ( $H_{meta}$ ) e 3,86 da HP- $\beta$ -CD. Além disso, há outra interação fraca que se dá pelo sinal em 3,68ppm da CND, referente aos hidrogênios do anel imidazólico e 3,52ppm da HP- $\beta$ -CD, referente ao hidrogênio H2. Este resultado pode indicar a formação de complexos de não inclusão, com interações “fora do anel”, via ligações de hidrogênio. A formação de complexos de não-inclusão já foi descrita e também pode resultar em resultados farmacológicos significativos (otimização da ação farmacológica ou diminuição da toxicidade), como já observado para a riboflavina (de Jesus et al., 2012) e meglumina (Martins et al., 2009) complexadas com ciclodextrinas, bem como otimizar propriedades físico-químicas (Duan *et al.*, 2005) e a estabilidade de fármacos (Hazecamp & Verpoorte, 2006). Porém, levando em conta a variação de deslocamento químico (já discutido para o hidrogênio 3 (H3) (destaque Fig. 20a)) e o *crosspeak* envolvendo o pico H3 da ciclodextrina e o anel aromática da CND, é mais provável que ocorra a interação intermolecular entre CND e HP- $\beta$ -CD, formando um complexo de inclusão, porém de baixa afinidade e dinâmica de associação/dissociação rápida.

#### 4.3.5. Caracterização do complexo: cinética de liberação do fármaco

Devido ao fato da complexação alterar a cinética de liberação dos fármacos, os estudos que avaliam a cedência do fármaco ao meio são importantes para a verificação do efeito da complexação sobre esta propriedade (Paavalola *et al.*, 1995; Spricigo *et al.*, 2008). Para o complexo CND:HP- $\beta$ -CD foi avaliada a

cinética de liberação, em comparação com o fármaco livre, em condições de pH, temperatura e agitação controladas. A figura 21 mostra o perfil de liberação da CND no meio de dissolução (tampão HEPES pH 7,4) durante tomadas de amostra em 300 minutos de experimento, tempo no qual a curva para ambas as condições (CND e complexo) atingiu platô de equilíbrio.

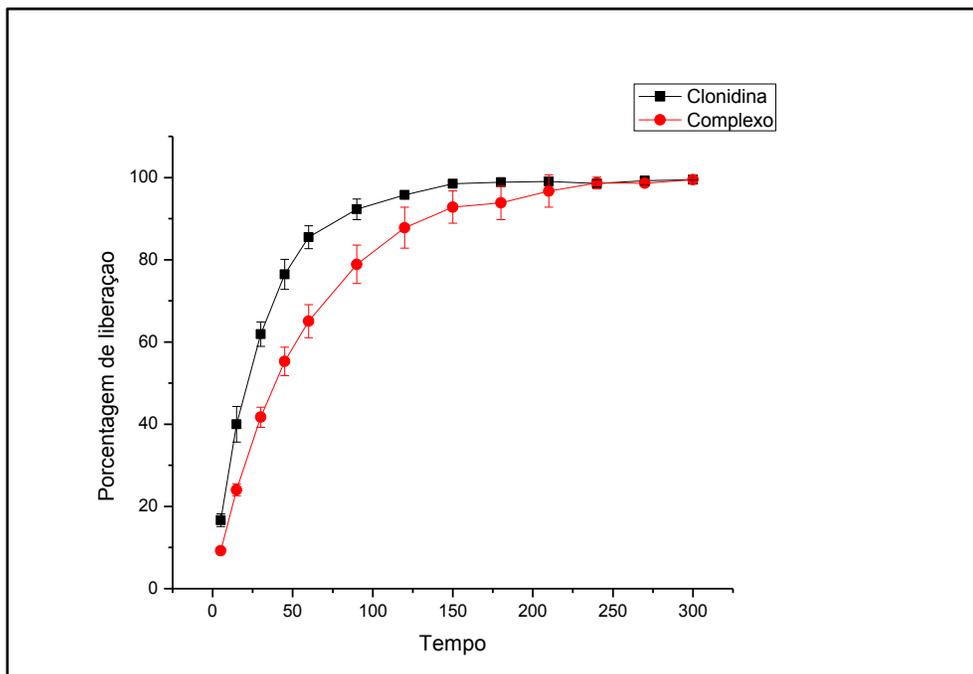


Figura 21: Perfil de liberação da CND e complexo CND:HP-β-CD em tampão HEPES pH 7,4; 25°C.

Nas replicatas com CND observou-se liberação maior que 90% em aproximadamente 1 hora de experimento, valor não atingido para o complexo, cujo equilíbrio ocorreu com mais de 3 horas de experimento. A partir de 220 minutos de estudo, observamos que, nas tomadas de amostra, houve tendência à superposição das curvas. Apesar da diferença nas curvas não ser tão pronunciada, o que pode refletir a baixa afinidade da CND com a HP-β-CD, houve um retardo significativo na liberação da CND para o meio (ASC CND = 25541,4 e ASC CND:HP-β-CD = 24175,3). Além disso, experimentos anteriores de nosso laboratório mostraram que mesmo que exista esta condição (baixa afinidade) o efeito *in vivo* do sistema fármaco:ciclodextrina pode ser bastante promissor, como mostrado para a bupivacaína e ropivacaína (de Araújo, 2005).

#### 4.4. Avaliação farmacológica do complexo de inclusão e associação ao anestésico local Bupivacaína

Diversos medicamentos podem ser utilizados a fim de diminuir ou bloquear a transmissão da dor. A associação de fármacos pode proporcionar efeito melhor que o uso isolado de um agente. O anestésico local pode ser administrado isolado ou associado a outro fármaco (Harris & Benveniste, 2000). A

bupivacaína (BVC), pertencente à classe das amino-amidas, é o anestésico local mais utilizado em procedimentos cirúrgicos, principalmente para bloqueios regionais prolongados. Este agente foi o primeiro anestésico local que combinou propriedades como início de ação moderada, longa duração, bloqueio da condução e separação significativa entre bloqueio sensorial e motor (Malamed, 2001). Diversos autores tem mencionado seu uso em associação à CND (Klimscha *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 2001; Rochette *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2009) para aumento do tempo de anestesia e diminuição da quantidade requerida de anestésico (Sites *et al.*, 2003; Yildiz *et al.*, 2006; Merivirta *et al.*, 2009). Sabendo desta descrição, propusemos neste trabalho avaliar a ação farmacológica do complexo CND:HP- $\beta$ -CD, associado à BVC, avaliando, previamente, a afinidade de cada fármaco pela cavidade da ciclodextrina. Para isso, através de ensaios que preveem a lipofilicidade de cada molécula, foi aferida a afinidade de cada fármaco pela cavidade do carreador HP- $\beta$ -CD.

#### 4.4.1. Determinação da lipofilicidade por diferentes técnicas

Para cada molécula isolada, foi avaliada a partição em sistema octanol/água, partição em lipossomas e em membranas artificiais imobilizadas, para servirem como indicativo da lipofilicidade de cada fármaco. Este parâmetro (lipofilia) pode ser indicativo de maior afinidade pela cavidade hidrofóbica da ciclodextrina, determinando maior afinidade de um fármaco em detrimento de outro, pelo carreador.

Primeiramente foi determinada a partição da CND e da BVC em sistema octanol/água, onde foi evidenciado que o valor de P para a CND foi de 6,0 ( $\log P = 0,78$ ) e o da BVC foi de 83,6 ( $\log P = 1,92$ ) em pH 7,4. Outros autores demonstraram que o  $\log P$  da CND, como base livre, é 1,59 (Remko *et al* 1995, Taillardat-Bertschinger *et al* 2002). Este valor também é confirmado em bases de dados, como o PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov em www.ncbi.nlm.nih.gov), que revela valor de  $\log P$  de 1,57 para a base livre da clonidina. Há que se considerar que nosso resultado refere-se à forma cloridrato em pH 7,4, em que o fármaco é mais solúvel e tende a particionar-se mais na fase aquosa, refletindo em menor valor de  $\log P$ . de Paula & Schreier (1995) determinaram a partição da BVC em sistema octanol/água, tendo obtido o valor de 1,30 em pH 7,4; valor condizente ao obtido por nós.

Devido às limitações do sistema octanol/água para mimetizar o ambiente de distribuição corpórea do fármaco (o solvente octanol representa uma fase apolar homogênea, bem diferente das barreiras biológicas representadas pelas membranas celulares), a partição foi também determinada entre lipossomas de fosfatidilcolina de ovo e meio aquoso (tampão Hepes pH 7,4). A CND apresentou valor de P de 83 ( $\log P = 1,92$ ). Neste tipo de lipossomas, em experimentos anteriores de nosso laboratório foi obtido valor de P para a BVC de 136 ( $\log P = 2,13$ ) (de Araújo, 2002) em pH 7,4. Estes resultados, assim como a partição em octanol/água, indicam maior lipofilicidade da BVC que a CND, ou seja, a BVC no caso da associação medicamentosa, poderia apresentar maior afinidade pela cavidade da HP- $\beta$ -CD que a CND, deslocando-a daquele carreador.

