



LUCIANA DE MATOS ALVES PINTO

“INTERAÇÃO DOS ANESTÉSICOS LOCAIS BENZOCAÍNA, LIDOCAÍNA E TETRACAÍNA COM MEMBRANAS MODELO”

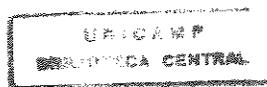
Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

Campinas, 1998

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Luciana de Matos Alves Pinto e aprovada pela Comissão Julgadora. 30/06/98 [Assinatura]

3818447



UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	P658i		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	35002		
PROJ.	395/98		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	11/09/98		
N.º CPD			

CM-00115899-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

P658i

Pinto, Luciana de Matos Alves

Interação dos anestésicos locais benzocaína, lidocaína e tetracaína com membranas modelo / Luciana de Matos Alves Pinto. — Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador: Eneida de Paula.

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

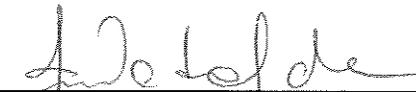
1. Anestesia local. 2. Ressonância paramagnética eletrônica. 3. Ressonância magnética nuclear. I. Paula, Eneida de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 30 de junho de 1998

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

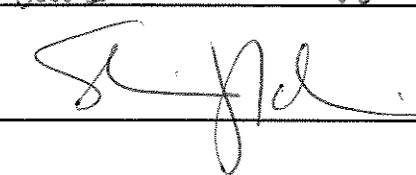
Profa. Dra. Eneida de Paula



Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Neto



Profa. Dra. Shirley Schreier



SUPLENTE:

Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva

Agradecimentos



- ✓ À CAPES e FAPESP pela concessão das bolsas e ajuda financeira para o andamento da tese;
- ✓ A todos do departamento de bioquímica, que me ajudaram;
- ✓ A todos da USP (laboratório da Dra. Shirley Schreier) que me ajudaram, em especial à Thelma, Lua, Fábio e Goretti;
- ✓ A minha orientadora Eneida, pela sua seriedade no trabalho e sobretudo pelo lado humano;
- ✓ Aos meus pais Lauro, Nina e Cláudia (*in memoriam*) e meus irmãos Bia e Igor, pelo apoio, incentivo e educação que me deram e por serem meus maiores fãs;
- ✓ Aos meus amigos do Rio, quanta saudade... Elaine, Kate, Marcela, Patrick, Andréa;
- ✓ Aos Parckzamparc (Pô, Ju, Ed, Stela, Lee, Caê, Nê e Dolly) pela acolhida num lar-doce-lar;
- ✓ Aos novos amigos que fiz aqui em Campinas, em especial ao povo do laboratório: Mariza, Dani, Pô, Sô, Nilce, Leo, Vanessa, Nonô, Rafa, Jack, Armindo, Edu, Dízima. Pelas pizzadas, churrascadas, peixadas, Caxambus, papos até a madrugada, viagens, luares no telhado, origamis, e-mails, poesias, filmes e discussões de filmes, garrafas de vinho, passeios no Lago, pelas dicas no laboratório, ajudas cibernéticas. E pelas viagens também! Enfim, pelos momentos ruins e principalmente pelos bons. Valeu!

☞* Ao Mac, pois afinal, se não fosse por ele eu não estaria aqui!

As pedras falam, eu estou calado...
Quando percebermos que nós e o planeta somos na verdade um só, uma realidade,
uma só consciência, teremos chegado ao ponto de descobrir que a nossa
transformação não foi apenas uma atitude, mas uma mutação.

Dedico esta tese aos meus amigos MAC E MARIZA.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1) INTRODUÇÃO	1
1.1) Breve histórico da anestesia	1
1.2) Tipos de anestésicos	2
1.3) Química e relação estrutura-atividade dos anestésicos locais	2
1.4) Mecanismo de ação	3
1.4.1) Interação dos anestésicos locais com a proteína canal de sódio.....	4
1.4.2) Interação dos anestésicos locais com a fase lipídica membranar.....	5
1.5) Estudo da interação dos anestésicos locais com membranas modelo	6
1.5.1) Membranas fosfolipídicas.....	6
1.5.2) Membranas biológicas.....	7
1.6) Anestésicos locais escolhidos para estudo	8
1.6.1) Benzocaína.....	9
1.6.2) Lidocaína.....	10
1.6.3) Tetracaína.....	11
2) OBJETIVOS	12

3) MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1) Fundamentação teórica das técnicas de ressonância	13
3.1.1) Ressonância paramagnética eletrônica.....	13
3.1.2) Ressonância magnética nuclear.....	15
3.2) Anestésicos locais utilizados	17
3.3) Preparo de membranas	18
3.3.1) Preparo de lipossomas.....	18
3.3.1.1) <i>Vesículas multilamelares (MLV)</i>	18
3.3.1.2) <i>Vesículas unilamelares (SUV ou LUV)</i>	18
3.3.2) Preparo da suspensão de eritrócitos.....	19
3.4) Estudo das propriedades físico-químicas da BZC	19
3.4.1) Caracterização óptica e de fluorescência.....	19
3.4.2) Solubilidade em tampão.....	20
3.4.3) Estabilidade.....	20
3.4.4) Medidas do coeficiente de partição.....	20
3.4.4.1) <i>Coefficiente de partição entre octanol e água</i>	20
3.4.4.2) <i>Coefficiente de partição entre EPC e água, por separação de fases</i>	21
3.4.4.3) <i>Coefficiente de partição entre EPC e água, determinado por ressonância paramagnética eletrônica</i>	21
3.5) Interação dos anestésicos locais com membranas	22
3.5.1) Medidas de fluorescência da BZC na presença de EPC.....	22
3.5.2) Testes de hemólise induzida pela BZC.....	22
3.5.3) Experimentos de ressonância paramagnética eletrônica.....	23
3.5.4) Experimentos de ressonância magnética nuclear de prótons.....	24

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1) Estudo das propriedades físico-químicas da BZC	26
4.1.1) Caracterização óptica e de fluorescência.....	26
4.1.2) Solubilidade em tampão.....	28
4.1.3) Estabilidade.....	29
4.1.4) Medidas do coeficiente de partição.....	30
4.1.4.1) <i>Coefficiente de partição entre octanol/água (P_{oct})</i>	30
4.1.4.2) <i>Coefficiente de partição entre EPC e água (P_{epc}), por separação de fases</i>	30
4.1.4.3) <i>Coefficiente de partição entre EPC e água, determinado por RPE (P_{rpe})</i>	31
4.1.4.4) <i>Determinação de P por saturação da membrana, em medidas de RPE ($P_{solubilidade}$)</i>	31
4.2) Interação dos anestésicos locais com membranas	34
4.2.1) Medidas de fluorescência da BZC na presença de EPC.....	34
4.2.2) Testes de hemólise induzida pela BZC.....	35
4.2.3) Experimentos de ressonância paramagnética eletrônica.....	37
4.2.3.1) <i>Efeito da Benzocaína no parâmetro de ordem</i>	37
4.2.3.2) <i>Medidas com o marcador 5-MeSL</i>	38
4.2.3.3) <i>Medidas com 7, 12 e 16-MeSL</i>	41
4.2.3.4) <i>Análise quantitativa do efeito dos anestésicos locais</i>	47
4.2.4) Experimentos de ressonância magnética nuclear de prótons.....	50
4.2.4.1) <i>Alterações nos deslocamentos químicos devido a interação AL:EPC</i>	57
4.2.4.2) <i>Medidas de T1 para o sistema AL:EPC</i>	58
4.2.4.3) <i>Alterações nos valores de T1 dos prótons dos AL</i>	62
4.2.4.4) <i>Experimentos de NOE bidimensionais</i>	66
5) CONCLUSÕES	73
6) BIBLIOGRAFIA	74
7) PARTICIPAÇÃO CIENTÍFICA	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AL.....	anestésico local
BZC.....	benzocaína
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CMC.....	concentração micelar crítica
EL ₅₀	concentração que causa 50 % de hemólise
EPC.....	fosfatidilcolina de ovo
D ₂ O.....	água deuterada
DMSO.....	dimetilsulfóxido
K _{binding}	constante de ligação
LDC.....	lidocaína
LUV.....	vesícula unilamelar grande
MeSL.....	éster metílico do ácido doxil esteárico
MLV.....	vesícula multilamelar
na.....	nº de moles na fase aquosa
nm.....	nº de moles na fase lipídica
nt.....	nº de moles totais (na+nm)
NOE.....	efeito nuclear Overhauser
P.....	coeficiente de partição
P _{epc}	coeficiente de partição epc/água, determinado por separação de fases
P _{oct}	coeficiente de partição octanol/água
P _{rpe}	coeficiente de partição epc/água, determinado por rpe
P _{sol}	coeficiente de partição obtido pelo método de solubilidade
PRC.....	procaína
RMN.....	ressonância magnética nuclear
ROESY.....	sequência de pulso bidimensional para determinação de NOE
RPE.....	ressonância paramagnética eletrônica
S.....	parâmetro de ordem
SASL.....	ácido doxil esteárico
SUV.....	vesícula unilamelar pequena
Sw.....	solubilidade aquosa
T ₁	tempo de relaxação longitudinal
τ _c	tempo de correlação rotacional
TTC.....	tetracaína
V _a	volume da fase aquosa
V _m	volume da fase lipídica

RESUMO

Dentre as teorias sobre o mecanismo de ação de anestésicos locais (AL) podemos destacar as que tentam explicar efeitos diretos sobre a proteína canal de sódio, ou aquelas que enfocam os efeitos da interação dos anestésicos com a fase lipídica membranar. Sabe-se que há uma correlação direta entre a hidrofobicidade da molécula anestésica (medida pelo coeficiente de partição) e a sua potência clínica. Sendo assim, é natural pensar que qualquer que seja o mecanismo de ação dos AL ele deve passar por uma interação com a bicamada lipídica. Os anestésicos na sua forma neutra são os que podem melhor explicar este tipo de interação, pois possuem maior hidrofobicidade em relação à forma protonada.

Ao escolhermos os anestésicos para este estudo, a Benzocaína (BZC, um éster) nos chamou atenção, pois é um composto que não se protona em pH fisiológico. Para que pudéssemos compará-la com outros anestésicos, escolhemos a Lidocaína (LDC, uma amino-amida) e a Tetracaína (TTC, um amino-éster) ambas já anteriormente estudadas em nosso laboratório (de Paula & Schreier, 1995) e que possuem amina ionizável em pH próximo a 7,4. Porém, todos os experimentos com a LDC e a TTC foram realizados em pH 10,5, para que estivessem na forma desprotonada. A hidrofobicidade desses anestésicos segue a ordem: $LDC < BZC < TTC$.

Inicialmente fizemos uma caracterização físico-química da Benzocaína. Pudemos observar suas propriedades de absorção no UV e de fluorescência. Além disso, foram feitas medidas de solubilidade em tampão e do coeficiente de partição entre membrana e água, usando diferentes métodos. Estes testes possibilitaram acompanhar e quantificar a BZC nos estudos subsequentes.

Para verificar a interação da BZC com membranas, usamos como modelos a membrana de eritrócito e lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (EPC). Os testes de hemólise serviram para medir a interação da BZC com eritrócitos e também comparar seu efeito com os da LDC e TTC, observando-se uma estreita correlação entre o efeito hemolítico e a hidrofobicidade destes AL. Medidas de fluorescência, utilizando lipossomas de diferentes tamanhos, indicaram que a BZC interage com vesículas lipídicas grandes e pequenas.

Em vesículas multilamelares grandes os experimentos de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) com marcadores de spin em várias profundidades (5, 7, 12 e 16 MeSL), foram úteis para evidenciar que a membrana lipídica se desorganiza de maneira diferente ao incorporarmos os três anestésicos. O maior efeito da LDC foi registrado pelo marcador na posição 5 da cadeia acila; a TTC afetou mais o marcador na posição 7, enquanto a BZC afetou menos, e sem definição de posição, os diferentes marcadores. Numa ordem crescente quanto ao efeito máximo sentido pelas membranas com o marcador 5-MeSL tivemos: $BZC < TTC < LDC$. O grande efeito desorganizador observado com a LDC não se deve a sua hidrofobicidade, mas provavelmente a restrições estéricas, já que a molécula possui substituintes volumosos (orto-metila) que estariam levando a uma menor compactação da membrana contendo LDC. Mas, ao compararmos o efeito para uma mesma razão molar AL:EPC (1:3) na membrana, observamos

que a TTC, que é uma molécula menos volumosa e mais hidrofóbica, provoca efeito maior. O perfil do efeito desorganizador na razão 1:3, medido pelo marcador 5-MeSL, é BZC<LDC<TTC.

Essa diferença entre o efeito para uma mesma concentração de AL e o efeito máximo reflete a partição não ideal da TTC, cuja baixa solubilidade aquosa a limita de atingir razões molares maiores na membrana e, conseqüentemente, determina um falso efeito máximo e saturação da membrana. A LDC, um pouco mais solúvel atinge razões maiores na membrana, justificando seu maior efeito.

Medidas de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons ($^1\text{H-RMN}$) com vesículas pequenas, forneceram resultados concordantes com os de RPE. Observamos um alargamento dos sinais dos prótons dos AL quando em membrana, refletindo uma menor mobilidade destes ao deixarem o meio aquoso. Experimentos de tempo de relaxação longitudinal (T_1) forneceram informações quanto a localização dos AL na membrana de EPC, que também pôde ser analisada por medidas de Efeito Nuclear Overhauser bidimensional (2D-NOE). A relaxação longitudinal mostrou que alguns prótons da porção mais polar da EPC sofreram alteração ao interagir com a BZC e a LDC. Com os experimentos de 2D-NOE, pudemos também medir "cross-peaks" intermoleculares que confirmam a hipótese de localização superficial da BZC e da LDC. Nem as medidas de T_1 , nem as de 2D-NOE determinaram interação específica da TTC com a cabeça polar da EPC. A molécula da TTC desprotonada interage com regiões mais profundas da bicamada lipídica (Boulanger et al., 1981), o que foi evidenciado pela maior alteração na região monitorada pelo 7-MeSL (RPE).

Os resultados aqui apresentados comprovam a importância da hidrofobicidade e de parâmetros estéricos dos AL na determinação de seu efeito em membranas. A relevância da hidrofobicidade justifica o estudo preferencial da forma neutra dos AL enquanto os resultados referentes a efeitos estéricos abrem a perspectiva de interpretação do mecanismo de anestesia com vistas à localização dos AL no interior da bicamada, talvez modulando o acesso ao sítio de ação no canal de Na^+ das membranas excitáveis.

ABSTRACT

Among the theories for the mechanism of action of local anesthetics (LA) we can highlight those explaining LA effects upon the sodium channel protein and those which focus on the effects of LA interaction with the lipid membrane phase. Once a direct correlation among LA hydrophobicity (measured by the partition coefficient) and its clinical potency exists, it is natural to believe that the mechanism of action of LA goes by an interaction with the lipid bilayer. The neutral form of the anesthetics fits better this interpretation because they are more hydrophobic than the protonated (charged) species.

When choosing the anesthetics for this work, Benzocaine (BZC, an ester) got our attention because it is always uncharged around the physiologic pH. To compare BZC with other anesthetics, we chose Lidocaine (LDC, an amino-amide) and Tetracaine (an amino-ester) which have been previously studied in our laboratory (de Paula & Schreier, 1995) and possess an ionizable amine around pH 7.4. All the experiments with LDC and TTC were conducted in pH 10.5 where they were totally uncharged. The anesthetics' hydrophobicity follows the order: LDC < BZC < TTC.

Initially we have made a physical-chemical characterization of Benzocaine. We measured its absorption properties and intrinsic fluorescence in the UV region. BZC's solubility and partition coefficient between membrane and water were determined using different methods. These tests allowed us to follow and to quantify BZC in the subsequent studies.

To verify the interaction of BZC with membranes, we used erythrocytes and egg phosphatidylcholine (EPC) liposomes as model membranes. Hemolytic tests were used to measure the interaction of BZC with erythrocytes and to compare its effect to those caused by LDC and TTC. We detected a straight correlation between the hemolytic effect and LA hydrophobicity. Fluorescence measurements, using liposomes of different sizes, registered BZC interaction with large and small lipid vesicles.

In large multilamellar vesicles we conducted electron paramagnetic resonance (EPR) employing spin probes for various bilayer depths (5, 7, 12 and 16 MeSL). These probes were useful to evidence that the lipid membrane is disorganized to different extents after addition of each anesthetic. The major effect of LDC was detected with the probe in carbon 5 of the acyl chain; TTC mostly affected the probe at position 7, while BZC showed less pronounced effect, with no definition for any monitored position. In relation to the maximum disorganizing effect detected with 5-MeSL, we have the profile: BZC < TTC < LDC. The great disorganizing effect caused by LDC is probably due to steric hindrances of this molecule since it possesses voluminous ortho-methyl substituents that would determine less membrane packing, in the presence of LDC. To really compare the effect of the three LA, we conducted this analysis to the same molar ratio LA:EPC (1:3) in the membrane. At this ratio TTC, a less voluminous and more hydrophobic molecule provokes a larger effect. The effect in the 1:3 ratio, measured by the 5-MeSL probe, is BZC < LDC < TTC.

The difference between the maximum effect and that for the same LA:EPC ratio in the membrane is due to the non-ideal partition of TTC. Low solubility does not allow TTC to reach a good LA:EPC ratio inside the membrane, determining a "false" maximum effect and membrane saturation. LDC, more soluble, reaches higher ratios and effects in the membrane.

With small unilamellar vesicles, we made measures of Proton Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$). The obtained results are in good agreement with those obtained by EPR. There is a broadening of the LA peaks when they are inside the membrane, reflecting the decrease in mobility that these protons experience as they move into the bilayer. Longitudinal relaxation time (T_1) experiments supplied us with information about the LA location in the EPC membrane, that could also be analyzed by measures of bidimensional Nuclear Overhauser Effect (2D-NOE). The T_1 values showed changes in the polar head group protons of the lipid, while interacting with BZC and LDC. With the 2D-NOE experiments, we could evidence some intermolecular cross-peaks that confirm the hypothesis of a superficial location for BZC and LDC. Neither the measures of T_1 , nor those of 2D-NOE determined specific interaction of TTC with the polar head groups of EPC. The uncharged TTC molecule interacts at deeper regions of the lipid bilayer (Boulanger *et al.*, 1981), which was also evidenced from the largest effect observed by EPR when the membrane was monitored by 7-MeSL.

The results here presented enhance the importance of hydrophobicity and steric parameters in the determination of LA effects upon membranes. The importance of the hydrophobic parameters justifies the preferential study of the LA neutral forms while the results concerning steric effects open the perspective of interpreting the anesthesia mechanism in view of specific LA location inside the membrane, possibly modulating its access to the site of action in the Na^+ channel protein.

1) INTRODUÇÃO

1.1) Breve histórico da anestesia

Os procedimentos cirúrgicos não eram comuns antes de 1840. Além disso, a falta de uma anestesia satisfatória constituía um grande obstáculo e a cirurgia era considerada o último recurso médico.

Alguns meios para tentar aliviar a dor cirúrgica estavam disponíveis e já vinham sendo utilizados desde os tempos antigos (Gilman, 1991). Drogas como o álcool, haxixe e derivados do ópio, administrados por via oral, proporcionavam algum alívio.

Embora as propriedades analgésicas tanto do óxido nitroso quanto do éter dietílico (anestésicos gerais) já fossem conhecidas, esses fármacos não eram utilizados com objetivos medicinais (Gilman, 1991). Os dentistas foram os mediadores na introdução dessas duas drogas como anestésicos. A primeira demonstração bem sucedida da eficácia da anestesia com éter, foi realizada por William T.G. Morton, um dentista de Boston, em 1846.

Desde aquela época, novos fármacos anestésicos vem sendo desenvolvidos e introduzidos na prática clínica, e os métodos para administração dessas drogas tem sido aperfeiçoados. Os novos fármacos mostraram-se mais seguros para os pacientes, por não serem explosivos como o éter, por exemplo, e por permitir administrar anestesia a pacientes que apresentam comprometimento de funções dos sistemas cardiovascular, respiratório e sistema nervoso central.

O primeiro anestésico de ação local a ser descoberto foi a cocaína, um alcalóide contido em grandes quantidades (0,6 a 1,8 %) nas folhas da *Erythroxylon coca*, um arbusto que cresce em grandes altitudes nas montanhas dos Andes. O alcalóide puro foi isolado pela primeira vez em 1860 por Niemann, porém seu uso clínico foi iniciado realmente por dois jovens médicos vienenses: Sigmund Freud e Karl Koller, em 1884 (Covino & Vassalo, 1985; Vandam, 1987).

Uma pesquisa para obtenção de substitutos sintéticos da cocaína foi iniciada em 1892, por Einhorn, que resultou na síntese da Procaína, em 1905. A partir daí, novos anestésicos locais foram sendo sintetizados e testados (Vandam, 1987). Atualmente, há a tendência ao desenvolvimento de anestésicos do tipo amino-amida mais potentes, visto que estes possuem um grau de toxicidade mais baixo que os amino-ésteres (Covino & Vassalo, 1985). Nos anos 90 tem se ressaltado a busca de estereoisômeros, como a S(-) Ropivacaína, uma amino-amida (de Jong, 1994).

1.2) Tipos de anestésicos

Existem duas classes de anestésicos, usados de acordo com o tipo de intervenção cirúrgica: anestésicos gerais e anestésicos locais.

Os anestésicos gerais são drogas que agem a nível das transmissões sinápticas. Eles podem ser administrados por diversas vias, porém a administração por via intravenosa ou por inalação é preferida, porque a dose eficaz e o tempo de ação são mais previsíveis quando tais técnicas são utilizadas.

No caso dos anestésicos locais (AL) sua ação se dá a nível da condução do estímulo nervoso, quando aplicados localmente sobre o tecido nervoso, em concentrações elevadas. Agem sobre os axônios em qualquer parte do sistema nervoso e em todo tipo de fibra nervosa. Suas principais vias de administração são: anestesia epi e peridural, bloqueios de plexos nervosos, além da administração local tópica, em odontologia e em pequenas incisões.

1.3) Química e relação estrutura-atividade dos anestésicos locais

Neste trabalho, iremos nos ater apenas ao estudo dos anestésicos locais.

Os AL são moléculas com diferentes estruturas químicas (amino-ésteres; amino-carbamatos; amino-cetonas; amidas; álcoois; tio-ésteres; tio-éteres; tio-amidas; derivados de uréia; ésteres fosfóricos; poliéteres e aminas simples) que contém domínios hidrofílicos e hidrofóbicos separados por uma cadeia alquílica intermediária (Covino & Vassalo, 1985; Courtney & Strichartz, 1987; Gupta, 1991).

O grupo hidrofílico é normalmente uma amina terciária, podendo ser também uma amina secundária. O domínio hidrofóbico é um resíduo aromático. A ligação com o grupo aromático é do tipo éster ou amida, sendo que a natureza dessa ligação determina algumas das propriedades farmacológicas desses agentes como a metabolização e potência (ex: ésteres são mais potentes que amidas) (Courtney & Strichartz, 1987).

A hidrofobicidade da molécula anestésica geralmente está relacionada a um aumento em sua potência anestésica. Quanto maior a hidrofobicidade, menos AL é necessário para o completo bloqueio da atividade fisiológica e elétrica, que também dura mais tempo. O seu potencial de toxicidade porém, irá aumentar (Covino & Vassalo, 1985; Courtney & Strichartz, 1987).

1.4) Mecanismo de ação

Fisiologicamente, a excitação da membrana nervosa causa ativação da proteína canal de sódio (Fig.1) que se abre, fazendo com que haja influxo de sódio e por conseguinte levando a uma despolarização da membrana. Assim, ocorre o impulso nervoso (Fig.2) e o sinal elétrico é transmitido ao longo do axônio, unidirecionalmente.

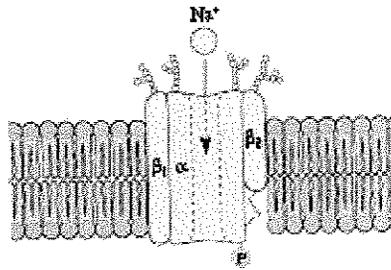


Fig.1 Canal de Sódio. O canal de sódio de mamíferos compreende 3 subunidades, denominadas α , β_1 e β_2 . Uma ponte dissulfeto liga α e β_2 , como mostrado na figura. Todas as 3 subunidades são glicosiladas e a subunidade α pode ser fosforilada na superfície citoplasmática (Garret & Grisham, 1995).

Por serem moléculas anfifílicas, os AL tem grande afinidade pela membrana celular. Em membranas excitáveis, eles diminuem sua velocidade de despolarização com o aumento da concentração de AL, e agem inativando os canais de sódio, impedindo o influxo de íons necessários à despolarização da membrana (Covino & Vassalo, 1985).

Dentre algumas teorias propostas para explicar os mecanismos de ação dos AL, podemos destacar:

i) Os AL interagiriam com a proteína canal de sódio se ligando a um sítio específico da proteína canal de sódio, alterando sua conformação e fechando o canal (Strichartz & Ritchie, 1987).

ii) Na teoria conhecida como hipótese do lipídio leva-se em consideração a interação do AL com os lipídios da membrana. Isto acarretaria alterações das propriedades estruturais e dinâmicas da matriz lipídica (separação lateral de fases, aumento da fluidez), promovendo mudanças conformacionais na proteína canal de sódio, causando sua inativação (Lee, 1976-a).

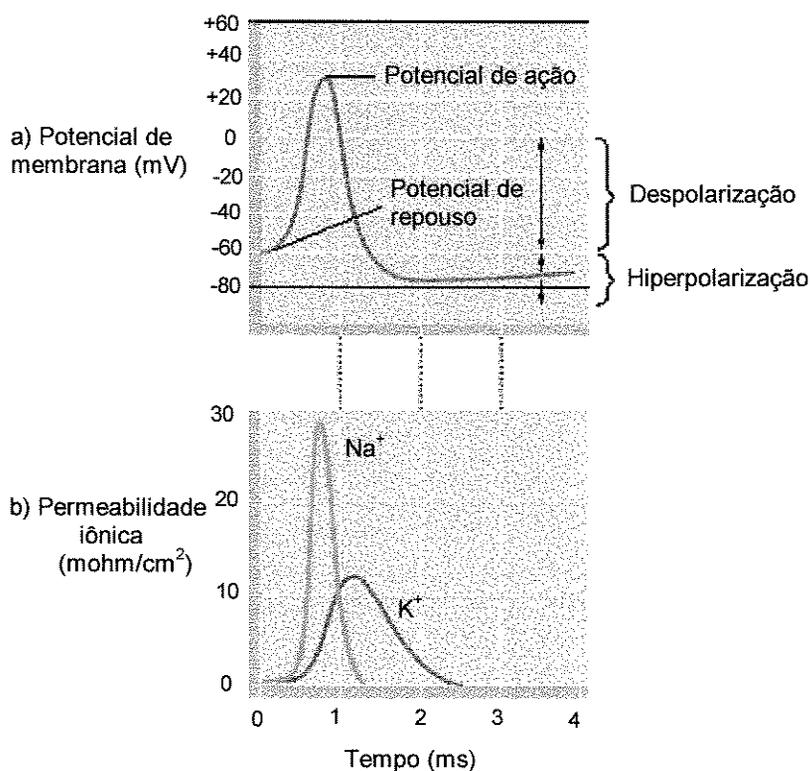


Fig.2 Potencial de ação e permeabilidade iônica do Na^+ e K^+ no axônio. a) O aumento rápido no potencial de membrana de -60mV para aproximadamente $+30\text{mV}$ é descrito como “despolarização”. Esta despolarização é causada por b) um rápido aumento na permeabilidade do Na^+ . Assim que a permeabilidade ao Na^+ diminuir, a permeabilidade ao K^+ aumenta e o potencial de membrana cai, muitas vezes abaixo do potencial de repouso - levando a um estado de “hiperpolarização”-seguido de um retorno lento ao potencial de repouso. (Adaptado de Garret & Grisham, 1995)

1.4.1) Interação dos anestésicos locais com a proteína canal de sódio

Dentro das duas teorias mais aceitas sobre o mecanismo de ação dos AL, algumas observações já foram feitas, em favor da interação específica AL-canal de Na^+ . Primeiramente encontramos na literatura inúmeras descrições da interação dos AL com proteínas membranares, como: calmodulina, canais de potássio, receptores de acetilcolina, ATP-ases microssomais e mitocondriais, citocromo oxidase, proteína G e proteína EnvZ que age na transdução de sinais por ativação da porina (de Paula & Schreier, 1996).

Frazier e col. (1970) verificaram que análogos quaternários de AL bloqueiam a condução nervosa quando aplicados internamente aos axônios gigantes de lula perfundidos, porém são relativamente ineficazes quando aplicados externamente. Esses resultados sugeriam que o sítio de interação dos anestésicos locais, pelo menos em sua forma ionizada, seria acessível apenas a partir da superfície interna da membrana (Frazier *et al.*, 1970;

Narahashi & Yamada, 1969). Assim, os AL aplicados externamente deveriam primeiro atravessar a membrana em sua forma não ionizada, antes de poder exercer a sua ação bloqueadora de canal na forma protonada (Strichartz & Ritchie, 1987).

Mais recentemente, Caterall e colaboradores, usando técnicas de biologia molecular, conseguiram demonstrar a existência de um "sítio hidrofóbico" para AL desprotonados no interior de uma alfa-hélice transmembranar da proteína canal de sódio. O acesso do AL até este sítio seria feito pela difusão do mesmo através da bicamada lipídica (Ragsdale *et al.*, 1994). Em outro estudo de 1996, o mesmo grupo observou a interação de AL, antiarrítmicos e anticonvulsivantes com sítios de ligação mutantes, no canal de sódio. Eles sugerem que estas drogas interagem com um sítio comum, porém de uma maneira não idêntica (Ragsdale *et al.*, 1996).

A grande potência anestésica de compostos como a Benzocaína (BZC), que não se protonam em pH próximo ao fisiológico, causava controvérsia para a descrição de um sítio único para os AL protonados. Além disso, a grande variedade estrutural de moléculas com ação anestésica local fortalece a idéia de que deve existir mais de um sítio receptor ou mecanismo de ação para os AL (Strichartz, 1987).

1.4.2) Interação dos anestésicos locais com a fase lipídica membranar

Em 1976, Lee demonstrou que a proteína canal de sódio necessita de lipídios específicos, para sua atividade na membrana. Esses dados chamaram a atenção para a importância da interação AL-lipídio pois, segundo esse autor, os AL alterariam a distribuição dos lipídios na região do anulo de ligação ("boundary") com a proteína canal de sódio (Lee, 1976-a).

Um grande número de experimentos demonstraram a interação dos AL com lipídios, através da observação de propriedades membranares como variação da temperatura de transição de fases (Lee, 1976-b), segregação lateral de fosfolipídios (Homby & Cullis, 1981), alteração da fluidez (Boulanger *et al.*, 1981; Bianconi *et al.*, 1988), entre outros (de Paula & Schreier, 1996). Esses estudos revelaram uma correlação direta entre a hidrofobicidade, potência e duração anestésica, atestando a importância da interação AL-fase lipídica membranar.

Acreditamos que o mecanismo de ação dos AL envolve sua interação com um ou mais sítios de ligação (específicos) dentro do canal de sódio. O acesso e a disponibilidade (em quantidades suficientes) do AL a esse(s) sítio(s) seria(m) controlado(s) pela interação do anestésico com a fase lipídica membranar.

1.5) Estudos da interação dos anestésicos locais com membranas modelo

As bicamadas lipídicas tem sido amplamente usadas para o estudo do mecanismo de ação e da toxicidade de AL. Como descrito, as teorias para o mecanismo de ação dos AL atestam a importância da sua interação com a bicamada lipídica, pois quanto mais hidrofóbico, mais ativo e mais tóxico o AL (Covino & Vassalo, 1985).

É interessante entender a interação molecular AL/membrana, para que drogas mais eficientes e menos tóxicas possam ser desenvolvidas.

1.5.1) Membranas fosfolipídicas

Estes tipos de membrana podem fornecer informações detalhadas sobre a interação de AL com constituintes específicos das membranas.

Entre outras estruturas possíveis, os fosfolipídios (a principal classe de lipídios das membranas biológicas) podem organizar-se em bicamadas, como descrito no modelo do mosaico fluido (Singer & Nicolson, 1972). Se forem depositados sobre uma superfície obtêm-se bicamadas planas, enquanto em suspensão formam-se os chamados lipossomas.

Os lipossomas são vesículas uni ou multilamelares que possuem, respectivamente, um ou mais compartimentos aquosos no seu interior, o que faz com que se assemelhem às membranas naturais (Fig.3 - a,b). A simples agitação do fosfolipídio anidro em água é suficiente para formar multibicamadas (MLV) com diâmetros de 1 a 10 μm (Prasad, 1996).

Existem vários métodos de obtenção de vesículas unilamelares pequenas (SUV) e grandes (LUV). Dentre eles a agitação ultrassônica é o método mais usado para se converter uma dispersão de MLV em SUV com aproximadamente 20 a 50 nm de diâmetro (Prasad, 1996). Já o método de extrusão sob pressão é bastante utilizado para se obter tanto vesículas unilamelares grandes quanto pequenas a partir de MLV (diâmetro controlado pelo poro do filtro) fornecendo uma população de vesículas bastante homogênea.

Estudos com lipossomas possibilitaram o entendimento da estrutura e função membranar. Alterações na transição de fase, permeabilidade, dinâmica molecular (movimentos transversais e laterais no plano da bicamada e movimentos intramoleculares dos fosfolipídios), incorporação de proteínas, resposta osmótica a alteração da fase aquosa, efeito da variação da composição da membrana (fosfolipídios, colesterol) entre outros, vem sendo estudados em lipossomas. Além do seu uso como modelo de membranas, os lipossomas possuem um grande potencial como carreadores de drogas hidrofílicas, lipofílicas e anfílicas para uso clínico, entre elas os AL (Djordjevich *et al.*, 1986; Gesztes & Mezei, 1988; Boogaerts *et al.*, 1995; Duncan & Wildsmith, 1995). Nesse caso, a administração de lipossomas diminui o grau de toxicidade e aumenta o tempo de liberação da droga, prolongando a duração do efeito e diminuindo a necessidade de várias administrações ao dia.

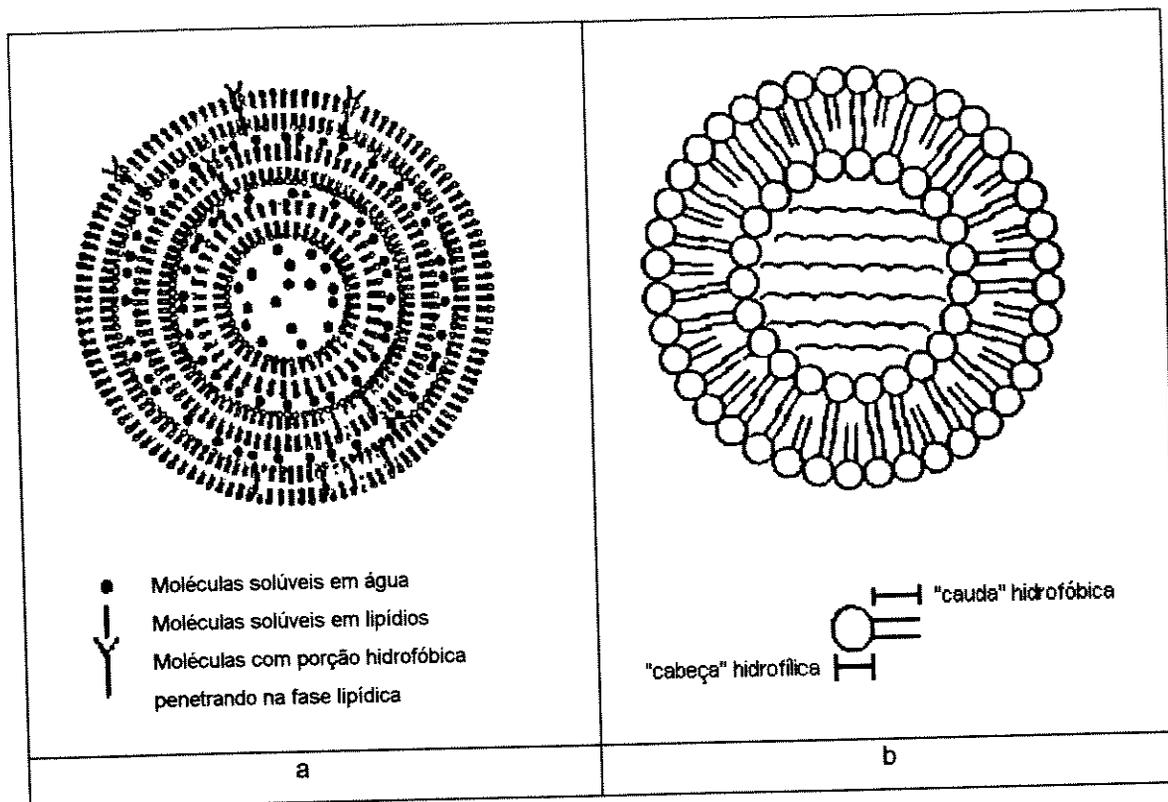


Fig.3 Representação esquemática de lipossomas . a) lipossoma multilamelar; b) lipossoma unilamelar (Haller, 1989).

1.5.2) Membranas biológicas

Dentre as membranas biológicas, a mais conhecida e estudada é a membrana de eritrócito, que é de fácil obtenção e pode ser manipulada sem a interferência de outros componentes celulares. Eritrócitos compõem um modelo muito interessante para o estudo da estrutura e função de membranas biológicas (Warren, 1987) pois sua composição lipídica se assemelha à de axônios de lula (Camejo *et al.*, 1969) um modelo de membrana biológica bastante apropriado, pois contém canais iônicos, incluindo o canal de Na^+ eletricamente responsivo.

A interação de moléculas com membranas eritrocitárias tem sido avaliada pelo efeito hemolítico. O efeito hemolítico induzido por substâncias químicas tem, na maioria das vezes, um caráter bifásico, i.e., protetor ou indutor da lise, dependendo da concentração do agente químico. Roth & Seeman (1972) descreveram o efeito bifásico de 44 diferentes compostos químicos, entre eles os neurolépticos fenotiazínicos, anestésicos locais, antiinflamatórios e álcoois. Vários tensoativos, como os detergentes da série Triton (Trägner & Csordas, 1987) e Renex (Meirelles *et al.*, 1998) bem como o composto endógeno bilirrubina (Brites *et al.*, 1997) interagem com o eritrócito de modo bifásico.

A interação de AL e tranqüilizantes com membranas eritrocitárias, foi descrita por Seeman (1966) que encontrou um efeito bifásico, concentração dependente, na hemólise eritrocitária induzida por dibucaína, tetracaína, lidocaína e procaína (PRC). Acredita-se que a interação do AL é do tipo não específica, com proteínas e lipídios da membrana. A proteção contra hemólise refletiria a partição do AL na membrana, aumentando a resistência mecânica desta. Já a lise eritrocitária, observada em concentrações mais elevadas de AL, ocorreria após a saturação da membrana com o anestésico (Meirelles *et al.*, 1994).

Outra abordagem da interação química com eritrócitos inclui a medida do estresse oxidativo induzido pela trifluoperazina em eritrócito (Ruggiero, 1994) e a solubilização de proteínas membranares por detergentes (Wong *et al.*, 1987).

A membrana eritrocitária isolada (ghosts) constitui um outro modelo interessante, por permitir estudar a interação de anfifílicos com os componentes da membrana, sem interferência do conteúdo celular. Além disso, pode-se encapsular sondas (fluorescentes, corantes, marcadores de spin) e re-selar os ghosts, num modelo que permite avaliar a integridade da membrana, transporte e difusão de drogas (Dodge, 1963).

1.6) Anestésicos locais escolhidos para estudo

Os AL escolhidos para este estudo foram a Benzocaína (éster), a Lidocaína (amino-amida) e a Tetracaína (amino-éster) pois são representantes potentes de diferentes famílias químicas, o que permitiu a comparação de parâmetros estruturais importantes para a anestesia (Fig.4).

Além disso a TTC é o AL cuja interação com membrana é melhor conhecida e estudada. Os clássicos trabalhos de Boulanger *et al.* (1980, 1981) revelaram detalhes da localização das formas neutra e protonada da TTC em vesículas lipídicas. Estas talvez sejam as referências mais citadas na literatura especializada quando se trata de mecanismos moleculares que determinam a inserção do AL nas membranas. A LDC se destaca pela grande perturbação que causa na organização das membranas (de Paula, 1993; de Paula & Schreier, 1995) apesar de sua baixa hidrofobicidade.

Já a Benzocaína é um interessante modelo para o estudo da forma neutra dos AL. Seu único grupamento ionizável é uma amina ligada ao anel benzóico cujo pKa é 2,5, e portanto ela não se protona em pH próximo ao fisiológico. A Tetracaína e a Lidocaína possuem um grupamento amina com pKa=8,5 e 7,8 respectivamente (Covino, 1986; Wildsmith *et al.*, 1987) contando com ambas as formas, neutra e protonada, em pH fisiológico. Essa propriedade é interessante se considerarmos que a forma neutra dos AL é a que mais contribui na interação com a bicamada lipídica, apresentando coeficiente de partição maior que o da forma protonada (Boulanger *et al.*, 1980 e 1981).

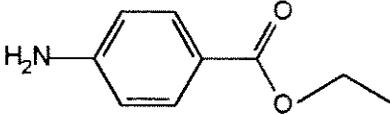
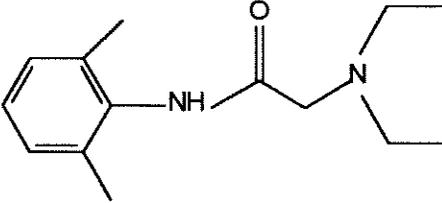
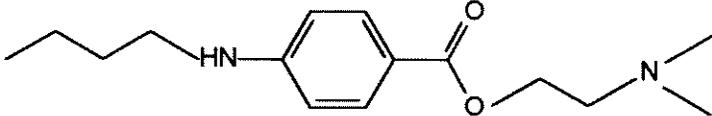
	<p>Benzocaína</p>
	<p>Lidocaina</p>
	<p>Tetracaína</p>

Fig. 4 Estrutura química dos anestésicos locais: BZC, LDC e TTC.

1.6.1) Benzocaína

A BZC foi sintetizada por Ritsert em 1890 (Covino & Vassalo, 1985). Devido a sua pouca solubilidade em água, que limita a sua administração parenteral, este composto permaneceu esquecido por muitos anos. Finalmente a BZC foi reconhecida como anestésico tópico eficaz, assim como a LDC, permanecendo atualmente como uma droga de grande uso em anestesia tópica (Covino & Vassalo, 1985; Strichartz & Ritchie, 1987).

Ela apresenta atividade quimioluminescente (Zhang *et al.*, 1995) e, em relação à ligação éster, tem boa estabilidade química (Strichartz *et al.*, 1990) em comparação com outros AL do tipo éster.

A sua metabolização hepática parece envolver a interação com o citocromo P₄₅₀ e o primeiro passo seria a N-hidroxilação do grupo amino-benzoato. Outro provável passo metabólico seria a hidrólise a ácido p-amino benzóico (PABA) e etanol, ainda não comprovada (de Jong, 1994). Segundo Guertler & Pearce (1994) o PABA formado é metabolizado a ácido amino hipúrico e que a BZC é metabolizada a anilina, que então é transformada a fenil hidroxilamina e nitroso benzeno. Ambos são compostos formadores de metahemoglobina (Guertler & Pearce, 1994).

Eventos celulares, como a inibição ao aumento dos níveis de Ca^{2+} intracitoplasmático (Li *et al.*, 1995) e fisiológicos, como a alteração da curva de resposta (para pressões mais altas) dos barorreceptores (Andresen *et al.*, 1994) tem sido associados ao uso da BZC. O maior efeito indesejável, porém, está relacionado ao aumento dos níveis de metahemoglobina, induzidos pela BZC em várias espécies (Guertler & Pearce, 1994; Martin *et al.*, 1995; Ellis *et al.*, 1995) e que deve decorrer da sua semelhança estrutural com drogas indutoras de Meta-Hb como a p-amino propiofenona (PAPP), que possui uma carbonila no lugar da carboxila da ligação éster, sendo portanto uma cetona (Martin *et al.*, 1995).

1.6.2) Lidocaína

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

A adição de metilas em posição orto no seu anel aromático contribui bastante para a hidrofobicidade desta parte da molécula. Porém, estas metilas restringem a orientação do oxigênio da carbonila na ligação amida, a uma direção perpendicular ao plano do anel. Isto pode gerar um impedimento estérico para uma aproximação do anel a um sítio de ligação lipofílico, um efeito que pode ser de considerável importância devido à potência relativa das amidas, i.e., inferior à dos ésteres (Courtney & Strichartz, 1987).

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

1.6.3) Tetracaína

A TTC é um AL do tipo amino-éster, derivado do ácido benzóico, e foi sintetizada pela primeira vez em 1930, por substituição do resíduo para-amino, pelo grupamento butil-amino, e diminuição da cadeia alquil-amina da Procaína. Estas modificações simples levaram a um AL completamente diferente, que é cerca de 10 vezes mais hidrofóbico, potente e tóxico que a PRC. A hidrólise do grupamento éster da TTC é quatro vezes menor que a da PRC. Seus efeitos são de duração prolongada e aí reside uma de suas vantagens (de Jong, 1994). A TTC porém, tem alta toxicidade sistêmica (Martindale, 1993).

Por possuir uma estrutura cilíndrica e ser bastante hidrofóbica, a TTC se insere facilmente nas membranas. Ela penetra profundamente e desorganiza bastante a bicamada (de Paula, 1993; de Paula & Schreier, 1995) em relação a outros AL do tipo amino-amida e amino-éster. Na verdade, a localização da forma neutra da TTC é mais profunda que a da sua forma protonada (Boulanger *et al.*, 1981). A forma protonada da TTC forma micelas em água numa cmc de 60 a 70 mM (de Paula & Schreier, 1996).

A TTC é hidrolisada, por esterases do plasma, a ácido para-amino-benzóico e outros metabólitos e é excretada pelo fígado. Ela é bastante empregada em anestesia superficial e espinhal (Martindale, 1993).

2) OBJETIVOS

Nosso principal objetivo foi comparar o efeito dos anestésicos locais benzocaína, lidocaína e tetracaína na organização de membranas fosfolipídicas. Através do uso de técnicas espectroscópicas como RPE, ^1H -RMN e fluorescência, estudamos a interação desses AL com membranas modelo, procurando determinar a possível localização da BZC (do tipo éster) e comparar com dados da lidocaína (amino-amida) e da tetracaína (amino-éster) desprotonadas nas bicamadas, além de monitorar mudanças nas propriedades estruturais e dinâmicas das membranas, provocadas pela inserção dos mesmos. Para isto, usamos marcadores de spin (RPE) e analisamos os deslocamentos químicos, tempo de relaxação longitudinal e efeito nuclear Overhauser por ^1H RMN.

Determinar as propriedades físico-química da BZC e compará-las com as da LDC e da TTC, já descritas anteriormente (de Paula & Schreier, 1995).

Medidas complementares de hemólise auxiliaram na interpretação da interação desses AL com membranas eritrocitárias. Buscamos assim obter uma relação entre membranas biológicas e lipossomas de diferentes tipos.

Finalmente procuramos correlacionar os parâmetros medidos com características físico-químicas desses três AL numa tentativa de entender melhor o mecanismo de anestesia através da relação estrutura-função.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Fundamentação teórica das técnicas de ressonância

3.1.1) Ressonância paramagnética eletrônica

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica que opera na região de microondas (GHz) e detecta transições de estados de spin eletrônicos. A energia correspondente a essas transições é da ordem de grandeza daquela envolvida em movimentos translacionais, rotacionais e segmentares das moléculas, o que permite a análise desses movimentos através dos espectros obtidos. A RPE detecta compostos com um ou mais elétrons desemparelhados (moléculas paramagnéticas). Essas moléculas, quando submetidas a um campo magnético, orientam-se segundo seus momentos magnéticos de spin. Quando se aplica uma onda eletromagnética ressonante com a precessão do spin eletrônico, ocorre absorção de energia e transição do estado de spin. A ressonância paramagnética eletrônica pode ser discutida como:

$$h \cdot \nu = g \cdot \beta \cdot H \quad (1)$$

onde: h =constante de Planck; ν =frequência da radiação incidente; g =fator característico do elétron ; β =magneton de Bohr ; H =campo magnético externo.

A absorção é registrada no espectro de RPE como a primeira derivada das bandas de absorção de energia da amostra (Schreier *et al.*, 1978; Warren, 1987). Após algum tempo há relaxação e retorno ao estado de spin original.

As moléculas paramagnéticas não são tão frequentes em sistemas biológicos. Para o estudo de sistemas diamagnéticos, a técnica do marcador de spin veio solucionar esse problema (Hubbel & McConnell, 1976; Warren, 1987). Através do uso de um marcador paramagnético estável, é possível obter informações de caráter estrutural e da mobilidade (tempo de correlação rotacional) do sistema no qual a sonda está inserida. Em particular nas membranas a técnica do marcador de spin trouxe enorme contribuição (Hubbel & McConnell, 1976).

O marcador de spin mais utilizado é o radical nitróxido, por ser estável em amplas faixas de temperatura e pH. Esta molécula, ao se intercalar na membrana, tende a se orientar preferencialmente. Os marcadores do tipo ácido doxil esteárico orientam-se com o eixo z aproximadamente paralelo ao eixo normal da bicamada (Warren, 1987).

A partir de espectros de RPE, é possível calcular o parâmetro de ordem (S) que é uma medida da anisotropia do ambiente em que se encontram as moléculas do marcador de spin. O espectro desses marcadores apresenta parâmetros que refletem as orientações nos eixos x , y (extremos internos) e z (extremos externos) que são usados para a determinação de S (Fig.5-a). O parâmetro de ordem é uma medida da orientação da molécula em relação

ao eixo diretor (normal à bicamada) e varia de 0, em sistemas isotrópicos, até 1, para uma molécula perfeitamente orientada (Jost *et al.*, 1971). S reflete a amplitude angular do movimento anisotrópico da molécula e pode ser obtido experimentalmente por:

$$S = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - [(A_{xx} + A_{yy})/2]} \quad (2)$$

onde: $A_{//}$ e A_{\perp} são medidos diretamente no espectro de RPE (Fig.5). A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} são os principais tensores hiperfinos, medidos em baixa temperatura, e tem os valores constantes de 32, 6 e 6, respectivamente (Schreier *et al.*, 1978).

Se o grau de ordem na membrana é pequeno, os extremos externos do espectro não são resolvidos e o parâmetro de ordem não pode ser medido diretamente. Este é o caso dos metil estearatos, que não interagem fortemente com a interface aquosa da membrana (Schreier *et al.*, 1984; Frezzatti *et al.*, 1986) por não possuírem um grupamento carregado para ancorar-se ao nível da cabeça polar dos lipídios. Pela falta de uma forte interação, o espectro mostra um baixo grau de anisotropia, o que impede tanto a medida do parâmetro de ordem, como o cálculo preciso do tempo de correlação rotacional da molécula, empregando a teoria desenvolvida para sistemas isotrópicos (Schreier *et al.*, 1984). Neste caso pode-se usar o parâmetro empírico (h_{+1}/h_0) isto é, a razão das alturas dos picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0), como uma medida do grau de organização da membrana (Fig.5-b), compreendendo com isso efeitos de ordem e mobilidade das moléculas na bicamada (Schreier *et al.*, 1978). Quanto mais anisotrópico o movimento do marcador na membrana, mais alargadas as linhas espectrais e maior a diferença entre os picos de campo baixo (h_{+1}) e médio (h_0), enquanto uma menor organização da membrana é acompanhada por razões h_{+1}/h_0 menores. Neste caso, o efeito desorganizador pode ser expresso como uma porcentagem da razão h_{+1}/h_0 inicial, de acordo com:

$$\text{Efeito} = \frac{\left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{\text{amostra}} - \left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{\text{controle}}}{\left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{\text{controle}}} \times 100 \quad (3)$$

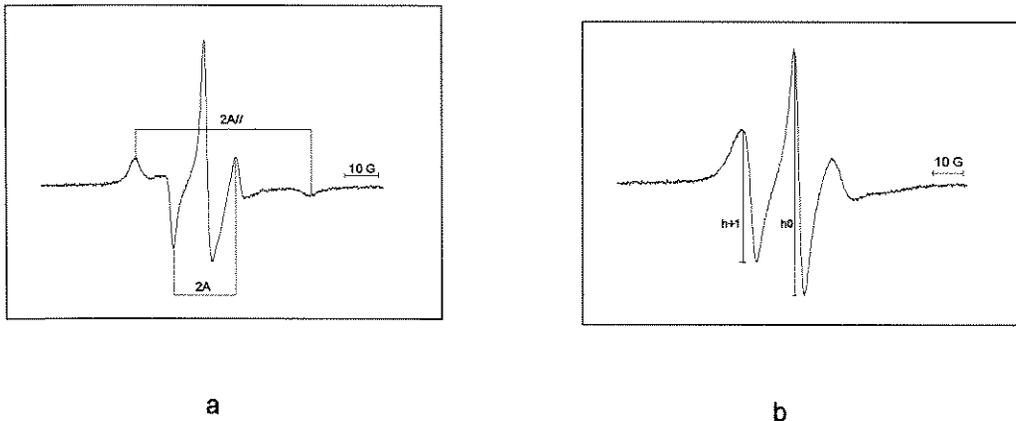


Fig. 5 Espectro de RPE do marcador a) 5-SASL em vesículas multilamelares de EPC (5 mM) na presença de BZC (8 mM) e b) 5-MeSL em vesículas de EPC (10 mM) na presença de BZC (5 mM).

3.1.2) Ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) é basicamente outro método de absorção espectrométrica, como a espectrofotometria de UV, RPE e infravermelho. Sob condições apropriadas, em um campo magnético, as transições nucleares de uma dada amostra podem ser registradas pela absorção de radiação eletromagnética na faixa de radiofrequência (MHz) de acordo com:

$$h \cdot \nu = \mu \cdot H \quad (4)$$

onde: μ = momento magnético nuclear; h , ν e H estão descritos na equação 1.

Numa mesma molécula, há valores de μ diferentes para cada núcleo, o que permite a observação de espectros de RMN de diferentes núcleos (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , etc) com número atômico ou de massa ímpar ($\mu \neq 0$).

Nos espectrômetros de RMN, todos os núcleos são irradiados simultaneamente e o decaimento do sinal de absorção (free induction decay - FID) é registrado e armazenado no espectrômetro. Em seguida os sinais digitais são transformados para o domínio da frequência, utilizando-se a transformada de Fourier. Nisto se constitui o espectro de RMN, em que os picos de absorção são decompostos (de um domínio de tempo) e mostrados num gráfico de frequência vs intensidade dos picos (Derome, 1987).

A ocorrência de sinais em diferentes valores de frequência para um mesmo núcleo (por exemplo, ^1H) é uma indicação de que o campo magnético experimentado por cada núcleo numa mesma molécula, depende do ambiente químico em que ele está inserido (Gil &

Geraldes, 1987). A diferença na frequência de absorção de um núcleo em particular em relação a um núcleo usado como referência é chamada de deslocamento químico (Silverstein *et al.*, 1991).

Outras informações importantes num espectro de RMN são a constante de acoplamento (J), que é o desdobramento de um núcleo ou grupo de núcleos em mais de um pico devido a interação com o momento magnético de núcleos adjacentes, e o tempo de relaxação nuclear, que é a medida do tempo que o núcleo demora para retornar de seu estado excitado (Derome, 1987; Silverstein *et al.*, 1991).

A constante de tempo T_1 na espectroscopia de RMN é conhecida como tempo de relaxação longitudinal ou spin-rede. T_1 mede o tempo da molécula no estado excitado e é um parâmetro bastante importante no estudo de amostras sólidas e sistemas de membranas lipídicas, onde a interação dos momentos magnéticos com a rede de spins é significativa.

Podem existir diferentes valores de T_1 em uma mesma molécula devido aos núcleos experimentarem ambientes diferentes. Como membranas lipídicas são sistemas bastante anisotrópicos os valores de T_1 são bem diferentes. Medidas de T_1 de fosfolípidios foram obtidas por RMN de deutério (de Paula, 1993), carbono 13 (Godici & Landsberger, 1974; Ellena *et al.*, 1988) e próton (Kuroda & Kitamura, 1984).

Outra característica interessante nas medidas de RMN é o Efeito Nuclear Overhauser (NOE). Quando saturamos o sinal de absorção de energia, os núcleos que interagem espacialmente com o spin nuclear saturado sofrerão alterações de intensidade, proporcionais à sua proximidade do pico saturado. (Gil & Geraldes, 1987).

O efeito Nuclear Overhauser, aplicado a "sólidos" (como podemos classificar proteínas e sistemas macromoleculares como as membranas lipídicas) utiliza o princípio da relaxação dos spins nucleares. Assim, num sistema razoavelmente estático, em que os movimentos das moléculas sejam longos ($> 10^{-9}$ s), predominam os mecanismos de relaxação entre o spin nuclear irradiado e a rede de moléculas ao seu redor (Kalk & Berendsen, 1976; Wagner & Wütrich, 1979; Dobson *et al.*, 1982; Gil & Geraldes, 1987). Em outras palavras, a perturbação de um spin, produzida em um núcleo pode ser dissipada através da amostra devido a existência de uma forte interação dipolar entre os núcleos; isso ocorre somente se os núcleos estiverem relativamente próximos entre si (proximidade espacial). A relaxação da polarização do spin é capaz de indicar a proximidade espacial entre núcleos de uma mesma molécula e entre moléculas vizinhas (ex.: AL e lipídio, na bicamada), desde que não se exponham os prótons a tempos de contato muito longos, a fim de evitar a difusão inespecífica (NOE de equilíbrio). Assim, empregam-se técnicas de pulso para observação de NOE transientes, variando o tempo de espera ("mixing") entre o pulso de pré-irradiação e o pulso não seletivo e obtém-se NOE negativos tempo dependentes, entre núcleos próximos espacialmente em até 5 Å (Wagner & Wütrich, 1979; Kuroda & Kitamura, 1984; Kuroda & Fujiwara, 1987; Wakita, 1992; Baber *et al.*, 1995).