Visando confirmar estes dados e prever a permeabilidade do complexo, foram realizados os ensaios em membranas artificiais imobilizadas (IAM). A CND apresentou tempo de retenção médio de 2,34

minutos. Este valor corresponde a um fator de capacidade,  $K_m$ , de 11,31 ou  $\log K = 1,05$ . Taillardat-Bertschinger *et al* (2002) determinaram para a CND (em IAM, pH 7,0) um valor de  $\log K$  de 1,36; valor próximo ao experimentalmente obtido por nós. Este resultado também vai de encontro ao obtido por Grumetto *et al* (2012), estudo no qual o  $\log K$  para a CND foi de 1,32 (pH 7,0).

Através desta técnica (IAM), Barbato *et al* (1997) determinaram um  $\log K$  para BVC de 1,45 em pH 7,0. Este resultado novamente reflete a maior lipofilicidade da BVC comparada a CND, podendo, no caso da associação medicamentosa em injeção simultânea, haver deslocamento da CND da cavidade da HP- $\beta$ -CD. Estes achados são confirmados ainda por de Paula *et al* (2010) que através da técnica de  $^1\text{H}$ -RMN mostraram que o  $K_a$  da BVC é  $91\text{mol/L}^{-1}$ . Nossos dados experimentais mostraram  $K_a$  de  $20\text{mol/L}^{-1}$  para CND. Conforme discutido no item 4.3.4 esta baixa afinidade é reflexo, além das características estruturais, da menor lipofilicidade da molécula quando comparada a BVC. Adicionalmente, por estudos de isotermas de solubilidade Moraes e col. determinaram para a BVC constante de estabilidade de  $13,1 \pm 2,8\text{ M}^{-1}$  em pH 7,4 (Moraes *et al.*, 2007b). Para a forma neutra da BVC, estes mesmos autores (Moraes *et al* 2007c) mediram constante de afinidade de  $95,4\text{ M}^{-1}$ . Em comparação à lidocaína, foi demonstrado maior lipofilicidade da BVC, sendo que esta hidrofobicidade influencia diretamente a complexação do fármaco com a cavidade hidrofóbica da HP- $\beta$ -CD (Moraes *et al.*, 2007b).

Apesar disso, foi observado que o complexo CND:HP- $\beta$ -CD apresentou tempo de retenção de 1,59 minutos, correspondente a um  $K_m = 7,36$ . Comparado à CND livre, houve diminuição do valor de  $K_m$  (11,31 para a CND livre) indicando que possivelmente a associação à ciclodextrina levou a diminuição de permeabilidade do complexo à membrana. De acordo com a Regis Technologies (2000), produtora da mini-coluna IAM, valores de  $K_{IAM}$  entre 0 e 5 classificam os fármacos como baixa permeabilidade, 5 a 15 como média e 15 a 25 como alta permeabilidade. Estudos *in vivo* adicionais são necessários para apuração desta hipótese, onde a diminuição da permeabilidade do complexo reforce o mecanismo de ação periférico da CND. Este mecanismo é particularmente importante, pois, a supressão da ação central pode levar a diminuição da ocorrência do principal efeito adverso da CND, que é a hipotensão durante a prática anestésica

Em resumo, através de diferentes métodos, foi possível verificar que a BVC é mais lipofílica que a CND e pode competir com este fármaco pela cavidade da HP- $\beta$ -CD. Além deste parâmetro físico-químico (lipofilia), a afinidade pela cavidade também é maior. Este achado é particularmente importante quando pondera-se o manejo desta associação *in vivo*, evitando a injeção em *bolus*, fato que possivelmente levaria a deslocamento da CND da cavidade da HP- $\beta$ -CD para alojamento da BVC.

#### 4.4.2. Ensaios de toxicidade *in vitro*: cultura de células 3T3

Em triagens iniciais, observou-se que o  $\text{IC}_{50}$  para a CND foi de 3,5mM. Para o complexo houve ligeira antecipação deste valor, com  $\text{IC}_{50}$  de 2,78mM (Figura 22). Apesar de em primeira análise inferir-se que o complexo seria mais tóxico por uma menor concentração provocar morte de 50% da população da placa, há que se considerar que esta diferença não é significativa ( $p = 0,9738$  teste Tukey). Em trabalho

anterior de nosso grupo (Queiroz, 2012), o  $IC_{50}$  da BVC foi determinado nas mesmas condições experimentais, sendo o valor obtido na linhagem de células em estudo; 1,67mM.

Desta forma, como temos menor  $IC_{50}$  para a BVC, esta concentração foi escolhida para o tratamento em associação com a CND, haja visto que este fármaco já está amplamente caracterizado pelo nosso grupo, sendo foco do presente trabalho a avaliação da viabilidade celular frente a tratamentos com a CND. Assim, conhecendo o  $IC_{50}$ , os tratamentos posteriores foram feitos com concentrações menores que este índice, i.e, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 250 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 1mM de CND. Concentrações maiores que estas, induziram morte significativa dos fibroblastos (Figura 22).

Conforme Figura 22, pode ser observado que não há diferença significativa entre o uso da CND e do complexo CND:HP- $\beta$ -CD, ou seja, do ponto de vista de toxicidade, o fármaco complexado não foi mais tóxico para as células 3T3 comparado ao fármaco livre. Estes resultados também corroboram os dados obtidos em DSC e RMN, haja visto que para aplicação nos poços das placas de cultura, o fármaco foi ressuspendido em meio de cultura. Sabendo da dinâmica envolvida na formação do complexo CND:HP- $\beta$ -CD, bem como de sua baixa afinidade, de fato não era esperada diferença significativa entre estes grupos tratados.

Quando da associação com a BVC, observou-se redução no número de células viáveis no grupo tratado com complexo CND:HP- $\beta$ -CD (Fig. 23). Considerando toda curva, esta redução pode ser considerada significativa ( $p$  valor = 0,0289), porém se observarmos o valor utilizado *in vivo*, que representa 100 $\mu$ M, obtivemos  $50,8 \pm 5,5$  células viáveis, ao passo que no complexo obtivemos  $42,3 \pm 7,2$  células viáveis. Considerando este ponto, particularmente importante devido ao ensaio *in vivo*, e o desvio obtido nas réplicas, podemos verificar que ambos estão contidos em intervalos similares. Desta forma, pode-se concluir que mesmo associado à BVC o complexo não alterou significativamente a viabilidade celular quando comparado ao fármaco isolado na dose utilizada nos ensaios em animais, i.e, em doses específicas, a complexação não aumentou a toxicidade (Figura 23).

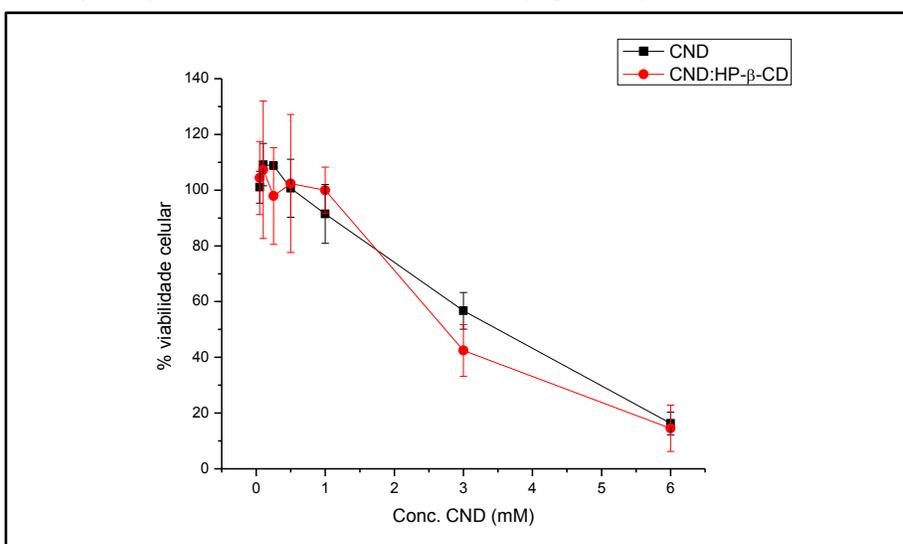


Figura 22: Ensaio de viabilidade celular para determinação do  $IC_{50}$  para a CND em cultura de células 3T3

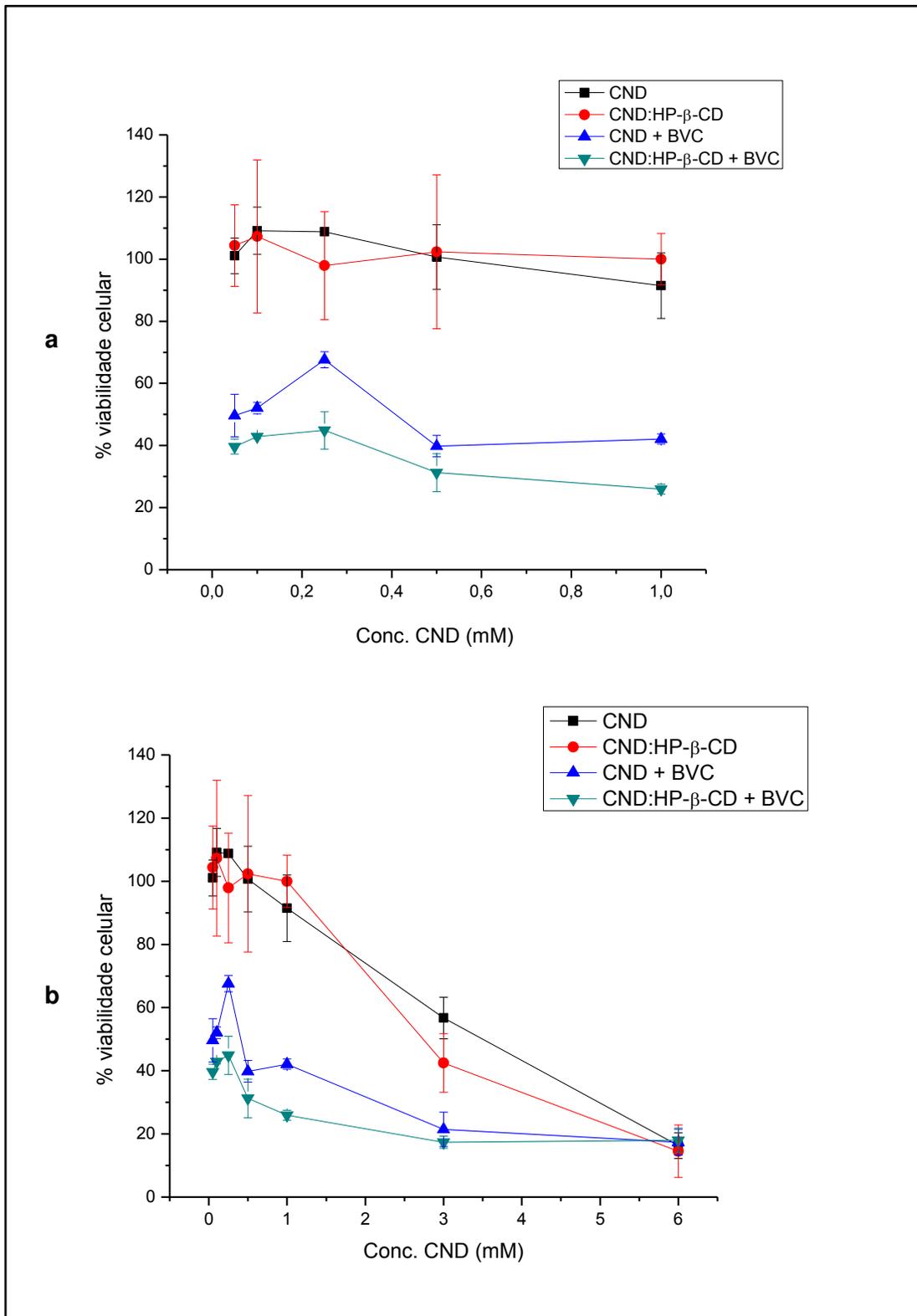


Figura 23. Testes de viabilidade celular em fibroblastos 3T3, realizados em concentrações abaixo (a) e acima (b) do IC<sub>50</sub> da CND, associada a BVC em concentração de 1,67mM

Em resumo, através dos ensaios de toxicidade, foi possível observar que não houve diferença significativa na viabilidade celular quando comparou-se o uso da CND isolada e do complexo CND:HP- $\beta$ -CD, i.e, este último não foi mais tóxico para as células. Quando a BVC, na concentração de seu IC<sub>50</sub>, foi associada à CND, houve redução significativa no número de células viáveis, mas há que se considerar que ponderando os desvios obtidos no teste, no ponto correspondente à concentração utilizada nos ensaios *in vivo*, este valor não é significativamente diferente. Nesta associação, já era esperado viabilidade de 50% das células pelo tratamento com BVC no IC<sub>50</sub>. Portanto, em doses específicas, a associação da BVC com o complexo CND:HP- $\beta$ -CD não foi mais tóxica para as células.

#### 4.4.3. *Ensaio in vivo: teste de Tail-flick*

A avaliação do bloqueio sensorial permitiu a observação de diferenças bem marcadas entre as formulações estudadas. O uso de CND, associada à bupivacaína, em concentração abaixo daquela capaz de induzir hipotensão (100 $\mu$ g) foi eficiente na indução do bloqueio sensorial, bem como no prolongamento do tempo de anestesia induzido pela BVC, resultados em consonância com a literatura (Braz *et al.*, 2003; Neves *et al.*, 2006; Tuijl *et al.*, 2006; McCartney *et al.*, 2007; Elia *et al.*, 2008).

A Figura 24 e a tabela 8 mostram os resultados obtidos durante o ensaio de bloqueio sensorial do nervo caudal, medido pelo limiar de remoção da cauda de ratos Wistar, frente a um estímulo térmico, como descrito no item 3.2.4, de métodos.

Os resultados mostraram que a CND, na dose de 30 $\mu$ g (0,15%) induz bloqueio sensorial do nervo caudal, reforçando os mecanismos de ação já discutidos na introdução deste trabalho. De forma similar, a BVC, nas concentrações de 0,125 e 0,25%, induz bloqueio concentração dependente, de acordo com o esperado. Os resultados obtidos com a associação medicamentosa de ambos foi bastante interessante: de maneira geral, os resultados mostraram um aumento na duração da analgesia quando da associação da CND com a BVC, mesmo em concentrações mais baixas do anestésico. Estes achados são respaldados pelo maior tempo de recuperação ( $T_{rec}$ ) da analgesia e no efeito total (ASC) do fármaco nos animais tratados (Figura 24a). Para melhor visualização, a Figura 24b apresenta a comparação entre as formulações estudadas em menor concentração de BVC. Os resultados reforçam ainda as constatações já amplamente difundidas de potencialização do efeito anestésico (McCartney *et al.*, 2007; Elia *et al.*, 2008) e aumento do tempo de bloqueio (Rhee *et al.*, 2003; Yildiz *et al.*, 2006; Merivirta *et al.*, 2009) com menor aporte de anestésicos (Macpherson, 2000; Sites *et al.*, 2003). A Figura 24c evidencia que doses maiores de BVC possuem efeito anestésico mais pronunciado quando comparado a CND isolada e associada a HP- $\beta$ -CD, fato já esperado pelo mecanismo de ação primário da própria BVC.

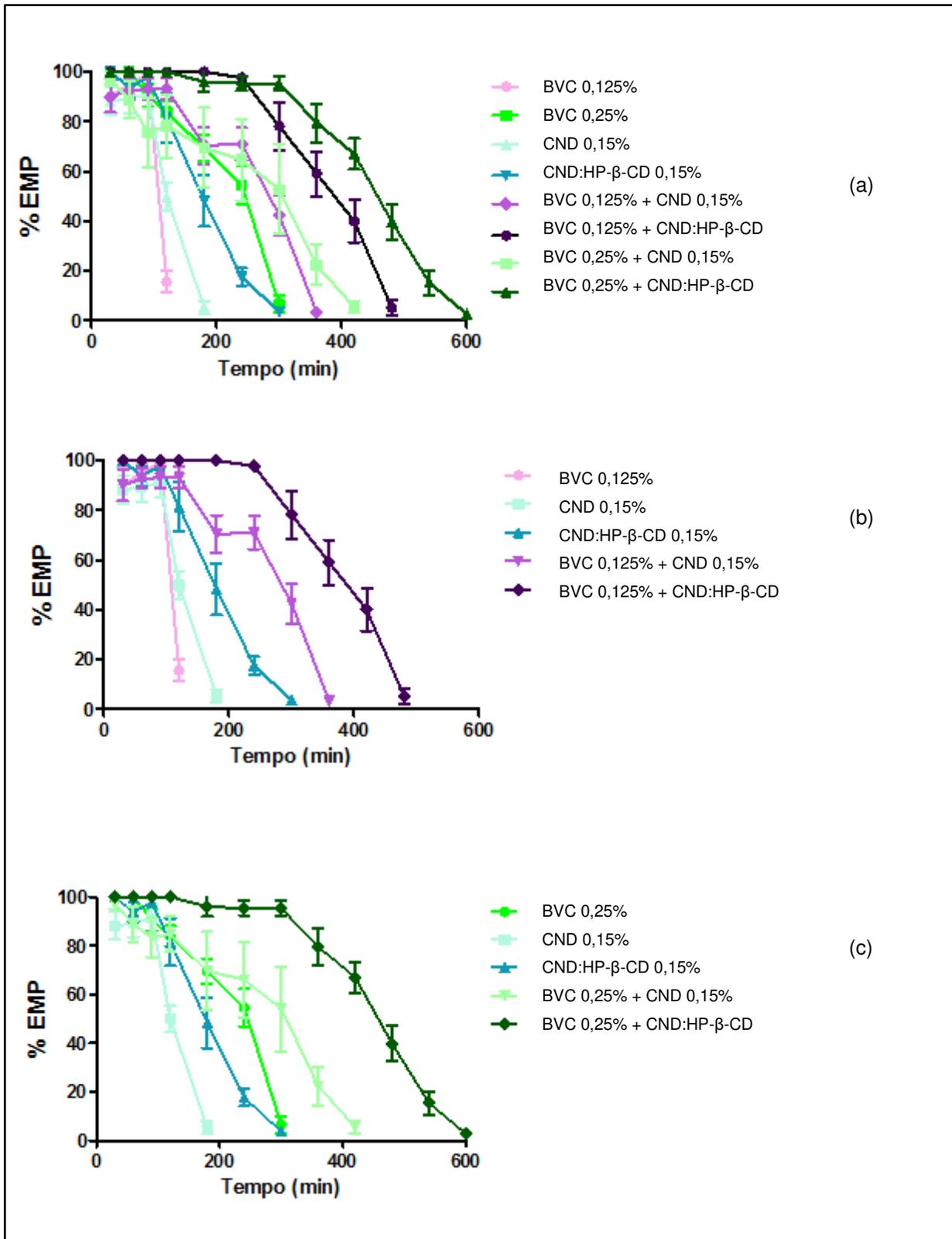


Figura 24: Avaliação do bloqueio sensorial do nervo caudal de ratos Wistar após administração intratecal dos fármacos clonidina (30µg, livre ou complexada com HP-β-CD), bupivacaína (0,125 e 0,25 %) e associação de ambas. a) porcentagem de animais com anestesia em função do tempo para todas as

formulações estudadas; b) porcentagem de animais com anestesia em função do tempo para o grupo tratado com BVC 0,125% e CND livre e complexada; c) porcentagem de animais com anestesia em função do tempo para o grupo tratado com BVC 0,25% e CND livre e complexada.