O efeito nuclear Overhauser consiste na variação da intensidade do sinal de absorção de um spin nuclear (o) produzida quando o sinal de absorção de outro spin (s) que

interage com o primeiro através de um processo de relaxação dipolar, é saturado (Gil & Geraldés, 1987). Considerando um sistema de dois spins não equivalentes (o e s) com spin $I=1/2$, o NOE de o em relação a s, é dado por:

$$\eta_o(s) = (M_o^s - M_o) / M_o \quad (5)$$

onde: M_o e M_s são as magnetizações de equilíbrio do núcleo o, na ausência e na presença de saturação de s. O NOE reflete a proximidade entre os dois núcleos:

$$\eta_o(s) = \rho_{os} / 2R_o \quad (6)$$

pois ρ_{os} , a velocidade de relaxação dipolar direta entre o e s, depende de r^{-6} (os), isto é, da sexta potência da distância entre esses dois núcleos. R_o é a velocidade de relaxação total do núcleo. Assim, os experimentos de NOE fornecem informações sobre a geometria da molécula ou proximidade intermolecular, no caso de o e s pertencerem a moléculas vizinhas (Gil & Geraldés, 1987).

3.2) Anestésicos locais utilizados

Os anestésicos locais Benzocaína, Lidocaína e Tetracaína foram escolhidos por serem de diferentes famílias químicas, o que permitiu um melhor entendimento da relação estrutura-atividade desses compostos. Eles foram obtidos de indústrias farmacêuticas e usados sem prévio tratamento, conforme segue:

AL	Indústria farmacêutica
Benzocaína	Hoeschst Marion Roussel S.A.
Lidocaína	Apsen Química e Farmacêutica
Tetracaína	Sigma Chem. Co.

A estrutura química dos anestésicos pode ser vista na Fig. 4.

3.3) Preparo de membranas

3.3.1) Preparo de lipossomas

A fosfatidilcolina de ovo (EPC) utilizada foi obtida da Sigma Chemical Co. e preparada por extração em solvente orgânico e separação em coluna de alumina, de acordo com o método de Singleton e col. (1965).

3.3.1.1) Vesículas multilamelares (MLV)

Este tipo de lipossoma foi preparado retirando-se alíquotas de lipídio de solução estoque 65 mM em clorofórmio e evaporando-se sob fluxo de N₂, seguida de vácuo por 2 horas a temperatura ambiente.

Após secagem, adicionou-se o tampão adequado e agitou-se em vórtex por 5 minutos. A dispersão assim preparada apresentou vesículas multilamelares concêntricas de fosfolipídio separadas por cavidades aquosas, que foram utilizadas para estudos de espectroscopia de fluorescência, RPE e para o preparo de lipossomas unilamelares pequenos (SUV) ou lipossomas unilamelares grandes (LUV). O diâmetro deste tipo de vesícula é normalmente maior que 1 µm (Prasad, 1996).

3.3.1.2) Vesículas unilamelares (SUV ou LUV)

Para o preparo de lipossomas unilamelares a partir dos multilamelares utilizamos um sonicador (Sonics & Materials Inc., modelo VC 50, frequência 20 KHz, potência de 50 W) e um extrusor da marca Lipex Biomembranes Inc.

As SUV obtidas por sonicação das MLV foram utilizadas em experimentos de RMN de prótons, ou em experimentos de fluorescência. As LUV obtidas por extrusão das vesículas multilamelares, sob pressão de N₂, foram utilizadas em experimentos de fluorescência. O diâmetro médio das vesículas obtidas nestas condições é de 20 a 50 nm para SUV e 100 a 1000 nm para LUV (determinado de acordo com o tamanho do poro da membrana, no caso da extrusão) (Prasad, 1996).

A sonicação foi feita utilizando-se ciclos alternados (agitação/repouso) de 30 s, durante aproximadamente 15-20 min., dependendo da concentração da amostra. Esta foi mantida em banho de gelo para se evitar oxidações da EPC durante o processo. O titânio residual da sonicação foi eliminado por centrifugação (320xg/30 min.) com resina Chelex (Sigma Chem.Co.).

A extrusão foi realizada a temperatura ambiente, passando-se a amostra de vesículas multilamelares por membranas de tamanho variável (100 e 450 nm). Foram feitas pelo menos 10 passagens da amostra para que o tamanho das vesículas obtidas fosse homogêneo. Isto foi verificado acompanhando-se o espalhamento de luz em

espectrofotômetro a 350 nm até que este, após uma fase de decréscimo, atingisse um valor constante.

3.3.2) Preparo da suspensão de eritrócitos

Utilizamos ratos Wistar isogênicos com idade de 90 dias, obtidos do Biotério Central da UNICAMP, alimentados com ração padrão, água *ad libidum*, e submetidos a jejum 18 horas antes dos experimentos. A coleta de sangue foi feita por punção cardíaca em solução anticoagulante Alsilver (citrato de sódio 0,027 M, NaCl 0,072 M, glicose 0,114 M e ácido cítrico 2,6 mM). As amostras foram centrifugadas a 4 °C por 10 min. a 700xg e o plasma, células da série branca e gorduras foram removidos por aspiração. Os glóbulos vermelhos foram ressuspensos em PBS 5mM (fosfato de sódio 5 mM + NaCl 0,15M a pH 7,4) tampão de osmolaridade e pH fisiológicos, sendo novamente centrifugados nas mesmas condições. Após três repetições consecutivas desse processo obteve-se o concentrado de hemácias, mantido sob refrigeração (4 °C).

3.4) Estudo das propriedades físico-químicas da BZC

3.4.1) Caracterização óptica e de fluorescência

Foram feitas amostras de BZC em tampão PBS 5mM (pH 7,4) em diversas concentrações, a partir de uma solução estoque. Procederam-se a leituras no espectrofotômetro (Beckman, modelo DU 70), varrendo o espectro de UV e do visível.

Uma vez obtidas as absorvâncias no comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) utilizou-se a equação de Lambert-Beer (5) para o cálculo dos valores de ϵ para nossas condições experimentais:

$$\epsilon = A / b.c \quad (7)$$

onde: A = absorvância; c = concentração (M);

b = espessura da cubeta (cm); ϵ = absorvidade molar

Os experimentos de fluorescência foram feitos no espectrofluorímetro SPF-500 (SLM Aminco). Para determinar a fluorescência intrínseca da BZC, as medidas foram feitas a temperatura ambiente. O comprimento de onda de excitação foi 284nm (correspondente a absorção máxima obtida nos experimentos de espectrofotometria) e a emissão foi observada entre 320 e 430nm. As fendas usadas foram de 2,5nm. A concentração de BZC utilizada (2×10^{-5} M) foi escolhida por dar uma leitura adequada em espectrofotômetro.

3.4.2) Solubilidade em tampão

As medidas de solubilidade da BZC foram feitas em pH 7,4, usando-se tampão fosfato 5mM isosmótico, i.e., contendo 0,154M de NaCl (PBS). Para a TTC e a LDC, medidas anteriormente feitas em nosso laboratório foram conduzidas em tampão acetato 0,02M pH 5,0 e tampão carbonato 0,02M a pH 10,5.

Utilizamos soluções de BZC com concentrações crescentes em tampão. As amostras foram centrifugadas a 2200xg por 2 min. em aparelho Sorvall MC 12 V (Du Pont) e a concentração de AL remanescente no sobrenadante foi determinada, por absorção em 284 nm. Um gráfico da absorção vs a concentração de AL mostrou a saturação da fase aquosa, indicando a solubilidade.

3.4.3) Estabilidade

Devido a susceptibilidade dos ésteres à hidrólise, testamos a estabilidade da BZC. A absorção óptica deste AL foi acompanhada em espectrofotômetro entre 200 e 350 nm. As medidas foram feitas a cada 10 min., por um período de 4 horas, a temperatura ambiente e na presença de luz.

3.4.4) Medidas do coeficiente de partição

3.4.4.1) Coeficiente de partição entre octanol e água

Volumes iguais de n-octanol e tampão foram misturados em funil de separação e deixados em equilíbrio durante a noite. As duas fases foram separadas por decantação. Usamos alíquotas deste tampão, previamente saturado com o n-octanol, para preparar soluções de BZC em concentrações adequadas à leitura no UV. Tais amostras foram adicionadas ao n-octanol (também previamente saturado com o tampão) misturadas em vórtex (5 min.) e centrifugadas (1000 xg / 5 min.).

A concentração de AL remanescente na fase aquosa foi determinada por absorção no UV (284 nm). Calculou-se a concentração de BZC no n-octanol pela diferença entre a concentração em água e a concentração total na solução inicial (antes da adição do n-octanol). Conhecendo-se o volume das fases apolar (n-octanol) e polar (água), pudemos calcular o coeficiente de partição (P) da BZC, conforme a equação (8):

$$P(s) = \frac{nm / Vm}{na / Va} \quad (8)$$

onde *s* refere-se ao soluto (no caso a BZC); *n* é o número de moles do soluto e *V* é o volume da fase; *m* e *a* correspondem a fase apolar (em nosso caso o octanol) e polar (aquosa) respectivamente. $nm + na = nt$ (número de moles total do soluto).

3.4.4.2) Coefficiente de partição entre EPC e água, determinado por separação de fases

Vesículas multilamelares (MLV) de EPC foram preparadas como descrito anteriormente. Aliquotas de solução estoque 1 mM de BZC em tampão PBS (pH 7,4) foram adicionadas a suspensão de vesículas, de modo a ter uma leitura adequada a 284 nm (4×10^{-5} M). Após ultracentrifugação (120.000xg por 2h) determinou-se a concentração de anestésico no sobrenadante. A concentração de BZC na membrana foi obtida pela diferença entre a concentração em água e a concentração inicial em vesícula. Conhecendo-se os volumes da fase aquosa e lipídica, o coeficiente de partição (*P*) foi calculado conforme a equação (8). O volume da fase lipídica (*V_a*) foi calculado assumindo-se uma densidade de 1g/mL para a EPC (Lissi *et al.*, 1990).

3.4.4.3) Coefficiente de partição entre EPC e água, determinado por ressonância paramagnética eletrônica

Utilizando a metodologia descrita por Lissi *et al.* (1990) fizemos a determinação do coeficiente de partição da BZC entre vesículas de EPC e água, por medidas de RPE, usando o marcador 5-MeSL. Nesta abordagem, foram feitas várias curvas do efeito desorganizador ($\Delta h_{-1}/h_0$) provocado pela BZC, variando a concentração de membrana (4, 6, 8 e 10 mM). A concentração de BZC variou de 0 a 31 mM.

A partir das curvas de efeito vs número total de moles do soluto, para diferentes concentrações de membrana (transformados para volume), é possível traçar uma reta, com o número total de moles necessários para causar um mesmo efeito. O cálculo do coeficiente de partição é então determinado pela razão inclinação/intercepto da reta obtida (Lissi *et al.*, 1990; de Paula & Schreier, 1995).

Em outra abordagem também descrita anteriormente (de Paula & Schreier, 1995) usamos curvas hiperbólicas do efeito desorganizador, obtidas com uma única concentração de membrana e quantidades crescentes de AL para determinar a concentração de AL (*nt*)

para saturação da membrana (efeito máximo). Como $n_t = n_a + n_m$, usando a equação 8 e admitindo que na saturação da membrana, o número de moles de AL em água (n_a) é igual à solubilidade aquosa do AL (S_w) determinamos P solubilidade, que é o coeficiente de partição decorrente da saturação da membrana, derivada da solubilidade do soluto.

3.5) Interação dos anestésicos locais com membranas

3.5.1) Medidas de fluorescência da BZC na presença de EPC

Foram realizadas medidas de fluorescência com a BZC ($2,5 \times 10^{-5}$ M) em tampão PBS 5mM (pH 7,4) na presença de 10^{-4} M de SUV (com diâmetro aproximado de 20 a 50 nm), LUV (com diâmetro de 450 nm) e lipossomas multilamelares. As amostras foram excitadas no comprimento de absorção máxima da BZC (284 nm) e o espectro de emissão foi lido entre 320 e 430 nm.

Os resultados obtidos (intensidade de fluorescência e $\lambda_{m\acute{a}x}$. de emissão) foram usados para comparação qualitativa de diferentes tamanhos de vesículas no estudo da interação da BZC com bicamadas.

3.5.2) Testes de hemólise induzida pela BZC

O ensaio hemolítico consistiu na adição de concentrações crescentes de BZC (4 a 25 mM) a uma suspensão de hemácias 5% (100 μ L de uma suspensão de hemácias 50% v/v) com obtenção de soluções com um volume final de 1 mL. Realizou-se uma incubação em banho-maria de aproximadamente 40 minutos a 37 °C sob agitação suave e constante. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação por dois minutos a 250xg e a absorbância do sobrenadante foi lida a 540 nm para determinação da hemoglobina livre em solução. Foram realizadas 2 medidas em triplicata para cada concentração de BZC e para os seguintes controles: Controle 1 (C1) = eritrócitos em PBS (controle de hemólise mecânica) e Controle 2 (C2) = eritrócitos em água destilada (controle de hemólise total). Devido às dificuldades obtidas na solubilização da BZC em água, fez-se a sua dissolução em DMSO/água até 8,5 % v/v. Ao controle C1 foi adicionado volume de DMSO correspondente ao maior volume da solução-estoque de BZC usado no teste hemolítico.

O efeito hemolítico pode ser acompanhado medindo-se a concentração de hemoglobina no sobrenadante de acordo com a fórmula (9):

$$A_R = \frac{A_a - A_{c_1}}{A_{c_2} - A_{c_1}} \quad (9)$$

onde A_a , A_{c_1} e A_{c_2} são respectivamente as absorvâncias da amostra e dos controles C_1 e C_2 a 540 nm. Com os valores de A_R calculados, uma curva de hemólise induzida pela BZC foi construída (ver item 4.2.2) e a partir do tratamento dos resultados obtivemos os valores de EL_{50} (concentração de BZC capaz de induzir 50% de hemólise), da concentração máxima de BZC que a membrana suporta sem que haja promoção de hemólise (concentração de saturação da membrana) e da concentração de BZC capaz de induzir hemólise total.

3.5.3) Experimentos de ressonância paramagnética eletrônica

As medidas de RPE foram conduzidas em espectrofotômetro Bruker ER-200, operando em frequência de 9 GHz (3,4 KG) pertencente ao laboratório da Prof^ª Dr^ª Shirley Schreier, do Instituto de Química da USP. Foram utilizadas celas chatas de quartzo para amostras líquidas, com capacidade para 200 μ L. Os experimentos foram feitos a temperatura ambiente.

Os marcadores de spin utilizados nos experimentos de RPE foram os ésteres metílicos dos ácidos 5, 7, 12 e 16-doxil esteárico (5, 7, 12 e 16-MeSL) da Sigma Chemical Co. (Fig.6). Algumas medidas foram feitas com o marcador ácido 5-doxil esteárico (5-SASL, Sigma Chemical Co.)

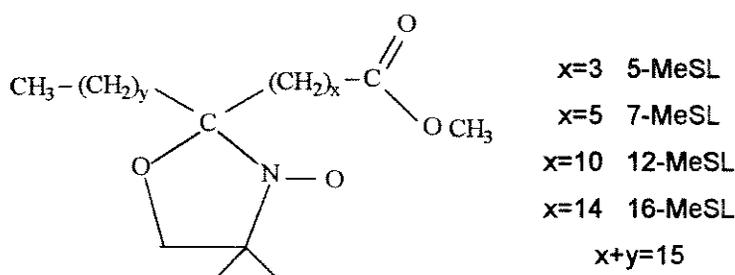


Fig. 6 Estrutura dos marcadores de spin metil estearato (MeSL).

Medimos o efeito dos três AL sobre o grau de organização da membrana utilizando os marcadores 5, 7, 12 e 16-MeSL, pela alteração do parâmetro empírico h_{+1}/h_0 . Este parâmetro é a razão das alturas dos picos de campo baixo, h_{+1} e médio, h_0 (Fig.5-b) e é usado como uma medida do grau de organização da membrana, compreendendo com isso efeitos de

ordem e mobilidade das moléculas na bicamada - ver item 3.1.1 desta tese (Frezzatti *et al.*, 1986; Schreier *et al.*, 1984).

O efeito máximo dos AL estudados, em bicamadas de EPC multilamelares, pôde ser medido pela variação (h_{-1}/h_0) da amostra em relação a um controle sem anestésico (equação 3).

A concentração de EPC utilizada foi de 8 mM e a concentração de AL variou conforme segue: BZC (0 a 31 mM), LDC (0 a 40 mM) e TTC (0 a 15 mM). As medidas foram feitas com os AL na sua forma desprotonada em pH 7,4 (BZC) e 10,5 (LDC e TTC). Devido à baixa solubilidade aquosa da BZC, usamos misturas de dimetilsulfóxido (DMSO) em água como solvente, nas proporções máximas de 8,5% v/v. Foram feitos controles (brancos) para se descartar o efeito do DMSO nas membranas de EPC estudadas. A solução estoque de TTC foi preparada em água para que a solubilidade desta aumentasse (maior proporção da forma protonada, que é mais solúvel).

Antes do uso do marcador MeSL, fizemos medidas com 5-SASL para observar o grau de ordem da membrana. O marcador foi utilizado numa proporção de 1 mol% e a concentração de vesículas foi de 5 mM. Para solubilizar a BZC foi preparada uma solução estoque desta em etanol. Esta abordagem não mostrou-se satisfatória, levando a substituição do solvente por uma mistura DMSO:água.

3.5.4) Experimentos de ressonância magnética nuclear de prótons

Após incorporação dos AL sólidos às SUV (preparadas em tampão carbonato liofilizado 0,02M, pH 10,5 e ressuspenso em água deuterada - Sigma Chemical e Co.) pôde-se obter espectros de ^1H RMN, após as amostras serem submetidas a um fluxo de N_2 , para degaseificação.

Foram feitos espectros da EPC, dos 3 AL e do sistema AL:EPC (1:3, mol:mol) para comparação. A concentração de EPC usada foi de 65 mM. As medidas foram realizadas num espectrômetro Varian Gemini 12000 300 MHz, pertencente ao Instituto de Química da UNICAMP e num espectrômetro Bruker DRX 500 MHz, pertencente ao Instituto de Química da USP. Algumas medidas foram realizadas pela Profa. Dra. Eneida de Paula, num espectrômetro Bruker 400 MHz, pertencente ao Instituto di Chimica Biologica, da Università Degli Studi di Parma, Itália.

Medidas do tempo de relaxação longitudinal, T_1 , foram feitas em condições similares, porém a $t = 30$ °C. A sequência de pulsos empregada é a de recuperação do sinal invertido (programa DOT₁ da Varian e T₁ir da Bruker):

$$\pi_x - t_1 - \pi / 2_y - t_2 - \text{aquisição} \quad (10)$$

As medidas de T_1 foram conduzidas em pares controle (SUV) e tratado (SUV + AL) dada a instabilidade das vesículas sonicadas a 30 °C, se deixadas de um dia para outro.

Também foram feitas medidas de 2D-NOE, através da seqüência de pulsos ROESY, da EPC na presença dos três anestésicos estudados. O ROESY consiste em NOE em duas dimensões com "rotating frame" e é indicado para sistemas biológicos devido ao tempo de aquisição do espectro e de processamento dos resultados. Estas medidas foram feitas usando-se os mesmos parâmetros de temperatura e concentração das medidas de T_1 . A seqüência de pulsos utilizada nas medidas de ROESY (programa ROESYPRSH) é a seguinte:

$$\text{(preparação) } \pi / 2 \text{ -- (evolução) -- } \pi / 2 \text{ -- } \tau_m \text{ (mistura) -- } \pi / 2 \text{ -- } t_2 \text{ (detecção)} \quad (11)$$

Esta seqüência refere-se ao NOESY, sendo que no ROESY o efeito nuclear Overhauser é causado pela relaxação medida no "rotating frame" T_1 (Derome, 1987).

Os espectros de 2D foram processados e manipulados usando o programa 2D-WINNMR da Bruker, numa versão para PC ou na própria estação de trabalho (equipamento de RMN).

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente descrevemos resultados referentes a BZC, aqui caracterizada quanto a propriedades físico-químicas e alguns parâmetros de interação com membrana. Numa segunda etapa passamos a comparar os resultados obtidos com os três AL estudados, pelas técnicas de ressonância eletrônica e nuclear.

A necessidade do estudo de algumas características físico-químicas da BZC veio da intenção de observarmos seu comportamento em condições semelhantes às descritas anteriormente para LDC e TTC. Além do mais, pudemos ajustar as medidas às nossas condições experimentais.

4.1) Estudo das propriedades físico-químicas da BZC

4.1.1) Caracterização óptica e de fluorescência

O espectro óptico da BZC foi obtido, observando-se o comprimento de onda de máxima absorção em 284 nm (Fig.7).

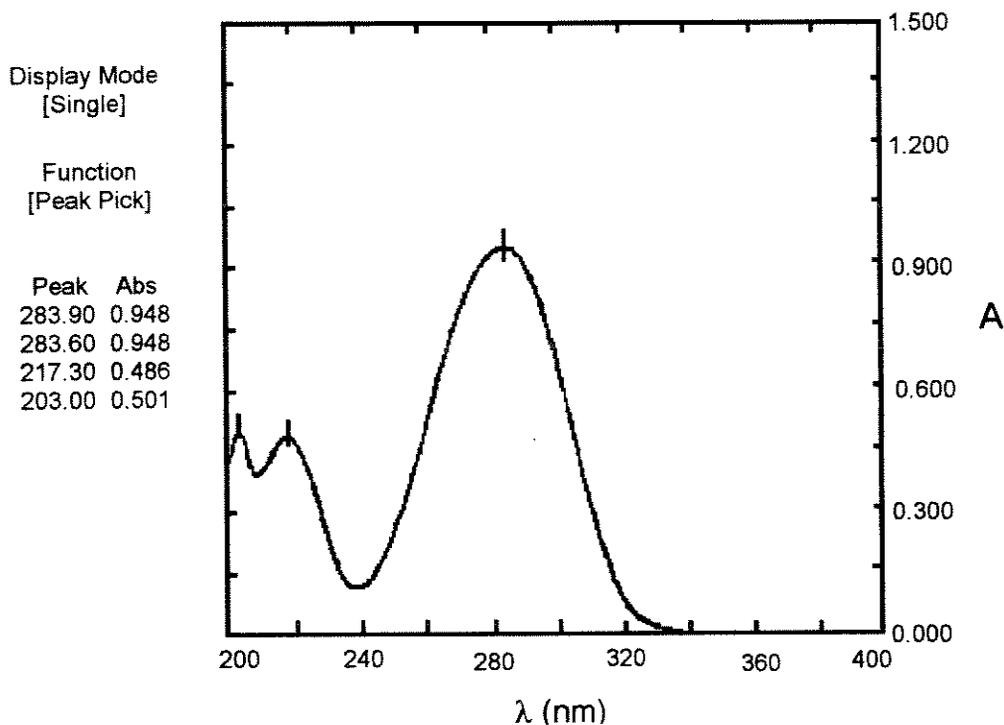


Fig.7 Espectro de absorção da BZC ($6 \times 10^{-5}M$) entre 200 e 400 nm, em pH 7,4.

Outros ésteres aromáticos, derivados do ácido benzóico apresentam pico máximo de absorção nessa mesma região, como a procaína e clorprocaína (290 nm para a forma protonada e 287 nm para a forma neutra) e a tetracaína (310 nm para a forma protonada e 307 nm para a forma neutra) com coeficiente de absorvidade molar, ϵ na faixa de 15000-25000 (de Paula & Schreier, 1995).

A Fig.8 mostra uma curva de calibração para a absorção da BZC em 284 nm. O valor obtido de ϵ foi de: $15853 \pm 0,00291$ (Tabela 1).

Este valor de ϵ foi calculado a partir da reta da Fig. 8, utilizando-se a média das absorbâncias obtidas em 8 experimentos feitos para determinação da solubilidade da BZC, em concentrações inferiores à solubilidade.

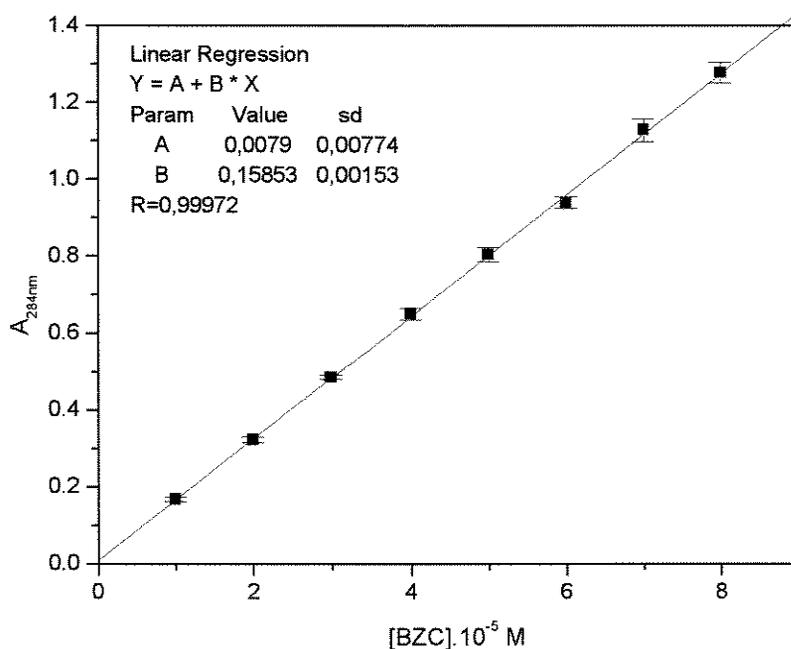


Fig.8 Determinação do coeficiente de absorvidade molar da BZC a 284 nm, em tampão PBS 5 mM, pH 7,4 e temperatura ambiente.

Conhecendo-se as semelhanças estruturais entre os anestésicos locais BZC e TTC, determinamos as propriedades de fluorescência da BZC. Como ilustra a Fig. 9, a BZC apresenta emissão máxima de fluorescência em 353 nm, quando em tampão.

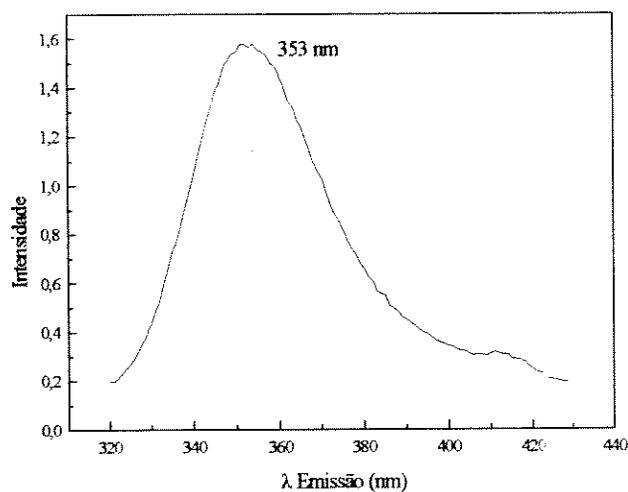


Fig.9 Espectro de emissão da BZC entre 320nm a 430 nm. λ excitação = 284 nm. Solução de BZC $2,5 \cdot 10^{-5}$ M em PBS 5mM pH 7,4 a temperatura ambiente. λ emissão máx. = 353 nm.

4.1.2) Solubilidade em tampão (Sw)

A solubilidade do anestésico local BZC em tampão PBS 5 mM (pH 7,4) foi obtida pela interseção das retas na Fig.10. A solubilidade determinada foi $4,4 \times 10^{-3}$ M (Tabela 1):

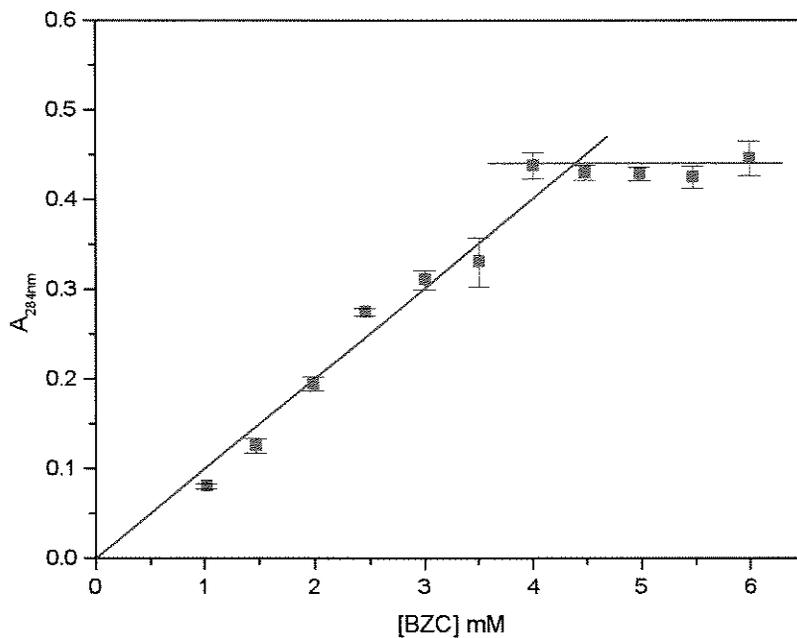


Fig.10 Curva de solubilidade do anestésico BZC, em tampão PBS 5 mM, pH 7,4 e temperatura ambiente.