Tabela 8: Tempo de recuperação ( $T_{rec}$ ) e área sob a curva em função do tempo ( $ASC_{0-600}$ ) para o efeito anestésico medido para os fármacos clonidina e bupivacaína, mais associações, mostrados na Figura 24.

Grupo	$ASC_{0-600}$	$T_{rec}$ (min)
BVC 0,125%	7500(6321-7853)	120 (90-120)
BVC 0,250%	19625(14864-22615) <sup>g***</sup>	240(180-300) <sup>g***</sup>
CND 0,15%	9231(7154-10607)	180 (120-240)
<b>CND:HP-β-CD 0,15%</b>	13909(12923-18000) <sup>a***</sup>	240 (180-300) <sup>a***</sup>
<b>BVC 0,125% + CND 0,15%</b>	21808(17045-28385) <sup>b***; h*</sup>	300 (240-360) <sup>b***; h*</sup>
<b>BVC 0,125% + CND:HP-β-CD 0,15%</b>	34200(39545-41455) <sup>c,d***; j*</sup>	420(360-480) <sup>c,d***</sup>
<b>BVC 0,250% + CND 0,15%</b>	27429(8590-33500) <sup>i**</sup>	360 (300-420) <sup>i**; j*</sup>
<b>BVC 0,250% + CND:HP-β-CD 0,15%</b>	42000(35143-45900) <sup>e,f***</sup>	540 (480-600) <sup>e,f***</sup>

Análise estatística pelo método de Tukey-Kramer: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , a) CND 30 $\mu$ g vs CND:HP-β-CD 30 $\mu$ g; b) BVC 0,125% vs BVC 0,125% + CND 30 $\mu$ g; c) BVC 0,125% vs BVC 0,125% + CND:HP-β-CD 30 $\mu$ g; d) BVC 0,125% + CND 30 $\mu$ g vs BVC 0,125% + CND:HP-β-CD 30 $\mu$ g; e) BVC 0,250% + BVC 0,250% + CND:HP-β-CD 30 $\mu$ g; f) BVC 0,250% + CND 30 $\mu$ g vs BVC 0,250% + CND:HP-β-CD 30 $\mu$ g; g) BVC 0,1250% vs BVC 0,25%; h) BVC 0,250% vs BVC 0,125% + CND 30 $\mu$ g; i) BVC 0,250% vs BVC 0,125% + CND:HP-β-CD 30 $\mu$ g; j) BVC 0,125% + CND 30 $\mu$ g vs BVC 0,250% + CND 30 $\mu$ g.

Os dados da Figura 24 e Tabela 8 evidenciam, principalmente, o grande incremento em tempo de recuperação dos animais tratados com o complexo de CND associado à BVC 0,25%, pelo prolongamento significativo da base 100% até aproximadamente 320 minutos. Experimentos adicionais são necessários para confirmar a competição entre os fármacos pelo carreador, devido a baixa afinidade da CND evidenciada durante os experimentos de  $^1H$ -RMN, como discutido anteriormente. Contudo, é possível discernir que pelo menos para a formulação preparada com 0,25% de BVC não há HP-β-CD suficiente para carrear ambos os fármacos visto que, sabendo da quantidade adicionada de HP-β-CD, ter-se-ia aproximadamente 36 $\mu$ g de BVC a adicionar para manter a estequiometria 1:1. No caso desta associação medicamentosa foi injetado 50 $\mu$ g de BVC, ou seja, 38% a mais do que o necessário para manter esta estequiometria. Em teoria não há carreador suficiente para compartilhar ambos os fármacos, reforçando-nos a suposição que o prolongamento do tempo de anestesia deve-se, primariamente, a associação da CND com a HP-β-CD.

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho preparamos e caracterizamos um complexo de inclusão formado entre o agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico clonidina e HP- $\beta$ -CD. Através de análises de espectroscopia UV-VIS foi possível determinar que a estequiometria para complexos de CND:HP- $\beta$ -CD é de 1:1. O complexo, porém, apresentou baixa afinidade, revelada pelos ensaios de  $^1\text{H}$ -RMN, através das técnicas DOSY. Medidas de ROESY evidenciaram interação intermolecular do tipo complexo de inclusão molecular entre hidrogênios da CND e da HP- $\beta$ -CD, devido ao maior deslocamento dos hidrogênios 3 (H3), apesar de não ter sido possível identificar a topologia. Apesar disso, os ensaios de DSC, TG, Raios-X, MEV e diálise serviram como indícios da ocorrência de complexação.

Os resultados *in vivo* nos apontaram a vantagem do uso do complexo CND:HP- $\beta$ -CD associado à bupivacaína em relação ao uso de cada anestésico/analgésico isolado e em associação, sem ciclodextrina. Comparando-se o grupo tratado com o complexo CND:HP- $\beta$ -CD, comparada a CND isolada, houve aumento em aproximadamente 33% em relação ao tempo de recuperação dos animais. Este aumento no tempo de recuperação foi 40% maior nos grupos tratados com o complexo associado à BVC em concentração de 0,125% e 50% maior no grupo tratado com complexo e BVC a 0,25%. Em suma, estes experimentos revelaram prolongamento significativo do tempo de anestesia, mesmo em concentração mais baixa de bupivacaína, substanciando o potencial terapêutico do uso do complexo CND:HP- $\beta$ -CD associado a este anestésico.

Esta associação da CND com ciclodextrina não havia sido descrita até então, o que revela a contribuição deste trabalho no campo da anestesia infiltrativa, face ao aumento significativo do tempo de bloqueio, que é de particular interesse em cirurgias de grande porte.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot F. V., Melzack R. Samuel C. Morphine Analgesia in the Tail-Flick and Formalin Pain Tests is Mediated by Different Neural Systems. *Exp. Neurol.* 75; 644-651; 1982.
- AlSharari S. D., Carroll F. I., McIntosh J. M., Damaj M. I. The Antinociceptive Effects of Nicotinic Partial Agonists Varenicline and Sazetidine-A in Murine Acute and Tonic Pain Models. *J. Pharm. Exp. Ther.* Vol. 342; 742 – 749; 2012.
- Al-Omari M. M., Mohammad B. Z., Davies J. E. D., Badwan A. A. Factors contributing to solubility synergism of some basic drugs with  $\beta$ -cyclodextrin in ternary molecular complexes. *J. Incl. Phenom.* 54; 159–164; 2006.
- Arantes L. M., Scarelli C., Marsaioli, A. J., de Paula E., Fernandes S. A. Proparacaine complexation with  $\beta$ -cyclodextrin and *p*-sulfonic acid calix[6]arene, as evaluated by varied  $^1\text{H-NMR}$  approaches *Mag. Res. in Chem.* V. 47; 757-763; 2009.
- Araújo M. V.G., Macedo F. L. O., Nascimento C. C., Conegero L. S., Barreto L. S., Almeida L. E., Costa N. B. J. R., Gimenez L. F. Characterization, phase solubility and molecular modeling of  $\beta$ -cyclodextrin/pyrimethamine inclusion complex. *Spectrochim Acta.* 72; 165–70; 2009.
- Babich H., Borenfreund E. Citotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. *App. Environ. Microb.* 57; 168-172; 1991.
- Baranauskas G. e Nistri A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 54; 349-365; 1998.
- Barbato F., La Rotonda M. I., Quaglia F. Chromatographic indexes on Immobilized artificial membranes for local anesthetics: relationship with activity data on closed sodium channels. *Pharm. Res.* V. 14; 1969 – 1705; 1997.
- Baron, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain – a clinical perspective. *Nature Clin Prac Neur, New York.* V. 2; 95-106; 2006.
- Bouquet W. I., Ceelen W., Fritzinger B., Pattyn P., Peeters M., Remon J. P., Vervaet C. Paclitaxel/ $\beta$ -cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion – Formulation and stability. *Eur J Pharm Biopharm.* 66; 391–397; 2007.
- Belmonte C., Cervero F. *Neurobiology of nociceptors.* Oxford University Press, 1996.
- Banerjee, R.; Chakraborty, H.; Sarkar, M. Host-guest complexation of Oxicam NSAIDs with  $\beta$ -Cyclodextrin. *Biopolymers.* V. 75; 355-365; 2004
- Bear M. F., Connors B. W., Paradiso M. A. *Neuroscience: exploring the brain.* Willians & Wilkins Publishers. NY. 340-345; 1996
- Benesi H. A., Hildebrand J. H. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* 71; 2703–2707; 1949.
- Bernacchio R. M. G., Contin I., Mori M. Fatores modificadores da percepção da dor. *Rev. Dor.* V. 6; 621-633; 2005.