4.1.3) Estabilidade

A Benzocaína demonstrou estabilidade química, verificada opticamente, por um período de até 4h a temperatura ambiente, na presença de luz, o que foi acompanhado pela ausência de mudanças no seu espectro de absorção em 284nm. Este resultado está de acordo com o descrito na literatura, segundo a qual sua ligação éster tem boa estabilidade química (Strichartz *et al.*, 1990; Brosowski & Müller, 1994).

A TTC, outro AL com grupamento éster, é bastante estável, mesmo em pH alcalino (Boulanger *et al.*, 1980; Covino & Vassalo, 1985; de Jong, 1994). Já a PRC e a CLP sofrem hidrólise alcalina significativa em aproximadamente 1 hora. (Covino & Vassalo, 1985).

Os valores das propriedades ópticas (ϵ , λ máx.) e da solubilidade da BZC, estão listados na Tabela 1, onde pode-se comparar os parâmetros físico-químicos deste AL com os da LDC e TTC desprotonadas, determinados anteriormente (de Paula & Schreier, 1995).

Tabela 1 Comprimento de onda de máxima absorção, coeficiente de absorvidade molar e solubilidade aquosa dos anestésicos estudados. A LDC e a TTC estão na forma desprotonada, pH 10,5. Valor de pKa da LDC e TTC.

AL	$\lambda_{\text{máx.}}(\text{nm})$	ϵ (M)	S_w (mM)	pKa
Benzocaína	284	15853	4,4	--
Lidocaína	262	420	13,1	7,8
Tetracaína	307	24900	0,76	8,5

4.1.4) Medidas do coeficiente de partição

4.1.4.1) Coeficiente de partição entre octanol/água (P_{oct})

O valor do coeficiente de partição (P_{oct}) da BZC em temperatura ambiente foi calculado em $37,82 \pm 6,1$ ($n=7$), entre n-octanol e tampão PBS, pH 7,4, usando a equação 8. É comum se expressar este valor na forma logarítmica, que fica então em 1,58. Esta medida está de acordo com dados da literatura: 1,44 e 1,91 a 25 °C (Strichartz *et al.*, 1990; Grouls *et al.*, 1997, respectivamente).

O valor absoluto de P_{oct} não leva em consideração a interação da molécula com um meio apolar ordenado como as membranas. Porém, ele nos dá boa indicação da hidrofobicidade da molécula ao compararmos os valores obtidos com outras moléculas da mesma família química.

4.1.4.2) Coeficiente de partição entre EPC e água (P_{epc}), por separação de fases

O coeficiente de partição entre EPC e água, por separação de fases, foi calculado como 253 ± 43 ($n=7$) usando a equação 6, conforme descrito em métodos.

A determinação de P_{epc} por esta técnica, tem sido criticada devido a problemas experimentais como a co-sedimentação do soluto ou EPC remanescente no sobrenadante. Sendo assim, fizemos a determinação do coeficiente de partição entre vesículas multilamelares de EPC e água, usando medidas de RPE.

4.1.4.3) Coefficiente de partição entre EPC e água, determinado por RPE (Prpe)

Através da técnica de RPE, e usando metodologia descrita por Lissi *et al.* (1990) pudemos obter um valor de coeficiente de partição.

Este resultado da BZC entre EPC e água, foi usado na comparação do efeito dos três AL na membrana, quando inseridos numa mesma concentração molar na bicamada.

Usando quatro concentrações de EPC, construímos curvas de efeito vs nt (concentração de BZC) e determinamos valores de n^o de moles totais (nt) de benzocaína, nos quais o efeito era o mesmo. Pelo gráfico de nt vs Vm (concentração de membrana, convertida para volume) obtivemos P_{rpe} pela inclinação da reta. O valor obtido foi de 115 ± 17 (Fig.11-a e b). Este valor baixo de P_{rpe} reflete o uso de DMSO/água para solubilizar a BZC nos experimentos de RPE. Neste caso, o meio “aquoso” torna-se mais atraente para a BZC e a partição na membrana diminui.

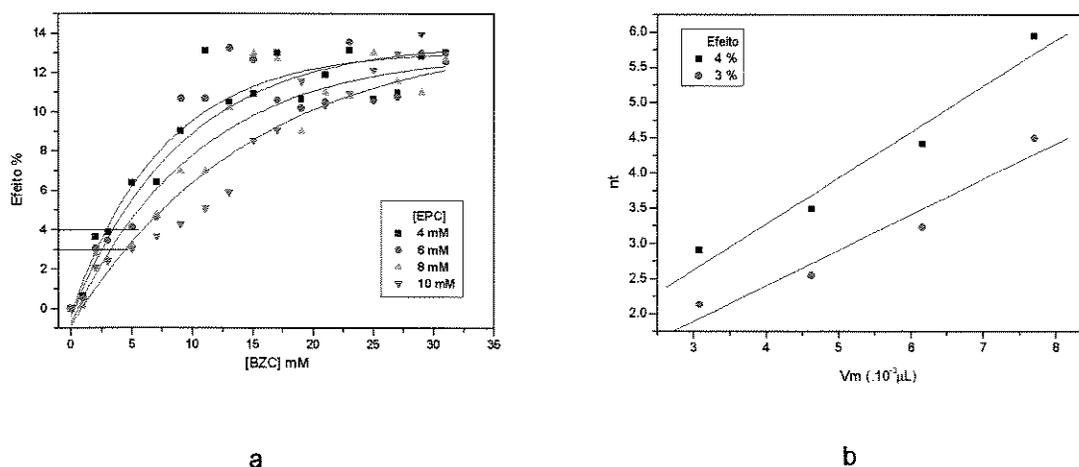


Fig 11 Experimento de RPE para cálculo do coeficiente de partição da BZC a) Efeito da BZC com diferentes [EPC]. A barra de erro foi suprimida para maior clareza, n=2; b) n^o de moles vs volume de membrana, da inclinação da reta foram tirados os valores de P.

4.1.4.4) Determinação de P por saturação da membrana, em medidas de RPE (Psolubilidade)

Essa metodologia foi descrita anteriormente em nosso laboratório e constitui um método bastante simples para determinação do coeficiente de partição, podendo utilizar quaisquer medidas espectroscópicas que indiquem alterações na membrana, em função da partição (de Paula & Schreier, 1995). Para tanto é necessário conhecer a solubilidade aquosa do soluto (S_w), que deve ser suficientemente baixa para que seja alcançada nas condições experimentais. Neste caso, o efeito máximo na membrana, E_{max} , acontece na solubilidade

aquosa do soluto, e concentrações superiores não apresentam efeito. Como P é uma constante termodinâmica, uma vez atingida a solubilidade aquosa, o soluto não pode mais particionar na fase membranar. Efeito parecido foi descrito por Hill (1974), estudando a partição de n-álcoois e anestésicos gerais em vesículas de DPPC. Pringle e col. (1980) observaram que o efeito de n-álcoois em neurônios de girino aumentava com o tamanho da cadeia acila, até 12 carbonos; depois, um efeito "cut-off" acontecia e n-álcoois de cadeia mais longa (e $S_w < 10^{-6}$ M) apresentavam efeitos iguais ou mesmo menores que os de cadeia curta. Jones & Lee (1985) estudando a partição de inseticidas do tipo hexacloroetano em vesículas de DOPC também relataram que a partição seria limitada pela saturação da fase aquosa, e não da fase lipídica, e que a concentração máxima de inseticida na membrana não correspondia a saturação dos sítios de ligação disponíveis.

Numa análise termodinâmica do coeficiente de partição, Hill (1974), derivou a seguinte equação:

$$K_{\text{binding}} \times S_w = 2 \quad (12)$$

(concentrações em mol/soluto por mol/solvente), para o caso ideal. K_{binding} é constante de ligação e se relaciona com o coeficiente de partição (P) através do volume molar (\bar{V}) do lipídio, onde:

$$K_{\text{binding}} = P \cdot \bar{V} \quad (13)$$

Para a EPC o volume molar parcial é de 0,770.

Assim, podemos calcular o produto $K_{\text{binding}} \times S_w$ para os três AL estudados:

Tabela 2 Partição não ideal dos AL. Cálculo de $K_{\text{binding}} \times S_w$ para a ligação dos AL com membranas de EPC

AL	P_{epc}	$K_{\text{binding}} (M^{-1})$	$S_w (.10^{-3}M)$	$K_{\text{binding}} \times S_w$
Benzocaína	253	194,81	4,4	0,86
Lidocaína	144 *	110,88	13,1 *	1,45
Tetracaína	868 *	668,4	0,76 *	0,51

* de Paula & Schreier, 1995.

Hill observou que o produto 2 era obtido para álcoois de cadeia par, enquanto que valores menores que 2 eram observados quando o número de carbonos na cadeia era ímpar.

No caso dos AL o produto é sempre menor que 2, indicando que a partição é não-ideal. Relatamos valores próximos a 2 para AL com maior solubilidade aquosa como a LDC (1,45) e Prilocaina (1,96); já para a TTC, $K_{\text{binding}} \times S_w = 0,51$ em pH10,5 (de Paula & Schreier, 1995). Determinamos aqui, para a BZC, um produto igual a 0,86. Este resultado indica partição não ideal da BZC e justifica a determinação do coeficiente de partição pelo método da solubilidade.

Embora neste caso a medida de P_{sol} ofereça ainda uma estimativa (já que S_w é maior que 4,4 mM na presença do solvente DMSO) o valor obtido ($P_{\text{sol}}=113,6$) é coerente com o obtido por RPE ($P_{\text{rpe}}=115$).

Abaixo, foi feita uma Tabela relacionando os coeficientes de partição encontrados para a BZC pelos métodos descritos acima.

Tabela 3 Coeficientes de partição da BZC, obtidos por diferentes métodos.

AL	Poct	Pepc	Prpe	Psol
Benzocaína	37,82	253	115	113,6

Como podemos ver pela tabela acima, o valor absoluto de Poct é muito diferente dos valores de coeficiente de partição obtidos para o sistema EPC/água pelos diferentes métodos. Esta medida, apesar de clássica, deve ser usada com cuidado, pois fornece apenas a indicação da hidrofobicidade do soluto em um sistema apolar como o n-octanol. De fato, o conhecimento do valor de Poct da BZC foi usado inicialmente para estimar Pepc. Este valor estimado (312) obtido de uma correlação com valores conhecidos de três anestésicos, foi usado para o cálculo da razão molar AL:EPC, nas primeiras medidas de RMN. Ao medirmos Pepc obtivemos um valor coerente com o anteriormente estimado, validando as medidas iniciais com este valor.

As medidas por RPE (Pepr e Psol) foram feitas na presença de 8,5 % de DMSO elevando a solubilidade aquosa e diminuindo o coeficiente de partição da BZC nessas condições (ver discussão no item 4.2.3.4).

4.2) Interação dos anestésicos locais com membranas

4.2.1) Medidas de fluorescência da BZC na presença de EPC

Para comparar os resultados obtidos por RPE e RMN com vesículas multilamelares grandes e unilamelares pequenas respectivamente, investigamos as propriedades de fluorescência da BZC já que por essa técnica poderíamos utilizar vários tamanhos de vesícula.

Através da fluorescência intrínseca da BZC pudemos avaliar a sua interação com vesículas de EPC (SUV, LUV com diâmetro de 0,1 μm e 0,45 μm , e MLV). A BZC teve sua intensidade de fluorescência aumentada quando na presença de qualquer uma das membranas utilizadas e apresentou um deslocamento no seu λ de emissão máximo (SUV > LUV > MLV) para o azul (Fig. 12). Esses resultados são indicativos de que o fluoróforo deslocou-se para ambiente de menor polaridade e provavelmente está protegido da supressão do oxigênio, explicando o aumento da intensidade de fluorescência.

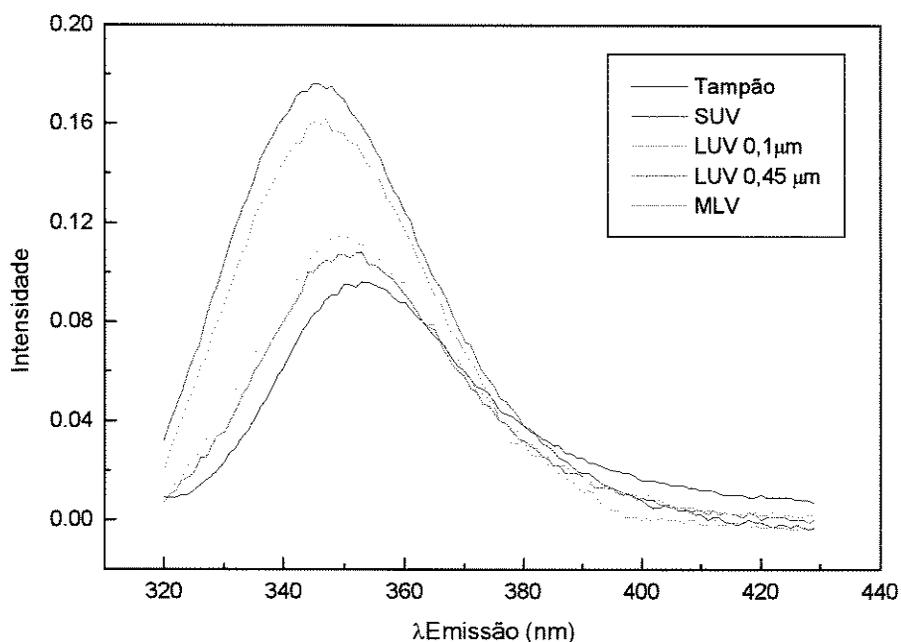


Fig. 12 Espectros de fluorescência da BZC em PBS e em lipossomas uni e multilamelares. [BZC]= $1,85 \times 10^{-5}$ M; [SUV]= 0,5 mM; [LUV]= 0,2 mM (Diâmetro= 0,1 μm); [LUV]= 0,07 mM (Diâmetro= 0,45 μm); [MLV]= 0,1 mM; λ exc= 284 nm; temperatura ambiente.

As medidas de fluorescência nos forneceram dados qualitativos da inserção da BZC em vesículas de diferentes tamanhos. O que pôde-se observar foi um aumento no rendimento quântico da fluorescência depois que esta se inseriu num meio mais apolar. A tendência ao deslocamento do λ emissão máximo para comprimentos de onda menores (blue-shift) também foi verificada.

Em relação aos diferentes tamanhos de vesículas usadas, o que se observou foi um rendimento quântico crescente, conforme o tamanho das vesículas foi diminuindo. Isto provavelmente se deve ao fato da BZC se inserir diferentemente em vesículas pequenas, por causa da curvatura maior destes lipossomas. Não se observou diferença considerável das vesículas multilamelares para LUV 0,45. Essas medidas são qualitativas, pois para evitar a dispersão de luz não pudemos trabalhar com concentrações de membranas superiores a 1 mM. As diferentes concentrações usadas neste experimento devem-se a uma tentativa de ajustar a concentração a uma leitura de absorção adequada (na qual não ocorra dispersão de luz). Nessas condições, uma pequena fração de BZC está incorporada na membrana e não sabemos se a partição é a mesma nas vesículas de diferentes tamanhos, para comparar os resultados entre elas. De qualquer forma as medidas de fluorescência mostraram que a BZC interage com as membranas modelo grandes e pequenas, que foram então estudadas por RPE e RMN, respectivamente.

4.2.2) Testes de hemólise induzida pela BZC

Esses ensaios foram usados para estudo do efeito dos anestésicos, aplicando nossos conhecimentos adquiridos com o sistema AL:lipossomo, a membranas biológicas.

O efeito hemolítico da BZC na estabilidade isosmótica de eritrócitos é apresentado na Fig.13. A BZC adicionada à suspensão de hemácias causa hemólise concentração-dependente. Na Fig. 13 determinamos a concentração de BZC para saturação da membrana (A), para 50% de hemólise (EL_{50}) e para hemólise total (B) ou solubilização da membrana. Em hematócrito 5% essas concentrações correspondem a 17,42 mM, 19,44 mM e 21,69 mM, respectivamente. No hematócrito de 0,5%, EL_{50} = 15,64 mM. Este hematócrito foi feito para que pudéssemos comparar com os dados da LDC e TTC. A absorbância relativa lida em 540 nm (A_{R540}) foi calculada pela equação 9.

Para esses ensaios a BZC foi diluída em DMSO:H₂O até a razão de 8,5% (v:v) a fim de que se atingissem concentrações superiores a 4,4 mM. Não foi observado efeito lítico do DMSO nessas condições.

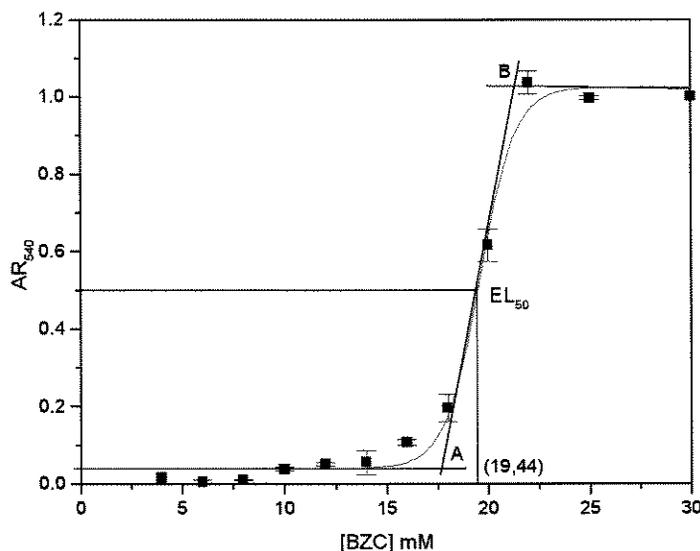


Fig. 13 Curva de Hemólise induzida por BZC em PBS 5mM pH 7,4, Ht = 5% (v/v); EL₅₀ (50% de efeito lítico). A = 17,42 mM- Concentração de BZC para saturação da membrana ; B = 21,69 mM- Concentração de BZC para hemólise total.

O estudo do efeito hemolítico comprova a importância de parâmetros hidrofóbicos na determinação do efeito biológico, i.e., da ação lítica sobre eritrócitos. Para a BZC o valor de EL₅₀ (definido como a concentração de anestésico capaz de produzir 50% de hemólise), situa-se entre os da TTC (mais hidrofóbica) e LDC (mais hidrofílica), como mostra a Tabela 4. Desta forma, podemos dizer que o efeito hemolítico, assim como a potência anestésica é diretamente proporcional ao coeficiente de partição dos AL, nos ensaios em pH 7,4. Essa e outras evidências do importante papel da hidrofobicidade na interação de AL com membranas e portanto, em seu efeito biológico, nos levaram a analisar especificamente a interação da forma desprotonada dos anestésicos com as membranas modelo.

Tabela 4 Efeito Hemolítico de diferentes anestésicos locais em condições isosmóticas, Ht= 0,5%, pH 7,4. Valores de EL₅₀ determinados em gráficos como o da Fig.13. LDC e TTC, comunicação pessoal da Dra. Eneida de Paula, resultados não publicados.

Anestésico Local	EL ₅₀ (mM)
Benzocaína	15,64
Lidocaína	47,60
Tetracaína	6,98

4.2.3) Experimentos de ressonância paramagnética eletrônica

Medidas de RPE possibilitaram avaliar a ação dos AL nas propriedades estruturais e dinâmicas dos lipídios em lipossomas multilamelares de EPC, usando marcadores em diferentes posições da bicamada. Foram feitas pelo menos 2 medidas de cada experimento.

Devido à baixa solubilidade da BZC em água, as amostras foram preparadas a partir de uma solução estoque em DMSO. Foram feitos controles (brancos) com DMSO para se descartar seu efeito na organização das bicamadas. Antes de optarmos pelo uso do DMSO como solvente, havíamos testado o etanol, porém verificamos que o seu efeito desorganizador nas membranas de EPC era relevante. Substituímos então, este solvente pelo DMSO (em concentração máxima de 8,5 % v/v, ou 1,1 mM), obtendo melhores resultados. O DMSO não altera a organização de membranas de EPC nas concentrações usadas, de acordo com o observado por Quan e col. (1996) que usou misturas de DMSO para solubilizar a BZC em estudos eletroquímicos com canais iônicos em cultura de células GH₃. Em outro estudo usando cultura de células para medir o aumento de cálcio intracelular, Li *et al.* (1995) utilizaram DMSO para dissolver a BZC, LDC, TTC e Bupivacaína, não observando nenhum efeito nas condições usadas. Além disso, nossos ensaios de hemólise mostram que o DMSO não desestrutura as membranas de eritrócito (resultados não mostrados).

4.2.3.1) Efeito da Benzocaína no parâmetro de ordem

Inicialmente utilizamos o marcador 5-SASL para observar o grau de ordem (S) da bicamada, como já descrito em métodos (equação 2). Esta abordagem não se mostrou satisfatória pois, apesar de observarmos um decréscimo do parâmetro de ordem (demonstrando uma desorganização da membrana) o efeito foi pequeno (< 10%), e somava-se ao efeito do próprio etanol (Fig.14). O parâmetro de ordem S, calculado conforme a equação (2) variou de 0,68 para 0,63 (7,4%) na presença de 15 mM de BZC e 0,66 a 0,63 (4,5%) nas amostras controles (brancos) do etanol. Para comparação podemos citar que a variação máxima de S, observada em vesículas multilamelares de EPC contendo 5-SASL é de 11,4% para a LDC (de Paula & Schreier, 1995). Na tentativa de caracterizar o efeito da BZC sobre a organização de membranas lipídicas procuramos outros marcadores de spin que fossem mais sensíveis ao efeito desse AL.

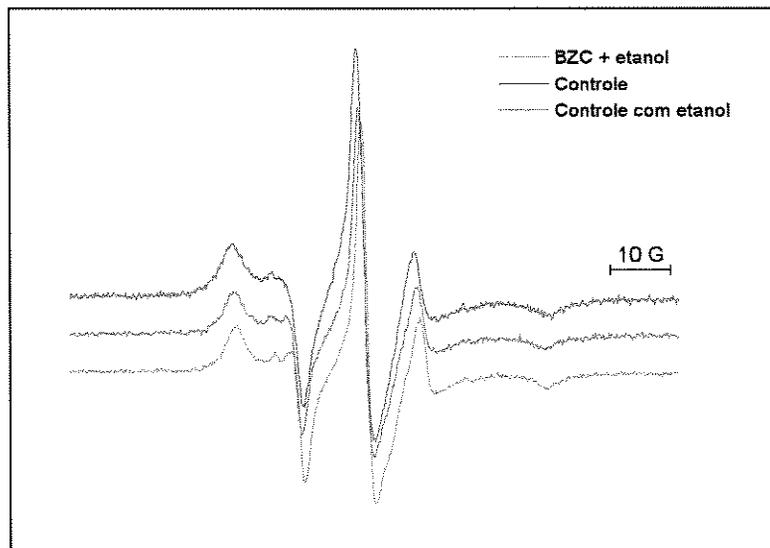


Fig.14 Espectro de RPE do marcador 5-SASL, em vesículas multilamelares de EPC (5mM) na presença de BZC (15 mM) solubilizada em etanol. Tampão PBS, pH 7,4, temperatura ambiente.

4.2.3.2) Medidas com o marcador 5-MeSL

Optamos pelo uso do marcador MeSL que não fornece a medida do parâmetro de ordem mas nos indica o grau de organização da membrana (um parâmetro misto que envolve ordem e mobilidade dos fosfolípidios) através da medida das alturas dos picos h_{+1}/h_0 - ver item 3.1.1 e Fig.5-b. Pudemos assim observar um decréscimo na organização da bicamada (aumento da fluidez) e verificar que o DMSO, nas concentrações usadas, não provoca um efeito significativo na membrana (Fig.15 e 16).

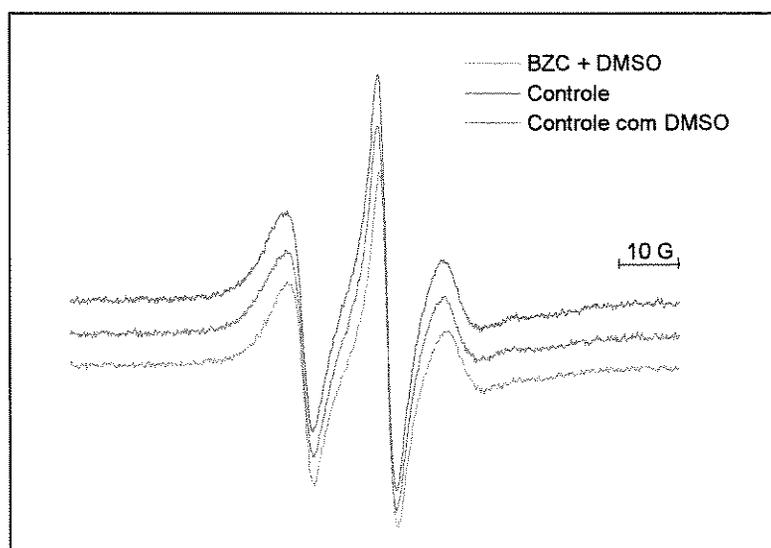


Fig.15 Espectro de RPE do marcador 5-MeSL, em vesículas multilamelares de EPC (8mM) na presença de BZC (15 mM), solubilizada em DMSO. Tampão PBS, pH 7,4, temperatura ambiente.

Essas medidas mostraram o efeito da BZC em aumentar a fluidez das bicamadas lipídicas, confirmando observações anteriores por ^2H -RMN para a TTC e a PRC (Boulanger, 1980 e 1981) e por RPE para análogos da TTC (Bianconi *et al.*, 1988) e nove AL do tipo amino-éster e amino-amida em vesículas de EPC (de Paula & Schreier, 1995).

A Fig. 17 - a,b mostra a variação percentual de h_{+1}/h_0 por efeito da LDC e TTC.

O efeito máximo de perturbação da bicamada usando [EPC]=8 mM, determinado pela inflexão da curva da Fig. 16 foi de 11,6% (BZC) enquanto para LDC e TTC desprotonadas, encontramos 26,0% e 17,1% respectivamente (Fig.17).

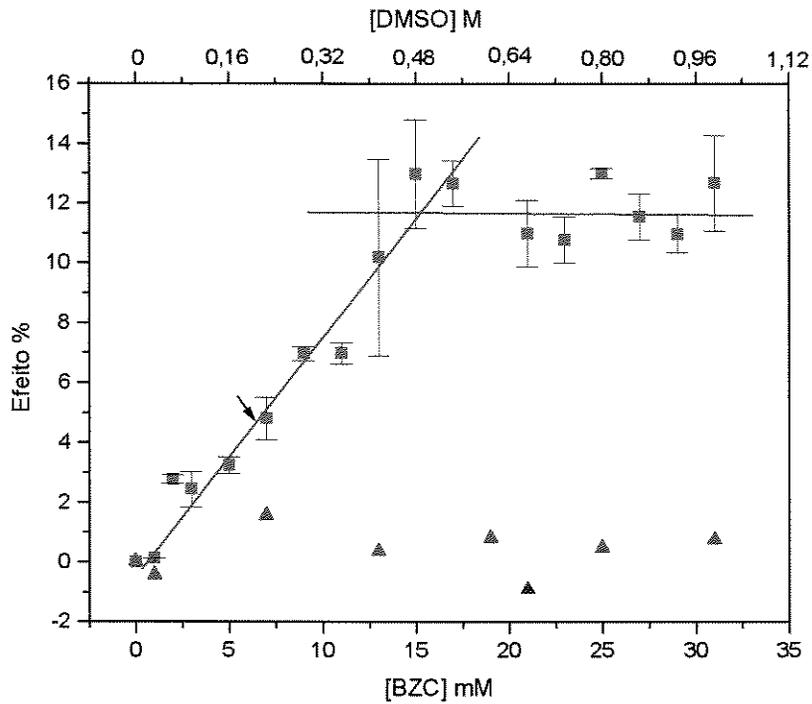
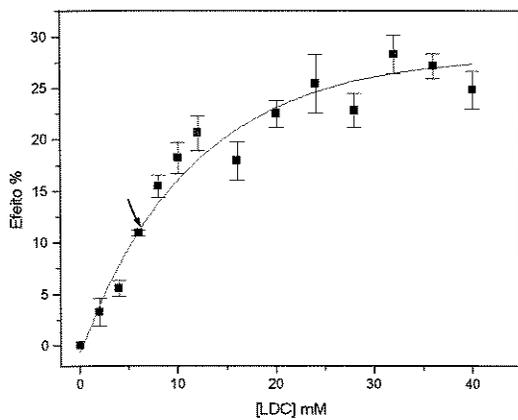
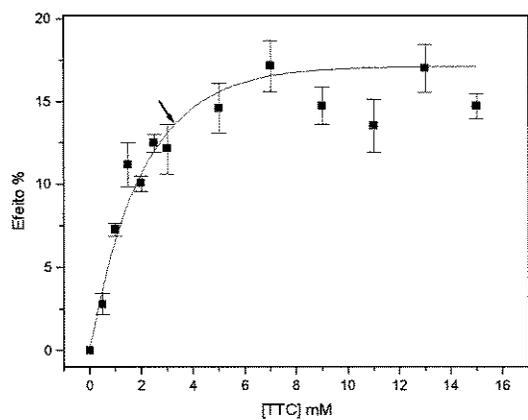


Fig.16 Experimento de RPE com marcador 5-MeSL - Efeito da BZC em vesículas multilamelares de EPC (8mM), pH 7,4, temperatura ambiente (■). O controle utilizando somente DMSO está em vermelho (▲). A seta indica relação molar 1:3 AL:EPC na membrana.



a



b

Fig. 17 Experimento de RPE com marcador 5-MeSL - Efeito observado em vesículas multilamelares de EPC (8mM). a) Curva de efeito provocado pela Lidocaína; b) Curva de efeito provocado pela Tetracaína. Tampão carbonato 0,02M, pH 10,5, temperatura ambiente. A seta indica a relação molar 1:3 AL:EPC na membrana.