- Braga A. F. A., Frias J. A. F., Braga F. S. S., Pereira R. I. C., Titotto S. M. M. C. Spinal anesthesia for elective cesarean section. Use of different doses of hyperbaric bupivacaine associated with morphine and clonidine. *A. Cir. Bras.* V. 28; 26 – 32; 2013.
- Braga A. F. A., Frias J. A. F., Braga F. S. S., Potério G. B., Hirata E. S., Torres N. A. Raquianestesia em Operação Cesariana. Emprego da Associação de Bupivacaína Hiperbárica (10mg) a Diferentes Adjuvantes. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 62; 775-787; 2012.
- Brasil. Farmacopeia Brasileira, volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010
- Braz J. R. C., Koguti E. S., Braz L.G., Croitor L. B. J., Navarro L. H. C. Efeito da clonidina associada à bupivacaína hiperbárica na anestesia subaracnóidea alta. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 53; 561 – 572; 2003.
- Brewster M. E., Loftsson T. Cyclodextrin as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59; 645–666; 2007.
- British Pharmacopoeia. British Pharmacopoeia Commission, 2012.
- Büttner B, Ott B, Klose R - Effects of clonidine added to mepivacaine for brachial plexus blockade. *Reg Anesth.* 17; 45; 1992.
- Carvalho F. G. F. Avaliação biológica de uma pré-formulação de ropivacaína em hidroxipropil-beta-ciclodextrina produzida em processo escalonável. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, 2007.
- Carvalho W. A., Lemonica L. Mecanismos Centrais de Transmissão e de Modulação da Dor. Atualização Terapêutica. *Rev Bras Anesthesiol.* 48; 221 – 241; 1998.
- Carvalho M. M. J. Dor: um estudo multidisciplinar. Ed. Summus, 1999.
- Castelli V. V. A., Trivieri G., Zucchelli I., Brambilla L., Barbuzzi T., Castiglioni C., Paci M., Zerbi G., Zanol M. Characterization of an Inclusion Complex between Cladribine and 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.* V. 97; 3897 – 3906; 2008.
- Chadha R., Kashid N., Saini A. Account of analytical techniques employed for the determination of thermodynamics of inclusion complexation of drugs with cyclodextrins. *J. Sci. Ind. Res.* 63; 211-229; 2004.
- Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R. K. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. *AAPS PharmSciTech.* 43; 329 – 357; 2005.
- Connors, K.A. Binding constants, the measurements of molecular complex stability. Wiley. 1987
- Columb, M.O. Ramsaran, R. Local anaesthetic agents. *Anaesth. & Int. Care Med.* V. 11; 113-117; 2010.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth, H.R. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford University Press, Oxford. 2003.
- Crews J. C. New developments in epidural anesthesia and analgesia. *Anesthesiol. Clin. North America.* V. 18; 251 – 266; 2000.
- Crupi V., Ficarra R., Guardo M., Majolino D., Stancanelli R., Venutti V. UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with  $\beta$ -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44; 110–117; 2007.

- Cunha-Filho M. S. S., Sá-Barreto S. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Rev. Cien. Farm. Bas. Apl.* V. 28; 1 – 9; 2007.
- D'amour F. E., Smith D. L. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72; 74–79; 1941.
- Dahmani S., Brasher C., Stany I., Golmard J., Skhiri A., Bruneau B., Nivoche Y., Constant I., Murat I. Premedication with clonidine is superior to benzodiazepines. A meta-analysis of published studies. *Acta Anaesthesiol Scand.* 54; 397–402; 2010.
- Davidson E.M., Coggeshall R.E. e Carlton S.M. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport.* V. 8; 941-946; 1997.
- Davis, M. E., Brewster, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev.* 3; 1023-1035; 2004.
- Del Valle E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *P. Biochem.* V. 39; 1033-1046; 2003
- Denizot F., Lang R. 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; 1986.
- de Araújo D. R. Formulações de liberação controlada com anestésicos locais – bupivacaína e mepivacaína: preparação, caracterização e ensaios farmacológicos. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, 2002.
- de Araújo D. R., Pinto L. M. A., Braga A. F. A., de Paula E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 53; 663 – 671; 2003.
- de Araújo D. R. Desenvolvimento e avaliação farmacológica de formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-amida cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, 2005.
- de Araújo D. R., Braga A. F. A., Moraes C. M., Fraceto L. F., de Paula E. Mistura com Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) de Bupivacaína Complexada com Ciclodextrinas e Anestesia por Via Subaracnóidea em Ratos. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 56; 495-506; 2006.
- de Araújo D. R., Tsuneda S. S., Cereda C. M. S., Carvalho F. D. G. F., Preté P. S. C., Fernandes S. A., Yoikaichiya F., Franco M. K. K. D., Mazzaro I., Fraceto L. F., Braga A. F. A., de Paula E. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *Eur. J. Pharm. Sci.* 33; 60–71; 2008.
- de Jesus, M. B. Preparação, caracterização e avaliação da formulação anti-helmíntica de praziquantel em beta-ciclodextrina. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp. 2006.
- de Jesus, M. B., Fraceto L. F., Martini M. F., Pickholz M., Ferreira C. V., de Paula E. Non-inclusion complexes between riboflavina and cyclodextrin. *J. Pharm. Pharmacol.* 64; 832–842; 2012.
- de Paula E., Cereda C. M. S., Fraceto L. F., de Araújo D. R., Franz-Montan M., Tofoli G. R., Ranali J., Volpato M. C., Groppo F. C. Micro and nanosystems for delivering local anesthetics. *Expert Opin. Drug Deliv.* V. 9; 1505-1524; 2012.

- de Paula E., de Araújo D. R., Fraceto L. F. (a). Nuclear magnetic resonance spectroscopy tools for physicochemical characterization of cyclodextrin inclusion. In: Jie Hu. (Org.). Cyclodextrins: Chemistry and Physics. : Research Signpost / Transworld Research Network, 2010.
- de Paula E., Cereda C. M. S., Tofoli G. R., Franz-Montan M., Fraceto L. F., de Araújo D. R. (b). Drug delivery systems for local anesthetics. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* V. 4; 23-34; 2010.
- de Paula, E., Schreier, S. Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. *Bioch. Biophys. Acta* V. 1240; 25-33; 1995.
- de Paula, E., Schreier, S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic membrane interaction. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29; 877-894; 1996.
- Deyhimi, F., Ghalami-Choobar, B., Salamat-Ahangari, R. Activity coefficients for NH<sub>4</sub>Cl in ethanol–water mixed solvents by electromotive force measurements. *J. Mol. Liq.* 116; 93-97; 2004.
- Dewey W. L., Harris L. S., Howes J. S., Nuite J. A. The effect of various neurohumoral modulator on the activity of morphine and the narcotic antagonists in the tail-flick and phenylquinone tests. *J. Pharm. Exp. Therap.* V. 175; 435 – 442; 1970.
- Diniz A. Avaliação do perfil de absorção da vicentina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com máxima extração deste flavonóide. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, 2007.
- Dodziuk H. Cyclodextrins and Their Complexes. WILEY-VCH, 2006.
- Dollo G., Le Corre P., Chevanne F., Le Verge R. Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with  $\beta$ -ciclodextrin and its derivatives. I. Physicochemical characterization. *Int. J. Pharm.* V. 131; 219-228; 1996.
- Duan M. S., Zhao N., Össurardóttir I. B., Thorsteinsson T., Loftsson T. Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: Formation of aggregates and higher-order complexes. *I. J. Pharm.* 297; 213–222; 2005.
- Duchene D., Wouessidjewe D. (a) Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivatives, part I. *Pharm. Tech.*, Jun, 1990.
- Duchene D., Wouessidjewe D. (b) Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivatives, part II. *Pharma. Tech.*, Aug, 1990.
- Elia, N., Culebras, X., Mazza, C., Schiffer, E., Tramèr, M.R., Phil, D. Clonidine as an Adjuvant to Intrathecal Local Anesthetics for Surgery: Systematic Review of Randomized Trials *Reg. Anesth. Pain Med.* 33; 159–167; 2008.
- El-Kemary, M.A.; El-Gerawy, H.S.; El-Baradie, H.Y.; Issa, R.M. Spectral and photophysical studies of inclusion complexes of 2-amino-4,6-dimethyl pyrimidine with  $\beta$ -cyclodextrin. *Spectrochim. Mol. Biomol. Spectr.* 58; 493-500; 2002.
- Ernst, R.R.; Bodenhausen, G.; Wokaum, A. Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions. Clarendon Press. Oxford. 1986.
- Farmacopéia Japonesa (JP) 2011. Edição eletrônica.