Em estudo anterior relatamos efeitos máximos de 26,5 e 15%, respectivamente para a LDC e TTC (de Paula & Schreier, 1995) em 16 mM de EPC. Utilizando 8 mM de EPC obtivemos resultados semelhantes. Esses dados reforçam a observação de que a LDC é o AL mais efetivo na desorganização da bicamada, monitorada pelo 5-MeSL.

Propusemo-nos então monitorar diferentes regiões da bicamada, com marcadores do tipo MeSL em diferentes profundidades. Além disso, analisamos quantitativamente o efeito dos três AL estudados, em relação à quantidade do AL na membrana capaz de provocar o efeito medido por RPE.

Conhecendo os valores de P_{rpe} pudemos comparar os efeitos dos três AL, quando presentes na mesma concentração na membrana. As setas indicativas nas Fig. 16 e 17, mostram os efeitos para a razão molar 1:3 AL:lipídio. Estes resultados estão discutidos em conjunto mais adiante (item 4.2.3.4).

4.2.3.3) Medidas com 7, 12 e 16-MeSL

Foram feitas medidas do efeito provocado pela adição dos anestésicos, utilizando marcadores de spin em outras posições (nos carbonos 7, 12 e 16 do MeSL). Esta abordagem teve como objetivo verificar a inserção das drogas em diferentes profundidades da bicamada.

Podemos notar, pelos gráficos de efeito para cada anestésico (Fig. 18, 19 e 20), as diferenças na inserção dos anestésicos, em cada posição. Os resultados obtidos com o marcador 5-MeSL também são apresentados, para comparação.

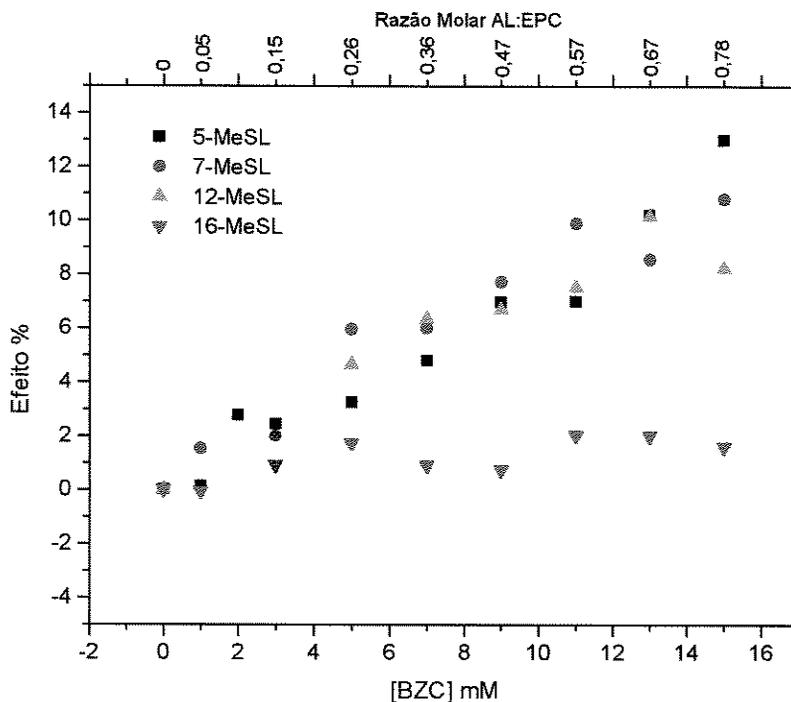


Fig. 18 Experimento de RPE - Efeito da BZC medido em diferentes profundidades nas vesículas multilamelares de EPC (8 mM). Comparação do efeito com marcadores 5, 7, 12 e 16 MeSL. pH 7,4, temperatura ambiente.

A BZC parece diminuir a organização da membrana de forma homogênea para os marcadores 5, 7 e 12 MeSL (Fig.18). O marcador 16-MeSL não mostrou-se sensível a alterações de organização provocada por qualquer dos AL estudados, e mais particularmente para a BZC (efeito máximo de 2% enquanto para LDC e TTC tem-se 4,4 e 3 %, respectivamente). Esse resultado poderia ser explicado por uma inserção não preferencial no interior da bicamada, justificada pois a BZC, ao contrário da LDC e TTC, não possui um grupamento amina e a polaridade da molécula é determinada somente pelo seu grupamento éster. Assim, apesar de ser menos hidrofóbica que a TTC, ela poderia não se ancorar firmemente à cabeça polar dos lipídios, aprofundando-se na bicamada com pouca definição de localização preferencial, i.e., a BZC flutuaria bem entre regiões de baixa polaridade explicando o efeito similar entre os marcadores 5, 7 e 12 MeSL. Dos três AL estudados, somente a BZC tem efeito a nível do marcador 12-MeSL em proporção igual a das posições superiores.

Em relação à polaridade e inserção na membrana um bom exemplo a citar são os marcadores ácido doxil esteárico (SASL) e seus ésteres metílicos (MeSL). O espectro de RPE do 5-SASL em membrana tem resolução espectral para determinação do parâmetro de ordem S porque o radical nitróxido está situado abaixo das carbonilas (carbonos α e β) da cadeia acila, i.e., na região de maior imobilidade das membranas (Godici & Landsberger,

1974; Ellena *et al.*, 1988). A metilação do ácido esteárico marcado na posição 5 (5-MeSL) leva à perda de resolução espectral, indicando que o N-O observa região menos orientada (mais profunda) da bicamada (Smith & Butler, 1976) por efeito da perda do grupamento carregado que o ancorava na interface aquosa da membrana (Schreier *et al.*, 1978; Frezzatti *et al.*, 1986).

No entanto, a pouca hidrofobicidade da BZC e seu grupo éster polar não devem torná-la propensa a residir no interior hidrofóbico da membrana. Neste caso, outra possibilidade de localização para este AL seria um posicionamento superficial (ao nível do glicerol ou cabeça polar) pouco perceptível para os marcadores de RPE inseridos na cadeia acila.

Estes resultados de RPE não evidenciaram uma localização preferencial para a BZC no interior da bicamada. Além disso, ela parece ter o menor efeito perturbador da organização da bicamada (efeito global) ao compararmos com a LDC e TTC, na mesma razão molar na membrana (Tabela 6). Esses resultados (efeito pequeno e não localizado) estão de acordo com os obtidos nas medidas de T1 por ^1H RMN (item 4.2.4.2) e refletiriam a estrutura molecular da BZC, que é mais curta que a TTC e menos volumosa que a LDC.

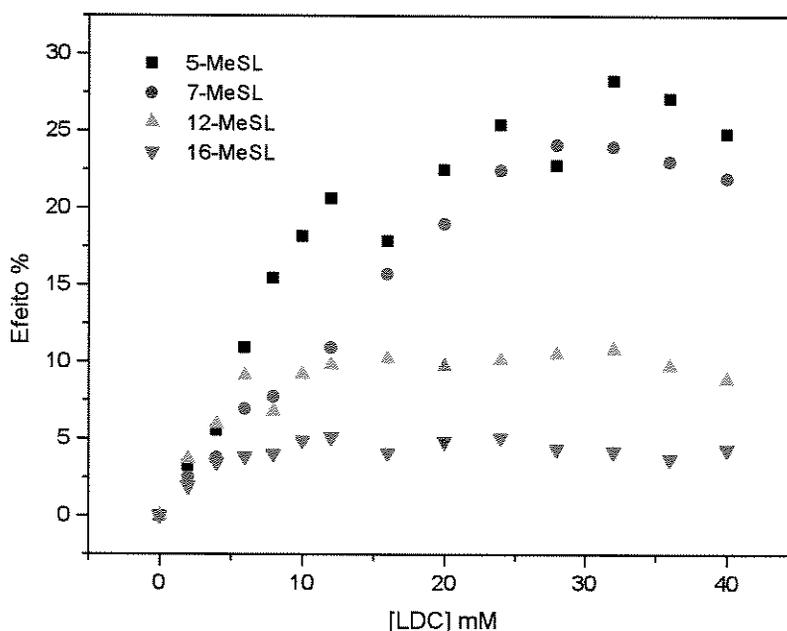


Fig 19 Experimento de RPE - Efeito da LDC medido em diferentes profundidades nas vesículas multilamelares de EPC (8 mM). Comparação do efeito com marcadores 5, 7, 12 e 16 MeSL. pH=10,5, temperatura ambiente.

A Fig.19 mostra que a LDC desprotonada desorganiza principalmente a região mais superficial da membrana (monitorada pelo 5 e 7 MeSL) diminuindo seu efeito em direção ao core hidrofóbico. Cabe notar que mesmo o marcador 16-MeSL (que monitora região de menor anisotropia da membrana) é sensível à desorganização provocada pela LDC (efeito máximo de 4,4 %) indicando que o efeito desse AL como um todo, sobre a ordem e mobilidade das vesículas é maior que o provocado pela BZC e pela TTC. É interessante notar que a LDC é o menos hidrofóbico dos três AL estudados. Neste caso, a substituição metílica na posição orto (2,6) do anel aromático deve ser responsável pela perturbação estérica da LDC na orientação dos fosfolipídios já que os volumosos substituintes metila conferem impedimento estérico à própria LDC em solução (ligação amida paralela ao plano do anel- ver item 1.6.2).

O efeito da LDC estende-se até as regiões mais hidrofóbicas da bicamada provavelmente devido ao espaçamento criado pela sua intercalação entre os fosfolipídios na região mais superficial. Como os anestésicos são bem mais curtos que as moléculas de EPC, cria-se um espaçamento entre os lipídios vizinhos, aumentando a mobilidade e diminuindo a ordem local, em todos os segmentos abaixo da posição de inserção do anestésico.

Como veremos no item 4.2.4 esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por RMN de prótons, elucidando a localização da LDC nas membranas modelo de EPC.

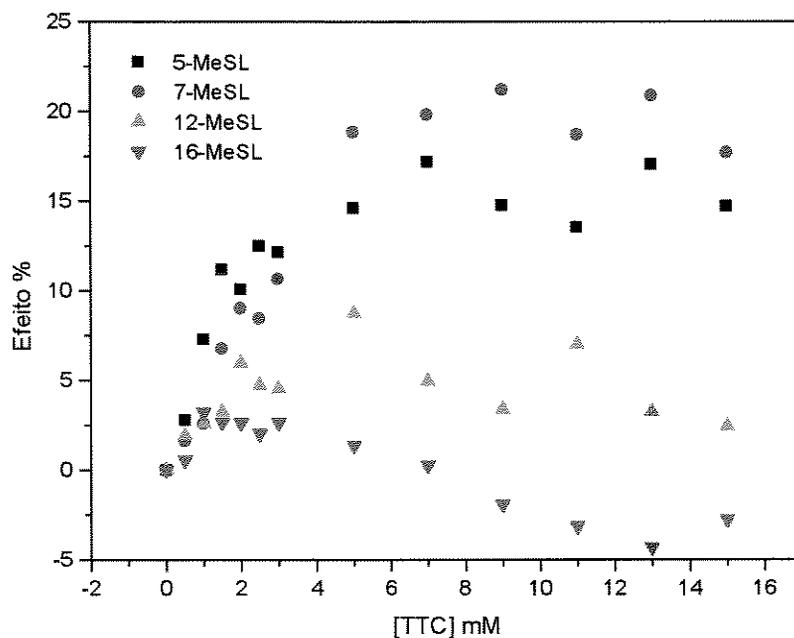


Fig. 20 Experimento de RPE - Efeito da TTC medido em diferentes profundidades nas vesículas multilamelares de EPC (8 mM). Comparação do efeito com marcadores 5, 7, 12 e 16 MeSL. pH=10,5, temperatura ambiente.

O efeito da TTC desprotonada sobre a organização de diferentes profundidades da bicamada é visto na Fig. 20. O perfil do efeito é parecido com o dos outros AL (maior efeito nas posições superiores do marcador) porém não há efeito tão evidente na posição 5 (como acontece com a LDC) mas sim na posição 7. Esse resultado concorda com as observações de Boulanger *et al.* (1981) que, em vesículas multilamelares de EPC, mostrou que a TTC neutra insere-se mais profundamente que a forma protonada, i.e. com o anel benzóico nas imediações dos carbonos 2 a 5 da cadeia acila das lecitinas.

A TTC é uma molécula mais cilíndrica que a LDC e sua inserção não perturba tanto o empacotamento dos lipídios quanto a Lidocaína. De qualquer maneira o efeito em posições mais próximas ao interior hidrofóbico (12 e 16 MeSL) é devido ao espaçamento criado pela inserção da TTC (mais curta que as moléculas lipídicas) em regiões mais superficiais da bicamada.

Análise semelhante foi feita por Sikaris & Sawyer (1982) usando marcadores de fluorescência em diferentes profundidades de bicamadas de DPPC. Esses autores verificaram que a forma neutra da TTC suprimia ao máximo o marcador na posição do carbono 9.

Outra observação importante a ser feita em relação a Fig.20 é que em razões molares maiores que 0,5:1 há decréscimo do parâmetro h_{+1}/h_0 , como observado anteriormente para o marcador 5-MeSL (de Paula & Schreier, 1995, Frezzatti *et al.*, 1986). Esse efeito é verificado ainda para outros AL do tipo amino-éster (Procaína e Clorprocaína) e está relacionado ao aparecimento de um sinal de RPE mais imobilizado (de Paula & Schreier, 1995) que refletiria a formação de uma terceira fase.

Gráficos do efeito observado (máximo e na razão molar 1:3 na membrana) com cada marcador vs a sua posição na cadeia, ilustram as prováveis posições preferenciais dos AL (Fig.21-a,b).

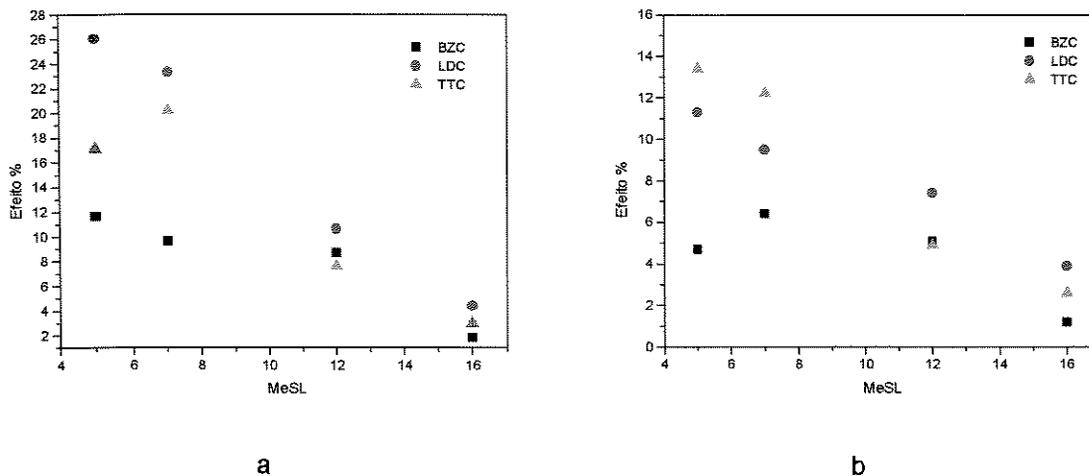


Fig.21 Experimento de RPE - Comparação do efeito provocado pelos AL em relação à posição do marcador de spin (5, 7, 12 e 16 MeSL). Condições idênticas às figuras anteriores. a) Efeito máximo vs posição do marcador; b) Efeito na razão molar 1:3 AL:EPC na membrana vs posição do marcador.

Foi observada a ocorrência de uma diminuição no efeito desorganizador produzido pelos três AL, conforme o marcador monitorava regiões mais profundas na bicamada. Embora esse resultado pareça indicar que os AL não atingem o core lipídico (o que é razoável, considerando-se o comprimento menor do AL em relação ao fosfolipídio) é necessário ter em mente que o perfil de ordem e mobilidade ao longo da cadeia lipídica diminui o que pode justificar graus diferentes de sensibilidade dos marcadores à desorganização da membrana (Stockton *et al.*, 1977; Seelig & Seelig, 1977).

Medidas de ^2H RMN com fosfolipídios perdeuterados na cadeia acila revelaram o perfil do parâmetro de ordem do interior da bicamada. Estas vesículas (Stockton *et al.*, 1977) e as de EPC contendo DMPC perdeuterada (de Paula, 1993) mostram um platô de máximo ordenamento que vai dos ^2H do carbono 2 aos do carbono 8 e ordem decrescente nos carbonos subsequentes, até a metila terminal. Desta forma podemos dizer que há diferença significativa entre a ordem do carbono 5 e a do 16 e portanto, diferenças nos dados de marcadores em regiões vizinhas (5, 7 e 12, 16) são reais e indicam ação localizada do AL.

Independente da maior sensibilidade dos marcadores em C5 e observando a Fig.21-a, podemos notar que a LDC produz um grande efeito na posição 5, o que refletiria sua inserção preferencial nesta região (ou acima). Além disso, este AL promove uma desorganização geral da bicamada que pode ser notado comparando-se seu efeito com o dos outros dois anestésicos.

A BZC afeta de forma semelhante as regiões monitoradas pelo marcador 5, 7 e 12 MeSL, enquanto a TTC afeta preferencialmente a região do 7 e 5 MeSL.

A concentração total de AL para a razão molar de 1:3 na membrana (2,67mM:8mM AL:EPC) foi determinada através da equação 6, usando-se os valores de coeficiente de partição determinado por RPE (P_{rpe}).

Como a partição na membrana desses três anestésicos é diferente, a Fig.21-b mostra o perfil do efeito dos AL em diferentes regiões da bicamada, quando presentes na mesma razão molar na membrana. Neste caso, o AL mais eficiente na desorganização da bicamada passa a ser a TTC, na região monitorada pelo 5 e 7-MeSL. A LDC vem a seguir e tem um efeito global (média das 4 posições) maior que o da TTC. Esses resultados serão discutidos a seguir.

4.2.3.4) Análise quantitativa do efeito dos anestésicos locais

A Tabela 5 reúne os valores de efeito máximo observado (%) de cada anestésico e razão molar AL:EPC no efeito máximo para o marcador 5-MeSL (os resultados são semelhantes para os outros marcadores de spin, a não ser pela variação de efeito).

Nesta Tabela, podemos comparar o efeito máximo dos três anestésicos sobre as membranas, como mostrado qualitativamente nos gráficos 16 e 17. O efeito máximo é maior para a LDC > TTC > BZC, como descrito.

Medimos ainda a concentração de AL na saturação da membrana ou efeito máximo (nt máx. experimental) e as razões molares AL:EPC na membrana, para o efeito máximo. Essas razões variaram de 0,9 a 3,2:3 AL:lipídio. Admitindo que a saturação da membrana é devida à limitação da concentração de AL solúvel em água (de Paula & Schreier, 1995) alimentamos a equação 6 com o valor de solubilidade no lugar de n° de moles na fase aquosa) e calculamos a concentração de AL total teórica (nt máx. calculado) para "saturação" da membrana.

Tabela 5 Comparação quantitativa do efeito de AL em vesículas multilamelares de EPC.

Dados obtidos das Figs. 18 a 20.

AL	Efeito máx. (%)	AL:EPC no efeito máximo	nt máx. experimental (mM)	nt máx. calculado (mM)
Benzocaína	11,6	2,4:3	15,4	7,5
Lidocaína	26,0	3,2:3	19,8	23,3
Tetracaína	17,1	0,9:3	3,1	4,4

Como descrito anteriormente (de Paula & Schreier, 1995) existe uma boa correlação entre os valores de n_t para efeito máximo (experimental e calculado) para a LDC e TTC. Esses resultados comprovam que a saturação da membrana é, na verdade, decorrente da saturação da fase aquosa. Note-se que a menor razão AL:lipídio para saturação é observada para a TTC, cujo valor de $K_{binding} \times S_w$ é o menor dos três AL (ver Tabela 2). A baixa solubilidade aquosa dos AL impede sua partição ideal na membrana e a saturação é atingida em razões molares diferentes para cada AL, refletindo sua maior ou menor solubilidade aquosa. Isso é decisivo no caso da TTC e justifica o fato dela não atingir efeito máximo como a LDC. Além disso, a TTC neutra parece formar algum tipo de agregado quando em altas razões molares AL:EPC como descrito anteriormente (item 4.2.3.3, pg.45).

Já no caso da BZC, existe uma grande diferença entre n_t máx. experimental e calculado. Essa diferença deve-se a maior solubilidade da BZC no solvente DMSO:água. De fato a variação é de ca. 7,9 mM, indicando que a solubilidade da BZC em DMSO:água deve estar próxima a 12,3 mM (7,9 + 4,4).

Se a razão AL:lipídio para saturação não é a mesma devido à solubilidade limitante, não é correto comparar os efeitos máximos de cada AL, mas sim o efeito de cada um quando presente numa mesma razão molar, na membrana. A Tabela 6 apresenta os valores de efeito causado pelos 3 AL, com os diferentes marcadores de spin, para a razão molar AL:EPC 1:3, na membrana.

Tabela 6 Efeito provocado pelos AL na razão molar 1:3, na membrana.

AL	n_t	5-MeSL Efeito (%)	7-MeSL Efeito (%)	12-MeSL Efeito (%)	16-MeSL Efeito (%)
Benzocaína	6,4	4,7	6,4	5,1	1,2
Lidocaína	6,1	11,3	9,5	7,4	3,9
Tetracaína	3,2	13,4	12,2	4,9	2,6

* $n_t = n^\circ$ total de moles para $n_m = 2,67$ mM.

A Fig. 21-b mostra que a LDC tem maior efeito no marcador na posição 5 enquanto a TTC altera preferencialmente C7 e C5 e a BZC não parece distinguir entre os marcadores 5, 7 e 12 MeSL. A novidade que a Tabela 6 traz é, no entanto, relativa ao efeito desorganizador dos AL em concentrações equivalentes na membrana. A TTC é mais potente na desorganização da bicamada em C5 e C7 do que a LDC, embora em regiões mais profundas (C12, C16) predomine o efeito da LDC. Esses resultados levam a duas constatações: 1) a perturbação da membrana é, pelo menos em parte, correlacionada a hidrofobicidade dos AL, pois a TTC causa perturbação maior que a LDC, quando presente na mesma razão molar na membrana; 2) A perturbação da membrana, além da hidrofobicidade, é determinada pela estrutura da molécula do anestésico, pois a LDC que deve introduzir maior espaçamento

entre os lipídios que os outros AL estudados devido a seus substituintes orto-metila no anel aromático, tem maior efeito que a BZC (mais hidrofóbica que ela) e efeito global e nas regiões mais profundas da bicamada (C12 e C16) superior ao da TTC. A inserção da LDC é superficial e cria espaçamento entre os lipídios vizinhos, que fica mais evidente nos carbonos de maior numeração i.e., abaixo da inserção da molécula do AL.

Interpretamos o maior efeito da TTC em C5, C7 como indicativo da localização do anel benzóico nessa região, de acordo com dados de ^2H RMN e fluorescência (Boulanger *et al.*, 1981; Sikaris & Sawier, 1982). Já a LDC estaria inserida com seu anel aromático próximo a C5 ou mais superficialmente, como indicam os resultados de ^1H RMN.

Os experimentos de RPE aqui apresentados confirmaram uma hipótese por nós levantada anteriormente de que, eliminadas as diferenças de partição (usando mesma razão AL:lipídio na membrana) o efeito dos AL sobre a fase lipídica das membranas é diferente devido a localização e impedimento estérico característico de cada AL, o que auxilia a interpretação da potência anestésica de compostos pouco hidrofóbicos como a LDC e a BZC.

Estas medidas mostraram que a BZC desorganiza membranas multilamelares de EPC, porém o efeito máximo de perturbação (11,6%) é inferior ao da TTC (17,1%) e LDC (26,0%) desprotonadas. Quando diferentes profundidades da membrana foram monitoradas, o efeito observado foi que a BZC não altera predominantemente nenhuma das posições (5, 7 e 12 MeSL), enquanto a LDC e a TTC tem maior efeito nos marcadores em posições menos profundas da membrana (5 e 7 MeSL, respectivamente). Essa perturbação deve refletir uma localização preferencial destes AL nessas porções da bicamada.

Porém, numa mesma razão molar AL:EPC na membrana, a TTC desprotonada mostrou-se mais eficiente no efeito desorganizador, seguida pela LDC desprotonada e a BZC. Isto reflete a importância da hidrofobicidade do anestésico aliada aos parâmetros estéricos, para determinar o grau de desorganização da membrana e a localização preferencial do AL. Embora seja mais efetiva que os outros AL, a TTC tem partição não ideal e não atinge altas concentrações na membrana, explicando seu efeito máximo inferior ao da LDC.

4.2.4) Experimentos de ressonância magnética nuclear de prótons

Os resultados de RPE evidenciaram que, diferentemente da potência anestésica que está diretamente relacionada à hidrofobicidade dos compostos anestésicos (Strichartz & Ritchie, 1987; Gupta, 1991) o efeito desorganizador dos três anestésicos estudados em vesículas multilamelares de EPC depende de outros fatores como:

- i) razão máxima AL:EPC que pode ser atingida, devido à partição não ideal e “falsa” saturação da membrana resultante da baixa solubilidade aquosa dos AL;
- ii) estrutura química do AL, que irá determinar o grau de perturbação no empacotamento dos lipídios e;
- iii) localização preferencial do AL, resultante de sua estrutura química e hidrofobicidade.

A limitação da abordagem por RPE reside na necessidade de usar sondas paramagnéticas, já que elétrons desemparelhados não aparecem com frequência nos compostos biológicos. O uso de marcadores limita a análise às poucas posições por ele monitoradas além de sempre dar margem a críticas em relação à real inserção (localização) da mesma e seu caráter de “contaminante” do sistema observado (Godici & Landsberger, 1974).

Por isso propusemo-nos realizar medidas de ^1H -RMN, pois a abundância natural do próton pode ser usada para o estudo de várias regiões da bicamada (e do anestésico) ao mesmo tempo. A resolução temporal deste método ($<10^{-8}$ s) requer o uso de membranas sonicadas (SUV) cujo tombamento é mais rápido que o de vesículas grandes, dando resolução espectral suficiente. Mesmo usando vesículas sonicadas, a largura das linhas dos prótons nas vesículas unilamelares é bem alargada em relação à de prótons em meio isotrópico, que giram livremente ($\tau_c < 10^{-10} - 10^{-12}$ s) em todas as orientações possíveis.

Foram feitos espectros de próton dos AL em meio isotrópico e de vesículas unilamelares de EPC na ausência e presença dos anestésicos, na proporção molar de 1:3 (AL:EPC) na membrana. As Figs. 22 a 28 mostram estes espectros realizados em espectrômetro de 400 MHz.

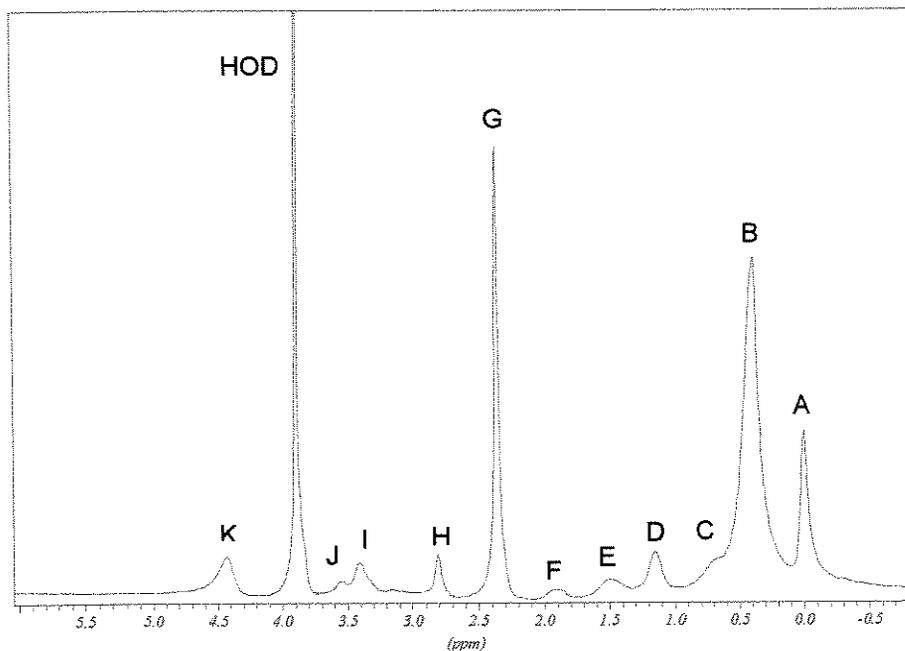


Fig. 22 Espectro de ^1H RMN (400 MHz) da EPC (65 mM) em D_2O , pH 10,5 a 30 °C. O pico dos prótons $\text{CH}_3\text{-t}$ (A) foi ajustado em 0 ppm. Ver tabela para atribuição.

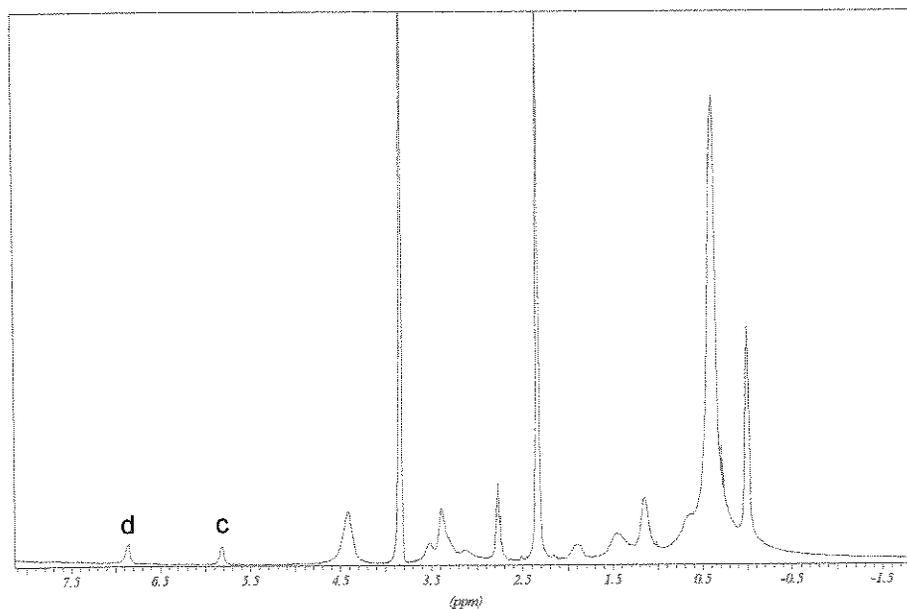


Fig. 23 Espectro de ^1H RMN (400 MHz) da BZC:EPC (razão molar 1:3) a 30 °C. EPC 65 mM, pH 10,5. O pico do CH_3t da EPC foi ajustado em 0 ppm. Os picos identificados com letras minúsculas pertencem ao AL.

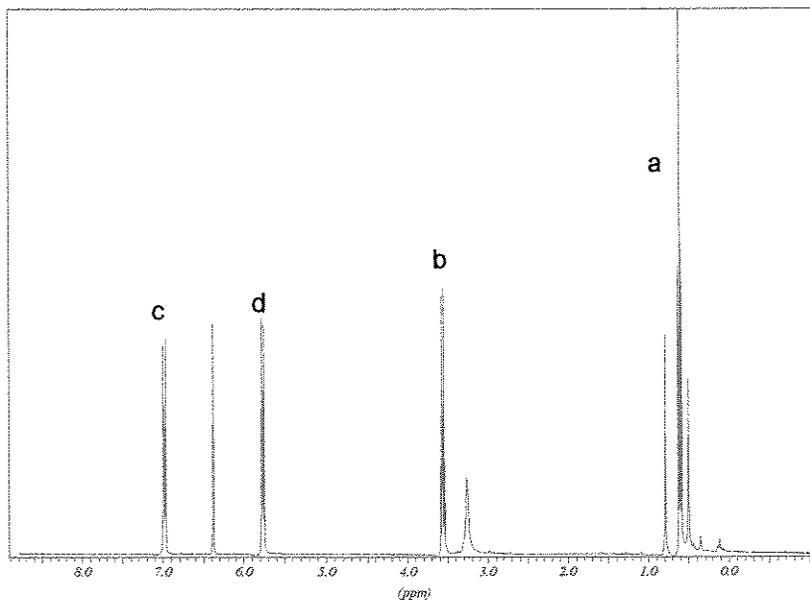


Fig. 24 Espectro de ^1H RMN (400 MHz) da BZC em meio isotrópico (CDCl_3). $[\text{BZC}]=15$ mM.

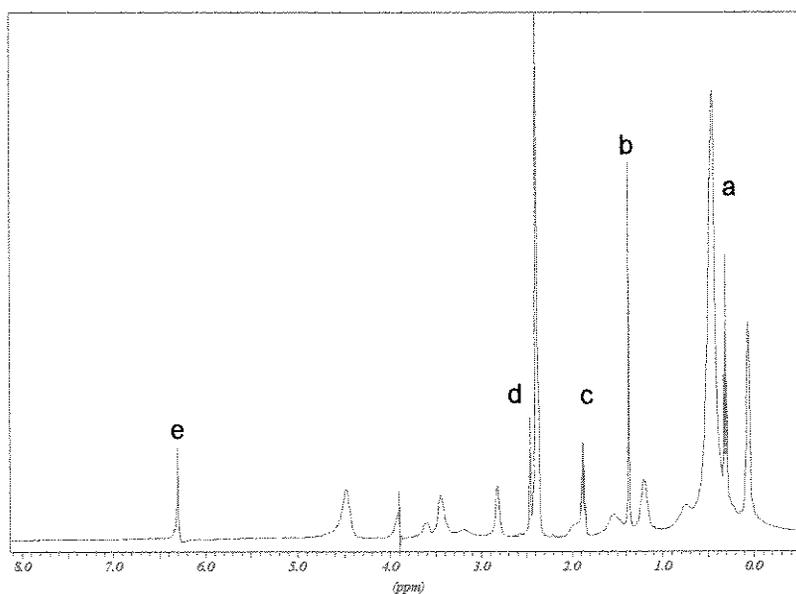


Fig. 25 Espectro de ^1H RMN (400 MHz) da LDC:EPC (razão molar 1:3) a 30 °C. EPC 65 mM, pH 10,5. O pico do CH_3 da EPC foi ajustado em 0 ppm. Os picos identificados com letras minúsculas pertencem ao AL. O pico da água residual foi suprimido.

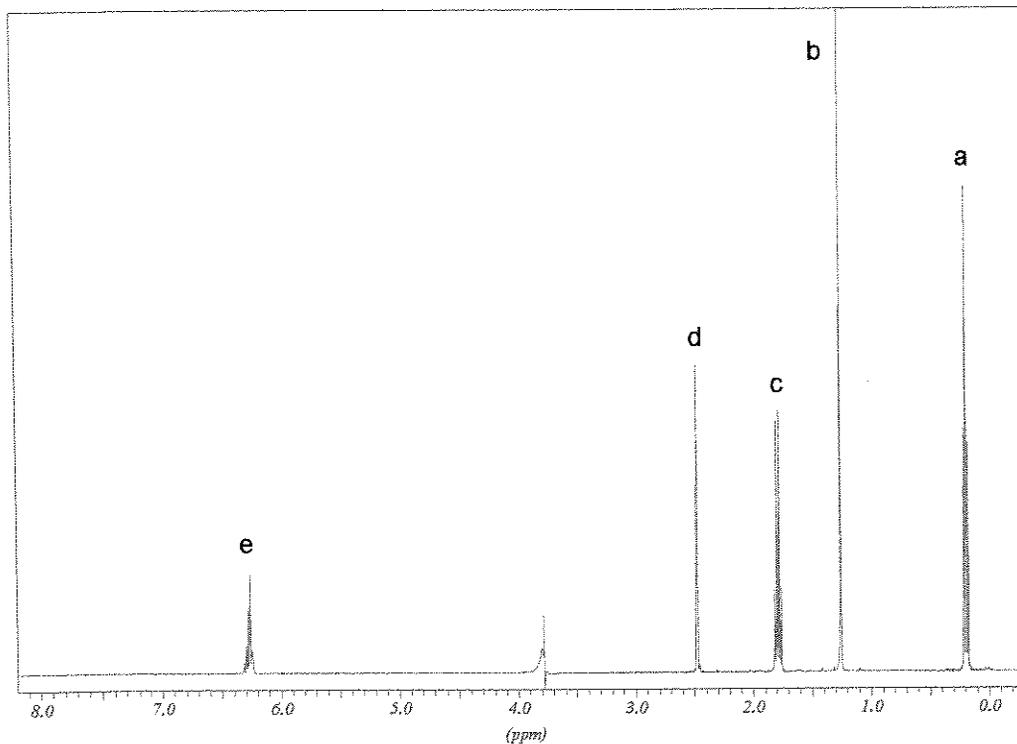


Fig. 26 Espectro de ^1H RMN (400 MHz) da LDC em meio isotrópico (D_2O) pH 10,5. O pico da água residual foi suprimido.

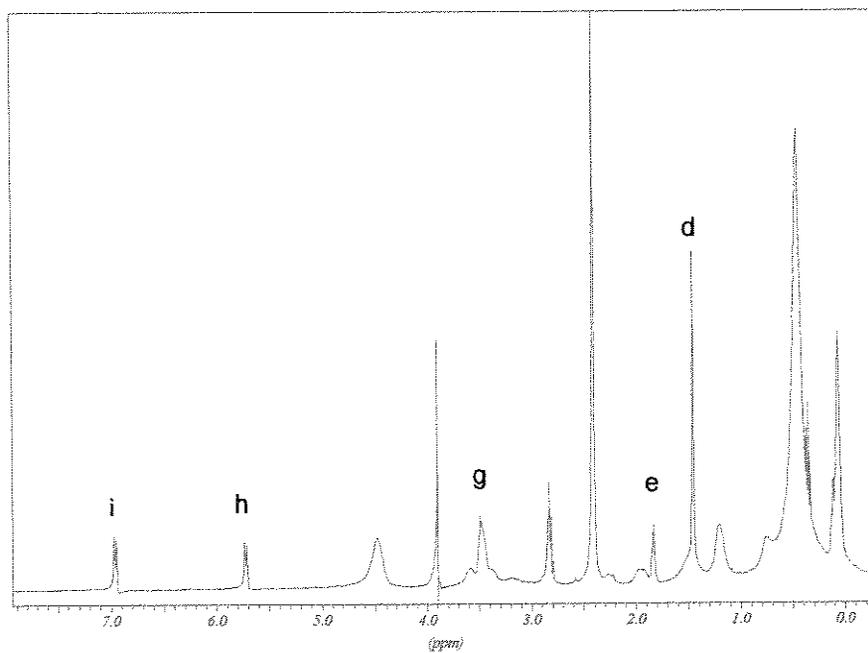


Fig. 27 Espectro de ^1H RMN (400 MHz) da TTC:EPC (razão molar 1:3) a 30 °C. EPC 65 mM, pH 10,5. O pico do CH_3t da EPC foi ajustado em 0 ppm. Os picos identificados com letras minúsculas pertencem ao AL. O pico da água residual foi suprimido.

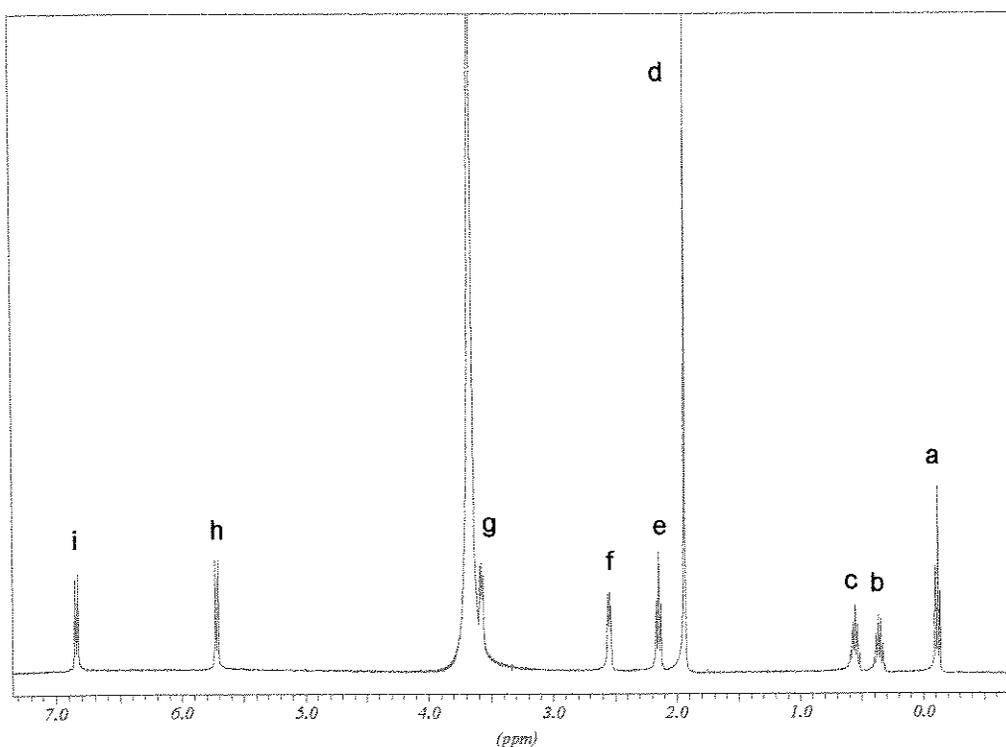


Fig. 28 Espectro de ^1H RMN (400 MHz) da TTC em meio isotrópico (D_2O) pH 5,0.

Observamos que, incubando AL e EPC para uma concentração final de anestésicos na membrana (razão molar 1:3, AL:EPC), somente é possível a identificação de alguns prótons dos anestésicos, devido à sobreposição com os picos da EPC e também ao alargamento do sinal, que diminui a intensidade do pico de absorção. Este alargamento dos picos é uma evidência da partição dos AL nas membranas unilamelares. Comparando as Fig. 23 e 24, é interessante notar que os prótons identificáveis da BZC estão alargados em relação ao espectro da BZC em meio isotrópico, devido à restrição de sua mobilidade na membrana. Efeito semelhante foi observado para LDC e TTC. No caso da TTC, a constante de acoplamento escalar (J) entre os prótons aromáticos em posição orto e meta é praticamente perdida, em função deste alargamento. Essas duas observações refletem a perda de mobilidade do anestésico, comprovando sua inserção na bicamada

As Tabelas 7 e 8 listam os respectivos deslocamentos químicos e atribuições dos sinais da EPC e BZC em meio isotrópico e na membrana utilizando espectrômetro de 500 ou 300 MHz.

Tabela 7 ^1H RMN - Atribuição e Deslocamentos Químicos dos prótons da EPC (SUV) em D_2O . O pico das metilas terminais foi ajustado em 0 ppm. As letras maiúsculas identificam os prótons. Espectrômetro Bruker 500 MHz.

EPC em D_2O - pH 10,5 - $t=30^\circ\text{C}$		
Atribuição	Deslocamento Químico (ppm)	
A	$(\text{CH}_3)_t$	0,00
B	$(\text{CH}_2)_n$	0,39
C	$\beta\text{-CH}_2^*$	0,70
D	$\text{CH}_2\text{-C=C}$	1,15
E	$\alpha\text{-CH}_2^*$	1,51
F	$=\text{C-CH}_2\text{-C=}$	1,93
G	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	2,36
H	$\text{CH}_2\text{-N}^+$	2,80
I	$\text{O}_3\text{PO-CH}_2$	3,14
I'	$\text{CH}_2\text{-OPO}_3^{--}$	3,41
J	$\text{CH}_2\text{-OCO}$	3,55
K	CH=CH_1 CHO-CO	4,42

EPC

* α e β referem-se as posições 1 e 2 na cadeia acila.

** I' refere-se ao CH_2 na posição 3 do glicerol, formando uma ligação éster-fosfórica com o grupamento fosfato e só é resolvido (de I) no espectrômetro de 500 MHz (alta resolução). Nos espectros de 300 MHz o pico I representa a média de I e I'.

Tabela 8 ^1H RMN - Atribuição e Deslocamento Químico dos prótons da BZC em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$ deuterado e em vesículas de EPC (razão molar 1:3, BZC:EPC). As minúsculas referem-se aos prótons do AL. O $(\text{CH}_3)_t$ da EPC, foi utilizado como referência (0 ppm). Espectrômetro Varian 300 MHz.

BZC - pH 10,5 - $t=30^\circ\text{C}$				
Atribuição	Deslocamento Químico (ppm)			
	$\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$	EPC		
A	$(\text{CH}_3)_t$		0,00	
a	$\text{CH}_3\text{-et}$	0,62	—	
B	$(\text{CH}_2)_n$		0,39	
C	$\beta\text{-CH}_2$		—	
D	$\text{CH}_2\text{C=C}$		1,15	
E	$\alpha\text{-CH}_2$		1,47	
F	$=\text{C-CH}_2\text{-C=}$		1,90	
G	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$		2,34	
H	CH_2N^+		2,78	
I	$\text{O}_3\text{PO-CH}_2$		3,39	
b	$\text{CH}_2\text{-et}$	3,58	—	
J	$\text{CH}_2\text{-OCO}$		3,53	
K	CH=CH_1 , CH-OCO		4,42	
c	Ar-3,5	6,04	5,81	
d	Ar-2,6	7,09	6,86	

As Tabelas 9 e 10 mostram os deslocamentos químicos e atribuições para os anestésicos LDC e TTC, em razão molar 1:3 na membrana e em D_2O . No caso da TTC as medidas em D_2O foram feitas na forma protonada (pH 5,0) dada a baixa solubilidade aquosa da TTC neutra. Resultados anteriores de nosso laboratório mostram que o deslocamento

químico dos prótons de AL em maio aquoso não se altera com a protonação, à exceção dos prótons pertencentes aos carbonos vizinhos do grupamento amina (de Paula, 1993).

Tabela 9 ^1H RMN - Atribuição e Deslocamento Químico dos prótons da LDC desprotonada em D_2O e em vesículas unilamelares de EPC (razão molar 1:3, LDC:EPC). As letras minúsculas referem-se aos prótons do AL. O $(\text{CH}_3)_t$ da EPC foi usado como referência (0 ppm). Espectrômetro Varian 300 MHz.

LDC - pH 10,5 - t=30 °C			
Atribuição		Deslocamento (ppm)	
		D_2O	EPC
A	$(\text{CH}_3)_t$		0,00
a	$\text{CH}_3\text{-et}$	0,19	0,23
B	$(\text{CH}_2)_n$		0,37
C	$\beta\text{-CH}_2$		--
D	$\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$		1,12
b	$\text{CH}_3\text{-Ar}$	1,26	1,29
E	$\alpha\text{-CH}_2$		1,46
c	$\text{CH}_2\text{-et}$	1,78	1,80
F	$=\text{C-CH}_2\text{-C}=\text{C}$		1,90
G	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$		2,31
d	$\text{CO-CH}_2\text{-N}$:	2,48	2,38
H	$\text{CH}_2\text{-N}^+$		2,74
I	$\text{O}_3\text{PO-CH}_2$		3,37
J	$\text{CH}_2\text{-OCO}$		3,52
K	$\text{CH}=\text{CH}, \text{CH-OCO}$		4,41
e	Ar-3,4,5	6,28	6,23

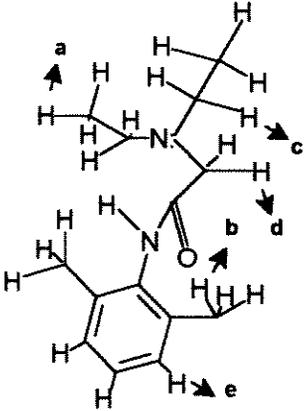
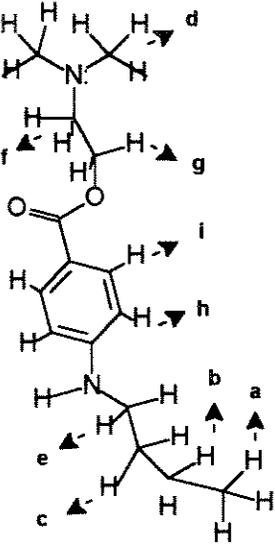


Tabela 10 ^1H RMN - Atribuição e Deslocamento Químico dos prótons da TTC em D_2O (pH 5,0) e em vesículas unilamelares de EPC (pH 10,5) na razão molar 1:3, TTC:EPC. As letras minúsculas referem-se aos prótons do AL. O $(\text{CH}_3)_t$ foi usado como referência (0 ppm). Espectrômetro Varian 300 MHz.

TTC - t=30 °C			
Atribuição		Deslocamento (ppm)	
		D_2O	EPC
A	$(\text{CH}_3)_t$		0,00
a	$\text{CH}_3\text{-but}$	-0,12	0,05
B	$(\text{CH}_2)_n$		0,39
C	$\beta\text{-CH}_2$		0,69
D	$\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$		1,14
b	$\text{C-CH}_2\text{-but}$	0,30	--
c	$\text{C-C-CH}_2\text{-but}$	0,50	--
d	$\text{CH}_3\text{-N}$	1,94	1,39
E	$\alpha\text{-CH}_2$		--
e	$\text{CH}_2\text{-NH-Ar}$	2,02	1,77
F	$=\text{C-CH}_2\text{-C}=\text{C}$		1,91
G	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$		2,35
H	$\text{CH}_2\text{-N}^+$		2,79
I	$\text{O}_3\text{PO-CH}_2$		3,40
J	$\text{CH}_2\text{-OCO}$		3,54
K	$\text{CH}=\text{CH}, \text{CHOCO}$		4,43
f	$\text{CH}_2\text{-N}$	2,59	--
g	COO-CH_2	3,57	3,43
h	Ar-3,5	5,58	5,66
i	Ar-2,6	6,81	6,90



4.2.4.1) Alterações nos deslocamentos químicos devido a interação AL:EPC

Para verificar a variação nos valores de deslocamentos químicos da interação AL:EPC inicialmente fizemos a caracterização e atribuição dos picos dos anestésicos na forma desprotonada em meio isotrópico (com exceção da TTC, que foi observada em pH 5,0). A partir destes dados realizou-se a atribuição dos picos dos AL inseridos na bicamada (Tabelas 8 a 10).

Verificou-se que os prótons dos AL tiveram seus espectros bastante alterados, quer seja pelo alargamento dos picos, quer pela alteração no deslocamento químico de alguns picos, como mostra a Tabela 11.

Tabela 11 Variação nos deslocamentos químicos dos prótons dos AL entre o meio isotrópico e membranas de EPC.

AL	prótons	D ₂ O (ppm)	D ₂ O/DMSO (1:1) ppm	65mM de EPC (ppm)	variação (ppm)
Benzocaína	c	φ 3,5	6,04	5,81	0,23
	d	φ 2,6	7,09	6,86	0,23
Lidocaína	d	COCH ₂ N:	2,48	2,38	0,10
	e	Ar-3,4,5	6,28	6,23	0,05
Tetracaína	a	CH ₃ -but	-0,12	0,05	0,17
	h	φ 3,5 (meta)	5,58	5,66	0,08
	i	φ 2,6 (orto)	6,81	6,90	0,09

Dados normalizados em relação ao deslocamento do CH₃ terminal da EPC. Para BZC, LDC e TTC (CH₃t=0,7ppm).

Verificou-se nas medidas de deslocamentos químicos dos espectros de ¹H RMN para os prótons dos anestésicos que os deslocamentos químicos de alguns prótons sofreram alterações ($\Delta > 0,05$ ppm) quando estes se moviam do ambiente aquoso para a membrana (Tabela 8, 9 e 10). Estas alterações foram observadas em geral nos prótons dos anéis aromáticos dos anestésicos, possivelmente os mais afetados pela restrição de movimento e proximidade espacial com outros núcleos, quando o anestésico se encontra inserido na bicamada lipídica. Podemos observar que a nuvem eletrônica desses anéis tornou-se menos blindada com a partição, provavelmente pela proximidade espacial com grupamentos no empacotamento da membrana. Um exemplo é a TTC onde os prótons da posição 3,5 do anel sofreram uma variação ligeiramente menor do que os prótons da posição 2,6 indicando que estes últimos substituintes (orto) devem estar próximos a algum grupamento polar (carbonila ?) da EPC ou em região de menor mobilidade da bicamada o que concorda com o modelo de inserção longitudinal da TTC (Boulangier *et al*, 1981).

Cabe ressaltar o deslocamento dos prótons metilênicos situados entre a carbonila e o grupamento amina da LDC. Além dos prótons aromáticos, somente esses mostraram alteração de deslocamento químico.

No caso da BZC, a grande variação observada nos prótons aromáticos se deve ao fato de que o deslocamento químico dela em meio isotrópico foi feito em D₂O/DMSO,

diferente dos outros AL cujo deslocamento químico observado em meio isotrópico foi feito em D₂O.

Em relação aos prótons da EPC, *não há alteração evidente do deslocamento químico* ($\Delta < 0,05$ ppm) a não ser pelo próton da cabeça polar (pico H) na presença de LDC. Esse dado forneceu informações específicas quanto a localização deste AL nas vesículas pequenas e evidencia a proximidade espacial entre a LDC e o grupamento amina da cabeça polar do lipídio. Isto nos faz supor que haja uma perda de orientação da colina por intercalação da LDC (efeito espaçador entre os lipídios).

4.2.4.2) Medidas de tempo de relaxação longitudinal para o sistema AL:EPC

As medidas de T₁ foram feitas pela técnica de recuperação do sinal invertido, conforme descrito em métodos usando uma lista de 16 tempos de espera (10, 50, 100, 200, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1400, 1800, 2000, 2500, 3000 ms).

Determinamos os valores de tempo de relaxação longitudinal (T₁) dos prótons de vesículas sonicadas de EPC, na ausência e na presença de anestésicos locais. Alterações de T₁ podem fornecer indicações da localização preferencial de cada anestésico, no interior da bicamada. Foram feitas pelo menos duas medidas para cada AL.

A necessidade de um controle para cada AL é justificada pela instabilidade das SUV. Observamos que amostras preparadas com antecedência de 1 dia sofreram diminuição progressiva dos valores de T₁. Por isso passamos a preparar as SUV no dia do experimento e sempre em pares: EPC, EPC+AL.

Nos estudos de tempos de relaxação (T₁) para os sistemas lipídio: anestésico foram feitas duas abordagens para apresentação dos resultados: na primeira demonstramos as alterações nos valores de T₁ dos prótons da EPC, em ausência e presença de anestésicos. Na segunda, demonstramos alterações nos valores de T₁ dos anestésicos em meio isotrópico contra valores destes prótons em sistemas membranares. As medidas de T₁ foram realizadas em espectrômetros de 300 e 500 MHz.

A partir da atribuição dos prótons da EPC, mostrados na Tabela 7, apresentamos os dados de T₁ na Tabela 12.

Tabela 12 Valores de T_1 (em segundos) observados para os prótons (A - K) da EPC com e sem anestésicos locais (BZC, LDC e TTC). Amostras em D_2O , pH 10,5, EPC (65mM), razão molar AL:EPC 1:3, na membrana, $t=30^\circ C$. Ver atribuições nas Tabelas 8, 9 e 10. Experimentos realizados em um espectrômetro Varian 300 MHz (BZC) e em um Bruker DRX 500 MHz (LDC e TTC).

	Controle(EPC)	EPC+BZC	Controle(EPC)	EPC+LDC	Controle(EPC)	EPC+TTC
A	0,841	0,880	0,949	0,917	0,995	0,958
B	0,578	0,622	0,709	0,692	0,745	0,720
C	--	--	0,600	0,605	0,625	0,654
D	0,515	0,557	0,666	0,658	0,695	0,682
E	0,439	0,470	0,590	0,589	0,603	--
F	0,536	0,563	0,727	--	0,730	0,725
G	0,417	0,466	0,515	0,529	0,539	0,533
H	0,395	0,430	0,536	0,577	0,544	0,544
I	0,434	0,465	0,620	0,601	0,624	0,621
I'	--	--	0,623	0,602	0,615	0,613
J	0,435	0,436	0,611	0,610	0,648	0,645
K	0,576	0,625	0,760	0,750	0,773	0,756

-- Não determinados por problemas de sobreposição de picos (AL/EPC).

O aumento nos valores de T_1 da EPC na presença de anestésico, indica maior mobilidade rotacional dos prótons da EPC por ação dos AL, em concordância com o efeito desorganizador dos anestésicos em membranas mostrados por 2H -RMN (Boulanger *et al*, 1980,1981; Westman *et al*, 1982; Kelusky & Smith, 1984) e RPE (Butler *et al*, 1973; Neal *et al*, 1976; de Paula & Schreier, 1995). Quanto maior a mobilidade, menor a probabilidade de perda de energia para a rede de moléculas do sistema e maior o tempo de relaxação.

A partir dos dados da Tabela 12 foram construídos gráficos da variação dos valores de T_1 (do controle e do sistema EPC:AL). Os gráficos podem ser vistos nas Fig. 29 (BZC), 30 (LDC) e 31 (TTC).

Nestes gráficos os prótons nas abcissas (identificados pelas letras de A a K, Tabela 7) estão arranjados de acordo com a estrutura da molécula de EPC (forma estendida), indo da colina à esquerda até o CH_3 terminal da cadeia acila, à direita. Desta forma procuramos evidenciar a(s) região(ões) de maior alteração da bicamada, na presença dos AL em sua forma neutra.

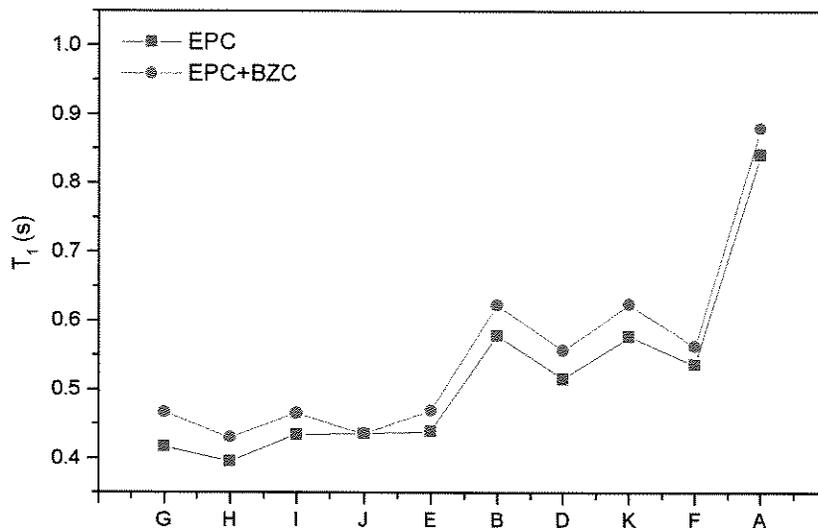
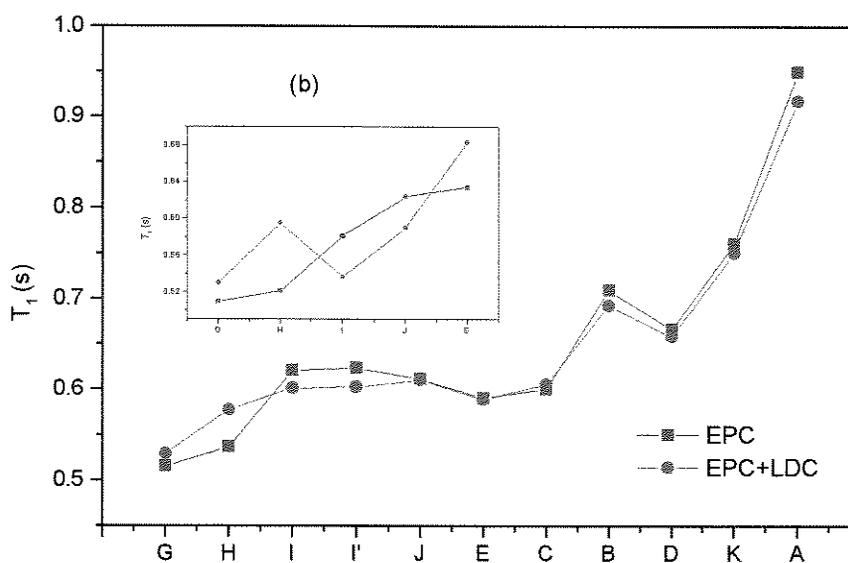


Fig. 29 1H -RMN: Valores de T_1 (s) dos prótons da EPC, na presença e ausência de BZC (BZC:EPC 1:3 na membrana) EPC 65 mM - pH 10,5 - $t=30^\circ C$.



(a)

Fig. 30 1H -RMN: Valores de T_1 (s) dos prótons da EPC na presença e ausência de LDC. (AL:EPC 1:3 na membrana) EPC 65 mM - pH 10,5 - $t=30^\circ C$. a) 500 MHz e b) detalhe do T_1 dos prótons da cabeça polar do glicerol medidos em 400 MHz.

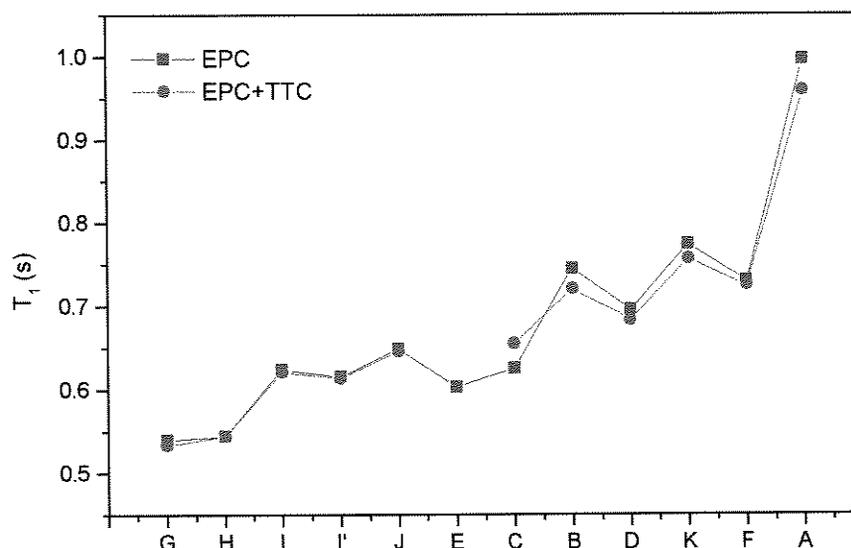


Fig. 31 1H -RMN: Valores de T_1 (s) dos prótons da EPC na presença e ausência de TTC. (AL:EPC 1:3 na membrana) EPC 65 mM - pH 10,5 - $t=30^\circ\text{C}$.

Os valores de T_1 da EPC (controle) determinados estão bem próximos aos relatados por Kuroda *et al.* (1986) e Baber *et al.* (1995). Analisando o perfil das curvas dos valores de T_1 ao longo da moléculas de EPC verificamos que:

i) os prótons da cabeça polar estão bastante imobilizados, refletindo sua interação com lipídios vizinhos (tem os menores valores de T_1 determinados);

ii) os prótons vizinhos ao grupamento fosfato e aqueles do glicerol tem valores de T_1 próximos entre si e maiores que os da colina;

iii) na cadeia acila os prótons α e β (E e C) estão bastante restritos e os valores de T_1 crescem em direção ao CH_3 terminal que possui os maiores valores de T_1 registrados.

iv) Além dos carbonos α e β a resolução dos prótons da cadeia acila está restrita ao pico B, que representa a média dos demais prótons, com exceção dos envolvidos em dupla ligação (K) ou próximos a uma (D) ou duas insaturações (F).

Os gráficos mostram que é possível determinar regiões de interação preferencial para cada anestésico.

Na Fig. 29, observamos aumento nos valores de T_1 de vários prótons da EPC, indicando assim que a molécula de BZC no interior da membrana faz aumentar a mobilidade rotacional de vários segmentos da mesma. Nota-se aumento dos T_1 na região da cabeça polar (picos H e G), bem como na cadeia acila. A BZC também parece alterar indistintamente outras regiões da cadeia acila.

Para a LDC (Fig. 30) os picos G e H da EPC tem seu valor de T_1 aumentado em concordância com a variação citada no deslocamento químico desses prótons. Além disso os valores de T_1 dos picos I e I' estão diminuídos. Estes resultados indicam que a LDC insere-se nas proximidades do grupamento fosfato (picos I e I') aumentando a relaxação spin-rede nessa porção e liberando as cabeças polares de suas interações (com os lipídios adjacentes).

Experimentos realizados com variação de temperatura, medidos entre 10-40 °C confirmaram esses resultados (comunicação pessoal de Leonardo F. Fraceto, resultados não mostrados).

Na Fig. 31, não verificamos mudanças significativas nos valores de T_1 para o sistema EPC:TTC. Esse resultado é curioso pois a TTC é conhecida desorganizadora de membranas, mas é explicado se considerarmos sua geometria e sua inserção mais aprofundada do que a dos demais AL (maior hidrofobicidade) não alterando o T_1 da cabeça polar. Na verdade esses resultados estariam de acordo com os relatados por Boulanger *et al.* (1981) em vesículas multilamelares de EPC. Esses autores não encontraram variação na anisotropia do deslocamento químico do fosfato na presença de TTC neutra e um pequeno efeito (8%) com TTC protonada. Na análise dos resultados é necessário pensar que vesículas sonicadas tem grau de curvatura elevado e pode haver uma inserção diferente dos AL neste tipo de vesícula.

4.2.4.3) Alterações nos valores de T_1 dos prótons dos AL

Foram realizadas medidas dos valores de tempo de relaxação dos três anestésicos em meio isotrópico, para comparação com os valores de AL em membrana (Tabela 13).

Tabela 13 Valores de T_1 (em segundos) para os prótons dos anestésicos locais (BZC, LDC, TTC) em meio isotrópico e em vesículas unilamelares de EPC. Amostras em D₂O/DMSO deuterado 1:1 (BZC) e em D₂O (LDC, TTC); [AL]~ 15mM em meio isotrópico. Condições idênticas às da Tabela 12. Experimento realizado num espectrômetro Varian (300 MHz).

	BZC		LDC		TTC	
	D ₂ O/DMSO	EPC	em D ₂ O	em EPC	em D ₂ O*	em EPC
a	2,081	--	1,242	0,544	1,912	0,622
b	1,607	--	1,409	0,566	1,734	--
c	2,787	0,951	0,841	0,427	1,275	--
d	3,087	0,970	0,695	0,384	1,128	0,433
e			2,858	0,765	0,726	0,400
f					0,556	--
g					0,732	0,441
h					1,154	0,641
i					1,799	0,800

-- Não determinado devido à sobreposição com picos de EPC.

* pH 5,0

Assim como para os valores de T_1 do lipídio foram construídos gráficos dos valores de T_1 dos prótons dos anestésicos em $D_2O/DMSO$ (para a BZC) e D_2O (para LDC e TTC) contra os valores em membrana. Os gráficos podem ser vistos nas Fig. 32 (BZC), 33 (LDC) e 34 (TTC). Agora é a molécula do AL que está na forma estendida. O gráfico mostra a região hidrofóbica e anel aromático da molécula, a esquerda indo até os grupamentos polares, a direita.

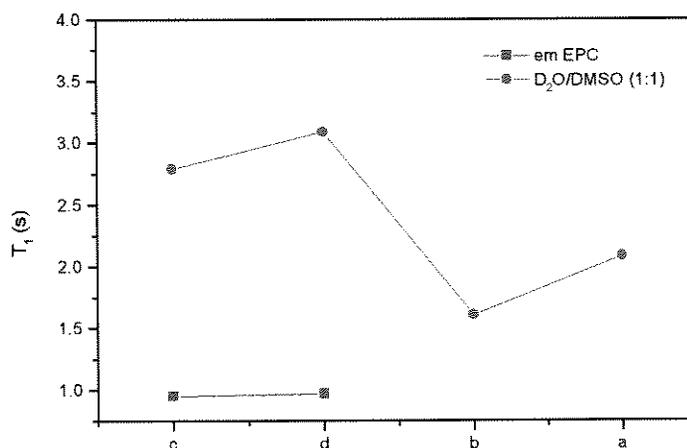


Fig. 32 1H -RMN: Valores de T_1 (s) dos prótons da BZC em meio isotrópico e em vesículas unilamelares de EPC (65 mM, pH 10,5) a 30 °C.

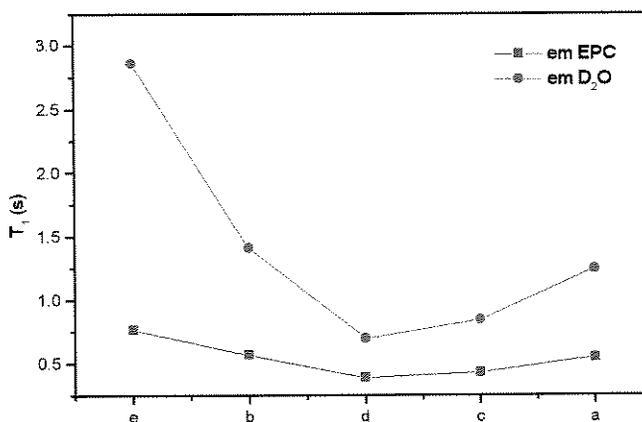


Fig.33 1H -RMN - Valores de T_1 (s) dos prótons da LDC em D_2O (pH 10,5) e em vesículas unilamelares de EPC (65 mM, pH 10,5) a 30 °C.

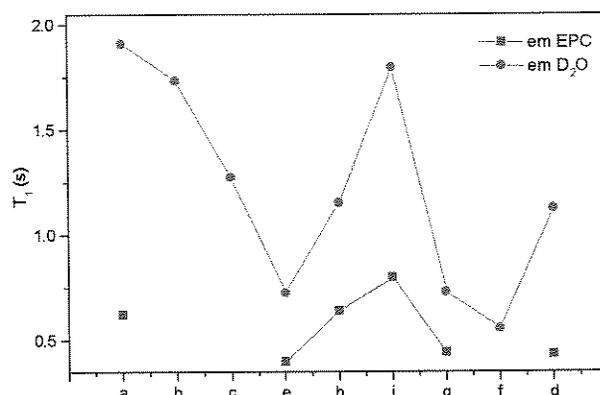


Fig. 34 ¹H-RMN - Valores de T₁ (s) dos prótons da TTC em D₂O (pH 5,0) e em vesículas unilamelares de EPC (65 mM, pH 10,5) a 30 °C.

Observamos que, nos três casos, há uma diminuição nos valores de T₁ pela inserção no meio anisotrópico da membrana, o que constitui uma evidência incontestável da partição desses AL na bicamada lipídica. Além disso, a diminuição nos valores de T₁ é observada para todos os prótons (identificáveis) dos três AL, mostrando que a molécula está toda imersa na membrana e não somente parte dela.

Por outro lado, em média os valores de T₁ dos AL na membrana são ligeiramente maiores que os dos prótons da EPC (controles sem AL, Tabelas 12 e 13), refletindo a maior liberdade de rotação dos prótons da molécula do anestésico (pequena) em relação aos prótons lipídicos. De fato, nos espectros de ¹H-RMN pode-se visivelmente detectar quais os picos referem-se aos prótons do anestésico, que são mais estreitos e chegam a manter a resolução de acoplamentos J (dobletos, tripletos).

A variação de T₁ afeta de forma diferente os prótons dos AL, como fica evidente na Fig.33, pois todos os picos dos prótons da LDC são resolvidos. Neste caso, todos os prótons parecem estar bastante imobilizados (T₁ dos alifáticos < 0,6 s) em concordância com os resultados anteriores de RPE e RMN.

No caso da BZC e TTC, que possuem 2 pares de prótons não equivalentes em substituição orto (2, 6) e meta (3, 5) pôde-se determinar que, em meio isotrópico, a relaxação dos prótons em posição orto é mais lenta (T₁ maior). Na membrana a TTC mantém essa diferença, embora os valores de T₁ caiam bastante. Já a BZC apresenta valores de T₁ praticamente iguais (~ 0,95 s) e maiores que os dos prótons aromáticos da TTC, na membrana. Esses resultados indicam diferente localização do anel benzóico da TTC e BZC na membrana e, se considerarmos os valores absolutos de T₁ temos que o anel da BZC está em ambiente de maior liberdade rotacional (T₁=0,95s) que o da TTC, que detecta diferenças

de mobilidade dos prótons em orto e meta em região menos móvel da membrana ($T_1=0,81$ e $0,64s$ respectivamente). O anel benzóico da TTC estaria situado na região de menor mobilidade rotacional (carbonos 2 a 8 da cadeia acila, como indicam medidas de T_1 de 2H -RMN; de Paula, 1993) sendo os prótons em substituição meta mais restritos que os em posição orto (inserção longitudinal?). Voltando à BZC, os dados de T_1 não são suficientes para apontar uma localização preferencial deste AL na bicamada, o que está de acordo com os resultados obtidos por RPE (BZC tem efeito desorganizador menor que os demais AL e - não há diferença entre os marcadores nas posições 5, 7 e 12 da cadeia acila).

4.2.4.4) Experimentos de NOE bidimensionais

Uma outra abordagem do experimento de ^1H -RMN são as medidas do Efeito Nuclear Overhauser (NOE).

Como descrita em métodos, as medidas de NOE fornecem informações sobre a proximidade espacial de prótons vizinhos (Gil & Gerald, 1987). O NOE depende do tempo de correlação rotacional das moléculas e no caso de sistemas membranares, com tempos de correlação longos, os valores de NOE ficam negativos e tendem a ser inespecíficos (Kalk & Berendsen, 1976). Isso acontece em condições de equilíbrio e reflete a prevalência da relaxação longitudinal (spin-rede, T_1) em que a saturação de um próton é percebida por todos os outros (Kalk & Berendsen, 1976; Dobson *et al.*, 1982). Essa condição é chamada de difusão de spins e deve ser evitada a fim de que sejam preservadas as informações de proximidade espacial das medidas de NOE.

Em membranas, o gráfico do efeito Overhauser pelo tempo de espera (tempo de "mixing" nos experimentos de 2D) entre a pré-saturação específica e o pulso de 90° é representado por uma hipérbole (Kuroda & Kitamura, 1984; Ellena *et al.*, 1988; Baber *et al.*, 1995). Em membranas de EPC Kuroda & Kitamura (1984) mostraram que o ponto de inflexão desses gráficos, para todos os prótons da EPC está sempre acima de 0,3 s, num espectrômetro operando a 200 MHz. Assim, em tempos de pré-irradiação longos os NOE atingem um equilíbrio, enquanto em tempos curtos tem-se valores de NOE crescentes ("build up") e específicos, *i.e.*, refletindo a proximidade espacial entre os prótons acoplados. Em trabalho anterior, medimos os valores de NOE no sistema AL:EPC com 0,2 s de espera e comparamos com medidas feitas com 2 s de espera (NOE de equilíbrio), *i.e.*, com difusão de spins. Os resultados com 9 AL indicavam alterações nos prótons lipídicos próximos ao glicerol (de Paula, 1993). Neste trabalho, utilizamos a abordagem de variar os tempos de espera na faixa de "build up" e usar sequências bidimensionais, que permitem a pré-saturação simultânea de todos os picos dos prótons de AL e lipídios.

Resultados com medidas feitas a partir de sequência NOESYSHPR (sem variação no "rotation frame") foram descartados porque o ruído é grande, dificultando as medidas de NOE intermoleculares, melhor resolvidos na sequência de pulsos ROESY. O ruído é tal que não se pode utilizar tempos de "mixing" maiores que 0,2 s.

Para o sistema AL:EPC, a partir do programa de pulso ROESYSHPR obtivemos espectros bidimensionais como os mostrados nas Figs. 35, 36 e 37, onde utilizamos um tempo de "mixing" de 0,1 s. Medidas em outros tempos de "mixing" também foram realizadas (25, 50, 200, 300 e 400 ms).

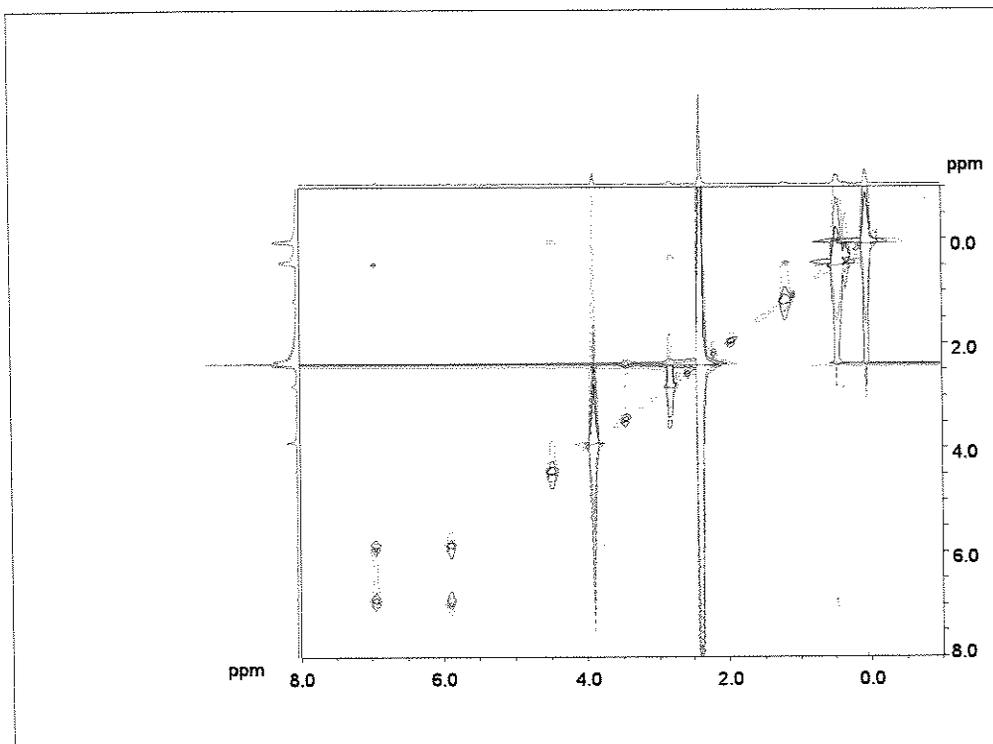


Fig.35 ^1H RMN - Espectro obtido no experimento de 2D-ROESY para BZC:EPC. Razão molar 1:3 na membrana. [EPC]= 65 mM, tempo de "mixing" = 100ms, pH 10,5, $t=30^\circ\text{C}$, 400 MHz.

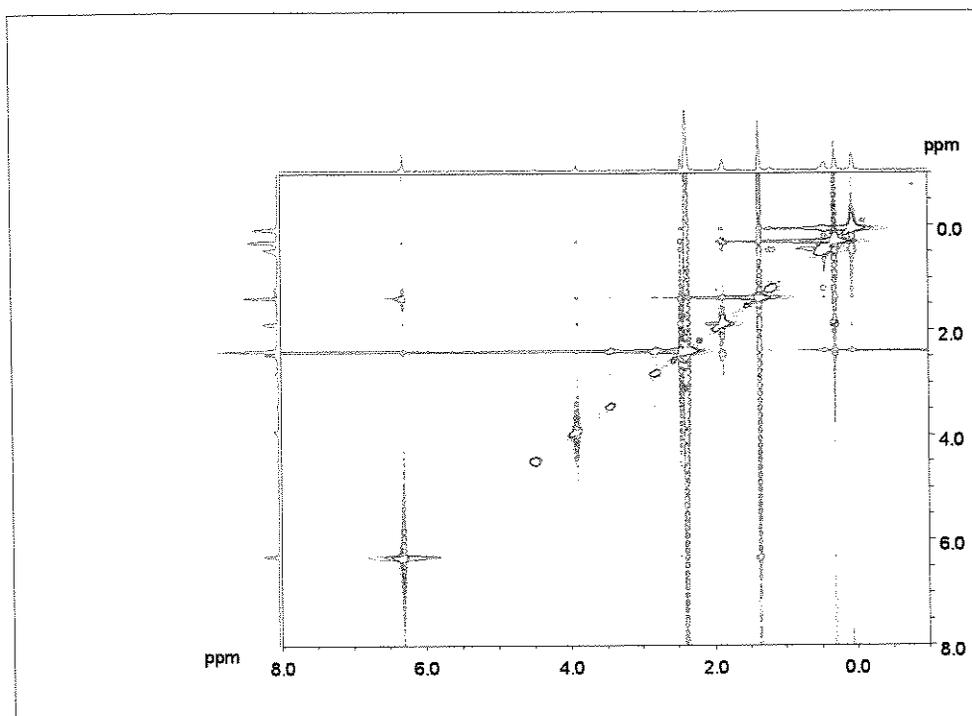


Fig.36 ^1H RMN - Espectro obtido no experimento de 2D-ROESY para LDC:EPC. Razão molar 1:3 na membrana. [EPC]= 65 mM, tempo de "mixing" = 100ms, pH 10,5, $t=30^\circ\text{C}$, 400 MHz.

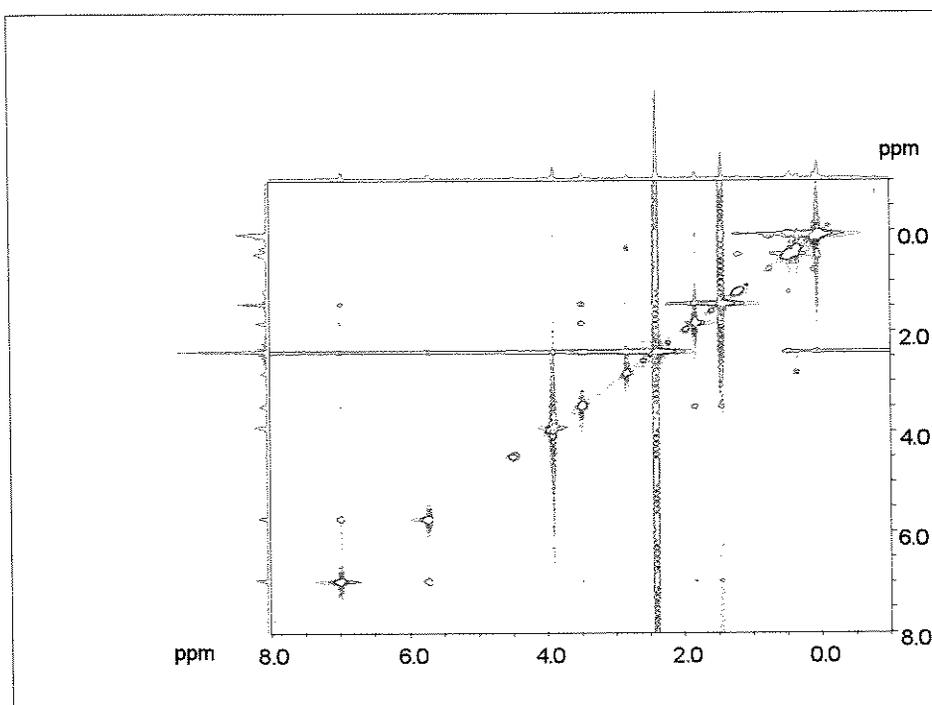


Fig.37 ¹H RMN - Espectro obtido no experimento de 2D-ROESY para TTC:EPC. Razão molar 1:3 na membrana. [EPC]= 65 mM, tempo de "mixing" = 100ms, pH 10,5, t=30 °C, 400 MHz.

Nestes gráficos, os espectros monodimensionais são mostrados nos eixos. Os picos fora da diagonal ("cross peaks") indicam NOE.

Uma lista dos "cross-peaks" encontrados, porém com tempo de "mixing" de 50 ms, podem ser vistos nas Tabelas 14 a 16. O tempo de 50ms foi escolhido para ser mostrado por ser o mínimo necessário para desenvolvimento (determinação) dos NOE intermoleculares. Conforme o tempo de "mixing" vai aumentando, o ruído também aumenta, por isso a escolha dos tempos deve ser feita de modo a se evitar o aumento de ruído de fundo (o que produziria falsos "cross-peaks") e que o tempo seja suficiente para que os "cross-peaks" apareçam. As Tabelas foram montadas após análise com diferentes cortes espectrais e ajuste de fase, a fim de eliminar possíveis artefatos. Além disso, os picos intermoleculares foram analisados em relação aos espectros com maior tempo de "mixing" e foram mantidos os que continuavam a aparecer nestes espectros.

No caso da BZC e da TTC, não foi possível usar tempos de "mixing" superiores a 100 ms, pois os picos aromáticos iam sendo saturados aos poucos, em tempos maiores.

Tabela 14 "Cross-peaks" encontrados na análise do experimento de ROESY do sistema BZC:EPC, com um tempo de "mixing" de 50 ms (espectrômetro de 400MHz, Fig. 35).

Intramoleculares				Intermoleculares	
EPC		AL		AL-EPC	
K-J	H-G	d-c		d-G	
K-H	H-F			c-G	
K-G	H-E				
K-F	H-B				
K-D	G-D				
K-B	G-B				
K-A	G-A				
J-I	F-D				
I-H	F-B				
I-G	D-B				
I-E	D-A				
I-B	B-A				

Tabela 15 "Cross-peaks" encontrados na análise do experimento de ROESY do sistema LDC:EPC, com tempos de "mixing" de 50, 100, 300 e 400 ms (espectrômetro de 400MHz, Fig. 36).

Intramoleculares								Intermoleculares			
EPC				AL				AL-EPC			
Tempos de "mixing" (ms)				Tempos de "mixing" (ms)				Tempos de "mixing" (ms)			
50	100	300	400	50	100	300	400	50	100	300	400
K-G	K-G	K-G	K-G	e-b	e-b	e-b	e-b	e-G	e-G	e-G	e-G
K-D	K-D	K-D	K-D	d-c	d-c	d-c	d-c	b-G	b-G	b-G	b-G
J-I	J-I	J-I	J-I	d-b	d-b	d-b	d-b		e-B	e-B	e-B
K-B	K-B	K-B	K-B	d-a	d-a	d-a	d-a		e-A	e-A	e-A
I-H	I-H	I-H	I-H	c-b	c-b	c-b	c-b			a-G	a-G
I-G	I-G	I-G	I-G	c-a	c-a	c-a	c-a		c-A		c-A
H-G	H-G	H-G	H-G		b-a	b-a	b-a		a-K		a-B
F-D	F-D	F-D	F-D		e-a	e-a	e-a		b-B		a-D
D-B	D-B	D-B	D-B		e-g				c-B		a-E
B-A	B-A	B-A	B-A		e-c						a-H
K-J	K-J	G-A	G-A								c-D
	K-A	K-A	K-A								
G-B	D-A	G-B	D-A								
	K-F	K-F	K-F								
	K-I										

Tabela 16 "Cross-peaks" encontrados na análise do experimento de ROESY do sistema TTC:EPC, com um tempo de "mixing" de 50 ms (espectrômetro de 400MHz, Fig. 37).

Intramoleculares		
EPC		AL
K-G	I-G	h-i
K-F	H-G	i-e
K-D	G-B	i-d
K-B	G-A	g-e
K-A	F-D	g-d
J-I	B-A	e-d
I-H	B-D	

Analisando as interações entre prótons da EPC (Tabelas 14 a 16) detectamos vários "cross-peaks" intramoleculares para os prótons próximos entre si (ex: J-I, I-G, K-B, F-D) ou em carbonos adjacentes (ex: H-G, I-H, K-D, B-A). Esses resultados são comuns aos três AL e os "cross peaks" vão aumentando em número e área com tempos mais longos (ver Tabela 15), revelando a contribuição crescente da difusão de spins nos NOE negativos aqui relatados.

Na Tabela 14, além dos NOE intramoleculares da EPC e AL, foram determinados NOE intermoleculares entre os prótons aromáticos da BZC (*c* e *d*) e os grupamentos metila da colina da EPC (pico G). A sobreposição dos picos *a* e *b* da BZC com picos da EPC impediram a análise de NOE destes prótons. Esse resultado demonstra que a BZC, em vesículas unilamelares, insere-se superficialmente, nas proximidades da cabeça polar. Resultados de T_1 (RMN) e RPE não detectaram região preferencial para a inserção da BZC, que parece afetar tanto prótons da cabeça polar como do interior da bicamada. Assim, acreditamos que o NOE detectado registra apenas uma das possíveis inserções da BZC na bicamada, isto é, uma inserção bastante superficial. Inserções mais profundas talvez não tenham sido detectadas por NOE nos tempos de "mixing" que se pode testar com a BZC, aponta para uma localização bastante superficial da BZC em vesículas unilamelares, e está de acordo com os resultados de T_1 já apresentados. Aqueles resultados mostravam aumento da liberdade rotacional dos prótons da colina, o que pode ser explicado pela inserção da BZC entre os lipídios, aumentando o espaçamento local e liberando o grupamento amina de interações eletrostáticas com grupos fosfato de lipídios adjacentes. Ao mesmo tempo, uma inserção da BZC com seu anel aromático ao nível do grupamento fosfato e glicerol explicaria o aumento da mobilidade em prótons da cadeia acila (detectado nas medidas de T_1) e a desorganização não diferenciada (entre os marcadores 5, 7 e 12 MeSL) determinada por RPE.

Na Tabela 15 estão listados os "cross-peaks" determinados para o sistema LDC:EPC. Além dos NOE intramoleculares, detectamos dois "cross-peaks" intermoleculares, entre a cabeça polar da EPC e prótons da LDC (H-b, H-e). Com aumento do tempo de "mixing" a especificidade das medidas de NOE vai sendo perdida, sendo detectados "cross-peaks" entre praticamente todos os prótons do sistema, por efeito da difusão inespecífica de spins.

Os resultados obtidos com 50 ms indicam localização superficial da LDC nessas vesículas e estão em perfeita concordância com os resultados de T_1 e obtidos por RPE, de forma que propomos um modelo de inserção da LDC neutra em vesículas de EPC conforme a Fig.38.

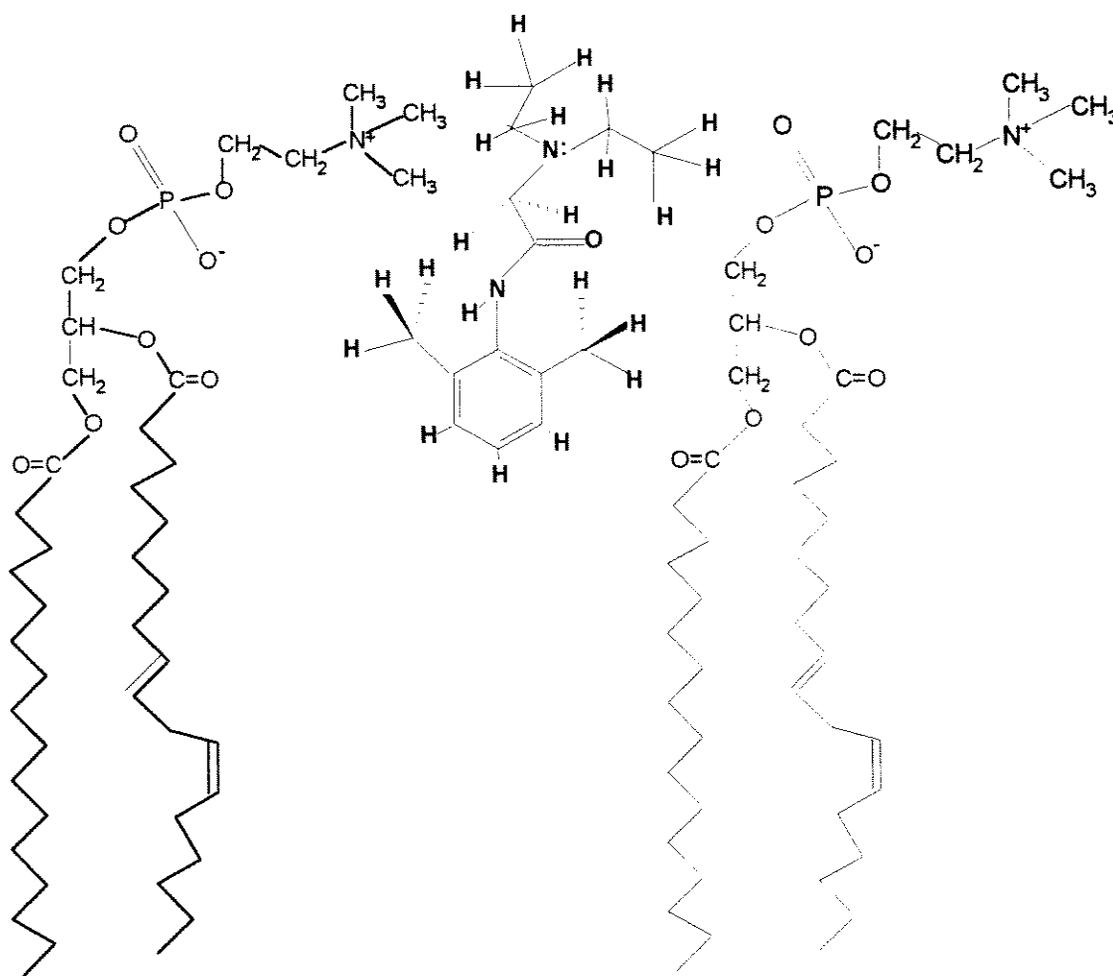


Fig. 38 Modelo proposto da inserção da LDC em membranas de EPC.

Embora considerando possíveis diferenças na localização dos AL entre vesículas pequenas e grandes, a localização superficial da BZC e LDC apontada pelos dados de RMN estão em boa concordância com os dados obtidos por RPE em vesículas multilamelares grandes. A localização dos anéis aromáticos da BZC e LDC na região do glicerol faz com que essas moléculas criem um espaçamento entre os lipídios que é sentido como uma desorganização geral da cadeia acila, nas posições monitoradas pelas sondas paramagnéticas. No caso da LDC, esse espaçamento é mais efetivo, sendo responsável pelo grande efeito desorganizador desse AL.

Observando os dados da Tabela 16 verificamos que não há evidências de "cross peaks" entre os prótons da TTC e os da EPC. A molécula da TTC tem a característica de ser mais hidrofóbica, cilíndrica e pouco volumosa. Sendo assim, ela insere-se mais profundamente na bicamada não sendo detectada nas medidas de T_1 e 2D-NOE a nível da cabeça polar da EPC. Ela porém, deve preencher melhor o espaçamento criado pela sua inserção entre os lipídios. Estes dados estão de acordo com os de RPE, que demonstram que ela insere-se mais profundamente que os outros dois AL estudados.

Os resultados aqui apresentados comprovam a importância dos parâmetros hidrofóbicos e estéricos na determinação do efeito perturbador do AL sobre bicamadas lipídicas. O primeiro parâmetro justifica os estudos com a forma neutra (mais hidrofóbica) dos AL e o segundo (efeitos estéricos) abre uma perspectiva interessante para o entendimento do mecanismo de anestesia, *i.e.*, a análise da localização preferencial do AL no interior da bicamada, modulando seu acesso a proteína canal de sódio.

5) CONCLUSÕES

- Os três AL estudados interagem com membranas lipídicas e biológicas, causando desorganização da bicamada (RPE) e hemólise, respectivamente. Estes efeitos são proporcionais à *hidrofobicidade* destes compostos;
- A baixa solubilidade aquosa da TTC limita sua partição em membranas e por isso a LDC ($P_{epc}=144$) atinge efeito máximo desorganizador maior que o da TTC ($P_{epc}=868$);
- A desorganização é proporcional ao *impedimento estérico* devido à inserção do AL na bicamada. O efeito desorganizador da LDC é maior que o da BZC;
- O efeito desorganizador é também determinado pela *localização* do AL dentro da bicamada. O anel aromático da TTC situa-se na região monitorada pelo marcador de spin 7-MeSL, enquanto o da LDC está próximo (ou acima) do marcador 5-MeSL, nas vesículas multilamelares. Não há evidência de inserção preferencial da BZC nas regiões monitoradas pelas sondas de RPE;
- Por medidas de $^1\text{H-RMN}$, registramos que a LDC localiza-se superficialmente causando um espaçamento tal que libera as cabeças polares das interações eletrostáticas amina-fosfato entre lipídios adjacentes, aumentando os valores de T_1 dos prótons da colina;
- Há evidências da localização da BZC na região da cabeça polar dos fosfolipídios, porém com efeitos menos pronunciados sobre os prótons lipídicos;
- Os resultados apresentados mostram como as técnicas de Ressonância Magnética Eletrônica e Nuclear são sensíveis aos fenômenos de movimentação e orientação das moléculas, sendo por isso adequadas ao estudo de parâmetros estruturais e dinâmicos das biomembranas na sua interação com compostos farmacologicamente ativos.

A Benzocaína, Lidocaína e Tetracaína são anestésicos locais representantes das três principais classes de AL de uso clínico atual e, dentro de suas classes, são os mais usados clinicamente devido a sua potência (TTC), solubilidade aquosa e aplicação nas infiltrações ou bloqueios da anestesia regional (LDC), ou adequação ao uso tópico (BZC).

A interação da forma neutra desses AL com membranas lipídicas parece refletir seus efeitos farmacológicos, sendo mais potentes os AL mais hidrofóbicos. Esses resultados assumem importância considerável a luz dos recentes relatos sobre a existência de sítios hidrofóbicos no canal de Na^+ eletricamente responsivo (Ragsdale *et al.* 1994, 1996). Assim, a ação anestésica se daria após partição do AL desprotonado na bicamada lipídica, cuja inserção lhe conferiria a orientação e localização propícia à interação no sítio de ação protéico.

Desta forma, a interpretação do mecanismo de anestesia deixa de ter a abordagem restrita das diferentes teorias (hipótese do lipídio vs. interação com a proteína canal de Na^+) para uma análise mais global. Esta abordagem considera igualmente importantes a modificação na fase lipídica causada pelos anestésicos locais e sua consequência nas mudanças conformacionais que levam a inativação do canal de Na^+ .

6) BIBLIOGRAFIA

- Andresen, M.C., Brodwick, M. & Yang, M. (1994). Contrasting actions of cocaine, local anaesthetic and tetrodotoxin on discharge properties of rat aortic baroreceptors **J. Physiol.** **477**: 309-319.
- Baber, J., Ellena, J.F. & Cafiso, D.S. (1995). Distribution of general anesthetics in phospholipid bilayers determined using ^2H NMR and ^1H - ^1H NOE spectroscopy **Biochemistry** **34**: 6533-6539.
- Bianconi, M.L., Amaral, A.T. & Schreier, S. (1988). Use of membrane spin label spectra to monitor rates of reaction of partitioning compounds: hydrolysis of a local anesthetic analog **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **152**: 344-350.
- Boogaerts, J.G., Lafont, N.D., Carlino, S., Noel, E., Raynal, P., Goffinet G. & Legros F.J. (1995). Biodistribution of liposome-associated bupivacaine after extradural administration to rabbits **Br. J. Anaesth.** **75**: 319-325.
- Boulanger, Y., Schreier, S., Leitch, L.C. & Smith, I.C.P. (1980). Multiple binding sites for local anesthetics in membranes: characterization of the sites and their equilibria by deuterium NMR of specifically deuterated procaine and tetracaine **Can. J. Biochem.** **58**: 986-995.
- Boulanger, Y., Schreier, S. & Smith, I.C.P. (1981). Molecular details of anesthetic-lipid interaction as seen by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance **Biochemistry** **20**: 6824-6830.
- Brites, D., Silva, R. & Brito, A. (1997). Effect of bilirubin on erythrocyte shape and haemolysis, under hypotonic, aggregating or non-aggregating conditions, and correlation with cell age **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** **57**: 337-350.
- Brosowski, A. & Müller, F. (1994). Temperature-dependance of the pH-value and effects on the kinetics of the hydrolytic decomposition of benzocaine **Eur. J. Pharm. Biopharm.** **40(2)**: 96-100.
- Butler, K.W., Schneider, H. & Smith, I.C.P. (1973). The effects of local anesthetics on lipid multilayers: a spin probe study **Arch. Biochem. Biophys.** **154**: 548-554.
- Camejo, G., Villegas, G.M., Burnola, F.V. & Villegas, R. (1969). Characterization of two different membrane fractions isolated from the first stellar nerves of the squid *Dosicus Gigas* **Biochim. Biophys. Acta** **193**:247-259.
- Courtney, K.R. & Strichartz, G.R. (1987). Structural elements which determine local anesthetics activity In: **Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology**, (Strichartz G.R. ed.), vol. 81, cap. 3, Springer-Verlag, Berlin.
- Covino, B.G. & Vassalo, H.G.(1985). **Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico**, Colina, Rio de Janeiro.
- Covino, B.G.(1986). Pharmacology of local anaesthetic agents **Br. J. Anesth.** **58**: 701-716.

- de Paula, E. (1993). **Estudos espectroscópicos dos efeitos de anestésicos locais sobre propriedades estruturais e dinâmicas de membranas lipídicas**, tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP.
- de Paula, E. & Schreier, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficient to compare the effect of local anesthetics on membrane structure **Biochim. Biophys. Acta 1240: 25-33**.
- de Paula, E. & Schreier, S. (1996). Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction **Braz. J. Med. Res. 29: 877-894**.
- de Jong, R.H. (1994). **Local Anesthetics**, C.C.Thomas, Springfield, Illinois.
- Derome, A.E. (1987). **Modern NMR Techniques for Chemistry Research**, Pergamon Press, New York.
- Djordjevich, L., Ivankovich, A.D., Chigurupati, R., Woronowich, A. & McCarthy, R. (1986). Efficacy of liposome encapsulated bupivacaine **Anesthesiology 65: A185**.
- Dobson, C.M., Olejniczak, E.T., Poulsen, F.M. & Ratcliffe, R.G. (1982). Time development of proton nuclear Overhauser effects in proteins **J. Magn. Reson. 48: 97-110**.
- Dodge, J. R. C.; Mitchell, R. H. & Hanahan, D. J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes **Arch. Biochem. Biophys. 100: 119-130**.
- Duncan, L. & Wildsmith, J.A.W.(1995). Liposomal local anaesthetics **Br. J. Anaesth. 75: 260-261**.
- Ellena, J.F., Archer, S.J., Dominey, R.N., Hill, B.D. & Cafiso, D.S. (1988). Localizing the nitroxide group of fatty acid and voltage-sensitive spin-labels in phospholipid bilayers **Biochim. Biophys. Acta 940: 63-70**.
- Ellis, F.D., Seiler, J.G. & Palmore, M.M.JR. (1995). Methemoglobinemia: a complication after fiberoptic orotracheal intubation with benzocaine spray **J. Bone Joint Surg. Amer. 77: 937-939**.
- Frazier, D.T., Narahashi, T. & Yamada, M. (1970). The site of action and active form of local anesthetics. II. Experiments with quaternary compounds **J. Pharmacol. Exp. Ther. 171: 45-51**.
- Frezzatti, Jr., W.A., Toselli, W.R. & Schreier, S. (1986). Spin label study of local anesthetic-lipid membrane interactions. Phase separation of the uncharged form and bilayer micellization by the charged form of tetracaine **Biochim. Biophys. Acta 860: 531-538**.
- Garret, R.H. & Grisham, C.M. (1995). **Molecular aspects of cell biology**, Saunders College Publishing, Orlando.
- Gesztes, A. & Mezei, M. (1988). Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine **Anesth. Analg. 67: 1079-1081**.
- Gil, V.M.S. & Geraldés, C.F.G.V. (1987). **Ressonância Magnética Nuclear**, Fundação Kalouste Gulbenkian, Lisboa.

- Gilman, A.G. (1991). **As Bases Farmacológicas da Tarapêutica**, 8^a edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Godici, P.E. & Landsberger, F.R. (1974). The dynamic structure of lipid membranes. A ¹³C nuclear magnetic resonance study using spin labels **Biochemistry** **13**: 362-368.
- Grouls, R.J.E., Ackerman, E.W., Korsten, H.H.M., Hellebrekers, L.J. & Breimer, D.D. (1997). Partition coefficients (n-octanol/water) of N-butyl-p-aminobenzoate and other local anesthetics measured by reversed-phase high-performance liquid chromatography **J. Chromatogr. B** **694**: 421-425.
- Guertler, A.T. & Pearce, W. A. (1994). A prospective evaluation of benzocaine-associated methemoglobinemia in human beings **Ann. Emerg. Medic.** **24**: 626-630.
- Gupta, S.P. (1991). Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics **Chem. Rev.** **91**: 1109-1119.
- Haller, P.H. (1989). Aplicações de lipídios e fosfolipídios em cosméticos **Cosmetics & Toiletries** **1**: 33-40.
- Hill, M.W. (1974). The effect of anaesthetic-like molecules on the phase transition in smetic mesophases of dipalmitoyllecithin I. The normal alcohol up to C=9 and three inhalation anaesthetics **Biochim. Biophys. Acta** **356**: 117-124.
- Hornby, A.P. & Cullis, P.R. (1981). Influence of local and neutral anaesthetics on the polymorphic phase preferences of egg yolk phosphatidylethanolamine **Biochim. Biophys. Acta** **647**: 285-292.
- Hubbel, W.L. & McConnell, H.M. (1971). Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes **J. Am. Chem. Soc.** **93**: 314-326.
- Jones, O.T. & Lee, A.G. (1985). Interaction of hexachlorocyclohexanes with lipid bilayers **Biochim. Biophys. Acta** **812**: 731-739.
- Jost, P., Libertini, L.J., Hebert, V.C. & Griffith, O.H. (1971). Lipid spin labels in lecithin multilayers. A study of motion along fatty acid chains **J. Mol. Biol.** **59**: 77-98.
- Kalk, A. & Berendsen H.J.C. (1976). Proton magnetic relaxation and spin diffusion in proteins **J. Magn. Reson.** **24**: 343-366.
- Kelusky, E.C. & Smith, I.C.P. (1984). Anesthetic-membrane interaction: a ²H nuclear magnetic resonance study of the binding of specifically deuterated tetracaine and procaine to phosphatidylcholine **Can. J. Biochem. Cell Biol** **62**: 178-184.
- Kuroda, Y. & Kitamura, K. (1984). Intra- and intermolecular ¹H-¹H nuclear Overhauser effect studies on the interactions of chlorpromazine with lecithin vesicles **J. Am. Chem. Soc.** **106**: 1-6.
- Kuroda, Y., Matsuzaki, K., Handa, T. & Nakagaki, M. (1986). Mobility of fluorescent probe molecules in lipid bilayer vesicles as studied by steady-state and time-dependent Overhauser effect measurements in ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy **Biochim. Biophys. Acta** **859**: 171-179.

- Kuroda, Y. & Fujiwara, Y. (1987). Locations and dynamical perturbations for lipids of cationic forms of procaine, tetracaine, and dibucaine in small unilamellar phosphatidylcholine vesicles as studied by nuclear Overhauser effects in ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy **Biochim. Biophys. Acta** **903**: 395-410.
- Lee, A.G. (1976-a). Model for action of local anaesthetics **Nature** **262**: 545-548.
- Lee, A.G. (1976-b). Interactions between anaesthetics and lipid mixtures amines **Biochim. Biophys. Acta** **448**: 34-44.
- Li, Y.M., Wingrove, D.E., Too, H.P., Mamerakis, M., Stimson, E.R., Strichartz, G.R. & Maggio, J.E. (1995). Local anesthetics inhibit substance P binding and evoked increases in intracellular Ca^{2+} **Anesthesiology** **82**: 166-173.
- Lissi, E., Bianconi, M.L., Amaral, A.T., de Paula, E., Blanch, L.E.B. & Schreier, S. (1990). Methods for the determination of partition coefficients based on the effect of solutes upon membrane structure **Biochim. Biophys. Acta** **1021**: 46-50.
- Martin, D.G., Watson, C.E., Gold, M.B., Woodard, C.L.Jr. & Baskin, S.I. (1995). Topical anesthetic-induced methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia in macaques: a comparison of benzocaine and lidocaine **J. Appl. Toxicol.** **15**: 153-158.
- Martindale (1993). **The Extra Pharmacopoeia**, The Pharmaceutical Press, London.
- Mason, R.P., Rhodes, D.G. & Herbette, L.G. (1991). **J. Med. Chem.** **34**: 869-877.
- Meirelles, N.C., Malheiros, S.V.P., Ruggiero, A.C. & Degterev, I. (1994). Mouse liver microsomes (MLM) protect erythrocytes against trifluoperazine (TFP) induced and mechanical hemolysis which are due to TFP microsomal transformation and to the action of an unidentified water-soluble microsomal factor (UF) **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.** **19**: 349-354.
- Meirelles, N.C., Galembeck, E. & Alonso, A. (1998). Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by poly[oxyethylene (n) nonylphenol] non-ionic surfactants **Chem. Biol. Inter.**, *in press*.
- Narahashi, T., Yamada, M. (1969). Cationic forms of local anaesthetics block action potentials from inside the nerve membrane **Nature** **223**: 748-749.
- Neal, M.J., Butler, K.W., Polnaszek, C.F. & Smith, I.C.P. (1976). The influence of anesthetics and cholesterol on the degree of molecular organization and mobility of ox brain white matter. Lipids in multilayer membranes - a spin probe study **Mol. Pharmacol.** **12**: 144-155.
- Prasad, R. (1996). **Manual on membrane lipids**, Springer-Verlag, Berlin.
- Pringle, M.J., Brown, K.B. & Miller, K.W. (1980). Can the lipid theories of anesthesia account for the cutoff in anesthetic potency in homologous series of alcohols? **Mol. Pharmacol.** **19**: 49-55.
- Quan, C., Mok, W.M. & Wang, G.K. (1996). Use-dependent inhibition of Na^+ currents by benzocaine homologs **Biophys. J.** **70**: 194-201.

- Ragsdale, D.S., McPhee, J.C., Scheuer, R. & Catterall, W.A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics **Science** **265**: 1724-1728.
- Ragsdale, D.S., McPhee, J.C., Scheuer, R. & Catterall, W.A. (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**: 9270-9275.
- Rang, H.P. & Dale, M.M. (1993). **Farmacologia**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Roth, S. & Seeman, P. (1972). The membrane concentrations of neutral and positive anesthetics (alcohols, chlorpromazine, morphine) fit the meyer-overton rule of anesthesia; negative narcotics do not **Biochim. Biophys. Acta** **255**: 207-219.
- Ruggiero, A.C. (1994). **Ação das drogas Trifluoperazina e Papaverina e do estresse oxidativo em eritrócitos**, tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP.
- Schreier, S., Polnaszek, C.F. & Smith, I.C.P. (1978). Spin labels in membranes. Problems in practice **Biochim. Biophys. Acta** **515**: 375-436.
- Schreier, S., Frezzatti Jr., W.A., Araujo, P.S., Chaimovich, H. & Cuccovia, I.M. (1984). Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine. Spin label and titration studies **Biochim. Biophys. Acta** **769**: 231-237.
- Seelig, A. & Seelig, J. (1977). Effect of a single cis double bond on the structure of a phospholipid bilayer **Biochemistry** **16**: 45-50.
- Seeman, P. (1966). II. Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetics and tranquilizers **Biochem. Pharmacol.** **15**: 1753-1766.
- Sikaris, K.A. & Sawyer, W.H. (1982). The interaction of local anaesthetics with synthetic phospholipid bilayer **Biochem. Pharmacol.** **31**: 2625-2631.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. & Morrill, T.C. (1991). **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, John Wiley & Sons Inc., Singapore.
- Singer, S.J. & Nicolson, G.L.(1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes **Science** **175**: 720-731.
- Singleton, W.S., Gray, M.G., Brown, M.L. & White, J.C. (1965). Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids **J. Am. Oil Chem. Soc.** **42**: 53-56.
- Smith, I.C.P. & Butler, K.W. (1976). **Spin Labeling, theory and applications**, Academic Press, New York.
- Stockton, G.W., Johnson, K.G., Butler, K.W., Tulloch, A.P., Boulanger, Y., Smith I.C.P., Davis, J.H. & Bollm, M. (1977). Deuterium NMR study of lipid organisation in *Acholeplasma laidlawii* membranes **Nature** **269**: 267-268.
- Strichartz, G.R. (1987). **Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology**, vol.81, Springer-Verlag, Berlin.

- Strichartz, G.R. & Ritchie, J.M. (1987). The action of Local Anesthetics on ion channels of excitable tissues In: **Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology**, (Strichartz G.R. ed.), vol. 81, cap.2, Springer-Verlag, Berlin.
- Strichartz, G.R., Sanchez, V., Arthue, R., Chafetz, R. & Martin, D. (1990). Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:buffer partition coefficient and pKa values of clinically used drugs **Anesth. Analg.** **71**: 158-170.
- Trägner, D. & Csordas, A. (1987). Biphasic interaction of Triton detergents with the erythrocyte membrane **Biochem. J.** **244**: 605-609.
- Vandam, L.D. (1987). Some aspects of the history of local anesthesia In: **Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology**, (Strichartz G.R. ed.), vol. 81, cap.1, Springer-Verlag, Berlin.
- Wagner, G. & Wütrich, K.J. (1979). Truncated driven nuclear Overhauser effect (TOE). A new technique for studies of selective ^1H - ^1H Overhauser effects in the presence of spin diffusion **J. Magn. Reson.** **33**: 675-680.
- Wakita, M., Kuroda, Y., Fujiwara, Y & Nakagawa, T. (1992). Conformations of dibucaine and tetracaine in small unilamellar phosphatidylcholine vesicles as studied by nuclear Overhauser effects in ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy **Chem. Phys. Lipids** **62**: 45-54.
- Warren, R.C. (1987). **Physics and the architecture of cell membranes**, Adam Hilger, Bristol and Philadelphia.
- Westman, J., Boulanger, Y., Ehrenberg, A. & Smith, I.C.P. (1982). Charge and pH dependent drug binding to model membranes. A ^2H -NMR and light absorption study **Biochim. Biophys. Acta** **685**: 315-328.
- Wildsmith, J.A.W., Gissen, A.J., Takman, B. & Covino, B.G. (1987). Differential nerve blockade : esters v. amides and the influence of pKa **Br. J. Anaesth.** **59**: 379- 384.
- Wong, R.K.M., Nichol, C.P., Sekar, C. & Roufogalis, B.D. (1987). The efficiency of various detergents for extraction and stabilization of acetylcholinesterase from bovine erythrocyte **Biochem. Cell Biol.** **65**: 8-18.
- Zhang, X.R., Baeyens, W.R.G., Van Der Weken, G., Calokerinos, A.C. & Imai, K. (1995). Chemiluminescence determination of some local anaesthetics **Anal. Chim. Acta** **303**: 137-142.

7) PARTICIPAÇÃO CIENTÍFICA

- L. M. A. Pinto, D. K. Yokaychiya, E. de Paula, *Characterization of Benzocaine interaction with model membranes*, XXVI^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), resumo n^o P11, 3 a 6 de maio de 1997, Caxambu - MG.
- L. M. A. Pinto, L. F. Fraceto, L. Franzoni, A. Spisni & E. de Paula, *¹H NMR relaxation times studies in membrane: anesthetic systems*, VI Encontro de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear, resumo n^o T2, 12 a 16 de maio de 1997, Angra dos Reis - RJ
- L. M. A. Pinto, L. F. Fraceto, L. S. Schreier & E. de Paula, *Benzocaine, Lidocaine and Tetracaine: a comparative study with local anesthetics from different families and their interaction with model phospholipids membranes*, XXVII^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), resumo n^o P16, 23 a 26 de maio de 1998, Caxambu - MG.
- L. F. Fraceto, L. M. A. Pinto, L. Franzoni, A. Spisni & E. de Paula, *Aminoamide anesthetics superficial location inside sonicated lipid vesicles: longitudinal relaxation times and 2-D NOE proton NMR experiments*, XXVII^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), resumo n^o P17, 23 a 26 de maio de 1998, Caxambu - MG.
- E. de Paula, L. M. A. Pinto & D. K. Yokaychiya, *Further studies on benzocaine interaction with membranes: uncharged form/lipid ratio of different local anesthetics at pH 7.4*, XXVII^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), resumo n^o P15, 23 a 26 de maio de 1998, Caxambu - MG.
- Leonardo Fernandes Fraceto, Luciana de Matos Alves Pinto, Lorella Franzoni, Alaberto Spisni & E. de Paula, *Utilização de ¹H-RMN e RPE no estudo de anestésicos locais com membranas fosfolipídicas*, resumo submetido à V Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, 13 e 14 de agosto de 1998, UNICAMP, Campinas - SP.