- Feng X., Zhang F., Dong. R., Li W., Liu J., Zhao X., Xue K., Yu B., Xu J. Intrathecal administration of clonidine attenuates spinal neuroimmune activation in a rat model of neuropathic pain with existing hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 614; 38 – 43; 2009.
- Fernandes C. M., Veiga F. J. B (a). As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica: produção, estrutura e propriedades. *Rev. Cien. Farm.* 20; 335 – 351; 1999.
- Fernandes C. M., Veiga F. J. B (b). As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica: preparação e caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido. *Rev. Cien. Farm.* 20; 375 – 387; 1999.
- Fernandes B. H. P., Gomes C. R. G. Mecanismos e aspectos anatômicos da dor. *Rev. Saúde & Pesq.* V. 4; 237-246; 2011
- Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nature Rev.* Vol. 5; 565 – 575; 2004.
- Figueiras A., Sarraguça J. M. G., Carvalho R. A., Pais A. A. C. C., Veiga F. J. B. Interaction of omeprazole with a methylated derivative of  $\beta$ -cyclodextrin: phase solubility, NMR spectroscopy and molecular simulation. *Pharm Res.* V. 24; 377-389; 2007 (a).
- Figueiras A., Carvalho R. A., Ribeiro L., Torres-Labandeira J. J., Veiga F. J. B. Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified  $\beta$ -cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm.* 67; 531–539; 2007 (b).
- Fonseca N. M., Oliveira C. A. Efeito da Clonidina Associada à Bupivacaína a 0,5% Hiperbárica na Anestesia Subaracnóidea. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 51; 483 – 492; 2001.
- Fraceto L. F., Gonçalves M. M., Moraes C. M., de Araujo D. R., Zanella L., de Paula E., Pertinhez T. A. (a) Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: $\beta$ -ciclodextrina. *Química Nova.* Volume 30; 1203 – 1207; 2007.
- Fraceto L. F., Moraes C. M., Abrami P. Gonçalves M. M., Filho N. A., Fernandes S. A., de Paula E. (b) Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. *Química Nova.* Volume 30; 777–784; 2007.
- Gaignaux A., Réef J., Siepman F., Siepman J., Vriese C., Goole J., Amighi K. Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* 437; 20– 28; 2012.
- Giordano F., Novak, C., Moyano, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochim. Acta.* 380; 123-151; 2001.
- Goodman, L.S.; Gilman, A.G. *The Pharmacological Basis Of Therapeutics.* 11<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill Interamericana, 2007.
- Grillo R., Melo N. F. S., Fraceto L. F., Brito C. L., Trossini G. H. G., Menezes C. M. S., Ferreira E. I., Moraes C. M. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil-  $\beta$ - ciclodextrina. *Quim. Nova.* Vol. 31; 290-295; 2008.
- Grumetto L., Carpentiero C., Barbato F. Lipophilic and electrostatic forces encoded in IAM-HPLC indexes of basic drugs: Their role in membrane partition and their relationships with BBB passage data. *E. J. Pharm. Sci.* 45; 685–692; 2012.
- Guyton A. C., Hall J. E. *Textbook of Medical Physiology.* 11<sup>th</sup> Edition. Elsevier Inc. Philadelphia, 2011.

- Gunther H. NMR Spectroscopy basic principles, concepts and applications in chemistry. Willey, NY. 1994.
- Harris R. J. D., Benveniste G. Recurrent laryngeal nerve blockade in patients undergoing carotid endarterectomy under cervical plexus block. *Anaesth Int. Care.* 28; 431-433; 2000.
- Hazecamp A., Verpoort R. Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29; 340-347; 2006.
- Hedges A. R. Industrial applications of cyclodextrin. *Chem. Rev.* 98, (5), 1998.
- Higuchi, T, Connors, K.A. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.* 4; 117-212; 1965.
- Horvath G., Benedek G., Szikszay M. Enhancement of Fentanyl Analgesia by Clonidine Plus Verapamil in Rats. *Anesth Analg.* 70; 284-288; 1990.
- Jackman, L.M., Jen, R.,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Tautomerism, Geometrical Isomerism, and Conformation of Some Cyclic Amidines, Guanidines, and Related Systems. *J. Am. Chem. Soc.* 97; 2811-2818; 1975.
- Jang J., Yaksh T. L., Hill H. F. Use of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as an intrathecal drug vehicle with opioids. *Pharmacol Exp Ther.* 261; 592 – 600; 1992.
- Klimscha W., Chiari A., Krafft P., Plattner O., Taslimi R., Mayer N., Weinstabl C., Schneider B., Zimpfer M. Hemodynamic and Analgesic Effects of Clonidine Added Repetitively to Continuous Epidural and Spinal Blocks. *Anesth Analg.* 80; 322-327; 1995.
- Korolkovas A. Ciclodextrinas: obtenção, propriedades e aplicações. *Rev. Bras. Med.* 49 (8), 1992.
- Kraycheti D. C., Gozzani J. L., Kraycheti A. C. Dor neuropática: aspectos neuroquímicos. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 58; 492 – 505; 2008.
- Lampl Y. Pain. Tel Aviv University, Israel, Elsevier, 2012.
- Lauretti G. R., Rodrigues A. M., Gomes J. M. A., Reis M. P. Avaliação clínica comparativa entre cetamina e clonidina por via peridural no tratamento da dor crônica neuropática. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 52; 34 – 40; 2002.
- Leal A. A. X. , Henriques C. A. , Luna A. S. Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por Espectrofotometria Uv-Vis. *Rev. Anal.* 32; 28-34; 2008.
- Lee J. K., Chung K. H. Lee J. Y., Chun D. H. Yang H. J. Ko T. K. Yun W. S. Comparison of fentanyl and sufentanil added to 0,5% hyperbaric bupivacaine for spinal anesthesia in patients undergoing cesarean section. *Kor. J. Anesth.* 60; 103-108; 2011.
- Lepont C., Poole, C. F. Retention characteristics of an immobilized artificial membrane column in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromat.* 946; 107-124; 2002.
- Lima R. A. F. Avaliação de formulações anestésicas de tetracaína em beta-ciclodextrina e hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP, 2010.
- Lima R. A. F., de Jesus, M. B., Cereda C. M. S., Tofoli G. R., Cabeça L. F., Mazzaro I., Fraceto L. F., de Paula E. Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrins. *Journal of Drug Targeting.* V. 20; 85-96; 2012.

- Loftsson T., Brewster M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85; 1017 – 1025; 1996.
- Loftsson T., Brewster M. E. Cyclodextrins as pharmaceutical excipients. *Pharm. Tech. Eur.* May; 26-34; 1997.
- Loftsson T., Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 329; 1–11; 2007.
- Loftsson T., Jarho P., Másson M., Jarvinen T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 335 – 351; 2005.
- Loftsson T., Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and Practice. *Int. J. Pharm.* 225; 15–30; 2001.
- Loukas Y. L., Vraka V., Gregoriadis G. Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. *Int. J. Pharm.* 162; 137–142; 1998.
- Lyra M.A.M., Alves L.D.S., Fontes D. A. F., Soares-Sobrinho J. L., Rolim-Neto P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. *J. Bas. Ap. Pharm. Sci.* V. 31; 117-124; 2010.
- Maccartney C. J. L., Duggan E., Apatu E. Should we add clonidine to local anesthetic for peripheral nerve blockade? A qualitative systematic review of the literature. *Reg. Anest. Pain Med.* 32; 330 – 338; 2007.
- McLure H. A., Rubin A. P. Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol.* V. 71; 59-74; 2005.
- Macpherson R. D. The pharmacological basis of contemporary pain. *Pharmacol. Therap.* 88; 163 – 185; 2000.
- Malamed S. F. Manual de anestesia local. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2001.
- Marchand S. The Physiology of Pain Mechanisms: From the Periphery to the Brain. *Rheum Dis Clin N Am.* 34; 285–309; 2008.
- Martindale W. Martindale: the complete drug reference. The Pharmaceutical Press. London, 2011.
- Martins P. S., Ribeiro R. R., Bahia A. P. C., Neto R. L. M., Frezard F., Pimenta A. M. C., Melo A. L., Moyec L., Demichely C. Physicochemical Characterization of Orally-Active Meglumine Antimoniate/Beta-Cyclodextrin Nanoassemblies: Non-Inclusion Interactions and Sustained Drug Release Properties. *Br. J. Ph.* vol. 39; 1A; 2009.
- Merck Index. 13 ed. Whitehouse Station, Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., 2001
- Mestre C., Pélissier T., Fialip J., Wilcox G., Eschalié A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharm. Toxic. Meth.* 32; 197-200; 1994.
- Merivirta R., Kuusniemi K., Jaakkola P., Pihlajama K., Pitka M. Unilateral spinal anaesthesia for outpatient surgery: a comparison between hyperbaric bupivacaine and bupivacaine–clonidine combination. *Acta Anaesthesiol Scand.* 53; 788–793; 2009.
- Misiuk W., Zalewska M. Spectroscopic investigations on the inclusion interaction between hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and bupropion. *J. Mol. Liq.* 159; 220–225; 2011.
- Millan M. J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* 66; 355–474; 2002.

- Monnaert V., Tilloy S., Bricout H., Fenart L., Cechelli L., Monflier E. Behavior of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Cyclodextrins and Their Derivatives on an in Vitro Model of Blood-Brain Barrier. *J. Pharm. Exp. Ther.* V. 310; 2004.
- Moraes C. M., Abrami P., de Araújo D. R., Braga A. F. A., Issa M. G., Ferraz H. G., de Paula E., Fraceto L. F. Characterization of lidocaine:hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *J. Incl. Phenom.* 57; 313 – 316; 2007 (a)
- Moraes. C. M.,Abrami P., de Paula E., Braga A. F. A., Fraceto L. F. Study of the interaction between *S*(-)-bupivacaine and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 331; 99–106; 2007 (b)
- Moraes C. M., Abrami P., Gonçalves M. M., Filho N. A., Fernandes S. A., de Paula E., Fraceto L. F. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. *Quim. Nova.* Vol. 30; 777-784; 2007 (c)
- Nam T. S., Yeon D. S., Leem J. W., Paik K. S. Adrenergic sensitivity of uninjured C-fiber nociceptors in neuropathic rats. *Yonsei Med. J.* v 41; 2000.
- Neto W. P., Issy A. M., Sakata R. K. Estudo Comparativo entre Clonidina Associada à Bupivacaína e Bupivacaína Isolada em Bloqueio de Plexo Cervical para Endarterectomia de Carótida. *Rev. Bras. Anesthesiol.* V. 59; 387-395; 2009.
- Neves J. F. N. P., Monteiro G. A., Almeida J. R., Sant'Anna R. S., Saldanha R. M., Nogueira E. S., Coutinho F. L., Neves M. M. P., Araújo F. P., Nobrega P. B. Analgesia pós-operatória para cesariana. A adição de clonidina à morfina subaracnóidea melhora a qualidade da anestesia? *Rev. Bras. Anesthesiol.* V. 56; 370 – 376; 2006.
- Nunes R. S., Azevedo J. R., Pereira N. L. Caracterização de formulação lipossomal contendo clonidina. *Scientia Plena* V. 1; 176 – 181; 2005.
- Ong S., Liu H., Pidgeon C. Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *J. Chromat.* 728; 113-128; 1996.
- Ossipov M. H., Dussor G. O., Porreca F. Central modulation of pain. *J. Clin. Invest.*, 120; 3779 – 3887; 2010.
- Ossipov M. H., Suarez L. J., Spauldin T. C. A Comparison of the Antinociceptive and Behavioral Effects of Intrathecally Administered Opiates,  $\alpha$ -2-Adrenergic Agonists, and Local Anesthetics in Mice and Rats. *Anesth Analg.* 67; 616-624; 1988.
- Ossipov M. H., Lopez Y., Bian D., Nichols M. L., Porreca F. Sinergistic antinociceptivo interactions of morphine and clonidine in rats with nerve-ligation injury. *Anesth.* 86; 196-204; 1997.
- Ottiger C., Wunderli-Allenspach H. Immobilized Artificial Membrane (IAM) HPLC for partition studies of neutral and ionized acids and basis in comparison with the liposomal partition system. *Pharm. Res.* V. 16; 1999.
- Paavola, A., Yliruusi, J., Kajimoto, Y., Kalso, E., Wahlström, T., Rosenberg, P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. *Pharm. Res.* 12; 1997 – 2002; 1995

- Pedersen L. H., Scheel-Kruger J., Blackburn-Munro G. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. *Pain* 127; 17-26; 2006.
- Patel N. B. Phosysiology of Pain. In: Kopf, A.; Patel, N. B. Guide to pain management in low-resource settings. Amsterdam: Internacional Association for the Study of Pain, 2010.
- Perl E. R. Pain mechanisms: A commentary on concepts and issues. *Prog. Neurobiol.* 94; 20–38; 2011
- Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog. Neurobiol.* 80; 53–83; 2006.
- PI3039846. Compostos de inclusão entre  $\beta$ -ciclodextrinas e anestésicos locais para formulações anestésicas de longa duração. Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI), nº 4.927, 2003.
- Pinto, L. M. A. Desenvolvimento de formulações anestésicas locais de longa duração. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp. 2002.
- Pinto, L. M. A., Fraceto, L. F., Santana, M. H. A., Pertinhez, T.A., Oyama Junior, S., de Paula E. Physico-chemical characterization of benzocaine- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39; 956; 2005.
- Pidgeon C., Ong S., Liu H., Oiu X., Pidgeon M., Dantzig A. H., Munroe J., Homback W. J, Kasher J. S., Glunz L., Szczerba T. IAM Chromatography: An *in Vitro* Screen for Predicting Drug Membrane Permeability. *J. Med. Chem.* 38; 590-594; 1995
- Post C., Gordh T., Minor B. G., Archer T., Freedman J. Antinociceptive Effects and Spinal Cord Tissue Concentrations after Intrathecal Injection of Guanfacine or Clonidine into Rats. *Anesth Analg.* 66; 317-324; 1987.
- Previdello B. A. F., Carvalho F. R., Tessaro A. R., Souza V. R., Hioka N. O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. *Quim. Nova*, V. 29; 600-606; 2006.
- Price T. J., Geranton S. M. Translating nociceptor sensitivity: the role of axonal protein synthesis in nociceptor physiology. *Eur. J. Neurosci*, 29; 2253 – 2263; 2009.
- Purves, D., Augustine, G.J.; Fitzpatrick, D.; Katz, L. C.; Lamantia, A. S.; Mcnamara, J. O.; Williams, S. M. Dor. In: *Neurociência*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed. 209-221; 2005.
- Pubchem em [www.ncbi.nlm.nih.gov.br](http://www.ncbi.nlm.nih.gov.br). Consultado em 14/01/2013
- Queiroz V. A. Avaliação das atividades citotóxica e anestésica e da farmacocinética da bupivacaína complexada com hidroxipropil-beta-ciclodextrina, em associação com sufentanil. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp. 2012.
- Rajewski, R.A., Stella, V.J.. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 85; 1142–1168; 1996.
- Rama A. C. R., Veiga F., Figueiredo I. V., Sousa A., Caramona M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. *Rev Bras Cienc Farm.* V. 42; 59-68; 2006.
- Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M. *Farmacologia*. Quarta Edição. Editora Guanabara Koogan, 7ª. Edição. 2012.

- Regis Technologies. IAM Chromatography. Chromatography Catalog. Copyright Regis Technologies, Jul, 2000.
- Resende M. A. C., Nascimento O. J. M., Rios A. A. S., Quintanilha G., Ceballos L. E. S., Araújo F. P. Perfil da Dor Neuropática: a Propósito do Exame Neurológico Mínimo de 33 Pacientes. *Rev Bras Anesthesiol.* V. 60; 144-153; 2010.
- Reichardt, C. Solvents and solvent effects in organic chemistry. VCH. Weinheim. 2003.
- Remko M., Walsh O. A., Richards W. G. Molecular structure and gas-phase reactivity of clonidine and rilmenidine: two layered ONIOM calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3; 901 – 907; 2001.
- Remko M., Swart M., Bickelhaup F. M. Theoretical study of structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some centrally acting antihypertensives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14; 1715–1728; 2006
- Ren K., Dubner R. Descending Control Mechanisms. In: Basbaum AI, Kaneko A, Shepherd GM, Westheimer G, editors, *The Senses: A Comprehensive Reference, Volume 5: Pain*, Eds. Bushnell MC, Basbaum AI, Academic Press, San Diego, 2008
- Rhee K., Kang K., Kim J., Jeon Y. Intravenous clonidine prolongs bupivacaine spinal Anesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 47; 1001—1005; 2003.
- Ribeiro L., Loftsson T., Ferreira D., Veiga F. Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyl ether  $\beta$  - cyclodextrin binary and ternary complexes. *Chem Pharm Bull.* 51; 914-922; 2003.
- Roberts T. G. Opioids. In. Churchill Livingstone. Textbook of pain. London. 1187-1214; 1999.
- Rocha A. P. C., Kraychete D. C., Lemonica L., Carvalho L. R., Barros G. A. M., Garcia J. B. S., Sakata R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. *Rev Bras Anesthesiol.* V. 57; 94-105; 2007.
- Rocha F. R. P., Teixeira L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Quím. Nova.* V. 27; 807-812; 2004.
- Rochette A., Raux O. Troncin R., Dadure C., Verdier R., Capdevila X. Clonidine Prolongs Spinal Anesthesia in Newborns: A Prospective Dose-Ranging Study. *Anesth Analg.* 98; 56–59; 2004.
- Roh D. H., Kim H. W., Yoon S. Y., Seo H. S., Kwon Y. B., Han H. J., Beitz A. J., Lee J. H. Intrathecal Clonidine Suppresses Phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor NR1 Subunit in Spinal Dorsal Horn Neurons of Rats with Neuropathic Pain. *Anesth Analg.* V. 107; 693 – 700; 2008.
- Rojas H., Ritter C., Dal Pizzol F. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. *Rev Bras Ter Intensiva.* V. 23; 222-227; 2011.
- Rowe R. C., Sheskey P. J., Owen S. C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5<sup>th</sup> Ed. Pharmaceutical Press. 2000.
- Saltão R., Veiga F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Rer. Bras. Cienc. Farmac.* V. 37; 1 – 17; 2001.

- Schaible, H. G.; Richter, F. Pathophysiology of pain. *Langenbeck`s Archive Surgery*. V. 389; 237-243; 2004.
- Schestatsky P. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. *Rev HCPA*. V. 28; 177-187; 2008.
- Schestatsky P., Nascimento O. J. M. What do general neurologists need to know about neuropathic pain? *Arq. Neurop.* V. 67; 741 – 749; 2009.
- Spamer E., Muller D. G., Wessels P. L., Venter J. P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- $\beta$ -cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm.* 16; 247–253; 2002
- Serpell M. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. In *Anesthesia and Intensive care Medicine*. The Medicine Publishing Company, 2005
- Shafi A. A.A. , Shihry S. S. Fluorescence enhancement of 1-naphthol-5-sulfonate by forming inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution. *Spectrochim Acta.* 72; 533–537; 2009
- Shulman J. M., Strichartz G. R. Farmacologia dos anestésicos locais. In: *Princípios de Farmacologia – a base fisiopatológica da Farmacoterapia*. 2ª. Edição, 2009
- Simonetti M. P. B., Valinetti E. A., Ferreira F. M. C. Clonidina: de descongestionante nasal a analgésico potente. Considerações históricas e farmacológicas. *Rev. Bras. Anesthesiol.* V. 47; 37 – 47; 1997.
- Singelyn FJ, Dangoisse M, Bartholomé S. Adding clonidine to mepivacaine prolongs the duration of anesthesia and analgesia after axillary brachial plexus block. *Reg Anesth.* 17; 148-150; 1992.
- Singh R., Kumar N., Singh P. Randomized controlled trial comparing morphine or clonidine with bupivacaine for caudal analgesia in children undergoing upper abdominal surgery. *Br J. Anaest.* V.106, N. 1, 96–100, 2011.
- Sinha V. R., Amita, Chadha R., Goel H. Enhancing the dissolution of hydrophobic guests using solid state inclusion complexation: characterization and in vitro evaluation. *J. Incl. Phenom*, 66; 381 – 392; 2010.
- Sites B. D., Beach M., Biggs R., Rohan C., Wiley C., Rassias A., Gregory J., Franciullo G. Intrathecal clonidine added to bupivacaine-morphine spinal anesthetic improves postoperative analgesia for total knee arthroplasty. *Anesth. Analg.* 96; 1083 – 1088; 2003.
- Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 98; 1743-1753; 1998
- Soares L. A., Leal A. F. V. B., Fraceto L. F., Maia E. R., Resck I. S., Kato M. J., Gil E. S., Sousa A. R., Cunha L. C., Rezende K. R. Host–guest system of 4-nerolidylcatechol in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: preparation, characterization and molecular modeling. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 64; 23–35; 2009.
- Solomons, T. W. G., Fryhle C. B. *Química Orgânica*; 7ª. edição LTC. 2009
- Sosnowska N. S. Fluorometric Determination of Association Constants of Three Estrogens with Cyclodextrins. *J. Fluores.* Vol 7; 1997.
- Souza A. A., Laverde A. Aplicação de espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. *Quim. Nova.* V. 25; 1022-1026; 2002.

- Spricigo R., Botelho K. C. A., Consiglieri V. O., Serra C. H. R. Obtenção e Avaliação de Complexos de Inclusão de Furosemida com  $\beta$ -ciclodextrina e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina: Efeitos sobre as Propriedades de Dissolução do Fármaco. *Lat Am J Pharm.* V. 27; 645-653; 2008.
- Stacey BR, Watkins WD - Mechanisms and modulators of opioid analgesia. *Curr Opin Anaesthesiol*, V. 4; 343-346; 1994.
- Steeds C. E. The anatomy and physiology of pain. In *Basic Science. Surgery*. Elsevier Ltd; 2009
- Stevens C. W. Alternatives to the use of mammals for pain research. *Life Sci.* 50; 901-912; 1992.
- Strichartz, G.R.; Covino, B.G. Local anesthetics. In: Miller, R.D. *Anesthesia*. 3<sup>o</sup> edição. New York: Churchill Livingstone, 1990.
- Svensden F., Tjølsen A. e Hole K. LTP of spinal A $\beta$  and C-fiber evoked responses after electrical sciatic nerve stimulation. *Neuroreport*. V. 8; 3427-3430; 1997.
- Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 98; 5; 1998.
- Tablet C., Matei. Matei I., Hillebrand M. The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods: Possibilities and Limitations. In: *Stoichiometry and Research - The Importance of Quantity in Biomedicine*, Alessio Innocenti (Ed.), 2012
- Taillardat-Bertschinger A., Galland A., Carrupt P. A., Testa B. Immobilized artificial membrane liquid chromatography: proposed guidelines for technical optimization of retention measurements. *J Chromat.* 953; 39–53; 2002.
- Taillardat-Bertschinger A., Carrupt P. A., Barbato F., Testa B. Immobilized Artificial Membrane HPLC in Drug Research. *J. Med. Chem.* V. 46; 5; 2003.
- Tavares A., Plavinik F. L. Inibidores do sistema simpático. *HiperAtivo*, V. 5; 1998.
- Tavares L. C. Qsar: a abordagem de Hansch. *Quim. Nova*, V. 27; 631-639; 2004
- Tejwani G. A., Rattan A. K. Antagonism of Antinociception Produced by Intrathecal Clonidine by Ketorolac in the Rat: The Role of the Opioid System. *Anesth Analg.* 90; 1152–1156; 2000.
- Tsao J. Y., Wu C. P., Tsai H. H., Peng K. C., Lin P. Y., Su S. Y., Chen L. D., Tsai F. J. Tsai Y. Effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complexation on the aqueous solubility, structure, thermal stability, antioxidant activity, and tyrosinase inhibition of paeonol. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 72; 405–411; 2012.
- Tuijl I. Klei W. A., Werff D. B. M., Kalkman C. J. The effect of addition of intrathecal clonidine to hyperbaric bupivacaine on postoperative pain and morphine requirements after caesarian section: a randomized controlled trial. *Brit. J. Anesth.* V. 97; 365 – 370; 2006.
- USP 35 (The United States Pharmacopeia) – Edição electrónica.
- Vadivelu N., Whitney C. J., Sinatra R. S. Pain Pathways and Acute Pain Processing, in *Acute Pain Management*. Cambridge University Press. 2009.
- Veiga F.J. B., Pecorelli C. C. M. F., Ribeiro S. S. L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Coimbra: Editora Minerva. Coimbra; 2006.
- Venturine C. G., Nicoline J., Machado C., Machado V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim Nova*. V. 31; 360-368; 2008.

- Volobuef C., Moraes C. M., Nunes L. A. S., Cereda C. M. S., Yokaichiya F., Franco M. K. K. D., Braga A. F. A., de Paula E., Tofoli G. R., Fraceto L. F., de Araújo D. Sufentanil- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complex for Pain Treatment: Physicochemical, Cytotoxicity, and Pharmacological Evaluation. *J. Pharm. Sci.* V. 101; 3698 – 3707; 2012.
- Warren, R.C. *Physics and architecture of cell membranes*, cap. 1 e 2, Adam-Hilger, Bristol and Philadelphia. 1987.
- Wang X. M., Chen H. Y. Investigation of the  $\beta$ -cyclodextrin-quinine inclusion complex in aqueous solution by spectroscopic study. *Spect. Acta*, V. 51A; 333-339; 1995.
- Weder A. A. A primary culture system of adult rat heart cells for the evaluation of cocaine toxicity. *Toxicol.* 72; 175-187; 1992.
- Woolf C. J. Recent advances in the pathophysiology of acute pain. *Br J Anaesth.* 63; 139-146; 1989.
- Wood J.N., Docherty R. J. Chemical activators of sensory neurons. *An. Rev. Physiol.* 59; 457-482; 1997.
- Yang C. Y., Cai S. J., Liu H., Pidgeon C. Immobilized Artificial Membranes - screens for drug membrane interactions. *Adv. D Deliv. Rev.* 23; 229-256; 1996.
- Yildiz T. S., Korkmaz F., Solak M., Toker K. Clonidine addition prolongs the duration of caudal analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 50; 501—504; 2006.
- Yoshimura M., Furue H. Mechanisms for the Anti-nociceptive Actions of the Descending Noradrenergic and Serotonergic Systems in the Spinal Cord. *Pharmacol Sci* 101; 107 – 117; 2006
- [http://www.chemicalbook.com/SpectrumEN\\_4205-91-8\\_1HNMR.htm](http://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_4205-91-8_1HNMR.htm), consultado em 14/01/2013

## 7. ANEXOS



CEUA/Unicamp

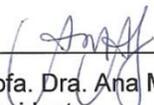
### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

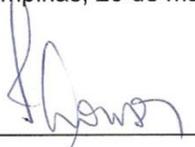
#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Preparo, caracterização e avaliação farmacológica de complexos de inclusão clonidina-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina" (protocolo nº 2708-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eneida de Paula / Mário Antônio Braga, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 29 de maio de 2012.

Campinas, 29 de maio de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva