



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



LEONARDO FERNANDES FRACETO

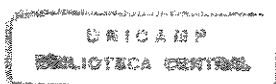
“LOCALIZAÇÃO DE ANESTÉSICOS LOCAIS DO TIPO AMINO-AMIDA EM LIPOSSOMAS UNI E MULTILAMELARES”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <u>Leonardo Fernandes Fraceto</u>
é aprovada pela Comissão Julgadora. <u>[Assinatura]</u> 28/3/2000

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

Orientadora: Profa. Dra Eneida de Paula

Campinas, 2000



20003382

N.º CHAMADA: T/UNICAMP
F841L
 V. 1 Ed. 1
 TOMBO BC/ 41447
 PROC. 278/00
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 11-07-00
 N.º CPD

CM-00142400-7

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

F841L **Fraceto, Leonardo Fernandes**
 Localização de anestésicos locais do tipo amino-amida em lipossomas uni e multilamelares/Leonardo Fernandes Fraceto. -- Campinas, SP:[s.n.], 2000.
 110f: ilus.

Orientadora: Eneida de Paula
 Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

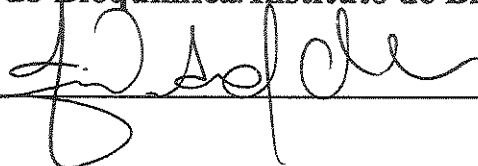
1. Anestesia local. 2. Anestésicos locais. 3. Fluorescência.
 4. Ressonância magnética nuclear. 5. Membranas(Biologia).
 I. Paula, Eneida de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 28/03/2000

Banca Examinadora

Titulares:

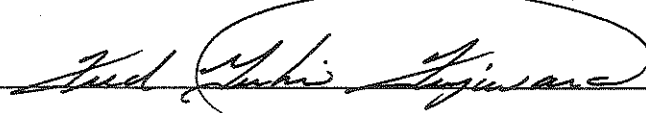
Profa Dra Eneida de Paula (Orientadora)
Depto de Bioquímica/Instituto de Biologia/ Unicamp



Profa Dra Maria Helena Andrade Santana
Depto de Processos Biotecnológicos/ F. E.Q./Unicamp



Prof Dr Fred Yukio Fujiwara
Depto de Físico-Química/ Instituto de Química/ Unicamp



Suplente

Profa Dra Nilce Correa Meirelles
Depto de Bioquímica/Instituto de Biologia/Unicamp

AGRADECIMENTOS

- δ À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e ajuda financeira para o andamento do projeto;
- δ À Profa Dra Eneida de Paula por seu profissionalismo, pelas oportunidades, estímulo a visão crítica e seu grande lado humano, que permitiram meu crescimento profissional e pessoal.
- δ À Profa Dra Nilce C. Meirelles pela grande amizade, confiança, valorização e discussões.
- δ A todos do Departamento de Bioquímica/Unicamp (alunos, funcionários e professores) que dividiram um pedacinho deste trabalho de alguma forma em especial para Marina, Miriam e Andréia pelos "quebra-galhos".
- δ A todos do laboratório da Dra Shirley Schreier que me ajudaram, em especial a Thelma e Lua.
- δ A todos da Central Analítica da USP (RMN) em especial a Miriam e Adriana, pelo profissionalismo e momentos agradáveis. Ao Prof Dr Bayardo pelos papos, utilização de e-mail e telefone em minhas idas a SP.
- δ Aos amigos do Instituto de Química, em especial: Ataulpa e Sílvio.
- δ Aos meus pais Benedito e Agda e meu irmão Leandro, pelo apoio, incentivo, educação, confiança, muito obrigado por tudo. As minhas avós Maria (in memoriam) e Maria, pelo carinho, pães e bolachinhas.
- δ Aos meus amigos de Dracena: Elano, Gustavo, Marção, Luciano, Fábio, Adriano, pelos churrascos e cervejadas nas férias e nos feriados.
- δ Aos amigos do laboratório e departamento (que passaram, estão presentes e que ainda estão por vir): Jackeline, Daniela, Daniela (técnica), Alessandro, Luciana, Eleonora, Alexandre, Paulinho, Sonia, Rafael, Vanessa, Eduardo, Mariza, Karina, Bayki, Paulino por suportarem minhas brincadeiras e sarros, pelos papos (sobre o Corinthians), e-mails, dicas, pelos momentos bons e ruins, pelo ambiente divertido. VALÉO!, não, não é VALEU!

♥♥♥♥ A GISLAINE, pelo amor, confiança e bons momentos juntos, te amo.

**“Toda ciência seria
supérflua, se a forma de
manifestação e a essência das
coisas coincidissem
imediatamente”**

Karl Marx

**Dedico essa Tese aos meus pais
Benedito e Agda.**

	Pág.
ÍNDICE	
ABREVIACÕES	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1) INTRODUÇÃO	1
1.1 – ANESTÉSICOS LOCAIS	1
1.1.1 – AMINO-AMIDAS	3
1.2 – INTERAÇÃO DE AL COM A PROTEÍNA CANAL DE SÓDIO	6
1.3 – INTERAÇÃO DE AI COM MEMBRANAS	13
1.2.1 – ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS	14
1.2.1.1 – ESTUDOS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	15
2) OBJETIVOS	18
3) MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DAS TÉCNICAS	19
3.1.1 – RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	19
3.1.2 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	21
3.1.3 – ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	23
3.1.4 – ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	24
3.2 - MATERIAIS	25
3.3 – PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS MULTILAMELARES DE EPC	25
3.4 – PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS UNILAMELARES DE EPC	26
3.5 – MEDIDAS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	26
3.6 – MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA	27
3.7 – MEDIDAS DE INFRAVERMELHO	28
3.8 – MEDIDAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	29
3.8.1 – DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RELAXAÇÃO LONGITUDINAL (T_1)	29
3.8.2 – MEDIDAS DO EFEITO NUCLEAR OVERHAUSER (2D-NOE)	30
3.8.3 – MEDIDAS DE FÓSFORO (^{31}P -RMN)	31
3.9 – MODELAGEM MOLECULAR	32
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANESTÉSICOS LOCAIS	33
4.2 - MEDIDAS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	34

4.2.1 – EFEITO DOS ANESTÉSICOS SOBRE A ORGANIZAÇÃO DE MEMBRANAS LIPÍDICAS	34
4.2.2 – MEDIDAS DE COEFICIENTE DE PARTIÇÃO POR RPE	41
4.2.3 – PARTIÇÃO NÃO-IDEAL DOS ANESTÉSICOS LOCAIS	43
4.3 – MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA	45
4.4 – MEDIDAS DE INFRAVERMELHO	51
4.5 – EXPERIMENTOS DE RMN DE FÓSFORO	54
4.6 – EXPERIMENTOS DE RMN DE HIDROGÊNIO	57
4.6.1 – ^1H -RMN DOS ANESTÉSICOS LOCAIS EM pH 10,5	57
4.6.2 – ^1H -RMN DE VESÍCULAS UNILAMELARES DE FOSFATILCOLINA (EPC)	63
4.6.3 – ^1H -RMN COM O SISTEMA ANESTÉSICO LOCAL:EPC	65
4.6.4 – ALTERAÇÃO NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS	71
4.6.5 – MEDIDAS DE TEMPO DE RELAXAÇÃO LONGITUDINAL: NO SISTEMA ANESTÉSICO:EPC	74
4.6.5.1 – ALTERAÇÃO NOS VALORES DE T_1 DOS HIDROGÊNIOS DA EPC	74
4.6.5.2 – ALTERAÇÃO NOS VALORES DE T_1 DOS HIDROGÊNIOS DOS AL	80
4.6.6 – EXPERIMENTOS DE 2D-NOE	81
4.7 – MODELAGEM MOLECULAR	88
5) DISCUSSÃO GERAL	91
5.1 – MODELO DE INSERÇÃO PARA OS ANESTÉSICOS LOCAIS	91
5.2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA AÇÃO DOS AL EM SUA FORMA NEUTRA	96
6) CONCLUSÕES	99
7) BIBLIOGRAFIA	100

ABREVIACÕES

AL	Anestésico local
AM1	Método semi-empírico (Austin Model)
BVC	Bupivacaína
CS	Chemical Shift (Deslocamento químico)
CSA	Anisotropia do deslocamento químico
$h+1/h0$	Razão das intensidades dos picos de campo baixo e central (RPE)
DBC	Dibucaína
DMPC	Dimiristoil fosfatidil colina
DOPC	Dioleil fosfatidil colina
EDC	Etidocaína
EPC	Fosfatidilcolina de ovo
D ₂ O	Água deuterada
GAMESS	Programa com vários métodos de modelagem molecular
IV	Infravermelho
K _b	Constante de ligação
LDC	Lidocaína
LMV	Vesícula multilamelar grande
LUV	Vesícula unilamelar grande
MeSL	Éster metílico do ácido doxil esteárico
MNDO	Teoria semi empírica de orbitais moleculares
MOLDEN	Programa visualizador de moléculas (modelagem molecular)
MVC	Mepivacaína
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
py	Marcadores de fluorescência (ácido pireno)
P	Coefficiente de partição de um soluto em duas fases
P _{S-F}	Coefficiente de partição, determinado por separação de fases, entre

	fosfatidilcolina de ovo (LMV) e água
P _{OCT}	Coeficiente de partição entre octanol/água
P _{LUV}	Coeficiente de partição, determinado por RPE, entre vesículas unilamelares grandes e água
P _{SUV}	Coeficiente de partição, determinado por RPE, entre vesículas unilamelares pequenas e água
PC	Phosphatidylcholine (Fosfatidil colina)
PE	Phosphatidylethanolamine (Fosfatidil Etanolamina)
PLC	Prilocaina
PRC	Procaína
PS	Phosphatidylserine (Fosfatidil serina)
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
¹ H-RMN	RMN de hidrogênio
² H-RMN	RMN de deutério
³¹ P-RMN	RMN de fósforo
ROESY	Sequência de pulso bidimensional para determinação de NOE
S _w	Solubilidade em água
S	Parâmetro de ordem
SUV	Vesícula unilamelar pequena
T ₁	Tempo de relaxação longitudinal
τ _c	Tempo de correlação rotacional
T _c	Temperatura de transição de fase
TTC	Tetracaína
V _a	Volume da fase aquosa
V _m	Volume da fase lipídica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos AL estudados.

Figura 2: Canal de Sódio. Estrutura e subunidades do canal de sódio de cérebro.

Figura 3: Potencial de ação e permeabilidade iônica do Na^+ e K^+ no axônio (Adaptado de Garret & Grisham, 1995).

Figura 4: Propriedades estruturais e funcionais do canal de sódio voltagem-dependente.

Figura 5: Modelo para inativação e ativação para o canal de sódio.

Figura 6: Estrutura do canal de potássio resolvida por raio-X.

Figura 7: Espectro de RPE do marcador 5-MeSL em vesículas unilamelares de EPC.

Figura 8: Diagrama de Jablonski para o fenômeno de fluorescência.

Figura 9: Estrutura química dos marcadores de spin membranares.

Figura 10: Estrutura química dos marcadores membranares de fluorescência, derivados do Pireno.

Figura 11: Variação da intensidade do Efeito Nuclear Overhauser em função de $\omega_0\tau_c$ para os experimentos de ROESY e NOESY.

Figura 12: Espectros de ressonância paramagnética eletrônica dos marcadores 5, 7 e 12 MeSL em vesículas unilamelares de EPC.

Figura 13: Efeito dos AL nos espectros dos marcadores de RPE 5, 7, 12 MeSL, inseridos nas vesículas de EPC.

Figura 14: a) Efeito máximo provocado pelos AL nos espectros dos marcadores de RPE inseridos em diferentes posições na bicamada; b) Efeito na razão molar 1:6 AL:EPC (na membrana) para marcadores de EPR em diferentes posições.

Figura 15: Espectros de emissão do marcador 4, 6, 10 e 16-py inseridos em vesículas unilamelares de EPC.

Figura 16: Efeito supressor dos AL na fluorescência dos marcadores 4, 6, 10 e 16 ácido pireno em membranas de EPC.

Figura 17: Supressão do sinal dos marcadores de fluorescência em diferentes posições na membrana.

Figura 18: Espectros de Infravermelho de vesículas unilamelares de EPC (65mM) na ausência e presença de LDC.

Figura 19: Espectro de RMN de Fósforo, com desacoplamento de hidrogênio, a) do padrão ácido fosfórico 85%, b) de vesículas unilamelares de EPC.

Figura 20: Espectro de ^1H -RMN da LDC, desprotonada.

Figura 21: Espectro de ^1H -RMN da EDC, protonada.

Figura 22: Espectro de ^1H -RMN da MVC, desprotonada.

Figura 23: Espectro de ^1H -RMN da BVC, desprotonada.

Figura 24: Espectro de ^1H -RMN da EPC.

Figura 25: Espectro de ^1H -RMN do sistema EPC+LDC.

Figura 26: Espectro de ^1H -RMN do sistema EPC+EDC.

Figura 27: Espectro de ^1H -RMN do sistema EPC+MVC.

Figura 28: Espectro de ^1H -RMN do sistema EPC+BVC.

Figura 29: Variação nos valores de T_1 (s) dos hidrogênios da EPC, em presença de AL.

Figura 30: Espectro de 2D-NOE para o sistemas EPC+LDC.

Figura 31: Espectro de 2D-NOE para o sistemas EPC+EDC.

Figura 32: Espectro de 2D-NOE para o sistemas EPC+MVC.

Figura 33: Espectro de 2D-NOE para o sistemas EPC+BVC.

Figura 34: Modelagem Molecular dos AL.

Figura 35: Modelo de inserção dos AL em vesículas unilamelares de EPC.

Figura 36: Esquema representativo da ação dos AL na forma neutra.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Regiões do canal de sódio e suas funções.

Tabela 2: Fonte e Nome comercial dos Anestésicos Locais (AL) estudados.

Tabela 3: Propriedades Físico-químicas e Atividade Anestésica.

Tabela 4: Desorganização da bicamada lipídica causada pelos AL. Medidas de RPE com marcadores do tipo MeSL em vesículas unilamelares.

Tabela 5: Valores de Coeficiente da partição EPC/tampão obtidos para os AL na forma neutra (pH 10,5).

Tabela 6: Valores de n_I (experimental e calculado), constante de ligação (K_b) e $K_b.S_w$, obtidos dos dados de RPE.

Tabela 7: Efeito dos AL na razão molar de 0,07:1 (AL:EPC na membrana) e no efeito máximo (EDC e BVC) nos experimentos de fluorescência.

Tabela 8: Valores de frequências de absorção das bandas de estiramento do fosfato, P=O, e carbonila, C=O, de vesículas unilamelares de EPC.

Tabela 9: Deslocamentos químicos e largura do pico a meia altura do ^{31}P da cabeça polar de vesículas unilamelares de EPC.

Tabela 10: Atribuições e deslocamentos químicos dos hidrogênios dos AL

Tabela 11: Atribuição e deslocamentos químicos dos hidrogênios das vesículas unilamelares de EPC.

Tabela 12: Deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos hidrogênios da EPC e dos AL em vesículas unilamelares de EPC.

Tabela 13: Variação nos deslocamentos químicos dos hidrogênios dos AL

Tabela 14: Média dos valores de T_1 observados para os hidrogênios de vesículas unilamelares de EPC com e sem anestésicos locais.

Tabela 15: Valores de T_1 para os hidrogênios dos AL, em vesículas unilamelares de EPC e em meio isotrópico.

Tabela 16: Atribuição dos hidrogênios do sistema LDC:EPC e “cross-peaks” encontrados da análise do experimento de ROESY

Tabela 17: Atribuição dos hidrogênios do sistema EDC:EPC e “cross-peaks” encontrados da análise do experimento de ROESY.

Tabela 18: Atribuição dos hidrogênios do sistema MVC:EPC e “cross-peaks” encontrados da análise do experimento de ROESY.

Tabela 19: Atribuição dos hidrogênios do sistema BVC:EPC e “cross-peaks” encontrados da análise do experimento de ROESY.

Tabela 20: Cálculos de modelagem molecular para os AL estudados.

RESUMO

Várias teorias sobre o mecanismo de ação de anestésicos locais (AL) são descritas na literatura. Podemos destacar as que tentam explicar os efeitos diretos dos AL sobre a proteína canal de sódio e as que levam em conta a interação dos mesmos com a fase lipídica membranar.

Também é bastante conhecida a correlação direta entre a hidrofobicidade das moléculas dos AL e sua potência anestésica clínica. Desta forma é muito razoável pensar que, no mecanismo de ação dos AL, a interação destes compostos anfifílicos com a membrana seja de fundamental importância e também que os AL, em sua forma neutra (não carregada), teriam um papel especial visto que apresentam maior afinidade pela fase lipídica, em relação à forma protonada.

Neste trabalho, visando um melhor entendimento da interação AL com a fase membranar, escolhemos estudar a forma neutra de quatro anestésicos da família das amino-amidas (lidocaína, etidocaína, mepivacaína e bupivacaína) em lipossomos unilamelares de fosfatidilcolina de ovo (EPC). A escolha se deu pelo fato destes AL serem bastantes utilizados na clínica e por existirem poucos estudos envolvendo a forma neutra destes em sistemas membranares. Embora pertencentes a uma série homóloga estes AL apresentam propriedades químicas (hidrofobicidade) e estéricas (cíclicos vs não-cíclicos) bem diferentes.

Utilizamos várias técnicas espectroscópicas: Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), Fluorescência, Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio e fósforo para obtermos informações específicas sobre a interação AL e membrana. Nos experimentos de RPE e fluorescência sondas membranares em diferentes profundidades da cadeia acila foram úteis para evidenciar que a membrana lipídica se desorganiza quando incorporamos os quatro anestésicos, mas com variações quantitativas que refletem a localização preferencial de cada AL no interior das bicamadas.

As medidas de infravermelho e RMN de fósforo mostraram que a partição dos AL na membrana causa maior acesso de moléculas de água à região do grupo fosfato e glicerol dos lipídios, compatível com a desorganização da membrana causada pelos AL e com o espaçamento lateral criado pela inserção dos mesmos entre as moléculas lipídicas.

Utilizando a técnica de RMN de hidrogênio, verificamos que os AL particionam no interior das bicamadas, como observado pelo alargamento dos sinais dos picos dos hidrogênios dos AL quando em membrana, indicando uma menor mobilidade destes, em relação ao meio aquoso. Medidas do tempo de relaxação longitudinal (T_1) mostraram-se de grande importância na investigação da localização preferencial dos AL, onde alterações nos hidrogênios de regiões mais profundas da bicamada foram detectados somente para os AL mais hidrofóbicos (etidocaína e bupivacaína). Medidas do efeito nuclear Overhauser (ROESY), revelaram “cross-peaks” intermoleculares (AL:lipídio) compatíveis com uma localização preferencial desses AL.

Considerando que os AL atravessam rapidamente a bicamada e que sua localização no interior desta é melhor representada por uma função de distribuição (em relação à normal da bicamada), apresentamos aqui evidências de regiões de maior probabilidade de distribuição, isto é, onde os AL se encontrariam na maior parte do tempo. Um modelo de localização é apresentado para cada anestésico.

Desta forma, pudemos demonstrar que os anestésicos particionam em vesículas unilamelares de EPC causando maior desorganização que em lipossomos multilamelares, estudados anteriormente. A perturbação da membrana não é proporcional à hidrofobicidade dos compostos, nem mesmo quando presentes na mesma razão molar, AL:lipídio, na membrana. Os AL apresentam uma região preferencial de inserção no interior da bicamada lipídica, de acordo com suas propriedades químicas, ou seja, os mais hidrofóbicos (etidocaína e bupivacaína) se inserem mais profundamente que os hidrofílicos (lidocaína e mepivacaína), cujos anéis aromáticos se encaixariam na região do glicerol. A inserção em regiões mais profundas da bicamada aumentaria a potência anestésica por facilitar o acesso dessas moléculas a sítios hidrofóbicos, no canal de sódio voltagem-dependente.

ABSTRACT

Literature carries many theories about the mechanism of action of local anesthetics (LA). We can highlight those that focus on the direct effect of LA on the sodium channel protein and the ones that consider the interaction of anesthetic molecules with the lipid membrane phase.

The direct correlation between LA hydrophobicity and anesthetic potency is well known. So, it is reasonable to consider that the interaction of these amphiphilic compounds with the membrane could be of great importance, as well as the neutral (uncharged) form interaction, since its affinity for the membrane is higher than the protonated LA species.

To better understand the LA – lipid membrane phase interaction, we have chosen to study the neutral form of four amino-amide local anesthetics (lidocaine, etidocaine, mepivacaine and bupivacaine) in unilamellar liposomes of phosphatidylcholine (EPC). The choice was made because these LA are clinically used and there are just a few studies involving the neutral species in membrane systems. These anesthetics belong to a homologous series but show quite different physicochemical properties such as hydrophobicity and steric parameters (mainly the cyclic vs. the non-cyclic).

We have employed different spectroscopic techniques such as Electron Paramagnetic Resonance (EPR), Fluorescence, Infra-Red and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of hydrogen and phosphorus to obtain information about the specific interaction of LA with the membrane. In EPR and fluorescence measurements membrane probes inserted to different depths of the lipid acyl chain revealed that all the four anesthetics led to a decrease in membrane organization, but with quantitative differences related to the preferential positioning of each molecule inside the bilayer.

IR and phosphorus-NMR measurements have clearly shown that partition of the LA molecule favors the access of water molecules up to the phosphate and glycerol moieties. These results are quite compatible with the decrease in membrane organization and can be explained by the spacement created by the LA insertion in-between the lipid molecules.

Hydrogen NMR (^1H -NMR) techniques evidenced LA partition inside the membrane, as shown by the broadening of the anesthetics ^1H peaks when they move from

the water to the membrane phase. Longitudinal relaxation time (T_1) measurements were quite useful in the investigation of the preferential positioning of LA in the bilayer: just the more hydrophobic anesthetics (etidocaine and bupivacaine) were able to disturb the mobility of lipid hydrogens in the acyl chain core region. Nuclear Overhauser effect (ROESY) experiments revealed LA:lipid cross-peaks consistent with the preferential insertion of these molecules.

Considering that LA crosses the membranes in a fast way and that its location inside the bilayer is best represented by a distribution function (against the bilayer normal), we have brought together clear evidences of regions with greater probabilities of finding the LA, i.e., where the LA stay most of the time. A model for the LA location inside the bilayer is presented.

We show here that local anesthetics partition causes a greater change in membrane organization in unilamellar than in multilamellar EPC vesicles, previously studied in our laboratory. Membrane perturbation is not proportional to the LA hydrophobicity, even when equal LA:lipid molar ratios are present inside the membrane. Each LA seems to have a preferential positioning inside the bilayer, determined by its chemical properties, i.e., the more hydrophobic (etidocaine and bupivacaine) prefer deeper regions than the more hydrophilic (lidocaine and mepivacaine), which aromatic rings would lie in the glycerol moiety. We believe that the deeper insertion would favor anesthetic potency by facilitating the access of the molecule to hydrophobic sites of the sodium channel protein.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - ANESTÉSICOS LOCAIS

Anestésicos locais (AL) compreendem um grande número de moléculas, de diferentes estruturas químicas: amino-ésteres, amino-amidas, amino-cetonas, amidas, álcoois, tio-ésteres, tio-amidas, derivados de uréia, poliéteres, etc (Gupta, 1991), capazes de bloquear a condução do estímulo nervoso.

AL diferem dos anestésicos gerais por sua ação regional e porque esses últimos são aplicados via sistêmica, direta (no sangue) ou indiretamente (pulmões). Além disso os AL agem sobre os axônios, enquanto os anestésicos gerais atuam nas transmissões sinápticas (Covino & Vassalo, 1976; Strichartz & Ritchie, 1987; de Jong, 1994).

Por serem moléculas anfifílicas, os AL têm grande afinidade pela membrana celular. Em membranas excitáveis, eles diminuem a velocidade de despolarização, inativando os canais de sódio voltagem-dependentes dos axônios, impedindo assim o influxo de íons necessários à despolarização da membrana (Covino & Vassalo, 1976).

Podemos classificar as teorias propostas para explicar os mecanismos de ação dos AL em duas categorias: a que atribui o efeito anestésico à ligação dos AL na proteína canal de sódio e a que considera a interação do AL com os lipídios da membrana (conhecida como “hipótese do lipídio”) como o mecanismo responsável pelas alterações no canal.

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 microsossomais e mitocondriais, citocromo oxidase, proteína G, proteína EnvZ que age na transdução de sinais por ativação da porina (de Paula & Schreier, 1996, para uma revisão, Arias, 1998), e proteína Quinase Ca (Slater, *et al*, 1997).

Na primeira categoria enquadram-se inúmeras tentativas de explicar a ligação direta dos AL em um ou mais sítios específicos do canal de sódio voltagem-dependente,

alterando sua conformação e levando a inativação temporária do canal (Strichartz & Ritchie, 1987).

Desde os trabalhos pioneiros de Hodgkin & Huxley (1952) sabe-se que os anestésicos têm efeito direto nos canais de sódio e que interagem com diferente afinidade com essas proteínas, dependendo do estado funcional (ativado, inativado, em repouso) destas. Uma possível interpretação para essa diferente afinidade estaria na presença das formas ionizada e neutra dos anestésicos, em pH fisiológico. Na década de 70 Frazier e col. verificaram que análogos quaternários de AL bloqueavam a condução nervosa quando aplicados internamente aos axônios gigantes de lula perfundidos. Esses autores entenderam esses resultados como indicativos de que a forma carregada dos AL seria a responsável pelo efeito no canal, e que o sítio de ligação seria acessível apenas a partir da face citoplasmática da membrana (Frazier *et al.*, 1970; Narahashi & Yamada, 1969).

No entanto, a grande potência anestésica de compostos como a Benzocaína (BZC), que não se protona em pH próximo ao fisiológico, causava controvérsia para a descrição deste sítio único para os AL protonados. Além disso, a grande variedade estrutural de moléculas com ação anestésica local levava a crer na existência de mais de um sítio receptor ou mecanismo de ação para os AL (Strichartz, 1987). O desenvolvimento quase simultâneo das técnicas de mutação sítio específica (Noda *et al.*, 1984) e de *patch-clamp*, na década de 1980 permitiu um crescimento enorme nas pesquisas envolvendo proteínas-canal. Em 1994 Caterall e colaboradores, usando técnicas de biologia molecular, conseguiram demonstrar a existência de um “sítio hidrofóbico” para a forma neutra dos AL, situado no interior da bicamada, isto é, em uma α -hélice transmembranar (S6 do domínio IV da subunidade α) da proteína canal de sódio. A substituição de resíduos hidrofóbicos como a fenilalanina (1710) por alanina faz decrescer de 10 a 100 vezes o bloqueio anestésico causado por anestésicos locais (Ragsdale *et al.*, 1994; 1996).

Talvez a teoria de anestesia mais compreensiva e abrangente seja a “receptor modulated”, que admite a existência de um ou mais sítios de ligação no canal de sódio para os AL. As diferentes afinidades dos AL por esse(s) sítio(s) seria modulada pelo estado conformacional do canal, sendo maior a afinidade pelo canal inativado ou em

repouso (na membrana despolarizada) do que para o estado ativado (membrana hiperpolarizada) (Hille, 1977; Hondeghen & Katzung, 1977).

Na hipótese do lipídio considera-se que as alterações causadas pelos anestésicos nas propriedades estruturais e dinâmicas da matriz lipídica como a separação lateral de fases (Trudell, 1977; Hornby & Cullis, 1981), aumento da fluidez (Hubbel et al., 1970; Boulanger *et al.*, 1981; Bianconi *et al.*, 1988), fusão (Cokley et al., 1983) ou lise celular (Seeman, 1966) levariam a mudanças conformacionais no canal de sódio, causando sua inativação (Lee, 1976).

Em nosso laboratório temos estudado a interação de anestésicos locais com membranas modelo, tendo em vista as alterações estruturais e dinâmicas provocadas pelos anestésicos na fase lipídica (de Paula & Schreier, 1995, 1996; Malheiros et al., 1999).

1.1.1 – AMINO-AMIDAS

Na clínica, as amino-amidas como a lidocaína e a etidocaína e amino-ésteres como a tetracaína, TTC, são os mais usados, no entanto há poucos estudos sobre as amino-amidas na literatura (de Jong, 1994, cap. 7). Os amino-ésteres são em geral mais potentes que as amino-amidas, no entanto, a tendência atual é a de desenvolver-se amino-amidas mais potentes, pelo fato de serem menos tóxicas e mais resistentes à hidrólise quando comparadas com os amino-ésteres (de Jong, 1994 - cap. 7). Tais fatos nos levaram à escolha de quatro anestésicos locais da família das amino-amidas para a realização deste estudo descritas abaixo:

- Lidocaína (LDC)

Introduzida em 1948, é atualmente o anestésico local mais amplamente utilizado. A estrutura química da lidocaína é mostrada na **Figura 1**.

A lidocaína produz anestesia mais rápida, mais intensa, de maior duração e mais extensa que uma igual concentração de procaína (primeiro AL sintético do tipo amino-éster). Ao contrário da procaína, é uma eminoetilamida e é o protótipo desta classe de anestésicos locais, as amino-amidas (Caterall & Mackie, 1996).

A LDC é rapidamente absorvida após administração parenteral e pelos tratos gastrointestinal e respiratório. Embora seja eficaz quando utilizada sem qualquer vasoconstritor, com adrenalina a taxa de absorção e a toxicidade são reduzidas e a duração da ação é em geral prolongada. A LDC é desalquilada no fígado por oxidasas de função mista, que podem ser metabolizadas em monoetilglicina e glicina xilidida. Monoetilglicina xilidida e glicina xilidida retêm a atividade anestésica local. Nos seres humanos cerca de 75% da xilidida é excretada na urina como o metabólito 4-hidróxi-2,6-dimetilanilina (Caterall & Mackie, 1996).

Os efeitos colaterais da LDC encontrados incluem sonolência, zumbido, disgeusia, tontura e contrações. A medida que se aumenta a dose, ocorrem convulsões, coma, depressão e parada respiratória. Em geral, níveis séricos de lidocaína que produzem efeitos acentuados no SNC provocam depressão cardiovascular clinicamente importante. Os metabólitos monoetilglicina xilidida e glicina xilidida contribuem para alguns desses efeitos colaterais (Goodman & Gilman, 1996).

A LDC tem vários usos clínicos como anestésico local; é útil em quase toda aplicação em que é necessário um anestésico de duração intermediária e também utilizada como agente antiarrítmico (Goodman & Gilman, 1996).

- Etidocaína (EDC)

A etidocaína foi introduzida em 1972 é uma amino-amida de longa ação (estrutura química na Figura 1). Seu início de ação é mais rápido que o da bupivacaína, e comparável ao da lidocaína, ainda que sua duração de ação seja semelhante ao da bupivacaína. Quando comparada a bupivacaína, a etidocaína produz bloqueio motor preferencial, portanto, embora seja útil para a cirurgia que exige relaxamento intenso da musculatura esquelética, sua utilidade no trabalho de parto e na analgesia pós-operatória é limitada. Sua cardiotoxicidade é semelhante à da bupivacaína (ver adiante) (Goodman & Gilman, 1996).

- Mepivacaína (MVC)

A mepivacaína foi introduzida em 1972 é uma amino-amida de ação intermediária (Figura 1). Suas propriedades farmacológicas são semelhantes às da

lidocaína, entretanto, a mepivacaína é mais tóxica para o neonato e portanto não pode ser utilizada na anestesia obstétrica. A toxicidade aumentada da mepivacaína, no neonato, não está relacionada ao seu metabolismo mais lento, mas à retenção iônica deste agente devido ao pH mais baixo no sangue do neonato e ao pK_a da mepivacaína. Apesar de seu lento metabolismo, a mepivacaína parece ter um índice terapêutico discretamente mais elevado nos adultos que a lidocaína. Seu início de ação é semelhante ao da lidocaína e sua duração discretamente mais longa (cerca de 20%) que a lidocaína na falta de um vasoconstritor administrado simultaneamente. A mepivacaína não é tão eficaz como anestésico tópico (Caterall & Mackie, 1996).

- Bupivacaína (BVC)

A bupivacaína foi introduzida em 1963 e é um anestésico local muito utilizado, sua estrutura é semelhante à da lidocaína, exceto que o grupo contendo amina é uma butil piperidina, assim como para a mepivacaína (Figura 1). É um agente potente capaz de produzir anestesia prolongada. Sua longa duração de ação aliada a sua tendência para fornecer um bloqueio mais sensorial que motor, tornou-o de uso popular para promover analgesia prolongada durante o trabalho de parto ou no período pós-operatório. Aproveitando-se a vantagem dos cateteres de demora e das infusões contínuas, a bupivacaína pode ser utilizada para fornecer vários dias de analgesia eficaz (Goodman & Gilman, 1996).

A bupivacaína (assim como a etidocaína) é mais cardiotoxica do que doses equieficazes da lidocaína. Clinicamente, a cardiotoxicidade da bupivacaína manifesta-se por arritmias ventriculares graves e depressão miocárdica após administração intravascular inadvertida de grandes doses. É provável que este efeito da bupivacaína seja devido a vários fatores: a lidocaína e bupivacaína bloqueiam os canais de sódio cardíacos rapidamente durante a sístole, entretanto, a bupivacaína dissocia-se muito mais lentamente que a lidocaína durante a diástole, de forma que uma fração significativa de canais de sódio permanece bloqueada no final da diástole com bupivacaína (Clarkson & Hondeghe, 1985). Portanto o bloqueio com bupivacaína é cumulativo e substancialmente maior do que seria previsível por sua potência anestésica local. A

toxicidade cardíaca induzida pela bupivacaína pode ser muito difícil de tratar, e sua gravidade aumenta com acidose, hipercarbia e hipoxemia (Goodman & Gilman, 1996).

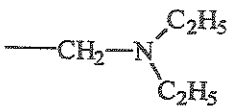
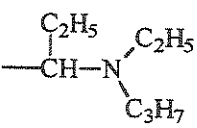
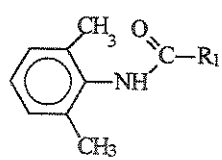
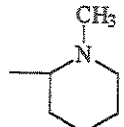
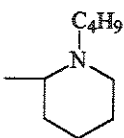
ANESTÉSICO	Abrev.	R ₁
Lidocaína	LDC	
Etidocaína	EDC	 
Mepivacaína	MVC	
Bupivacaína	BVC	

Figura 1: Estrutura química dos AL estudados.

1.2 – INTERAÇÃO DE AL COM A PROTEÍNA CANAL DE SÓDIO

A principal ação farmacológica dos AL é a de interromper o processo de excitação e condução do estímulo nervoso em fibras nervosas periféricas. Em todas as células excitáveis, a energia potencial para a condução do impulso nervoso provém do desequilíbrio iônico dentro e fora da membrana plasmática (Hodgkin & Huxley, 1952). Nas células nervosas como em outras, o desequilíbrio iônico é criado e mantido pela Na⁺, K⁺ ATPase (a bomba de sódio/potássio), um proteína de membrana que às custas de ATP bombeia 3 íons Na⁺ para fora contra 2 íons K⁺ para dentro da célula (Guyton & Hall, 1996; Lehninger *et al*, 1997; Voet & Voet, 1995).

Fisiologicamente, a excitação da membrana nervosa causa ativação da proteína canal de sódio (Figura 2) que se abre, fazendo com que haja influxo de sódio – no

sentido de re-equilibrar as concentrações desiguais desse íon dentro e fora da célula - levando à despolarização da membrana (**Figura 3**). Essa perda de cargas ou despolarização é o sinal para que os canais de sódio voltagem-dependente dos axônios se abram, permitindo assim a propagação do impulso nervoso, em que o sinal elétrico é transmitido ao longo do axônio, unidirecionalmente.

O canal voltagem-dependente é a principal proteína do axônio, chegando a representar mais de 90% das proteínas de membranas deste. Diferentemente de outros canais, esta proteína não possui um sítio receptor, e sua ativação é feita pela alteração do potencial elétrico da membrana, que causa alterações conformacionais na proteína levando-a ativar-se (Marban et al., 1998).

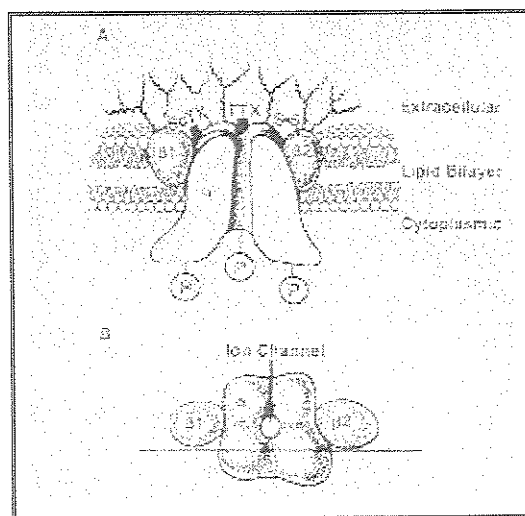


Figura 2: Canal de Sódio. Estrutura das subunidades do canal de sódio de cérebro. A) Vista da seção de um canal de sódio hipotético, consistindo de uma subunidade transmembranar α (260 kDa) em associação com duas subunidades β (β -1, de 36 kDa, e β -2, de 33 kDa). B) Vista do canal de sódio pelo lado extracelular, ilustrando a formação de um poro transmembranar, no centro da subunidade α (Catterall, 1992).

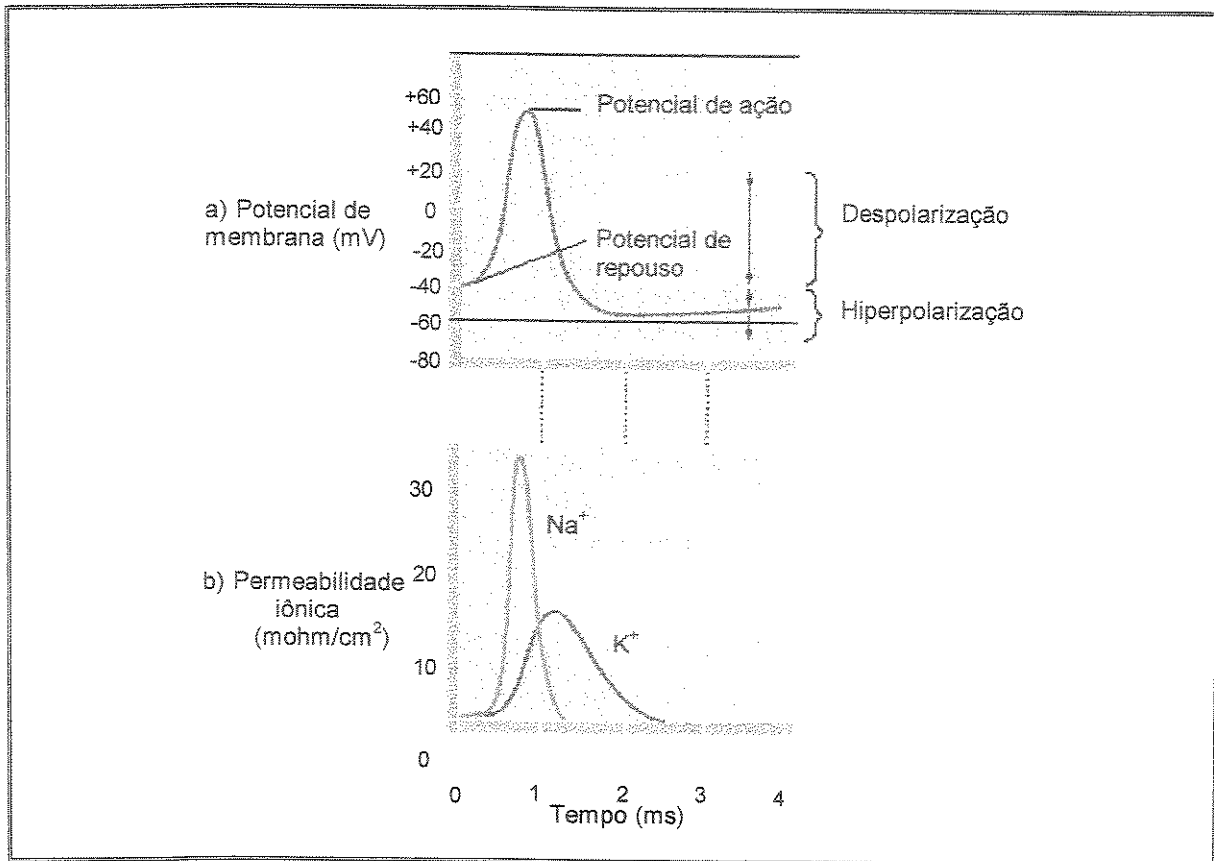


Figura 3: *Potencial de ação e permeabilidade iônica ao Na^+ e K^+ no axônio.* a) O aumento rápido no potencial de membrana de -60mV para aproximadamente +30mV é descrito como “despolarização”. Esta despolarização é causada por b) um rápido aumento na permeabilidade ao Na^+ . Assim que a permeabilidade ao Na^+ diminui, 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).

O canal de sódio (**Figura 4**), pertence a mesma família dos canais de potássio e de cálcio, voltagem-dependentes (Marban et al., 1998). É uma glicoproteína, seletiva ao íon sódio (a passagem de K^+ equivale a cerca de 8% da de Na^+). Pode apresentar mais de uma subunidade, mas somente a α é requerida para sua função. Experimentos usando anticorpos anti peptídeos de $\beta 1$ e $\beta 2$ mostraram que a maior parte dos canais de sódio de cérebro de rato têm ambas subunidades β ; a subunidade α tem 260kDa e 2006 resíduos de aminoácidos (Noda et al., 1986) e as β têm 23 e 21kDa cada, sendo que $\beta 2$ está ligada à subunidade α por pontes dissulfeto enquanto $\beta 1$ liga-se não covalentemente à α . Cada subunidade β tem um grande resíduo amino terminal extracelular com várias regiões de

consenso para N-glicosilação. Canais de músculo esquelético tem a subunidade α (260 kDa) e uma ou duas subunidades β (38 kDa cada) enquanto os canais voltagem-dependentes de enguia e de coração de galinha apresentam apenas a subunidade α (Catterall, 1992).

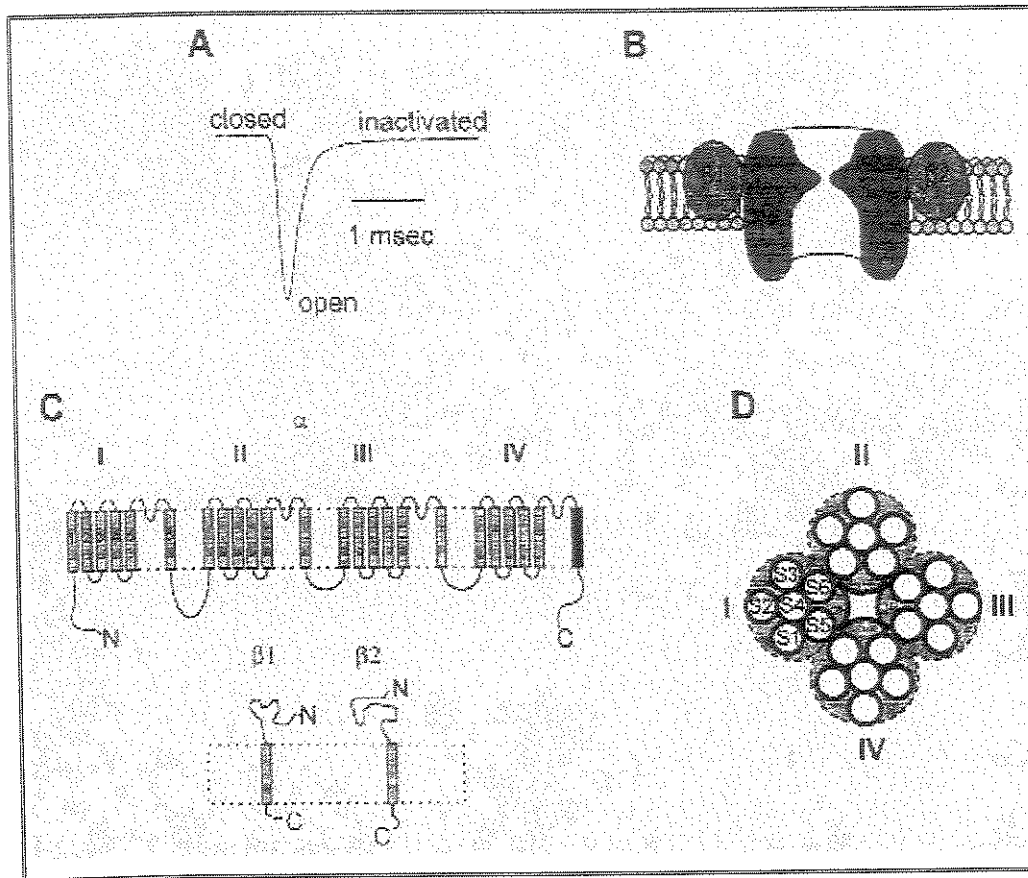


Figura 4: Propriedades estruturais e funcionais do canal de sódio voltagem-dependente. (A) Corrente macroscópica do canal de sódio, (B) Subunidades do canal de sódio de cérebro de mamíferos, (C) Topologia das subunidades do canal na membrana, (D) Arranjo dos quatro domínios ao redor do poro central. Cada domínio apresenta seis α -hélices (1-6) (Ragsdale & Avoli, 1998).

O canal de sódio é o mais estudado dos canais voltagem-dependentes. Já em 1952, Hodgkin & Huxley demonstraram neles que os fenômenos de abertura (“gating”) e permeação de íons (Hodgkin & Huxley, 1952) estavam relacionados com mais de 2 estados funcionais: aberto, fechado e inativado (**Figura 5**). Essa proteína foi também o primeiro canal desse tipo a ser clonado (Noda et al., 1984) e seu estudo beneficiou-se

ainda do desenvolvimento, na mesma época, da técnica de *patch-clamp*, que permite a medida do potencial elétrico de canais isolados (Hamill et al. 1981).

A característica dessa família de canais voltagem-dependentes é a presença de 4 domínios transmembranares homólogos (canais de sódio e cálcio) ou quatro subunidades homólogas (canais de potássio) onde cada domínio ou subunidade apresenta seis segmentos em α -hélice, S1 a S6, como mostra a **Figura 4C e D** (Caterral, 1992; Marban, et al 1998; Scheuer, 1999). Os domínios ou subunidades se organizam de forma a apresentar um poro central, seletivo ao sódio. Segundo Marban e col. (1998), os canais de sódio devem ter surgido a partir da mutação de canais de cálcio, que por sua vez evoluíram, por duplicação da informação gênica dos canais de potássio.

A estrutura dos canais de potássio, com resolução de 3,2 angstrons, foi revelada por cristalografia de Raios-X (Doyle et al., 1998) e está mostrada na **Figura 6**. Os canais de potássio são muito similares aos de sódio, pois apresentam quatro domínios (I a IV) compostos de seis α -hélices transmembranares (S1 a S6). Em cada domínio a α -hélice S4 - com vários resíduos de aminoácidos carregados positivamente - tem importância fundamental no processo de abertura do poro em ambos os canais. Como esses canais voltagem-dependentes não têm uma molécula ativadora específica, as α -hélices S4 formam a região “voltage-sensing” ou de disparo do canal (Scheuer, 1999). Acredita-se que a mudança do potencial da membrana desestabiliza o segmento S4 cujas cargas positivas são mantidas por pareamento com cargas negativas de outros segmentos transmembranares. Com a despolarização da membrana reduzem-se as forças que mantêm as cargas positivas de S4 na sua posição e a hélice S4 sofre uma rotação (movimento espiral de cerca de 60 graus, deslocando-se cerca de 5 angstrons para fora da bicamada). Esse movimento deixa uma carga negativa não pareada no interior da bicamada e expõe uma carga positiva na superfície externa da membrana, resultando na transferência de carga líquida de +1 (Caterral, 1992).

Outra similaridade é o segmento P (de poro, formado pela alça extracelular S5-S6, isto é, entre as α -hélices S5 e S6. Esse segmento é uma região bastante conservada entre os canais de Na^+ , K^+ e Ca^+ e considerada o “forro” do canal (pois se dobra sobre o poro, **Figura 6A**), como mostra a cristalografia de Raios-X dos canais de K^+ (Choe et al., 1999).

Uma região extremamente importante para o funcionamento dos canais de sódio é o sítio de inativação (“inactivating gate”) formado pela alça intramembranar entre os domínios III (S6) e IV (S1) que se projetariam (como tampa de dobradiça) sobre o lumen interno do poro, inativando-o. Anticorpos preparados contra esse peptídeo são capazes de inibir completamente a inativação do canal. Estudos de mutação sítio específica mostraram que os resíduos I-F-M (posição 1488, 1489, 1490, segundo Kuroda et al, 1996) são fundamentais para a inativação espontânea do canal e formariam o trinco da fechadura, mantendo a tampa da dobradiça fechada sobre o poro (Rohl *et al*, 1999; Scheuer, 1999), como mostrado na **Figura 5**.

Sítios de regulação - por fosforilação - para a proteína quinase dependente de AMPc, foram encontrados na isoforma neuronal e em várias isoformas cardíacas do canal, especificamente na alça intracelular entre os domínios I e II (Marban et al., 1998); a fosforilação diminui a amplitude da corrente e altera a condutância total da célula. A proteína quinase C também altera o funcionamento de todas as isoformas dos canais de sódio de mamíferos. O sítio de fosforilação é uma serina, altamente conservada, na alça entre os domínios III e IV; a fosforilação pela proteína quinase C reduz a condutância máxima do canal e altera sua ativação (Marban et al., 1998).

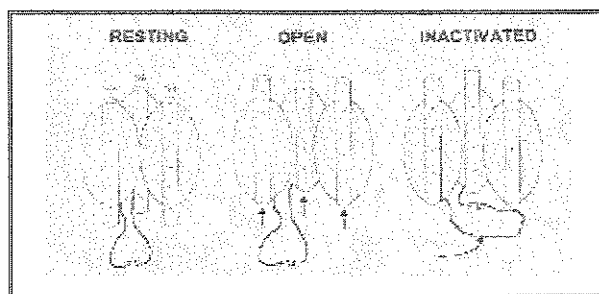


Figura 5: Modelo para ativação e inativação para o canal de sódio (Ragsdale & Avoli, 1998).

A **Tabela 1**, resume as informações específicas sobre funções relacionadas a diferentes porções do canal de sódio.

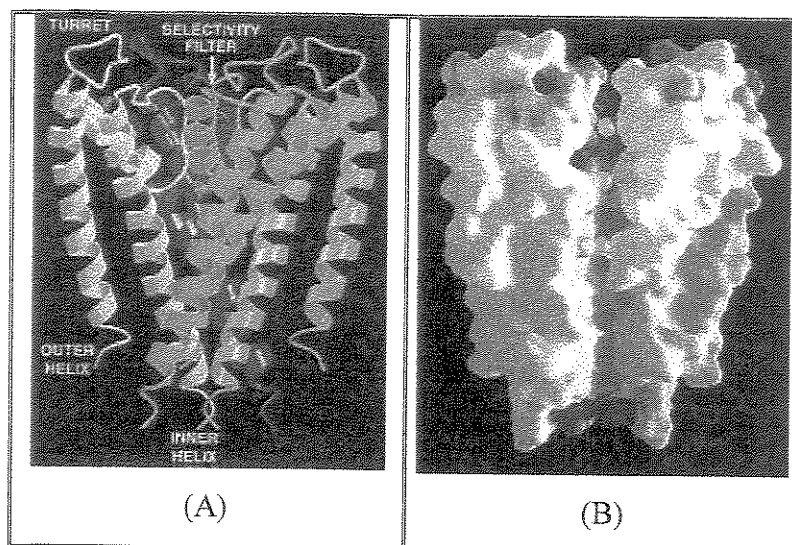


Figura 6: Estrutura do canal de potássio. (A) Vista tridimensional do tetrâmero do canal de potássio (em que as quatro subunidades apresentam cores diferentes); (B) Ilustração do poro iônico do canal de potássio (de acordo com Doyle et al., 1998).

Tabela 1: Algumas regiões do canal de sódio e suas funções.

Região	Função
Hélice S4 (Domínio IV)	“gating sensor” responsável pela ativação do canal
Alça S5-S6 (Domínio IV)	“Segmento P”, forro ou filtro do poro
Alça S6-S1 (Domínios III-IV)	“inactivating gate” ou tampa interna do canal; inclui também o sítio de fosforilação por proteína quinase C
Alça S6-S1 (Domínio I e II)	Sítios de fosforilação pela proteína quinase dependente de AMPc
Alfa-hélice S6 (Domínio IV)	Possível sítio de ligação de anestésicos locais
Alça S4-S5 (Domínio IV)	Relacionada com a inativação do canal. Possível sítio de ação para anestésicos locais

Algumas evidências de interação dos AL com a proteína canal de sódio foram descritas na literatura por vários autores.

Assim, 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 (Narahashi & Yamada, 1969; Frazier *et al.*, 1970). Assim, por muitos anos acreditou-se

que 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).

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 de cérebro de rato (Alfa-hélice S6 (Domínio IV)). O acesso do AL até este sítio seria feito pela difusão do mesmo através da bicamada lipídica (Ragsdale *et al.*, 1994). Posteriormente, o mesmo grupo observou a interação de AL, antiarrítmicos e anticonvulsivantes em sítios de ligação mutados, no canal de sódio e sugeriram que estas drogas interagem com um sítio comum, porém de uma maneira não idêntica (Ragsdale *et al.*, 1996).

Estudos recentes empregando RMN e biologia molecular mostraram que os AL não agem no canal iônico, nem na “alça” que mantém o canal fechado durante o estado refratário e de repouso (Rohl *et al.*, 1999; Scheuer, 1999), corroborando os resultados anteriores de existência de sítios hidrofóbicos para a ligação dos AL (Ragsdale *et al.*, 1996; Ragsdale & Avoli, 1998).

1.3 - INTERAÇÃO DE ANESTÉSICOS LOCAIS COM MEMBRANAS

Estudos clássicos da literatura mostram que os anestésicos locais agem sobre sistemas membranares alterando-os de diversas maneiras. Analisando somente a fase lipídica membranar foram observados efeitos de expansão da bicamada, aumento da fluidez da membrana e alteração da temperatura de transição de fase (T_c), entre outros (de Paula & Schreier, 1996).

A incorporação de anestésicos locais causa uma expansão da área superficial de monocamadas (Skou, 1954) e bicamadas (Seeman, 1966; Seelig, 1987), esta expansão seria favorecida pela diferença entre o comprimento do AL (mais curto) e o dos fosfolipídios: abaixo do seu ponto de inserção o AL criaria um “volume livre” que seria compensado com aumento de conformações gauche das cadeias lipídicas. Como resultado observa-se diminuição no comprimento total das moléculas lipídicas (Trudell, 1977; Gallová *et al.*, 1997). De fato, Hill (1974) observou uma diminuição da espessura da bicamada, acompanhando alterações da T_c por anestésicos gerais e álcoois; segundo o

mesmo, a alteração da T_c seria resultante da maior mobilidade das moléculas lipídicas causada pela expansão da membrana.

Diminuições na temperatura de transição de fase foram observadas por diferentes grupos de pesquisadores utilizando várias técnicas. Lee (1976b, 1978), utilizando calorimetria, registrou diminuição da T_c de vesículas de fosfatidilcolina (PC), causada pela partição da BZC, PRC, TTC, LDC e DBC, em concentrações iguais às necessárias para 50% de bloqueio na condução do estímulo nervoso. Esses achados foram confirmados para a forma neutra da PRC, TTC, LDC e BVC, por espalhamento de luz (Ueda *et al.*, 1977) e outros AL do tipo amino-amida protonados, utilizando microscopia de polarização de luz (Racanský *et al.*, 1984) e microcalorimetria (Gallová *et al.*, 1992) em vesículas de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC).

O fato de que os AL perturbam o empacotamento dos fosfolipídios em membranas modelo e biológicas foi bastante estudado por experimentos de ressonância paramagnética eletrônica e também por outras técnicas espectroscópicas como ressonância magnética nuclear, infravermelho e fluorescência, (revisão em de Paula & Schreier, 1996), trazendo enorme contribuição para o entendimento da interação AL / membrana.

1.3.1 - ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS

Através da técnica de absorção no infravermelho, que fornece informação sobre as energias vibracionais das ligações da molécula, Schöpflin e col. (1987) demonstraram a incorporação da DBC, PRC e dois outros AL em monocamadas de palmitoil oleil fosfatidilcolina (POPC), estudando as bandas de absorção dos compostos, entre 1400 e 1800 cm^{-1} . A combinação de estudos de I.V. com pressão possibilitou a Auger e col. demonstrarem que a TTC, incorporada em membranas de PC, fosfatidil serina (PS) e biológicas, é expulsa da bicamada por aumento da pressão (Auger *et al.*, 1987, 1990). Esse achado veio comprovar observações anteriores, *in vivo*, da reversão da ação de anestésicos gerais com aumento de pressão (Lever *et al.*, 1971). Explica também porque a TTC particiona melhor em membranas no estado líquido-cristalino (menos compactado), do que no estado gel e os achados de Bradley & Richards (1984) de que os AL penetram menos em membranas biológicas com a diminuição da temperatura. A compactação da

membrana deve ser o fator limitante da partição dos AL a baixa temperatura, como observaram Lee (1977) e Ueda e col. (Kaminoh *et al.*, 1988; 1989) sobre a partição dos AL em membranas lipídicas.

Medidas utilizando a técnica espectroscópica de fluorescência revelaram importantes informações sobre a localização de anestésicos locais em vesículas fosfolipídicas. Estudos utilizando o anestésico local TTC como supressor de marcadores fluorescentes em diferentes localizações no interior da bicamada puderam mapear regiões específicas, além de verificar a diferente mobilidade local nas cadeias acilas dos fosfolipídios (Sikaris & Sawyer, 1982; Hutterer, *et al.*, 1997) indicando uma inserção da TTC em regiões mais profundas da bicamada.

Medidas de Ressonância Magnética Eletrônica (RPE) foram realizadas com AL modificados, isto é, covalentemente ligados a radicais nitróxido (Gargiulo *et al.*, 1973; Giotta *et al.*, 1974) e também usando marcadores paramagnéticos hidrofóbicos, os "spin labels" (Kelusky & Smith, 1984; Schreier 1984, 1986; Frezatti Jr *et al.*, 1986; de Paula & Schreier, 1995; Gallová *et al.*, 1997). Esses estudos mostraram que a incorporação dos AL na bicamada lipídica é acompanhada por uma diminuição de ordem e dinâmica membranar. Em um estudo sistemático envolvendo AL das séries amino-amidas e amino-éster (de Paula & Schreier, 1995) observou-se que o efeito de diminuição da organização de membranas lipídicas não está relacionado diretamente à hidrofobicidade ou classe dos AL. Esses resultados foram reforçados por outro estudo realizado em nosso laboratório, que correlacionou resultados de RMN e RPE para análise da interação de três famílias de AL com membranas multilamelares de EPC (Pinto, 1998). Temos grandes evidências de que parâmetros estéricos dos AL determinariam sua localização preferencial no interior da bicamada.

1.3.1.1 - ESTUDOS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os primeiros experimentos com ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN) detectaram imobilização da molécula do anestésico local quando intercalado na bicamada lipídica (Hauser & Dawson, 1968; Cerbon, 1972; Darke *et al.*, 1972; Finer, 1972; Lee *et al.*, 1972), efeito semelhante ao observado por RPE com análogos paramagnéticos dos AL (Gargiulo *et al.*, 1973; Giotta *et al.*, 1974).

Com os experimentos de RMN de deutério, ^2H -RMN (Boulanger *et al.* 1980, 1981; Westman *et al.*, 1982; Browning & Akutsu, 1982; Kelusky, 1983; Kelusky & Smith, 1984) e a utilização de AL e lipídios seletivamente deuterados foi possível, pela primeira vez, identificar as regiões das membranas lipídicas em que se “situam” preferencialmente os AL. O trabalho de Boulanger e col. (1981) tornou-se citação obrigatória e é, com certeza, o trabalho de maior reconhecimento na área, por ter demonstrado inequivocamente a localização diferencial das formas protonada (mais superficial) e neutra da TTC em vesículas de PC. Em 1988, Auger *e col* demonstraram que a incorporação de colesterol nessas vesículas altera a afinidade de anestésicos do tipo amino-éster pela bicamada (Auger *et al.*, 1988).

Resultados semelhantes foram encontrados com anestésicos gerais, onde estudos utilizando ^2H -RMN mostraram que o etanol interage com diversas regiões da bicamada em vesículas unilamelares (Barry & Gawrisch, 1994) e multilamelares de EPC (Holte & Gawrisch, 1997) mas tem uma preferência para a região mais polar do lipídio. Já os anestésicos gerais halotano, isofurano e enfurano residem na região hidrocarbônica de vesículas fosfolipídicas, tendo também preferência pela interface membrana-solvente (Baber *et al.*, 1995).

Medidas de ^1H -RMN favoreceram-se do desenvolvimento de espectrômetros de RMN de alta resolução e de novas técnicas de pulso, que possibilitaram a obtenção de informações sobre a proximidade entre núcleos e o mapeamento do interior hidrofóbico da bicamada. Em relação aos AL, os resultados obtidos até aqui por ^1H -RMN com a forma protonada da TTC (Yokono *et al.*, 1989) PRC, DBC e TTC (Kuroda & Fujiwara, 1987; Wakita *et al.*, 1992), estão de acordo com os achados de ^2H -RMN, quanto a localização e grau de perturbação da bicamada.

No entanto, poucos trabalhos na literatura tratam da forma neutra dos AL, entre eles os do grupo de Smith (Boulanger *et al.*, 1980, 1981; Westman *et al.*, 1982; Kelusky *et al.*, 1984), o trabalho de Sikaris & Sawyer (1982) e nossos (Lissi *et al.*, 1990; de Paula & Schreier, 1995, 1996; Pinto *et al.*, 1999), a despeito da maior interação desses com a fase lipídica da membrana. É provável que a dificuldade imposta pela baixa solubilidade aquosa dos AL desprotonados tenha limitado seu estudo até aqui e também a falsa idéia decorrente dos trabalhos com análogos quaternários da LDC (Frazier & Narahashi, 1971;

Frazier *et al*, 1970) realizados nos anos 70 de que a forma protonada dos AL seria a responsável pela ligação à proteína canal de Na⁺. A importância da forma neutra dos AL foi retomada depois dos trabalhos de Ragsdale e col. (1994, 1996) que mostraram a existência de um sítio hidrofóbico no canal de Na⁺ para a ligação dos AL desprotonados. Além disso trabalhos de nosso grupo (Schreier *et al* 1984, Malheiros *et al*, 2000) mostram diminuição significativa do pK aparente de AL como a TTC e DBC pela partição na membrana, que leva a um aumento na fração de AL desprotonado em pH fisiológico, justificando seu estudo.

Temos trabalhado na questão da determinação das possíveis localizações preferenciais da forma neutra de AL no interior da bicamada, através da medida das proximidades moleculares por ¹H-NOE (ROESY) e tempos de correlações longitudinal spin-rede (T₁). Pretendemos aqui explorar essas medidas de RMN de forma obter informações sobre o sistema AL/fosfolípido que nos levem a melhor interpretação do mecanismo de anestesia.

As medidas com outras técnicas espectroscópicas: RPE, fluorescência, IV, ³¹P-RMN, têm o objetivo de confirmar essas análises de ¹H-RMN, além de fornecer evidências da diferente partição dos anestésicos estudados.

2 - OBJETIVOS

1) Estudar a interação da forma neutra de anestésicos locais do tipo amino-amida (Lidocaína, Etidocaína, Mepivacaína e Bupivacaína) com lipossomos de fosfatidilcolina de ovo (EPC), através de técnicas espectroscópicas.

Utilizando medidas RMN de hidrogênios (tempos de relaxação longitudinal e do efeito nuclear Overhauser em espectros bidimensionais ^1H - ^1H) e de fósforo, fluorescência e RPE.

2) Determinar alterações estruturais e dinâmicas da fase lipídica por ação dos diferentes anestésicos que evidenciem a inserção preferencial dos mesmos em dada região da bicamada.

A localização preferencial do anestésico na membrana, consideradas as diferenças estéricas e hidrofóbicas desses, pode ser a chave para um entendimento mais completo do mecanismo de ação anestésica, uma vez que a localização poderia mediar o acesso do AL ao sítio de ligação hidrofóbico na proteína canal de Na^+ voltagem dependente.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DAS TÉCNICAS

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 transições em 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 descrita por (Equação 1):

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot e \cdot B \quad (1)$$

onde: h =constante de Planck; ν =frequência da radiação incidente; g =fator característico do elétron; e =magneton de Bohr; B =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 frequentes em sistemas biológicos. Para o estudo de sistemas diamagnéticos, a técnica do marcador de spin veio solucionar esse problema (Hubbel & McConnell, 1971; 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, 1971).

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 facilmente. O espectro do marcador nitróxido apresenta três linhas bem definidas graças a interação do spin nuclear ($I=1$) do núcleo do nitrogênio com o spin eletrônico, que resulta em um desdobramento da absorção em $2I+1$: 3 linhas, como mostrado na Figura 7 (Schreier et al, 1978; Warren, 1987).

A partir dos espectros de RPE, é possível calcular o parâmetro de ordem (S), uma medida da anisotropia do ambiente em que se encontram as moléculas do marcador de spin. O parâmetro de ordem mede a orientação da molécula em relação ao eixo diretor (normal à bicamada) e varia de 0, em sistemas isotrópicos, até 1 em bicamadas, no entanto para a maioria dos sistemas varia entre 0,5 e 1 (Jost et al, 1971).

No entanto, se o grau de ordem na membrana (ou na região monitorada pelo marcador de spin) é pequeno o parâmetro de ordem não pode ser medido diretamente. Este é o caso dos metil estearatos, que não interagem fortemente com a cabeça polar dos fosfolipídios de membrana (Schreier *et al.*, 1984; Frezzatti *et al.*, 1986) por não possuírem um grupamento carregado. 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 (Figura 7), compreendendo com isso contribuições 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 maiores. Anestésicos e outros anfifílicos causam diminuição da organização da membrana; neste caso, o “efeito desorganizador” pode ser expresso como uma porcentagem da razão h_{+1}/h_0 inicial, de acordo com a Equação 2.

$$\text{Efeito} = \frac{\left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{\text{amostra}} - \left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{\text{controle}}}{\left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{\text{controle}}} \times 100 \quad (2)$$

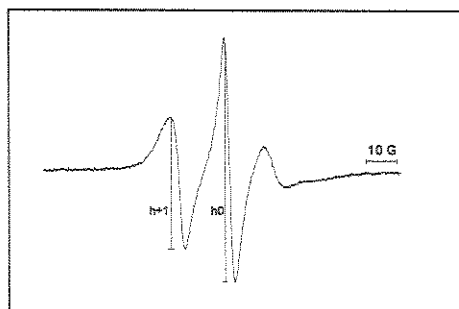


Figura 7: Espectro de RPE do marcador 5-MeSL em vesículas unilamelares de EPC (8mM).

3.1.2 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A ressonância magnética nuclear (RMN) é basicamente outro método de absorção espectrométrica, como a espectrofotometria de 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 a **Equação 3**.

$$h.\nu = \mu.H \quad (3)$$

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) que apresentem número atômico ou de massa ímpar ($\mu \neq 0$).

Nos espectrômetros de RMN, todos os núcleos selecionados, de um dado spin são irradiados simultaneamente e o decaimento do sinal de absorção (free induction decay - FID) é registrado e armazenado. 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 & Gerald, 1987). A diferença na frequência de absorção de um dado núcleo 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 relaxação do núcleo em análise e é um parâmetro bastante importante no estudo de amostras sólidas e sistemas de membranas lipídicas, onde a interação dos momentos magnéticos da molécula com a rede de spins ao seu redor é determinante para assimetria bilateral.

Podem existir diferentes valores de T_1 em uma mesma molécula devido aos núcleos experimentarem ambientes químicos diferentes. Como membranas lipídicas são sistemas bastante anisotrópicos os valores de T_1 são bem diferentes nas regiões da bicamada. Medidas de T_1 de fosfolípidios foram obtidas por RMN de deutério (Rance *et al.*, 1980; de Paula, 1993), carbono 13 (Godici & Landsberger, 1974; Ellena *et al.*, 1988) e hidrogênio (Kuroda & Kitamura, 1984).

Outra característica interessante nas medidas de RMN é o Efeito Nuclear Overhauser (NOE) que 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 & Geraldles, 1987; Derome, 1987). Considerando um sistema de dois spins não equivalentes, com spin $I=1/2$, o efeito NOE é dado na Equação 4.

$$\eta_o(s) = (M_o^s - M_o) / M_o \quad (4)$$

onde M_o e M_s são as magnetizações de equilíbrio do núcleo o, na ausência e na presença de saturação de s.

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 & Gerald, 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 hidrogênios 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; 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).

3.1.3 - ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência, consiste na excitação de um elétron do estado fundamental para um estado de alta energia (estado excitado) onde, em um tempo de vida da ordem de 10^{-8} s, o retorno para o estado fundamental é acompanhada da emissão de fótons (luz), como mostrado na Figura 8 (Lakowicz, 1983).

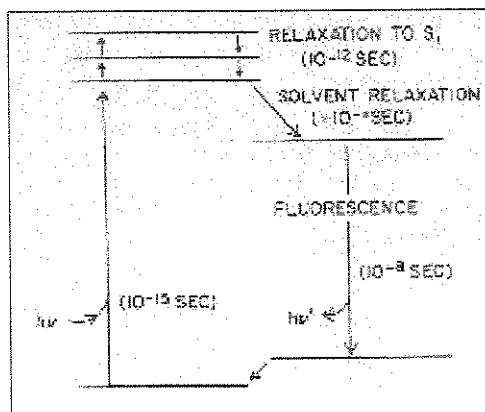


Figura 8: Diagrama de Jablonski para o fenômeno de fluorescência.

Diferentemente das outras técnicas apresentadas aqui, a fluorescência mede não a absorção de energia, mas sim a emissão de radiação.

As substâncias que apresentam significativa fluorescência geralmente apresentam em sua estrutura química deslocalização eletrônica na forma de duplas ligações conjugadas, estas substâncias são chamadas de fluoróforos.

Algumas moléculas fluorescentes são bastante frequentes em sistemas biológicos. No entanto para o estudo de membranas biológicas a utilização de marcadores veio solucionar o problema, assim como em RPE. Através do uso de um marcador ou sonda fluorescente, é possível obter informações de caráter estrutural e da mobilidade do sistema no qual a sonda está inserida. Em particular nas membranas a técnica de sondas trouxe enorme contribuição no estudo de interação de moléculas com membranas (Sikaris & Sawyer, 1982). Exemplos de fluoróforos usados como sondas de membrana são: pireno, fluoresceína, rodamina, difenil hexatrieno, etc (Warren, 1987).

Um fenômeno que é bastante utilizado em sistemas membranares é o de “quenching” ou supressão da fluorescência, onde uma variedade de processos pode resultar em diminuição da intensidade de luz emitida pelo fluoróforo. A supressão pode ser colisional ou dinâmica (quando decorrente da interação entre o supressor e fluoróforo) ou estática (quando decorrente da interação entre o supressor e o fluoróforo ocorrendo a formação de um complexo entre fluoróforo e supressor). A supressão estática é um freqüente complicador da análise da supressão dinâmica (Lakowicz, 1983).

Ambos os processos (supressão dinâmica e estática) requerem proximidade espacial entre fluoróforo e supressor; no caso da supressão dinâmica o supressor entra em contato durante o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado, causando a diminuição da fluorescência por transferência de energia (perda para o supressor). Já na supressão estática o supressor forma um complexo com o fluoróforo, sendo este complexo não fluorescente. O fenômeno de quenching ou supressão pode ser medido para um sistema onde só está presente o fluoróforo (intensidade de fluorescência = I_0) e em presença do supressor (intensidade de fluorescência = I) (Lakowicz, 1983).

3.1.4 – ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho, assim como outras técnicas espectroscópicas consiste na absorção de energia, onde as moléculas são excitadas para um estado de alta energia em que absorvem algum tipo de radiação, neste caso a infravermelha, relativa a

energia vibracional das moléculas; este fenômeno ocorre na ordem de tempo de μm . As moléculas absorvem somente em frequências selecionadas (energia) da radiação infravermelha (Pavia et al, 1996).

Desta forma esta espectroscopia é capaz de medir energia de vibração de ligações químicas (por exemplo estiramento ou deformação) que mudam o momento de dipolo das moléculas com o tempo. A absorção de energia ocorre em regiões características para cada ligação (por exemplo carbonilas, aminas, etc) podendo desta forma ser utilizada no estudo de membranas biológicas e de interação de compostos com estas (Wong, 1984; Wong & Mantsch, 1985; Wong & Mantsch, 1988; Auger et al, 1990).

3.2 - MATERIAIS

A EPC usada nos experimentos de foi obtida da Sigma Chem. Co. e preparadas por extração em solvente orgânico e separação em coluna de alumina, de acordo com o método de Singleton e col. (1965).

Os AL: LDC, EDC, MVC e BVC, foram obtidos de doações de indústrias farmacêuticas. A procedência e nome das preparações comerciais, bem como as estruturas dos AL são dados na Tabela 2 e Figura 1.

Tabela 2: Fonte e Nome comercial dos Anestésicos Locais estudados.

Anestésico Local	Abreviação	Fornecedor	Nome Comercial
Lidocaína	LDC	Apsen Química e Farmacêutica	Xilocaína
Etidocaína	EDC	Astra Pharmaceutical Products	Duranest
Mepivacaína	MVC	Sterling Drug Inc.	Carbocaína
Bupivacaína	BVC	Apsen Química e Farmacêutica	Marcaína

3.3- PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS MULTILAMELARES DE EPC

Aliquotas de EPC, foram retiradas de soluções estoque (mantidas a -80°C), ressuspensas em clorofórmio e foram evaporadas sob fluxo de N_2 seguido de vácuo (2 horas). Foram obtidos lipossomos multilamelares (LMV) por adição do tampão e agitação vigorosa, em vortex por 5 min.

O tampão usado para os experimentos com anestésicos locais desprotonados é o carbonato-bicarbonato 0,2M, pH 10,5. Alíquotas desse tampão foram liofilizadas e ressuspensas em D₂O, para os experimentos de ¹H-RMN e I.V.

3.4- PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS UNILAMELARES DE EPC

Para os experimentos de RMN de hidrogênio e Fósforo, Fluorescência, I.V. e RPE foram utilizadas vesículas unilamelares pequenas, SUV de EPC. Essas vesículas foram preparadas a partir de LMV, submetidas a sonicação (potência 50W, 20kHz de frequência nominal, sob fluxo de N₂) em tubos mergulhados em banho de gelo e ponteira (“tip”) imersa a meia altura, sintonizados para máxima cavitação. A sonicação foi feita em ciclos alternados de 1 minuto (agitação/repouso), para evitar superaquecimento da amostra. O tempo de sonicação, até translucidez da amostra (Sheetz & Chan, 1972; De Bony & Dennis, 1981), foi de 15-20 min para as amostras contendo 50 mg/mL (65mM de EPC) que foram utilizadas nos experimentos de RMN. As amostras foram então centrifugadas a 1000 x g durante 15 min., utilizando na centrifugação uma pequena quantidade da resina Quelex (quelante de metais), para a retirada de resíduos de titânio provenientes da ponteira do sonicador (Sonics & Materials, modelo VC50) e remoção de partículas maiores. Para todas as amostras foram feitas dosagens colorimétricas de fosfomolibdato, após digestão ácida (com ácido perclórico, a 180°C) para determinação da concentração dos fosfolípidios, de acordo com Rouser *et al.* (1970).

3.5 - MEDIDAS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

As medidas de RPE foram conduzidas em espectrômetro 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 µL.

Os marcadores de spin utilizados nos experimentos de RPE foram os ésteres metílicos dos ácidos 5, 7, 12-doxil esteárico (5, 7, 12-MeSL) da Sigma Chemical Co. (Figura 9). Nas medidas de RPE foram utilizadas SUV (8 mM). Os marcadores paramagnéticos foram incorporados nas membranas numa razão molar de 1 mol %. A organização da membrana foi monitorada pela medida da razão das intensidades dos picos

de campo baixo (h_{+1}) e campo central (h_0) nos espectros de RPE dos marcadores MeSL (Figura 7).

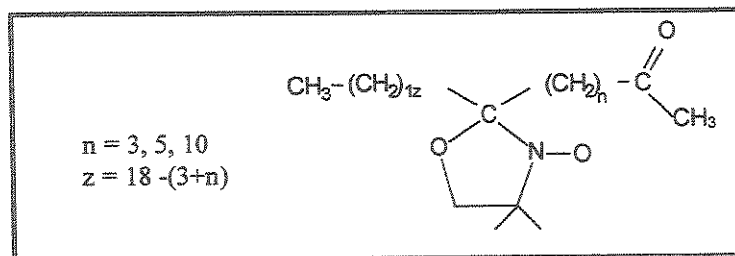


Figura 9: Estrutura química dos marcadores de spin membranares do tipo nitróxido-metil-esteárico (MeSL).

A **Figura 7** mostra um espectro típico de marcador nitróxido em vesículas lipídicas, com as linhas de campo baixo (h_{+1}), campo médio (h_0) e campo alto (h_{-1}), sendo diferentemente afetadas pela restrição do movimento do marcador de spin na membrana.

3.6- MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de fluorescência foram realizadas em um fluorímetro HITACHI F-4500, a temperatura ambiente (22°C). Foram utilizadas sondas lipofílicas de pireno, excitadas em 345 nm e cujos espectros de emissão foram registrados na faixa de 350 a 500nm. A sonda fluorescente foi incorporada nos lipossomas numa razão molar de 1 mol% (sonda: lipídios de membrana), durante a preparação e antes da secagem dos lipídios.

Foram medidas as intensidades de fluorescência inicial do marcador (I_0) incorporado na membrana; em seguida realizou-se a adição de AL e mediu-se a fluorescência resultante (I), após tempo de equilíbrio de 15 a 30 min. A razão I_0/I mede a supressão da fluorescência do marcador, causada pela inserção do anestésico na bicamada.

A estrutura química dos fluoróforos usados, derivados de ácidos graxos covalentemente ligados ao pireno e obtidos da Molecular Probes, pode ser vista na **Figura 10**.

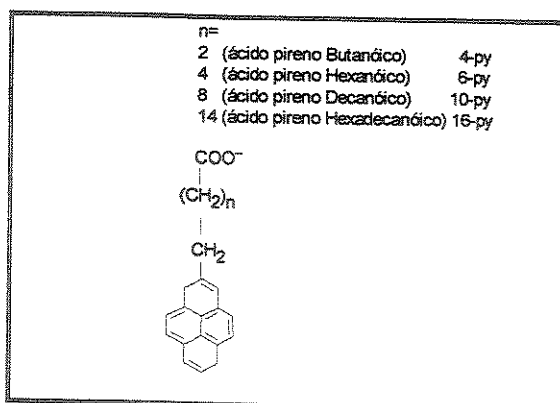


Figura 10: Estrutura química dos marcadores membranares de fluorescência, derivados do Pireno em pH 10,5.

3.7 - MEDIDAS DE INFRAVERMELHO

As medidas de IV foram realizadas em um espectrômetro BOMEM-MB Series, pertencente ao Instituto de Química/Unicamp. As amostras foram preparadas utilizando tampão liofilizado, ressuspensão em D₂O, devido a grande absorção de água nessa região do infravermelho e montadas em celas de CaF₂ de 10μL. Foram feitas 50 varreduras por amostra de SUV ou SUV+AL, com o intuito de observar alterações em duas regiões espectrais: da banda de estiramento assimétrico do fosfato ($\nu_{\text{ass}} \text{P=O}$), entre 1200-1300 cm⁻¹, e bandas de estiramento C=O ($\nu_{\text{ass}} \text{C=O}$), entre 1700-1800 cm⁻¹ (Wong & Mantsch, 1988).

Na região do infravermelho para membranas, as principais energias vibracionais características são as do estiramento das ligações P=O e C=O e as diferentes bandas vibracionais dos grupos CH₂ (Yeagle & Martin, 1976; Wong 1984; Wong & Mantsch, 1985).

No caso da banda $\nu_{\text{ass}} \text{C=O}$ de fosfolipídios em dispersões aquosas, observa-se um pico assimétrico que varia com a fase membranar, grau de hidratação e adição de colesterol (Blume *et al.*, 1988). A deconvolução do espectro revela duas frequências vibracionais com intensidade e largura distintas (próximas a 1740 e 1727 cm⁻¹ em vesículas de DMPC). Tal diferença seria dada pela maior proximidade da cadeia sn-2 (banda de menor frequência) com a interface membrana/água, que possibilitaria a formação de pontes de hidrogênio com a água (Mushayakarara & Levin, 1982), criando um diferente grau de hidratação para os grupamentos carbonílicos (Mushayakarara, *et al.*, 1986; Blume *et al.*, 1988), que gira em

torno de 40%. Aumentos no grau de hidratação da bicamada, como o que se observa na mudança de fase gel para líquido cristalino, podem ser acompanhados pela maior intensidade de absorção da banda $\nu_{\text{ass}} \text{C=O}$, de menor frequência.

A banda de estiramento do grupamento fosfato pode ser analisada de maneira similar. Uma só banda, alargada, é observada nas vesículas lipídicas e o aumento da formação de pontes de hidrogênio com a água causa seu deslocamento para regiões de menor frequência (Wong 1984; Wong & Mantsch, 1985).

3.8 - MEDIDAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Vesículas unilamelares, preparadas como descrito anteriormente foram levadas ao espectrômetro de ressonância em tubos de RMN de 5mm de diâmetro, depois de submetidas a um fluxo de N_2 , para desoxigenação.

Os experimentos de ^1H -RMN, T_1 , ROESY e ^{31}P -RMN foram conduzidos no espectrômetro Bruker DRX500 operando em um campo de 9,24 Tesla, pertencente ao Instituto de Química/USP, em colaboração com a Dra Shirley Schreier. As medidas de ROESY e ^{31}P -RMN foram feitas a 30°C e as de T_1 em temperaturas variadas.

3.8.1 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RELAXAÇÃO LONGITUDINAL (T_1)

O método utilizado nas medidas de T_1 foi o da inversão-recuperação, neste método procede-se à inversão da magnetização, através de um pulso de 180° , e deixa-se em seguida ocorrer a recuperação, durante um período de tempo t . O tempo de recuperação depende de t . O valor da magnetização é observado aplicando, após cada intervalo t , um pulso de 90° e determinando-se a intensidade do sinal assim gerado (Gil & Gerald, 1987). A sequência de pulsos utilizadas nos experimentos de inversão-recuperação do sinal é mostrada na **Seqüência 1**.

$$d_1 - \pi_{(x)} - t_1 - \pi/2_{(y)} - (\text{aquisição}) \quad (1)$$

Foram utilizadas nos experimentos os seguintes valores dos parâmetros: D_1 (delay) de 6s; pulso de 180° de 24 a $26\mu\text{s}$; número de scans de 16; janela de 12 ppm e utilização de 16 pontos (t_1), tamanho dos arquivos de 16K.

As medidas de T_1 são conduzidas em pares controle (SUV) e tratado (SUV + AL), dada a instabilidade das vesículas sonicadas, se deixadas de um dia para outro. Os experimentos levam um tempo de 30 minutos cada.

3.8.2- MEDIDAS DO EFEITO NUCLEAR OVERHAUSER (2D-NOE)

As medidas de efeito nuclear Overhauser foram feitas a partir de experimentos bidimensionais, pela sequência ROESY (“Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy”) descrita por Bax & Davis (1985) (Seqüência 2).

$$d_1 - \pi/2 - t_1 - \tau_m \text{ (trava de spin)} - \text{(aquisição)} \quad (2)$$

onde τ_m significa tempo de mistura.

Esta técnica permite medir proximidades espaciais em sistemas biológicos com mais eficiência que a de NOESY (Homans, 1995), devido ao fato de sistemas biológicos macromoleculares (como proteínas e membranas) apresentarem difusão de spins. No ROESY a difusão de spins é diminuída com isso melhorando a qualidade das informações obtidas. A difusão de spins consiste na transferência da energia através dos spins entre prótons adjacentes e também para os prótons de outras regiões, que estão fracamente acopladas com estes spins (Abragan, 1961; Kuroda & Kitamura, 1984). Para sistemas membranares $\omega_0\tau_c = 1$ (Kuroda & Kitamura, 1984), e as intensidades dos cross-peaks tendem a zero nos experimentos de NOESY, já no ROESY isto não acontece como mostra a Figura 11 (Derome, 1987; Evans, 1995; Homans, 1995).

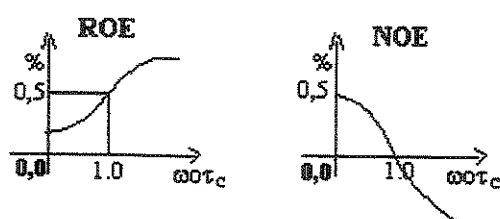


Figura 11: Variação da intensidade do Efeito Nuclear Overhauser em função de $\omega_0\tau_c$ para os experimentos de ROESY e NOESY (segundo Derome, 1987).

Os parâmetros utilizados nestes experimentos foram: pulso de 90° de 12-13µs; pulso da segunda dimensão de 90 µs (campo de força de 2,7 kHz); aquisições - número de scans de 32; atenuação de potência de 1 dB; atenuação de potência do pulso soft de 44 dB; janela de 12ppm; tamanho do arquivo 2048 K.

As medidas de ROESY foram feitas, com tempos de mistura variáveis (50ms a 200ms), tal que os experimentos duravam em média 4-6 horas.

3.8.3- MEDIDAS DE FÓSFORO (³¹P-RMN)

Vesículas unilamelares como as preparadas para ¹H-RMN, foram utilizadas nessas medidas. Os espectros de ³¹P-RMN foram obtidos com sonda de 5mm, no mesmo espectrômetro Bruker DRX500, operando em 202 MHz para fósforo. A sequência de pulsos utilizada está mostrada na Sequência 3.

$$\begin{array}{l} {}^{31}\text{P} \quad [d_1 \text{---} \pi/6 \text{---} t_1 \text{ (aquisição)}] \\ {}^1\text{H} \quad \text{-----[desacoplado]-----} \end{array} \quad (3)$$

Os tempos empregados foram de 7 µs para o pulso $\pi/6$ e 3s para os tempos entre pulsos (d_1). O sinal de fósforo foi desacoplado do de prótons durante a aquisição. Foram realizadas em média 6000-8000 aquisições por espectro, levando a um tempo médio de aquisição de 8 h/experimento. As janelas foram calibradas utilizando um padrão de H₃PO₄ (85%).

A técnica de RMN de fósforo é atualmente utilizada como uma ferramenta para investigação do metabolismo, uma vez que grupamentos fosfatos (como os presentes no ATP, ADP, fosfocreatina) podem ser identificados em amostras de tecidos, com potencial diagnóstico de estado fisiológicos (repouso, exercício) e patológicos (Gadian *et al* 1979; Radda, 1986). Como o fósforo é um constituinte da principal classe de lipídios membranares, a técnica de ³¹P-RMN tem sido bastante usada em membranologia. A vantagem da utilização de fósforo é que ele apresenta apenas um isótopo (³¹P), o qual tem spin meio ($I=1/2$). Em estruturas que apresentam rápido movimento isotrópico como as micelas, micelas invertidas e vesículas pequenas (nosso caso) detecta-se um único sinal alargado (Warren, 1987).

Em vesículas unilamelares pequenas somente um deslocamento, isotrópico, do ^{31}P é observado e variações em sua frequência de ressonância refletem alterações na nuvem eletrônica (blindagem) local do grupamento fosfato, sendo úteis para determinar a presença de dipolos próximos ao ^{31}P .

3.9 – MODELAGEM MOLECULAR

O programa MOLDEN (Molecular Density) foi utilizado para a construção das estruturas dos AL. Os cálculos foram feitos considerando-se a forma neutra dos AL, no vácuo (constante dielétrica, $\text{CD}=1,5$). A partir das estruturas dos AL montadas, tais arquivos foram transformados em arquivos de entrada (“inputs”) que foram processados pelo programa GAMESS (General Atomic and Molecular Electronic Structure System). Para fazer as otimizações dos AL, usando o GAMESS que consiste em um programa de química quântica geral, produzido pelos membros do Gordon Research Group (Iowa State University) e que utiliza a abordagem semi-empírica AM1 (Austin Model 1). O método AM1 utiliza para os cálculos semi-empíricos a distribuição de cargas e momentos dipolares utilizando a aproximação MNDO, “modified neglect of diatomic overlap”, (Dewar & Thiel, 1977), apresentando uma vantagem sobre os métodos *ab initio* de necessitar de um menor tempo de computação e resultar em boa precisão.

Os métodos semi-empíricos baseiam-se em um grande banco de dados de estruturas moleculares, e seus resultados têm sido descritos como de grande utilidade na avaliação de novos compostos orgânicos (Dewar et. al. , 1985).

Os cálculos foram realizados utilizando as facilidades do CENAPAD-SP (Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo) onde estão instalados os programas MOLDEM e GAMESS e do qual utilizamos máquinas em modo paralelo. Contamos com a colaboração do aluno de mestrado Ataulpa Albert C. Braga, do Departamento de Físico-Química/ Instituto de Química/ UNICAMP. O programa GAMESS forneceu, após os cálculos, um arquivo de saída (“output”) com as informações de otimização, energia, frequência, etc que puderam ser visualizados no programa MOLDEM.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item apresentaremos resultados referentes ao estudo da interação de anestésicos locais do tipo amino-amida com membranas fosfolipídicas, utilizando para tal, diversas técnicas espectroscópicas (RMN, EPR, fluorescência e infravermelho).

Os resultados apresentados referem-se a forma neutra dos AL, com medidas feitas em pH 10,5. Neste pH a membrana de EPC mantém seu caráter zwitteriônico e não há variação no empacotamento dos fosfolipídios na bicamada em relação ao pH fisiológico, como medido pela organização de vesículas de EPC com marcadores de spin (controle).

4.1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADE DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Na Tabela 3 encontram-se algumas propriedades físico-químicas dos quatro AL em estudo (LDC, EDC, MVC e BVC) como pesos moleculares, constante de ionização (pKa), solubilidade (Sw_{AL}) e coeficiente de partição (P) entre octanol e água, determinado por separação de fases, sendo esses dois últimos parâmetros relativos à forma desprotonada dos AL (pH 10,5). A potência anestésica, relativamente à procaina que foi o primeiro AL sintetizado, é também apresentada, bem como o tempo de duração da anestesia.

Tabela 3: Valores de Peso Molecular, pKa em meio aquoso, Solubilidade aquosa (pH 10,5) e Coeficiente de Partição entre octanol e água (pH 10,5), Potência anestésica (em relação a procaina=1) e Meia-Vida no plasma (h) dos AL estudados.

AL	PM	pKa ^a	Sw_{AL} : ^b (mM)	P_{oct} ^c	Potência ^a	Meia-Vida (h) ^a
LDC	270,79	7,9 -7,7	13,1	14,45	4	1,5
EDC	312,87	7,7	0,16	47,86	16	3,0
MVC	282,80	7,6	8,82	16,98	2	1,5
BVC	324,88	8,1	0,58	22,91	16	2,5

^a Covino & Vassalo (1986); ^b de Paula & Schreier (1995); ^c de Paula (1993).

Pelos dados da Tabela 3 podemos verificar que os anestésicos em estudo apesar de serem da mesma família, amino-amidas, apresentam propriedades físico-químicas diferentes, podendo ser divididos em dois grupos, os que apresentam maior solubilidade aquosa em pH 10,5 (LDC e MVC) e em contrapartida, os que apresentam maior partição em membrana (EDC e BVC). Note-se que esses últimos tem grande potência anestésica e maior tempo de anestesia.

Analizando ainda a estrutura química desses AL (mostrada na Figura 1) verificamos que dois deles apresentam-se ciclizados no grupamento amina (MVC e BVC) e dois são acíclicos (LDC e EDC). Sendo assim, poderemos correlacionar a localização no interior da bicamada lipídica dos AL aqui estudados com suas diferentes propriedades (hidrofobicidade, volume molecular), determinadas pelas substituições da cadeia lateral da família das amino-amidas.

Conhecendo o coeficiente de partição e a solubilidade desses compostos, pudemos preparar protocolos para os experimentos, de forma a comparar efeitos na membrana, produzidos pela mesma razão molar AL:lipídio, no interior da bicamada.

4.2 - MEDIDAS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Foram realizadas medidas de RPE, com o intuito de avaliar a ação dos AL nas propriedades estruturais e dinâmicas dos lipídios em lipossomas unilamelares de EPC, utilizando para isso marcadores de spin em diferentes profundidades da bicamadas. Cada experimento foi realizado pelo menos em duplicata.

4.2.1 - EFEITO DOS ANESTÉSICOS SOBRE A ORGANIZAÇÃO DE MEMBRANAS LIPÍDICAS, MEDIDO POR RPE

Nas vesículas unilamelares de EPC (8 mM) contendo marcadores da série MeSL (5, 7, 12), observamos o efeito do anestésico (definido em métodos, item 3.1.1), pela variação das intensidades dos picos de campo baixo e central (no espectro de RPE) em relação à amostra controle, sem AL. O aumento da razão h_{+1}/h_0 por ação dos AL indica

uma diminuição na organização (menor ordem e maior mobilidade) das moléculas fosfolipídicas na bicamada.

Os espectros do marcador 5, 7 e 12-MeSL (controle e em presença de LDC) obtidos nos experimentos realizados podem ser vistos na **Figura 12**. Todos os marcadores têm seu sinal estreitado, indicando menor organização local, causada pela inserção da LDC naquela região da bicamada. Resultados semelhantes foram descritos anteriormente, para a LDC em vesículas multilamelares (de Paula & Schreier, 1995).

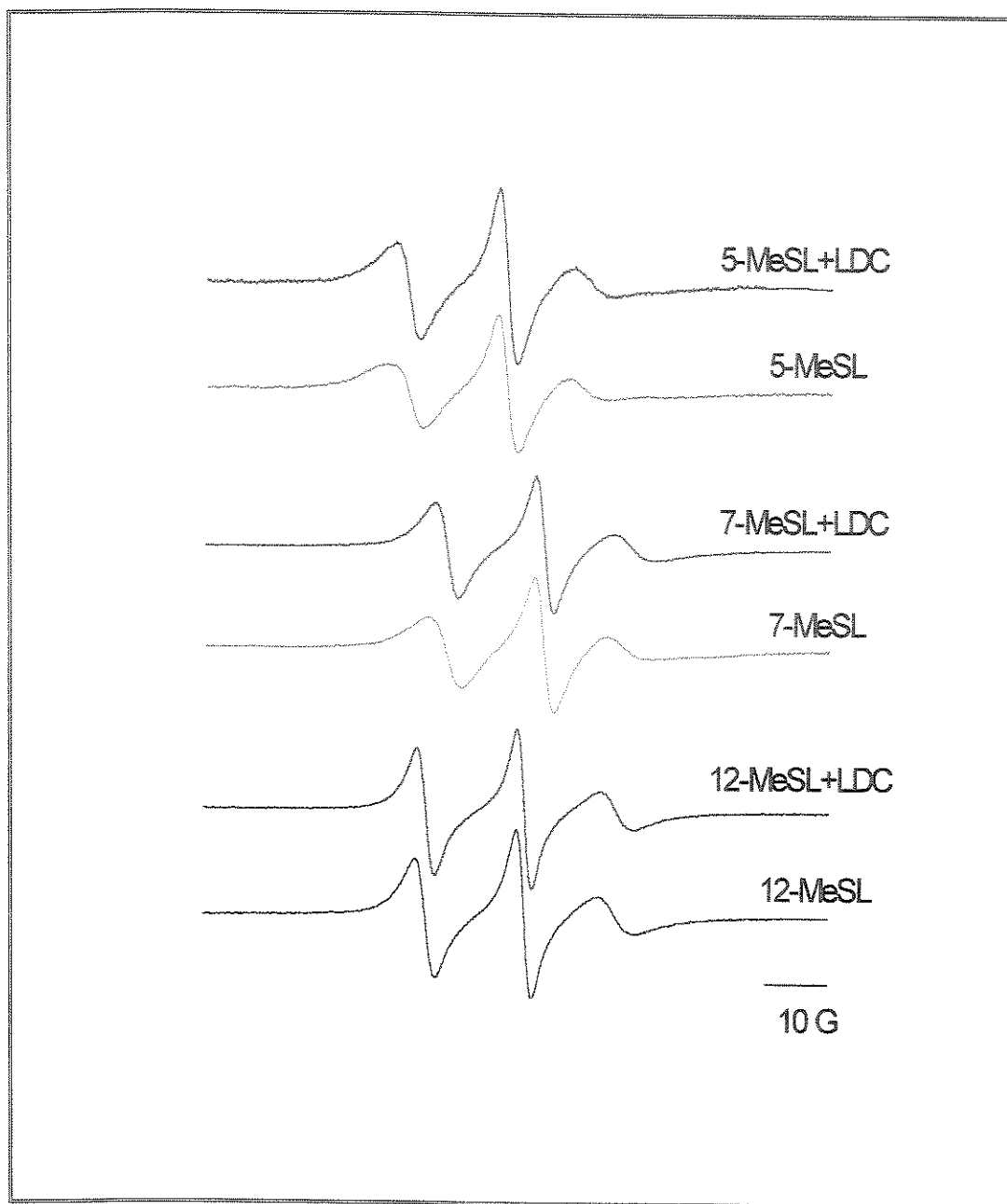


Figura 12: Espectros de ressonância paramagnética eletrônica dos marcadores 5, 7 e 12 MeSL em vesículas unilamelares de EPC, 8 mM, com e sem LDC (20 mM).

Os efeitos causados pelos AL na membrana de EPC e detectado pelos marcadores de EPR 5, 7, 12-MeSL podem ser vistos na Figuras 13.

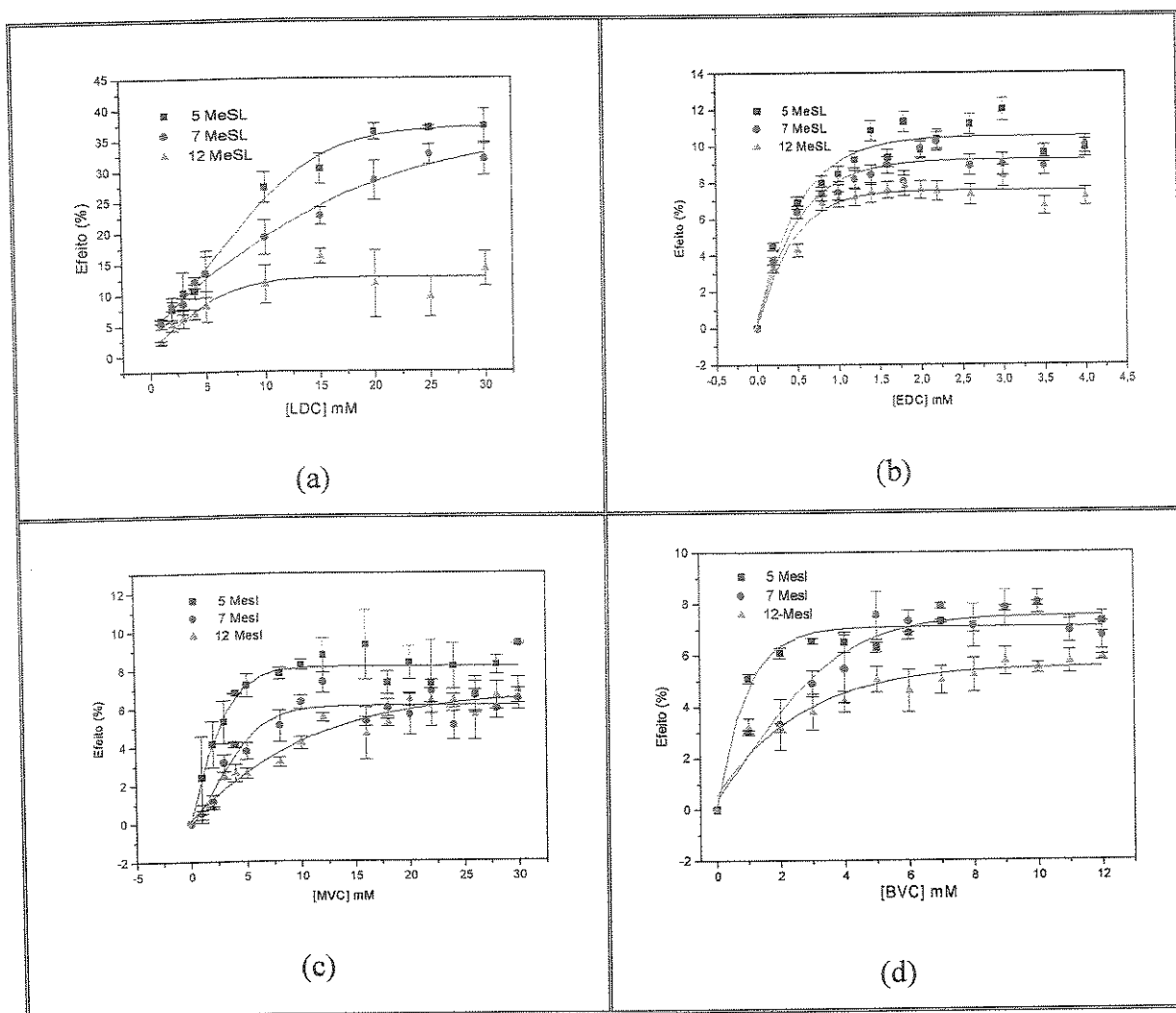


Figura 13: Efeito dos AL na organização de vesículas unilamelares de EPC, acompanhada pelo espectro dos marcadores de RPE 5, 7, 12 MeSL, (a) LDC, (b) EDC, (c) MVC e (d) BVC; pH 10,5 a 22 °C.

Os quatro AL estudados (Figuras 13a a d) perturbam a organização das SUV, sendo concentração dependente e tendendo a saturação, como observado anteriormente em LMV (de Paula & Schreier, 1995). O efeito observado é maior nas SUV (presente trabalho) que nas LMV. Esse aspecto das curvas indica que o anestésico particiona na bicamada de maneira proporcional à concentração adicionada (fase linear) até que atinja uma saturação.

Outra observação importante é que para todos os AL os marcadores superficiais foram os que mais sofreram alterações (5 < 7 < 12 MeSL) o que poderia indicar uma localização mais superficial dos AL na bicamada. Porém é preciso considerar o gradiente

decrecente de ordem e mobilidade das cadeias acila da EPC, a medida que nos aproximamos do centro da bicamada. Medidas de T_1 com RMN de deutério (Rance *et al*, 1980; Ellena *et al*, 1988), ^{13}C (Godici & Landsberger, 1974) e ^1H (Gaffney & McConnell, 1974; Kuroda & Kitamura, 1984) mostram que há um aumento progressivo da mobilidade rotacional dos núcleos estudados, indo das posições iniciais (carbonos 1, 2) até a metila terminal das caudas de membranas fosfolipídicas. Observações semelhantes foram relatadas para a orientação das moléculas lipídicas em relação ao eixo diretor da bicamada: o parâmetro de ordem decresce em direção ao interior hidrofóbico (Seelig, 1975; Driscoll *et al*, 1991).

Desta forma o maior empacotamento das regiões mais superficiais da cadeia acila pode proporcionar uma maior “sensibilidade” aos marcadores mais superficiais (5 e 7 MeSL) justificando a observação de maiores efeitos nesses marcadores (com todos os AL).

Feitas essas considerações, podemos ainda assim comparar o efeito dos diferentes anestésicos nas três regiões monitoradas da cadeia acila, pois alterações mais pronunciadas em dado marcador refletiriam posicionamento específico do AL.

Uma análise quantitativa do efeito causado pelos anestésicos através da razão h_{+1}/h_0 , foi feita para razão molar de 1:6 (AL:lipídio) e para os efeitos máximos provocados por cada AL nos marcadores posicionados em diferentes profundidades (Tabela 4).

Sabe-se que AL são capazes de alterar a organização de membranas lipídicas e biológicas, através do aumento no grau de mobilidade rotacional e diminuição da ordem dos fosfolipídios na bicamada (de Paula & Schreier, 1996). Estudos de RPE, como os do grupo de Wang (Gargiulo & Giotta, 1973; Giotta *et al*, 1974; Wang *et al* 1983, Limbacher *et al*, 1985) mostraram o efeito desorganizador na bicamada causada por análogos paramagnéticos de AL. Usando análogos da TTC e o marcador de spin 5-SASL (doxil estearato) Bianconi e col. verificaram alteração na ordem - medida pelo parâmetro de ordem, S - de bicamadas lipídicas multilamelares causada pelos AL de até 13%, enquanto que com o marcador 5-MeSL (éster metílico do SASL), variações do parâmetro h_{+1}/h_0 chegavam a até 60% (Bianconi *et al*, 1991). Semelhantemente, resultados anteriores deste laboratório com o marcador 5-SASL mostraram alteração máxima de S 38

de cerca de 10% (de Paula & Schreier, 1995), enquanto que o marcador 5-MeSL mostrou-se bem mais sensível (até 26,5%) para o efeito máximo da lidocaína em vesículas multilamelares grandes (Pinto, 1998); já o marcador 12-MeSL (Pinto, 1998; Pinto et al., 2000) mostrou menor sensibilidade (variação máxima de cerca de 11% em h_{+1}/h_0) que o marcador na posição 5, nas mesmas condições experimentais.

Os resultados aqui apresentados mostram variação máxima do parâmetro h_{+1}/h_0 nos espectros do 5 MeSL de até 36,5 % por efeito da LDC em vesículas unilamelares pequenas (8mM) de EPC, indicando que as SUV seriam mais sensíveis a perturbação da organização lipídica por ação dos AL que as vesículas multilamelares.

Finalmente a **Figura 14** representa as alterações de h_{+1}/h_0 no efeito máximo (a) e para a mesma razão molar AL:lipídio na membrana (b), calculada a partir dos valores de coeficiente de partição dos AL entre vesículas e água (**Tabela 6**).

Tabela 4: Desorganização da bicamada lipídica causada pelos AL. Medidas de RPE com marcadores do tipo MeSL em vesículas unilamelares (dados da **Figura 12**).

AL/Efeito(%)	5-MeSL		7-MeSL		12-MeSL	
	1:6 ^a	Máx. ^b	1:6 ^a	Máx. ^b	1:6 ^a	Máx. ^b
LDC	14,25	36,5	10,47	31,1	5,35	13,7
EDC	10,68	10,99	9,01	9,22	7,79	7,98
MVC	6,88	8,54	3,40	7,37	2,39	5,26
BVC	5,65	7,46	3,11	7,05	1,97	5,30

^aEfeito percentual (segundo equação 1) medido quando a razão molar de AL na membrana era de 1:6 AL:EPC. ^b Efeito máximo, observado na saturação da membrana.

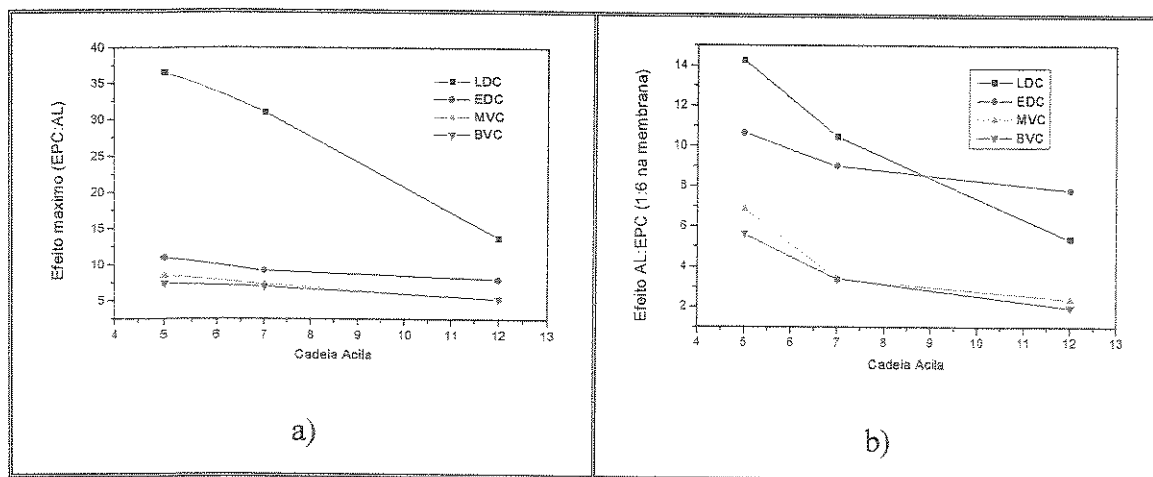


Figura 14: a) Efeito máximo provocado pelos AL nos marcadores de RPE em diferentes posições; b) Efeito na razão molar 1:6 AL:EPC (na membrana) para marcadores de RPE em diferentes posições.

Através dos resultados mostrados na Tabela 4 e Figura 14, vemos que (para os marcadores 5 e 7 MeSL) os AL que causam maior efeito, em uma mesma razão molar AL:EPC (1:6 na membrana), são $LDC > EDC > MVC > BVC$. A amplitude do efeito decai no sentido do interior da bicamada, refletindo a menor organização local, como discutido anteriormente. Na posição 12 somente a EDC tem efeito pronunciado, enquanto os demais AL mantêm o perfil de perturbação semelhante ao observado com 5 e 7 MeSL.

A análise da Tabela 4 e Figura 14 é bastante interessante pois revela:

- i) que a LDC tem um efeito desproporcionalmente grande nos marcadores 5 e 7 MeSL, o que constitui forte evidência da sua localização nas regiões mais superficiais da bicamada, de acordo com resultados anteriores de nosso laboratório (Pinto, 1998).
- ii) que o efeito da EDC estende-se até o marcador 12 MeSL (não decai tão acentuadamente como o da LDC, MVC e BVC).
- iii) que os AL de substituintes cíclicos (MVC e BVC) têm menor efeito que seus análogos não cíclicos, de igual hidrofobicidade, um resultado curioso já que esperava-se observar grande perturbação pelo (s) efeito (s) estérico do anel piperidínico da MVC e BVC. No entanto, devemos considerar que o AL, apesar de causar um espaçamento entre os lipídios ao se inserir na bicamada (justificando aí seu efeito desorganizador) é capaz de preencher parte desse volume-livre criado no interior da bicamada,

compensando parcialmente a desorganização causada e diminuindo a probabilidade de isomerizações trans-gauche (Gallová *et al*, 1997).

- iv) que os AL mais hidrofóbicos (EDC e BVC) têm sua partição na membrana limitada pela sua baixa solubilidade aquosa (como discutido no item 4.2.2), tal que seu efeito máximo na membrana é inferior aos análogos de igual hidrofobicidade (Figura 14 a). No entanto, na mesma proporção dentro da membrana, esses são tão eficazes quanto seus análogos (Figura 14 b).

4.2.2- MEDIDAS DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO POR RPE

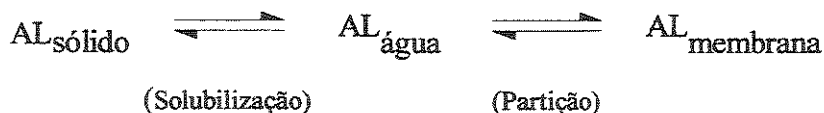
A alteração de h_{+1}/h_0 em função da concentração de AL (Figura 13) revela uma tendência a "saturação" da membrana. Trabalhos anteriores de nosso laboratório mostraram que a "saturação" observada pode resultar de ter sido atingida a solubilidade aquosa do anestésico (de Paula & Schreier, 1995), que limita a partição.

Neste caso, utilizando a solubilidade aquosa dos AL (Tabela 3) na Equação 5, como a concentração do AL na fase aquosa (n_a), pudemos deduzir a concentração máxima de AL na membrana - que é a diferença entre n_a e a concentração total de AL (n_t) na "saturação" da membrana ou efeito máximo (já que $n_t = n_a + n_m$) - para um dado volume de membrana e água. Assim, pudemos calcular os valores do Coeficiente de Partição dos AL nas vesículas unilamelares pequenas, sem uso de técnicas de separação de fases (Lissi *et al.*, 1990; de Paula & Schreier, 1995), pela Equação 5:

$$P = (n_m/V_m)/(n_a/V_a) \quad (5)$$

onde n é o número de moles e V o volume das fases membranas (m) e aquosa (a). O volume de membrana (V_m) foi calculado a partir da concentração lipídica assumindo-se densidade = 1mg/ μ L (de Paula & Schreier, 1995).

Como a concentração do AL desprotonado em água é pequena, a transferência dos AL para a fase membranas estaria sendo limitada pela sua concentração aquosa:



Na verdade, parece haver uma questão cinética no primeiro equilíbrio, e a solubilização do AL não acontece rapidamente (a reação foi seguida por RPE por mais de 4 horas, sem alteração do efeito).

Os valores de P_{SUV} , assim determinados (usando a solubilidade aquosa dos AL da Tabela 3 na Equação 5 e os valores de n da Figura 13) conforme metodologia desenvolvida em nosso laboratório (de Paula & Schreier, 1995) podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de Coeficiente da partição EPC/tampão da forma neutra dos AL obtidos dos experimentos de RPE em vesículas unilamelares (P_{SUV}), multilamelares (P_{MLV}) e por separação de fases (P_{S-F}). Tampão carbonato 0,2M, pH 10,5.

AL	P_{SUV}	P_{MLV}^*	P_{S-F}^*
LDC	74±24	92	144±54
EDC	1207±202	1077	1202±480
MVC	69±7	75	98±12
BVC	840±301	870	798±147

* em MLV, de Paula & Schreier, 1995.

A Tabela 6 mostra também os valores de P_{MLV} , encontrados para os 4 anestésicos em vesículas multilamelares de EPC pela mesma metodologia (de Paula & Schreier, 1995), em comparação com resultados obtidos com vesículas multilamelares por separação de fases (ultracentrifugação, P_{S-F}). Existe uma correlação bastante boa ($R=0,994$) entre as duas medidas espectrométricas (P_{SUV} e P_{MLV}) e entre essas e as medidas feitas por ultracentrifugação, com separação de fases, P_{S-F} ($R=0,998$ e $R=0,988$, respectivamente).

Esses dados confirmam a aplicabilidade dessa metodologia que, além de poder ser utilizada com qualquer método espectroscópico – do qual se mensure um parâmetro que varie proporcionalmente a partição do AL na membrana - não requer a separação de fases lipídica e aquosa, evitando erros experimentais decorrentes dessa separação (de Paula & Schreier, 1995). Os dados de P_{SUV} foram utilizados para calcular (no lugar de P_{S-F} , usados anteriormente) a concentração de AL nas membranas e comparar os efeitos dos diferentes AL, quando na mesma proporção na membrana.

4.2.3 – PARTIÇÃO NÃO-IDEAL DOS ANESTÉSICOS LOCAIS

Uma demonstração de que a saturação da fase aquosa leva à falsa “saturação” da membrana pode ser obtida pela “previsão” ou cálculo da concentração de AL máximo na membrana (n_m na saturação) e n_t (sendo $n_t = S_w + n_m$), empregando-se valores de Coeficiente de Partição previamente conhecidos e valores de S_w no lugar de n_a , na Equação 5. Neste caso a concentração calculada de AL total (n_t) deve ser igual a encontrada experimentalmente na Figura 13. Em outras palavras esse cálculo permite saber qual a concentração de AL que levará a “saturação” da membrana, partindo-se da premissa que a máxima quantidade em H_2O (n_a) será atingida pois equivale a S_w . De fato, os valores de n_t calculados desta forma (Tabela 7), usando o valor de P_{SUV} em 8 mM – 6,16 mg/ml - de EPC, apresentam boa correlação com os valores determinados experimentalmente, a partir da Figura 13. Portanto, conclui-se que a “saturação” realmente ocorre por ter sido atingida a solubilidade aquosa do AL, e que a transferência dos AL para a membrana é mediada pela água (Frezzatti Jr. *et al.*, 1986), que limita a partição do AL, mesmo em altas concentrações de membrana (Butherworth & Strichartz, 1990, de Paula & Schreier, 1995 e 1996). Observações semelhantes foram feitas para a partição de n -álcoois e três anestésicos gerais: clorofórmio, halotano e dietil-eter, entre membranas de DPPC e água; os autores demonstraram que a partição era limitada pela baixa solubilidade aquosa dos compostos (Hill, 1974). O efeito limitante da solubilidade, restringindo a partição (conhecido como efeito “cutoff”) também foi descrito para inseticidas do tipo hexacloro-ciclohexanos, em vesículas de DOPC (Jones & Lee, 1985) e para a potência anestésica de n -álcoois em neurônios de girino em álcoois com mais de 12 carbonos e solubilidade aquosa inferior a 10^{-6} M (Pringle *et al.*, 1980), para AL do tipo amino-éster e amino-amidas em vesículas multilamelares de EPC (de Paula & Schreier, 1995), para análogos de heptacaína em membranas orientadas de DPPC (Gallová *et al.*, 1997) e para a trifluoperazina em vesículas de EPC e eritrócitos (Malheiros *et al.*, 1998).

Tabela 7: Partição não ideal. Valores de n_t experimental (obtidos da Figura 13) e calculados segundo a Equação 5 (ver texto); constante de ligação (K_b) e $K_b.S_w$.

AL	n_t experimental (mM)	n_t calculado (mM)	K_b^a	$K_b.S_w$
LDC	19,83	19,07	57	0,74
EDC	1,52	1,34	929	0,14
MVC	12,74	12,56	53	0,50
BVC	3,40	3,58	647	0,37

^a Constante de ligação (Equação 7) obtida dos valores de P_{SUV} .

Segundo Hill, o efeito “cutoff” é observado quando a partição do soluto na membrana não é ideal (Hill, 1974). A partição ideal ocorreria quando houvesse certa proporcionalidade entre a hidrofobicidade e a solubilidade aquosa do composto e foi definida como (Equação 6) :

$$K_b \times S_w = 2 \quad (6)$$

(concentrações expressas em mol/soluto por mol/solvente). Onde K_b é a constante de ligação do soluto à membrana e relaciona-se com o coeficiente de partição, P , através do volume molar parcial ($\bar{V}$) do lipídio (Equação 7):

$$K_b = P \cdot \bar{V} \quad (7)$$

Para a EPC o volume parcial é de 0,770 L/mol.

Quando há partição não ideal caracteriza-se a desproporção entre os valores de Coeficiente de Partição e da solubilidade aquosa do composto e a Equação 6 leva a valores menores que 2 ($K_b \cdot S_w < 2$). Valores menores que 2 foram descritos para a partição da forma neutra de AL do tipo amino-éster e amino-amidas, em vesículas multilamelares de EPC (de Paula & Schreier, 1995).

Os valores de K_b e os de $K_b.S_w$ para a partição dos AL em vesículas unilamelares podem ser vistos na Tabela 7, caracterizando a partição não ideal dos AL, que possibilita a medida de coeficiente de partição (P). Esses dados evidenciam a importância do caráter anfifílico da molécula do AL para sua ação farmacológica e explicam resultados antes considerados controversos, como o relato da diminuição do

bloqueio à condução de estímulo nervoso em fibras tratadas com DBC quando o pH da solução era elevado de 7 a 9 (Ritchie et al., 1965; 1968); nesse caso, embora o aumento de pH seja acompanhado por maior partição da forma neutra do AL, há grande queda na solubilidade aquosa da DBC ($pK_a=8,4$), impedindo sua partição e, conseqüentemente diminuindo o efeito anestésico.

Igualmente explica-se a maior eficiência aparente da LDC sobre a EDC nos experimentos de RPE (Figura 14 a) que desaparece ao compararmos os 2 AL na mesma proporção na membrana (Figura 14 b).

4.3 - MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de fluorescência foram realizadas para observar alterações em sondas do tipo ácido pireno em diferentes profundidades da bicamada (Figura 10) quando em presença de concentrações crescentes de AL (LDC, EDC, MVC e BVC). Os experimentos foram planejados de forma que os efeitos dos AL pudessem ser correlacionados entre si, ou seja, em uma mesma razão molar (0,07:1, AL:EPC, na membrana). Devido a limitações de dispersão de luz, as medidas de fluorescência foram realizadas utilizando baixas concentrações de EPC (0,678 mM), limitando a proporção de AL incorporada a membrana.

As medidas foram conduzidas em temperatura ambiente (22°C), sendo utilizadas sondas lipofílicas de pireno incorporadas nos lipossomas numa razão molar de até 1 mol% e excitadas em 345 nm.

Os espectros de emissão dos marcadores 4, 6, 10 e 16-py obtidos entre 350 e 500 nm podem ser vistos na Figura 15 (controle e em presença de EDC).

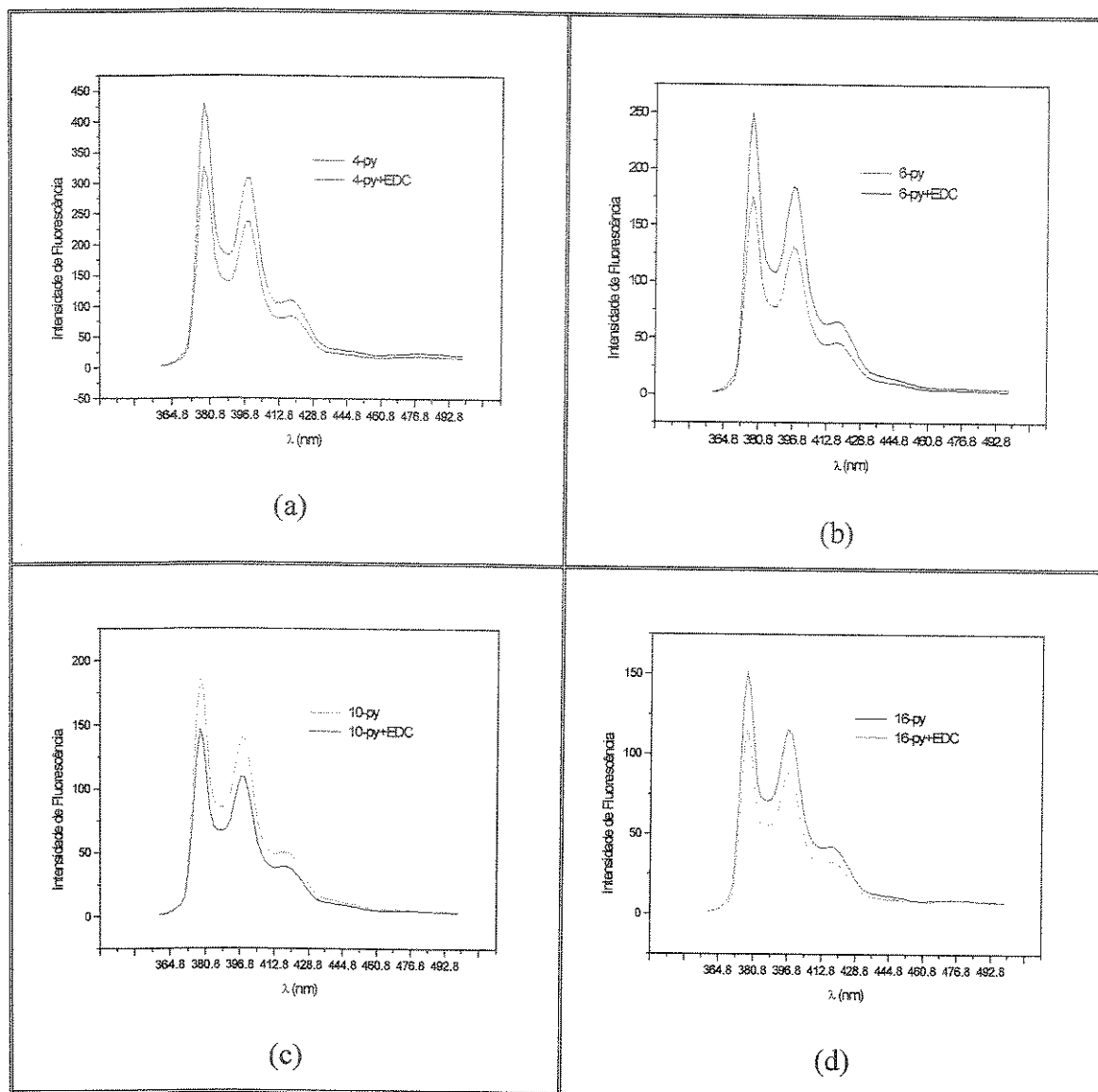


Figura 15: Espectros de emissão do marcador: (a) 4-py, (b) 6-py, (c) 10-py e (d) 16-py, em vesículas unilamelares de EPC (0,678 mM), com e sem EDC (0,13mM). λ_{exc} = 345 nm, λ_{em} = 378 nm, 22 °C.

O efeito supressor dos AL na fluorescência dos marcadores 4, 6, 10 e 16 ácido pireno em membranas de EPC (medidas realizadas em triplicata) podem ser vistos na **Figura 16**.

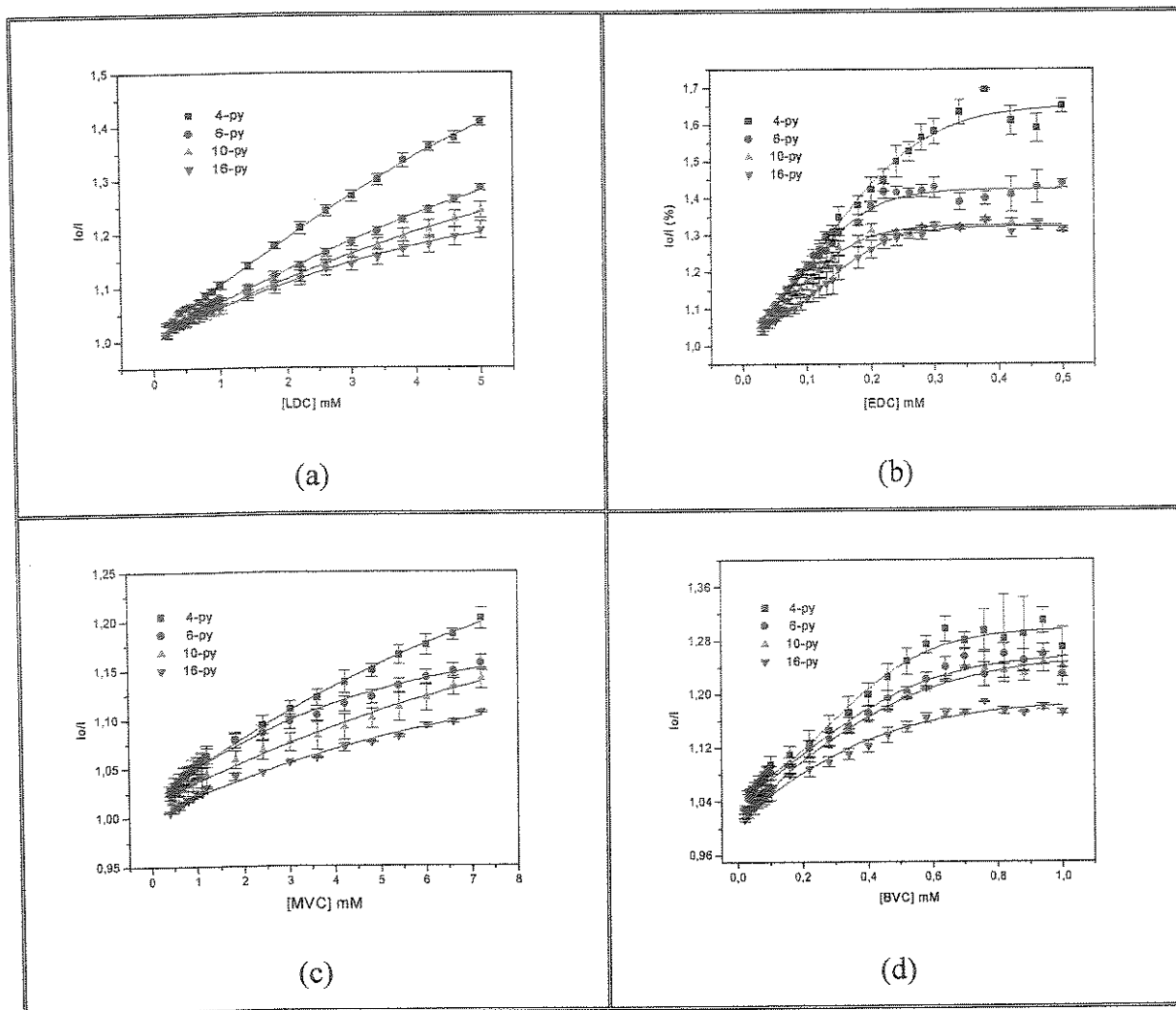


Figura 16: Efeito supressor dos AL na fluorescência dos marcadores 4, 6, 10 e 16 ácido pireno em membranas de EPC (SUV), (a) LDC, (b) EDC, (c) MVC e (d) BVC. $\lambda_{exc} = 345$ nm, $\lambda_{em} = 378$ nm, 22 °C.

Semelhante ao efeito desorganizador da membrana visto nos experimentos de RPE (Figura 13), na Figura 16 (b e d) observamos um comportamento tendendo à saturação (evidente para a EDC e BVC). Para LDC e MVC (Figuras 16 a e c) nas concentrações de membrana utilizadas nos experimentos (0,678 mM), não foi atingida a saturação da membrana e somente a fase inicial da curva é vista. Já para a EDC e BVC a saturação observada deve-se à saturação da fase aquosa, por ter sido ultrapassada a solubilidade aquosa destes anestésicos o que limita a partição na membrana, como mostrado no item 4.2.3. O parâmetro usado nos experimentos acima foi a supressão da fluorescência (I_0/I) do marcador, medida na presença (I) e na ausência do AL (I_0). O efeito

de “quenching” neste caso pode estar ocorrendo por três motivos: o primeiro, indireto, seria causado pela entrada do anestésico na membrana causando uma expansão da bicamada que permitiria maior acesso de moléculas de oxigênio ao marcador, ocorrendo o contato entre a molécula de oxigênio e do fluoróforo (py), o que provocaria a diminuição na intensidade do sinal (Lakowicz, 1983). A segunda explicação é a de que o anestésico se insere na membrana em localização próxima ao fluoróforo (e visto que aminas são eficientes supressores, o fluoróforo no estado excitado recebe um elétron da amina), causando a supressão do fluoróforo (Lakowicz, 1983; Warren, 1987). As duas possibilidades descritas acima, referem-se ao fenômeno de supressão colisional ou dinâmico, ou seja, pelo encontro do fluoróforo com o supressor (espécie que causa a supressão), sendo o oxigênio um dos melhores supressores colisionais conhecidos, seguido pelas aminas. A terceira possibilidade para a existência de supressão seria pela complexação do supressor com o fluoróforo durante o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado (conhecido como supressão estática), onde pode existir a formação de um complexo não fluorescente entre o quencher e o fluoróforo, podendo ser causado pelo anestésico em uma interação específica (Jones, 1990).

Nas nossas medidas não podemos afirmar qual (is) tipo (s) de fenômeno está (ão) ocorrendo, para sabermos realmente necessitaríamos de realizar medidas de tempo de vida (o que não é possível em nosso equipamento) ou na ausência de O₂. Desta forma usamos a informação pela supressão (a exemplo do parâmetro h_{+1}/h_0 nos resultados de RPE) para análise comparativa, entre os AL.

Observamos ainda na **Figura 16** que o efeito de supressão quando o anestésico foi adicionado ao sistema é mais pronunciado nos marcadores mais superficiais (4-py > 6-py > 10-py > 16-py). Esses dados poderiam indicar que tais anestésicos fiquem localizados mais superficialmente no interior das vesículas unilamelares de EPC. Entretanto, como discutido anteriormente, é importante levar em conta o gradiente decrescente da ordem da cadeia acila (Gallová *et al*, 1997) e a real posição do marcador. O ácido pirenobutanóico não se encontra com o pireno em profundidade exatamente equivalente à posição 4 da cadeia acila dos fosfolipídios, embora o anel do fluoróforo 4-py esteja mais superficial que os demais homólogos (6, 10 e 16-py). Desta forma podemos apenas dizer que tais 48

anestésicos suprimem com mais eficiência a fluorescência dos marcadores mais superficiais.

A partir dos dados mostrados na **Figura 16** registramos, para todos os marcadores, o efeito dos AL na razão molar na membrana de 0,07:1 (AL:EPC) e somente para a EDC e BVC medimos a razão molar no efeito máximo (**Tabela 8**). Os valores de efeito na razão molar 7% foram obtidos utilizando os valores de P_{SUV} .

Tabela 8: Efeito dos AL na razão molar de 0,07:1 (AL:EPC na membrana) e no efeito máximo (EDC e BVC) de supressão da fluorescência de marcadores da série pireno, inseridos em vesículas sonicadas de EPC (0,678mM).

AL/Marcador	4-py		6-py		10-py		16-py	
Efeito(%)	0,07:1 ^a	Máx. ^b	0,07:1 ^a	Máx. ^b	0,07:1 ^a	Máx. ^b	0,07:1 ^a	Máx. ^b
LDC	13,2	nd ^c	9,6	nd ^c	8,4	nd ^c	7,0	nd ^c
EDC	28,4	59,9	24,2	41,0	21,9	29,6	16,1	29,3
MVC	6,7	nd ^c	6,2	nd ^c	4,8	nd ^c	3,4	nd ^c
BVC	10,1	28,3	9,8	24,9	9,1	23,2	8,1	17,0

^a Efeito percentual de supressão da fluorescência do marcador para a razão molar de 0,07:1 AL:EPC na membrana; ^b Efeito máximo, na saturação da membrana; ^c nd= não determinado (ver texto).

Através dos resultados da **Tabela 8**, podemos verificar que os anestésicos não cíclicos, LDC e EDC, são os que causam maior efeito nos marcadores superficiais (4 e 6 py), em uma mesma razão molar AL:EPC (0,07:1), visto que MVC e BVC (cíclicos) causaram efeitos inferiores aos seus análogos de igual hidrofobicidade, a LDC e EDC respectivamente. Estes resultados estão representados na **Figura 17a**. Entretanto é importante notar que para os anestésicos da mesma série (cíclicos vs não cíclicos) os mais hidrofóbicos são os que apresentaram maiores efeitos (na mesma razão molar na membrana), isto reflete, provavelmente, uma inserção mais profunda da EDC e BVC nas vesículas, o que favoreceria a supressão da fluorescência.

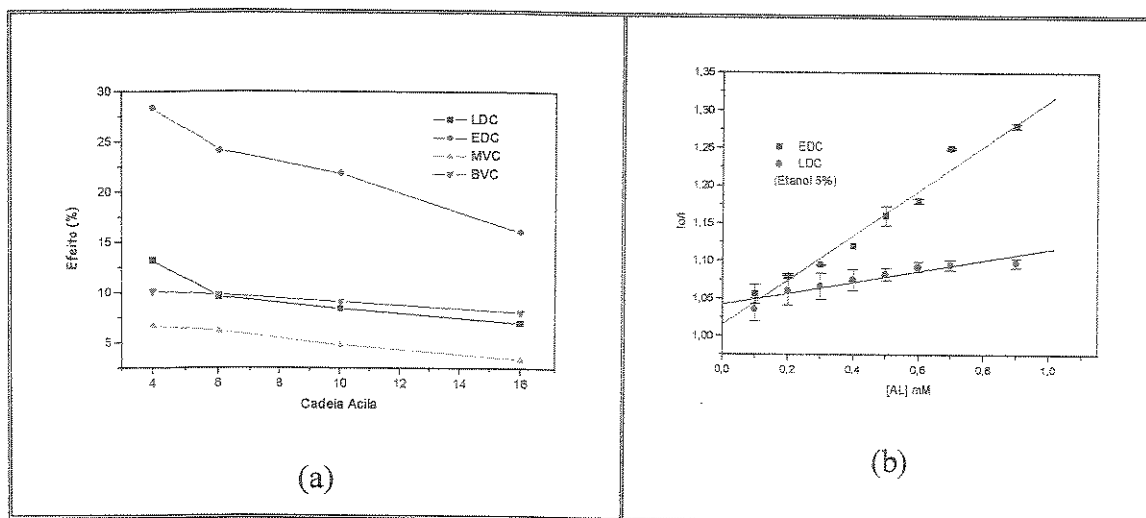


Figura 17: (a) Supressão dos marcadores de fluorescência em diferentes posições na membrana, causados pelos AL na razão molar 0,07:1 AL:EPC (na membrana); (b) Supressão do marcador 4-py em água/etanol (5%) em presença de LDC e EDC.

Tais resultados têm boa correlação com as propriedades biológicas destes AL, visto que os AL não-cíclicos apresentam maior potência anestésica que os cíclicos e os mais hidrofóbicos que os menos (Covino & Vassalo, 1985).

Os resultados evidenciam mais uma vez o maior efeito da LDC no marcador mais superficial (4 py), corroborando as evidências de RPE da localização desse AL na região da interface cabeça polar/ cauda hidrofóbica das vesículas (Figura 16 a).

Curiosamente a EDC mostrou efeito desproporcionalmente grande, em relação aos demais AL e a experimentos anteriores de RPE em vesículas unilamelares (Figura 17a e Tabela 8) e multilamelares (de Paula & Schreier, 1995). Acreditamos que este resultado seja causado pelo maior efeito supressor da EDC sobre o marcador de fluorescência (Lakovics, 1983) e a EDC seria mais potente que a MVC e a BVC, cujo grupamento amina terciário faz parte do anel piperidínico e está protegido por um grupamento metil ou butila. Em relação a LDC o maior efeito da EDC seria explicado pela maior hidrofobicidade desta e sua afinidade pelo interior hidrofóbico da membrana, enquanto temos grandes evidências de localização superficial da LDC nessas vesículas. Tais evidência foram confirmadas através dos resultados mostrados na Figura 17b, onde a EDC causa uma maior supressão da fluorescência do marcador (4-py) que a LDC em água/etanol (o etanol foi utilizado para aumentar a solubilidade do marcador em água).

4.4 - MEDIDAS DE INFRA-VERMELHO

Para observar a ação dos AL sobre a cabeça polar dos fosfolipídios foram feitas medidas de absorção na região do infravermelho, da frequência do estiramento do grupamento fosfato e das carbonilas da EPC. A **Figura 18** mostra o espectro de infravermelho de vesículas de EPC (unilamelares) contendo ou não LDC, na região entre 600 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} . As atribuições das bandas foram feitas a partir de trabalhos semelhantes da literatura, usando membranas fosfolipídicas multilamelares (Ueda et al, 1994). Os valores de frequência (cm^{-1}) para as diversas bandas da EPC atribuídas, bem como as alterações na presença dos AL, podem ser vistos na **Tabela 9**.

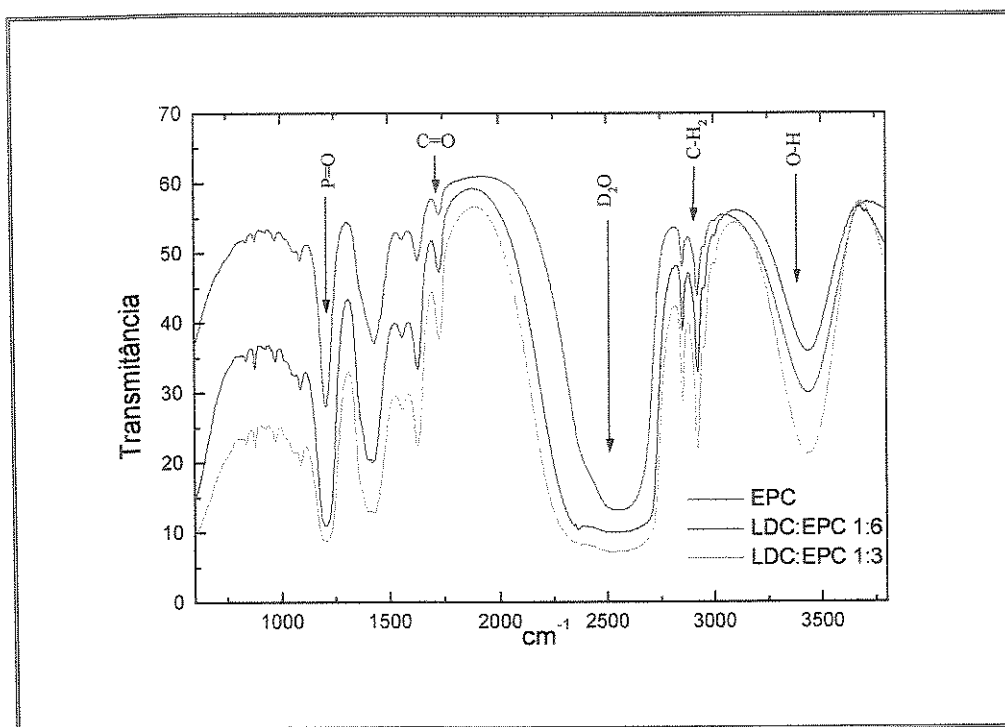


Figura 18: Espectros de Infravermelho de vesículas unilamelares de EPC (65mM) na ausência e presença de LDC (razões molares LDC:EPC 1:3 e 1:6 na membrana). Amostras feitas em celas de KBr, tampão carbonato 0,2 M, pH 10,5 ressuspenso em D₂O a 22 °C.

Tabela 9: Valores de frequências de absorção das bandas de estiramento do fosfato, P=O e carbonila, C=O de vesículas unilamelares de EPC (65mM) na presença dos AL (LDC, EDC, MVC e BVC). Razão molar AL:EPC 1:6 na membrana (exceto para a LDC medida também na razão 1:3). Tampão carbonato 0,2 M, pH10,5 a 22 °C.

Amostra	P=O (cm ⁻¹)	C=O (cm ⁻¹)
Controle	1203	1736
LDC	1206	1734
LDC (1:3)	1209	1730
EDC	1207	1731
MVC	1207	1735
BVC	1204	1729

Em LMV a banda de estiramento do fosfato é registrada em 1230 cm⁻¹ (de Paula, 1993), o deslocamento dessa banda vibracional para menor frequência nas vesículas unilamelares (1203 cm⁻¹, Tabela 9) indica que o grupamento fosfato forma maior número de pontes de hidrogênio com a água, o que está de acordo com a maior curvatura dessas SUV e conseqüente menor grau de empacotamento da cabeça polar. Na presença dos anestésicos parece haver menor acesso das moléculas de água ao grupo PO₄⁻ (verificar efeito da LDC 1:6 e 1:3 AL:EPC), que seria causado pela inserção dos AL nesta região. De fato temos demonstrado por medidas de T₁ (¹H-RMN) que a presença dos AL na cabeça polar da bicamada libera os grupamentos amina de suas interações eletrostáticas com PO₄⁻ vizinhos; neste caso esses grupos fosfato devem ficar mais livres, porém estão “blindados” pela presença do AL. Somente a BVC parece não ter efeito evidente sobre o estiramento do PO₄⁻, o que aponta para uma inserção mais profunda deste AL, devido a sua maior hidrofobicidade.

A banda em 1736 cm⁻¹, referente a carbonila, é idêntica à observada para vesículas multilamelares (de Paula, 1993), é importante notar que os AL diminuem a frequência desta banda, indicando um maior acesso das moléculas de água à carbonila, isto

devido ao espaçamento criado pela inserção dos AL entre os fosfolipídios. Para a EDC e BVC o efeito é maior (equivale a LDC em razão molar 1:3, LDC:EPC), indicando provavelmente que estas devam inserir-se mais profundamente na bicamada.

Não detectamos alterações evidentes na banda de estiramento das metilas da colina ou qualquer outra banda identificável da EPC.

As medidas de IR, assim como as de ^{31}P -RMN não são extremamente sensíveis para detectar a presença dos AL nas regiões monitoradas da cabeça polar e glicerol, uma limitação da metodologia já apontada em estudos com vesículas lipídicas grandes (Boulanger *et al*, 1981; de Paula, 1993). De qualquer maneira as pequenas alterações detectadas são coerentes e mostram boa correlação com os resultados obtidos por RPE, fluorescência e principalmente por RMN.

Acabamos de adquirir celas volumétricas (para análises quantitativas) que permitirão comparar o efeito causado em termo de % de alteração da área total das bandas, o que nos possibilitará o “refinamento” dos resultados.

4.5 - EXPERIMENTOS DE RMN DE FÓSFORO

As medidas de ^{31}P -RMN foram realizadas com o objetivo de verificar a ação dos AL na região da cabeça polar dos fosfolípidios. As medidas foram feitas utilizando vesículas unilamelares de EPC em pH 10,5 em presença dos anestésicos. Os espectros foram calibrados com relação ao pico do ácido fosfórico 85 % (utilizado como padrão de fósforo, 0 ppm). Os espectros do padrão e das vesículas unilamelares são mostrados na Figura 19.

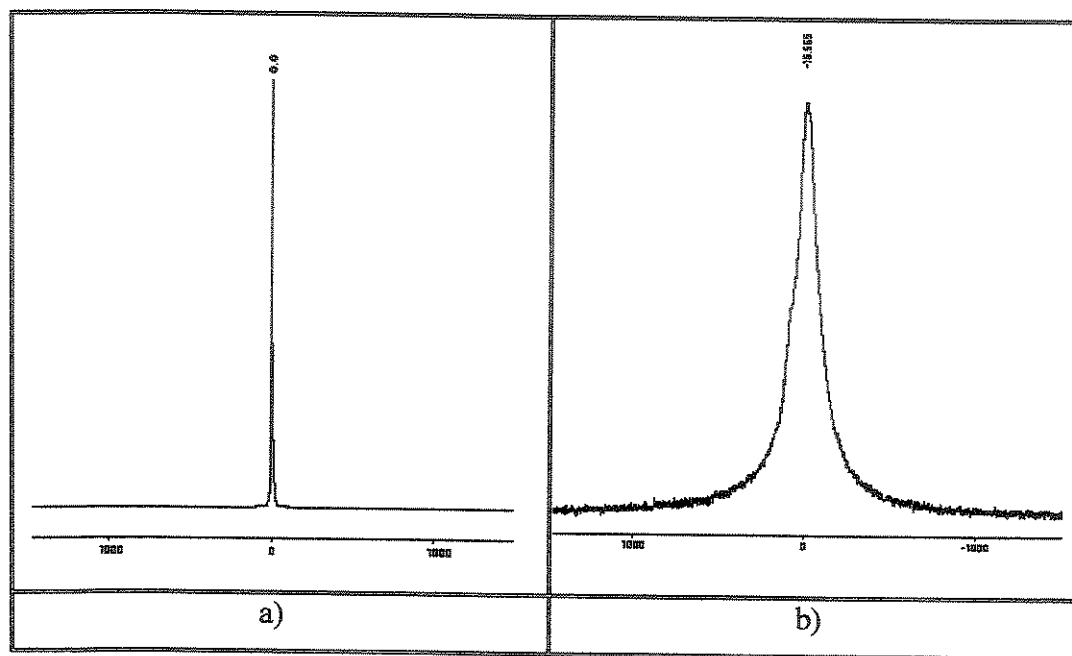


Figura 19: Espectro de RMN de Fósforo, com desacoplamento de hidrogênio, a) do padrão ácido fosfórico 85%, b) de vesículas unilamelares de EPC (65mM), pH 10,5, 23 °C 202 MHz.

Os espectros das vesículas unilamelares na presença de anestésicos são muito semelhantes ao da Figura 19 b. A partir desses espectros foram medidos dois parâmetros: o deslocamento químico do grupamento fosfato na ausência e presença dos AL (com o objetivo de determinar alterações no ambiente químico do grupamento fosfato quando na presença do anestésico) e a largura do pico a meia altura, com o objetivo de verificar a liberdade de rotação do grupamento fosfato, na presença dos AL (Tabela 10).

Em vesículas multilamelares de EPC o deslocamento químico do pico isotrópico de ^{31}P é registrado em $-1,77$ ppm, aqui o deslocamento é bem menor correspondendo a $0,082$ ppm. Naquele sistema não se observou alteração no espectro de ^{31}P -RMN (o

parâmetro medido foi o deslocamento químico anisotrópico) por ação dos anestésicos aqui estudado (de Paula, 1993).

Tabela 10: Deslocamentos químicos e largura do pico a meia altura do ^{31}P da cabeça polar de vesículas unilamelares de EPC (65 mM) na presença dos anestésicos locais (AL:EPC, 1:6 razão molar na membrana). Tampão carbonato 0,2 M, pH 10,5, 23 °C, 202 MHz.

	Deslocamento químico (ppm) ^a	Variação (ppm)	Largura a Meia altura (Hz)	Variação (Hz)
Controle*	-0,082		172,7	
LDC	-0,109	(-) 0,027	154,5	- 18,2
EDC	-0,106	(-) 0,024	163,6	- 9,1
MVC	-0,136	(-) 0,054	200,0	27,3
BVC	-0,121	(-) 0,039	172,7	0,0

* Em relação ao H_3PO_4 (em 0,00 ppm).

Analisando os resultados mostrados na **Tabela 10**, observamos que os maiores efeitos ocorrem para os anestésicos cíclicos (MVC e BVC), tais efeitos seriam justificados pelo maior impedimento estérico que o grupamento piperidínico causa no interior da bicamada, possivelmente por estar localizado próximo ao grupamento fosfato, ou pelo espaçamento criado pela inserção do anestésico em outra região, e conseqüente diminuição na interação eletrostática que o grupamento fosfato estabelece com outra molécula de fosfolípido adjacente. Os menores efeitos encontrados para a LDC e EDC podem ser justificados por estes causarem um menor impedimento estérico que os cíclicos ao empacotamento lipídico. De qualquer maneira a pequena alteração no deslocamento químico (negativo, ou desblindagem) indica que esses AL também teriam localização superficial

Analisando ainda a **Tabela 10**, a largura de linha nos indica o “grau” de movimentação dos grupamentos fosfatos na ausência e na presença de AL. Observamos que quando em presença de anestésicos acíclicos (LDC e EDC) o grupamento fosfato fica mais livre, visto que o seu pico fica mais fino, enquanto que para os anestésicos cíclicos o efeito é inexistente (BVC) ou oposto (MVC).

O estreitamento do pico de ^{31}P -RMN é um parâmetro bastante interessante e como veremos adiante, corrobora as informações de ^1H -RMN que mostram maior

dinâmica nos hidrogênios da cabeça polar da EPC na presença dos AL, sugerindo “liberação” das interações eletrostáticas entre grupos aminas e fostato dos fosfolipídios adjacentes. Neste caso, poder-se-ia esperar a detecção de um grupo fosfato “livre”, mais blindado (pico deslocado para direita em relação ao controle) como observado em nossos resultados. Também seria esperado que o fosfato tivesse rotação mais rápida (pico mais estreito), a não ser que houvesse impedimento estérico local (MVC e talvez BVC). Embora os AL sejam capazes de deslocar o pico do ^{31}P para campos mais altos, não podemos afirmar se essa maior blindagem (Tabela 10) é significativa. Há trabalhos na literatura, realizados com tetracaina, dibucaína e procaína protonadas, que mostram alterações da mesma ordem de grandeza (Kuroda & Fujiwara, 1987).

Interpretação dos resultados de IV e ^{31}P -RMN

As medidas de IV (banda de estiramento do fosfato) e ^{31}P -RMN trazem informações bastante interessantes e coerentes entre si. Enquanto as medidas de IV evidenciam maior acesso de moléculas de água aos grupos fosfato (liberados de suas interações eletrostáticas com lipídios vizinhos) na presença dos anestésicos, as medidas de ^{31}P -RMN mostram que esses mesmos grupos fosfatos estão mais livres.

O efeito pronunciado da MVC no deslocamento químico é indicativo de sua localização preferencial, reforçada pelo alargamento de linha (Tabela 10).

Porém como explicar a aparente discrepância entre os resultados de RPE, fluorescência e IV (C=O) que indicam inserção mais profunda para os AL mais hidrofóbicos como a EDC e BVC?

Acreditamos que nossos resultados reflitam a dinâmica da bicamada. A grande movimentação dos fosfolipídios (lateral) e dos anestésicos (transversal). Segundo Gawrisch a localização de moléculas anfifílicas no interior da membrana é melhor descritas por uma função de distribuição (Holte & Gawrisch, 1997; Huster *et al*, 1999 e comunicação pessoal) em que define-se uma região de grande probabilidade de encontrar-se a molécula, sem excluir sua movimentação (in-and-out) constante, atingindo as regiões mais polares e o core hidrofóbico.

Pelos valores mostrados na **Tabela 15** podemos notar que os valores de T_1 de EPC podem aumentar ou diminuir, na presença de anestésico. Isto nos mostra que os AL causam maior grau de mobilidade rotacional dos hidrogênios de regiões específicas da EPC e, em contrapartida, menor mobilidade em outras regiões.

O efeito desorganizador de anestésicos locais em membranas tem sido mostrado por técnicas de ^2H -RMN (Boulanger *et al*, 1980,1981; Westman *et al*, 1982; Kelusky & Smith, 1984), RPE (Butler *et al*, 1973; Neal *et al*, 1976; de Paula & Schreier, 1995) e fluorescência (Sikaris & Sawyer, 82), entre outras. A diminuição na ordem da bicamada foi utilizada para determinar a localização preferencial das formas protonada e neutra da TTC (Boulanger *et al*, 1981) em vesículas de EPC. Já alterações na fluidez da membrana foram usadas para comparar o efeito de nove anestésicos locais nessas vesículas (de Paula & Schreier, 1995). Medidas de alterações na dinâmica da bicamada como as aqui apresentadas, fornecem informações mais detalhadas que aquelas, pois revelam alterações positivas e negativas que podem levar a modelos mais definidos da inserção do AL.

A partir dos dados da **Tabela 15** foram construídos gráficos com variação dos valores de T_1 (do controle e do sistema EPC:AL), mostrados na **Figuras 29**.

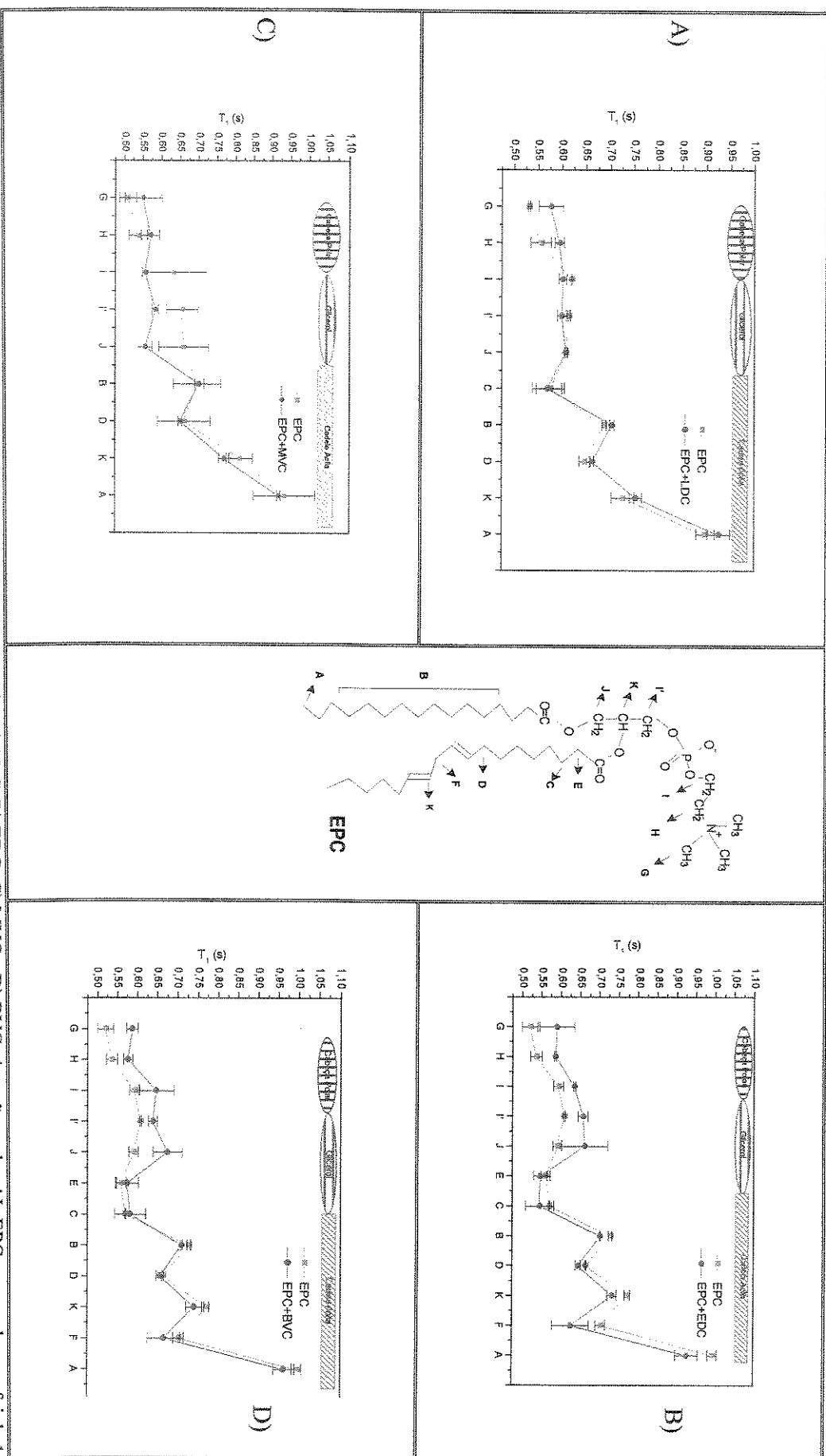


Figura 29: Variação nos valores de T_m dos hidrôgenios da EPC, em presença de: A) LDC, B) EDC, C) MVC e D) BVC. A razão molar AL:EPC na membrana, foi de 1:3 (LDC, MVC e BVC) e 1:6 (EDC), EPC 65mM, pH 10,5, a 30 °C.

4.6 - EXPERIMENTOS DE RMN DE HIDROGÊNIO

Descrevemos a seguir resultados obtidos pela técnica de RMN de hidrogênio. Note-se a preferência de usar “hidrogênio” e não “próton”, atendendo a uma tendência atual em química (nomenclatura IUPAC); no entanto, o uso de RMN de próton é bastante popular entre bioquímicos (RMN de proteínas) e usado como sinônimo de RMN de hidrogênio.

4.6.1 - ^1H -RMN DOS ANESTÉSICOS EM pH 10,5

Os espectros de RMN dos AL podem ser vistos nas Figuras 20 (LDC), 21 (EDC), 22 (MVC) e 23 (BVC) em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 M, pH 10,5 (desprotonados), exceto para EDC que pela baixa solubilidade em pH 10,5 (Tabela 3), teve sua atribuição realizada em pH 5,5 (forma protonada). Resultados anteriores de nosso laboratório com LDC, MVC e PRC mostram que os hidrogênios que devem sofrer as maiores alterações entre a forma neutra e protonada são os vizinhos ao nitrogênio ionizável, sendo os deslocamentos químicos dos demais hidrogênios inalterados com o pH (de Paula, 1993). As atribuições estão de acordo com vários trabalhos da literatura, com AL (Cerbon, 1972, Kuroda & Fujiwara, 1987).

O espectro da Figura 23 apresenta-se com muito ruído devido a baixa solubilidade deste anestésico em pH 10,5 (Tabela 3).

A Tabela 11 mostra as atribuições e deslocamentos químicos da forma desprotonada (LDC, MVC e BVC) e protonada (EDC) dos AL, cuja estrutura química encontra-se na Figura 1. Embora os espectros tenham sido feitos com padrão de tetrametilsilano os valores de deslocamento químico são dados em referência ao pico da água (ajustado em 3,9 ppm) tal que pudessem ser comparados aos espectros da EPC, ajustados pelo pico do CH_3 terminal da cadeia acila em 0 ppm.

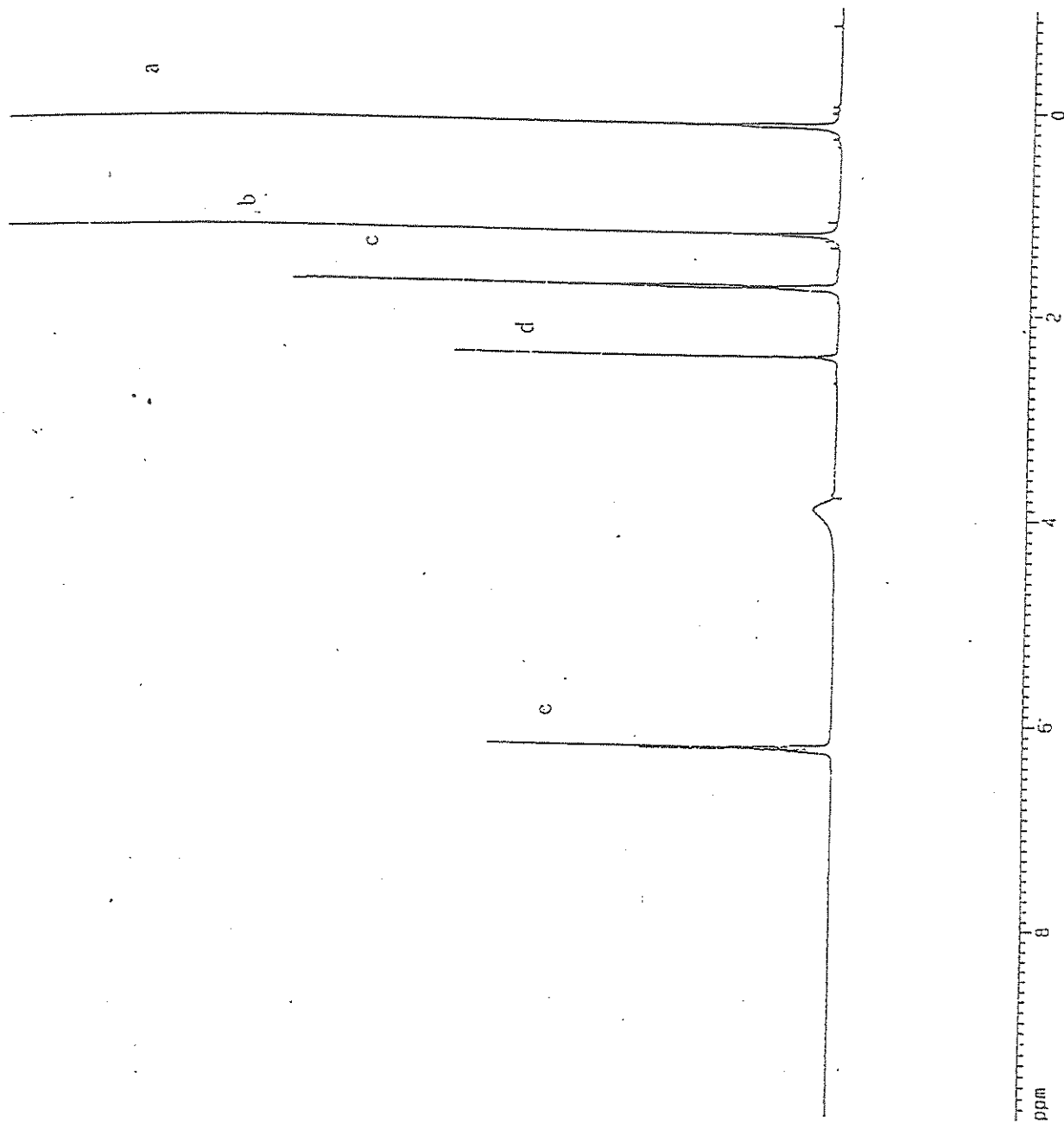
Como o pico da H_2O aparece em 4,7 ppm contra o padrão tetrametilsilano, os valores dos deslocamentos químicos dos AL contra aquele padrão é obtido somando-se 0,8 ppm aos números da Tabela 11.

Current Data Parameters
NAME 100
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 980819
Time 9.08
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13
PULPROG zgpg
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 24
DS 4
SAR 5995.294 Hz
FIDRES 0.182959 Hz
AQ 2.7325811 sec
RG 2296.0
DA 03.400 usec
DE 5.00 usec
TE 300.0 K
D12 0.00002000 sec
PL9 44.00 dB
D1 12.00000000 sec
SF01 500.1323569 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB
D13 0.0000300 sec
P1 10.60 usec
DE 5.00 usec

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1304564 MHz
WDW EH
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 20.00 cm
FIP 11.000 ppm
F1 5501.44 Hz
F2P -1.000 ppm
F2 -500.13 Hz
PPMCH 0.60000 ppm/cm
HZCM 300.07820 Hz/cm



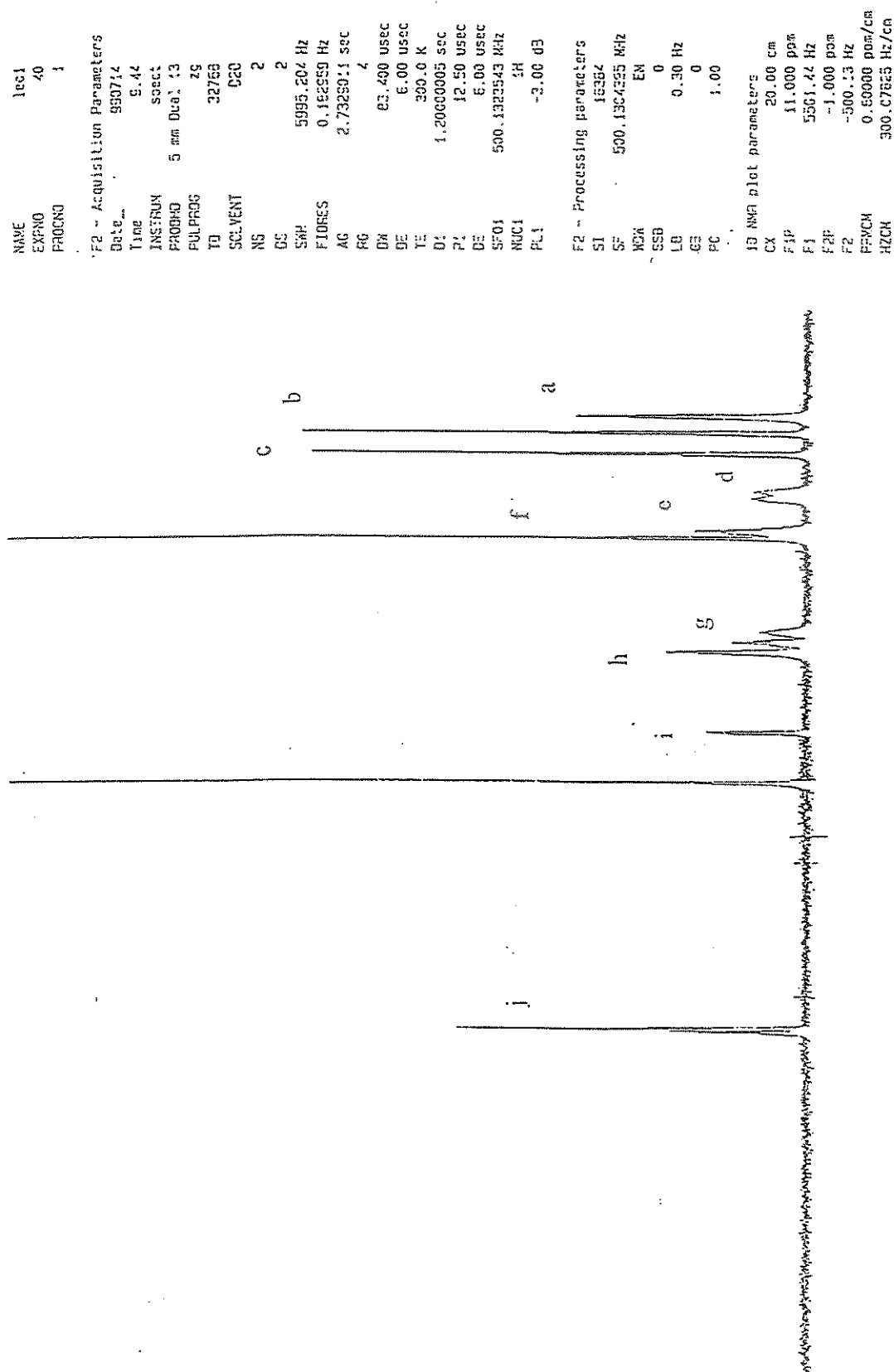


Figura 21: Espectro de ¹H-RMN (500MHz) da EDC em pH 5,5 a 30°C. O pico da água foi ajustado em 3,90 ppm (pré saturado).

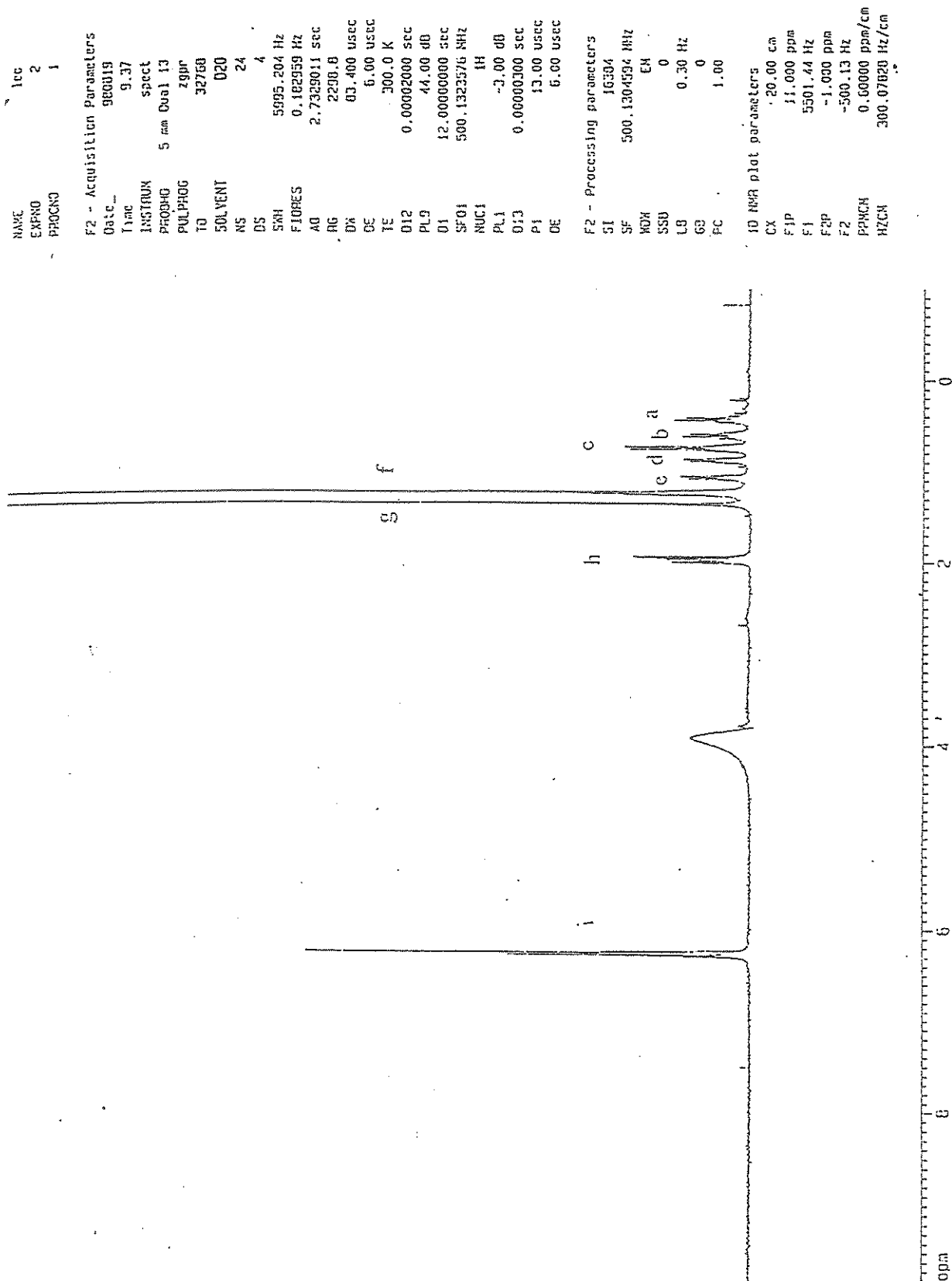


Figura 22: Espectro de ^1H -RMN (500MHz) da MVC em pH 10,5 a 30°C. O pico da água foi ajustado em 3,90 ppm (pré saturado).

NAME Proton1
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 981103
Time 14.10
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13
PULPROG zgpg
TO 65536
SOLVENT D2O
NS 2192
DS 0
SWH 8309.262 Hz
FIDRES 0.128010 Hz
AQ 3.9059956 sec
RG 3649.1
DH 59.600 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D12 0.00002000 sec
PL9 44.00 dB
D1 2.00000000 sec
SFO1 500.1323551 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB
D13 0.00000300 sec
P1 10.50 usec
DE 6.00 usec

F2 - Processing parameters

SI 32768
SF 500.1305040 MHz
WDW EH
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters

CX 22.00 cm
F1P 9.000 ppm
F1 4501.17 Hz
F2P -1.000 ppm
F2 -500.13 Hz
PPMCH 0.45455 ppm/cm
HZCH 227.33205 Hz/cm

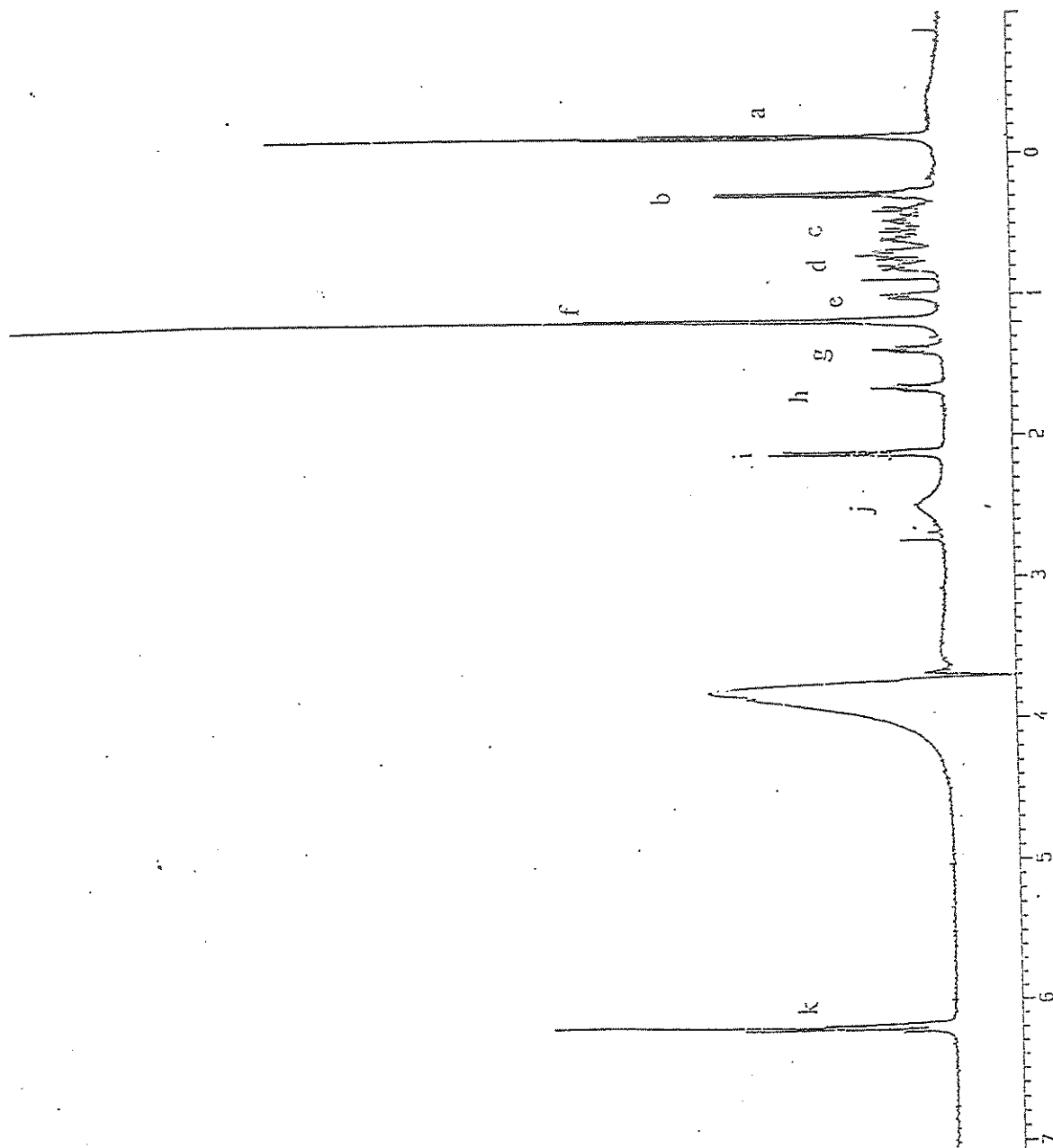
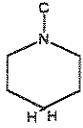
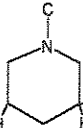
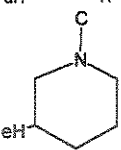
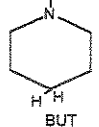
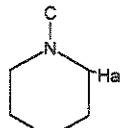
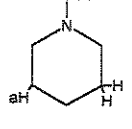
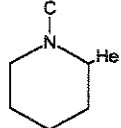
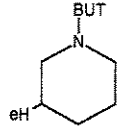
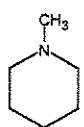
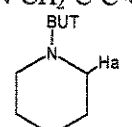
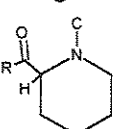
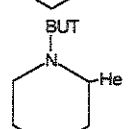
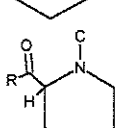


Fig. 1. 1D NMR spectrum of DMN in DMSO-d₆ at 30°C. The peak at 6.0 ppm is assigned to the DMN.

Tabela 11: Atribuições e deslocamentos químicos dos hidrogênios da LDC, EDC, MVC e BVC. Amostras ajustadas em relação ao pico da água (3.9 ppm), 500 MHz, a 30 °C. As concentrações utilizadas foram as de solubilidade dos AL, em pH 10,5, exceto para a EDC (medida em pH 5,5).

Deslocamento químico (ppm)					Atribuição			
	LDC	EDC	MVC	BVC	LDC	EDC	MVC	BVC
a	0,16	0,17	0,40	-0,11	$N(C-CH_3)_2$	$N-C-C-CH_3$		CH_3-but
b	1,25	0,34	0,59	0,29	ϕCH_3	$CO-C-C-CH_3$		$N-C-C-CH_2-C$
c	1,86	0,55	0,73	0,51	$N(CH_2-C)_2$	$N-C-CH_3$		$N-C-CH_2-C-C,$ 
d	2,54	1,00	0,86	0,75	$COCH_2N$	$N-C-CH_2-C$		
e	6,34	1,33	1,05	1,00	$\phi_{3,4,5}$	$CO-C-CH_2-C$		
f		1,41	1,23	1,20		ϕCH_3	ϕCH_3	$\phi CH_3,$
g		2,45	1,34	1,39		$N-CH_2-C$		$N-CH_2-C-C-C$ 
h		2,57	1,94	1,65		$N-CH_2-C-C$		
i		3,40	6,23	2,11		$CO-CH-N$	$\phi_{3,4,5}$	
j		6,43		2,50		$\phi_{3,4,5}$		$\phi-NHCO-$
k				6,20				$\phi_{3,4,5}$

Ha e He referem-se aos hidrogênios axiais e equatoriais, respectivamente, ao anel piperidínico.

4.6.2- ^1H -RMN DE VESÍCULAS UNILAMELARES DE EPC

O espectro de ^1H -RMN das vesículas unilamelares de EPC pode ser visto na **Figura 24** em tampão carbonato/bicarbonato 0,2 M, pH 10,5. As atribuições foram feitas e comparadas com dados da literatura (Finer et al, 1972, 1972, Kuroda & Kitamura, 1984, Kuroda & Fujiwara, 1987, Jendresiak & Smith, 1992). A nomenclatura (letras maiúsculas) foi preservada para comparação com essas citações.

A **Tabela 12** mostra as atribuições e deslocamentos químicos do espectro da **Figura 24**. Os deslocamentos químicos são dados em referência ao pico da metila terminal da cadeia acila, ajustado em 0,00 ppm ($\text{CH}_3\omega = 0,00$ ppm) ficando o pico da água em 3,90 ppm.

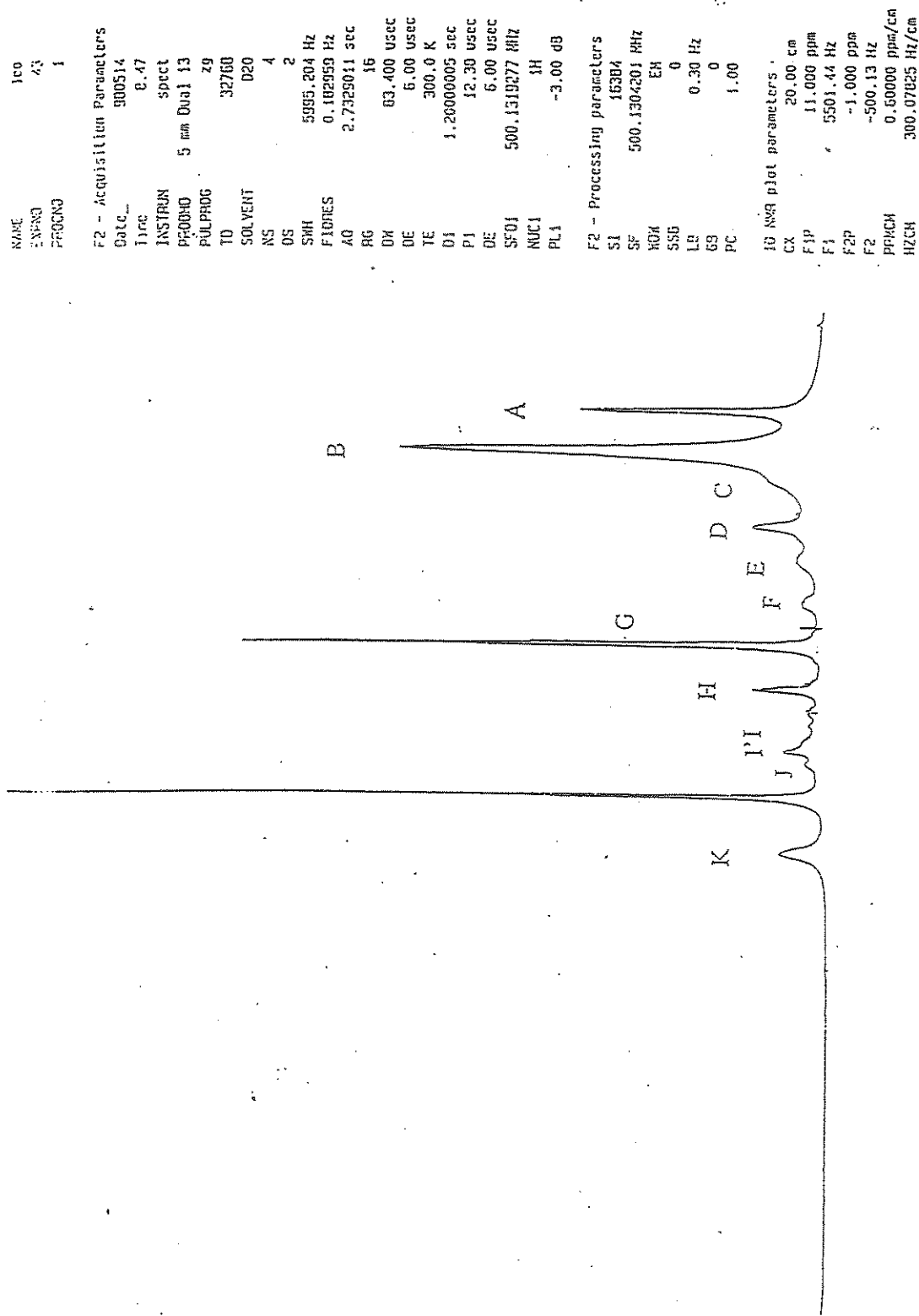
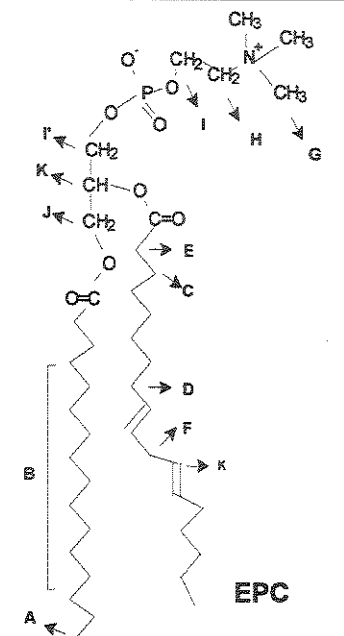


Figura 24: Espectro de ^1H -RMN (500MHz) da EPC em pH 10,5 a 30°C. O pico do $\text{CH}_3\text{-t}$ da EPC foi

Tabela 12: Atribuição e deslocamentos químicos dos hidrogênios das vesículas unilamelares de EPC. Amostras ajustadas em relação ao pico da metila terminal (0,00 ppm), 500 MHz. [EPC]= 65mM, a 30 °C.

Atribuição		Deslocamento químico (ppm)	
A	CH ₃	0,00	
B	(CH ₂) _n	0,40	
C	β-CH ₂ [*]	0,70	
D	CH ₂ C=C	1,15	
E	α-CH ₂ [*]	1,50	
F	=C-CH ₂ -C=	1,90	
G	N ⁺ (CH ₃) ₃	2,39	
H	CH ₂ N ⁺	2,80	
I	O ₃ POCH ₂ C	3,20	
I'	O ₃ POCH ₂ CHO	3,40	
J	CH ₂ OCO	3,55	
K	CH=CH, CHOCO	4,40	

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

4.6.3 - ¹H-RMN COM O SISTEMA ANESTÉSICO:EPC

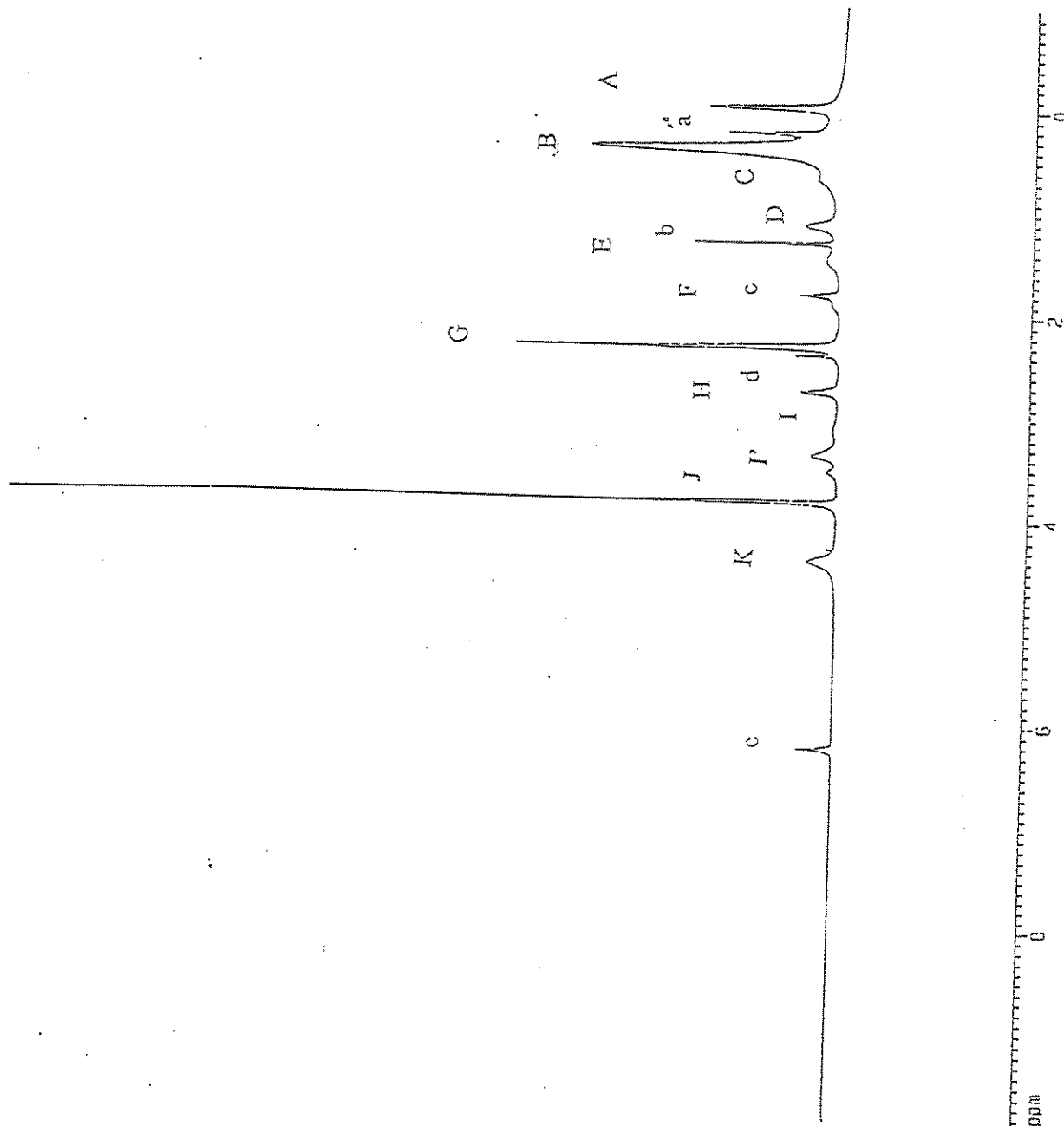
As **Figuras** de 25 a 28 mostram os espectros de ¹H-RMN das amostras de EPC incubadas com: LDC, EDC, MVC e BVC, respectivamente. A concentração de AL empregada propiciou razões molares na membrana de 1:3 (LDC, MVC, BVC) ou 1:6 (EDC). A **Tabela 13** mostra a atribuição e os deslocamentos químicos dos hidrogênios de vesículas de EPC contendo AL, a pH 10,5 (conforme **Figuras 25 a 28**). Os hidrogênios pertencentes aos anestésicos são identificados com letras minúsculas, conforme atribuição dada na **Tabela 11**. Os hidrogênios do lipídio são identificados com letras maiúsculas e a atribuição dos picos está de acordo com a **Tabela 12**.

Current Data Parameters
NAME lec1
EXPNO 32
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 990714
Time 5.22
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 13
PULPROG zg
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 4
DS 2
SMH 5995.204 Hz
FIDRES 0.182959 Hz
AQ 2.7325011 sec
RG 4
DM 63.400 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.20000005 sec
P1 13.00 usec
DE 6.00 usec
SF01 500.1323543 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1304395 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 20.00 cm
F1P 11.000 ppm
F1 5501.44 Hz
F2P -1.000 ppm
F2 -500.13 Hz
P2MCM 0.60000 ppm/cm
HZCM 300.07625 Hz/cm



NAME 100
EXPNO 7
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 990819
Time 13:11
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 13
PULPROG zg
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 1
DS 2
SWH 5995.204 Hz
FIDRES 0.182959 Hz
AQ 2.7329011 sec
RG 4
DX 83.400 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.20000005 sec
P1 12.00 usec
DE 6.00 usec
SF01 500.1323503 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB

F2 - Processing parameters
SI 15284
SF 500.1304240 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR old parameters
CX 20.00 cm
F1P 11.000 ppm
F1 5501.44 Hz
F2P -1.000 ppm
F2 -500.13 Hz
PPMCK 0.50000 ppm/cc
HZCK 300.07825 Hz/cm

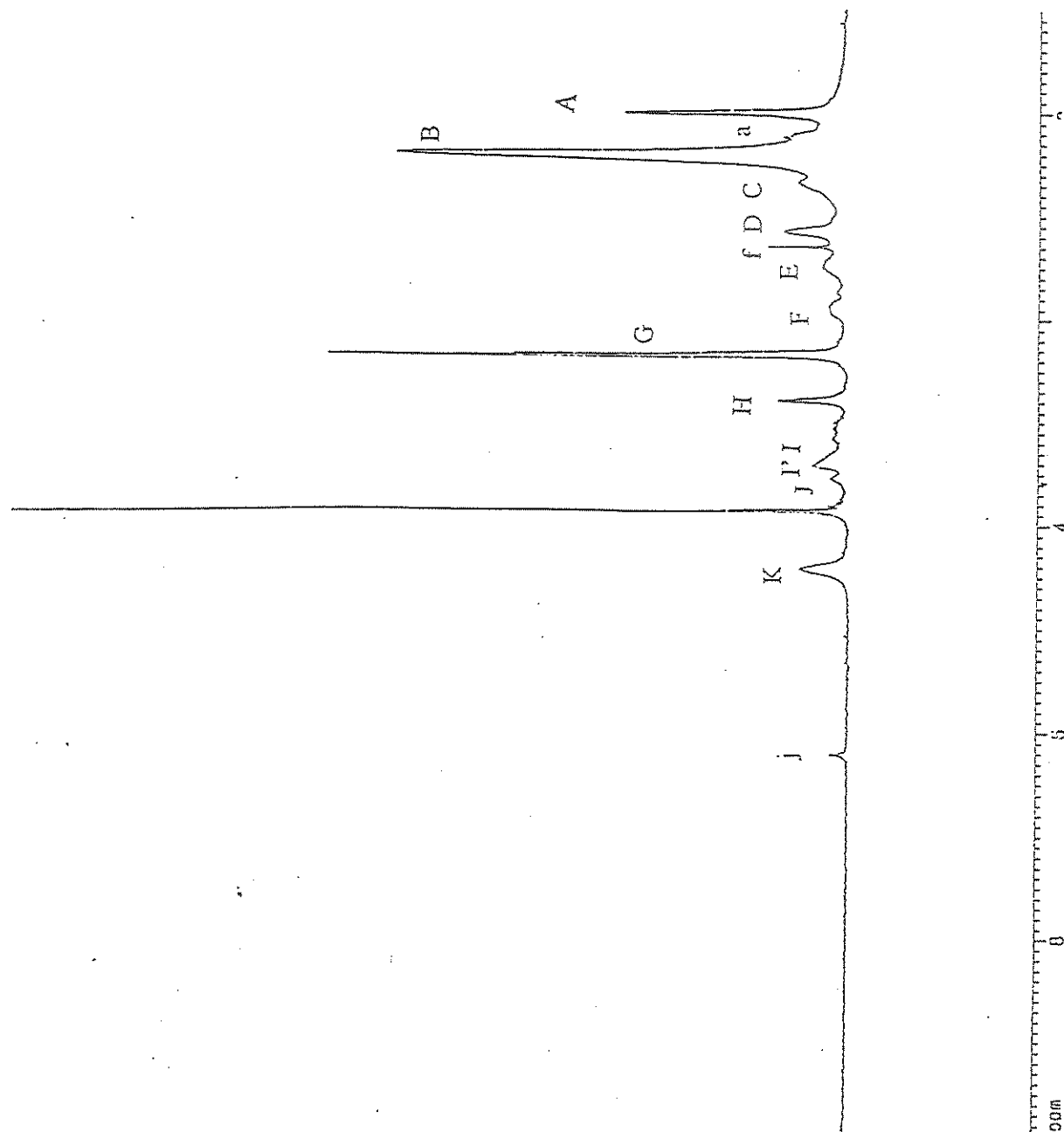


Figura 26: Espectro de ^1H -RMN (500MHz) da EDC:EPC (razão molar 1:6 na membrana) em pH 10,5 a 30°C. O pico do $\text{CH}_3\text{-t}$ da EPC foi ajustado em 0,00 ppm.

NAME lco
EXPNO 20
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 590321
Time 11.24
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 13
PULPROG zg
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 4
DS 2
SWH 5995.204 Hz
FIDRES 0.18359 Hz
AQ 2.7329011 sec
RG 16
DK 03.400 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
O1 1.2000005 sec
P1 12.05 usec
DE 6.00 usec
SF01 500.1319277 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 500.1304291 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.50 Hz
GB 0
PC 1.00

10 NMR plot parameters
CX 20.00 cm
F1F 11.000 ppm
F1 5501.44 Hz
F2P -1.000 ppm
F2 -500.13 Hz
PPMCM 0.60000 ppm/cm
HZCM 300.07825 Hz/cm

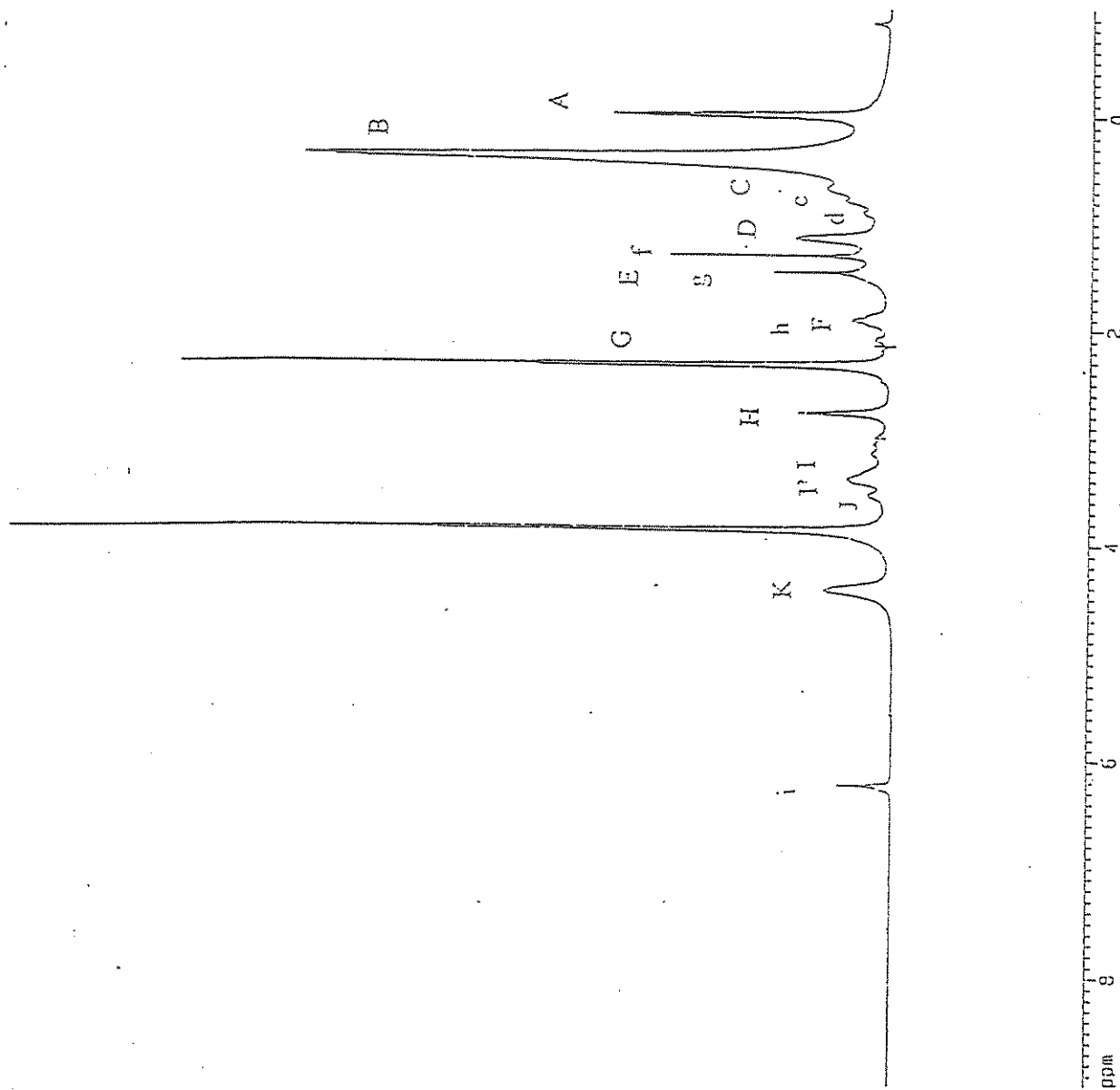


Figura 27: Espectro de ¹H-RMN (500MHz) da PVC-PDC (mistura molar 1:2)

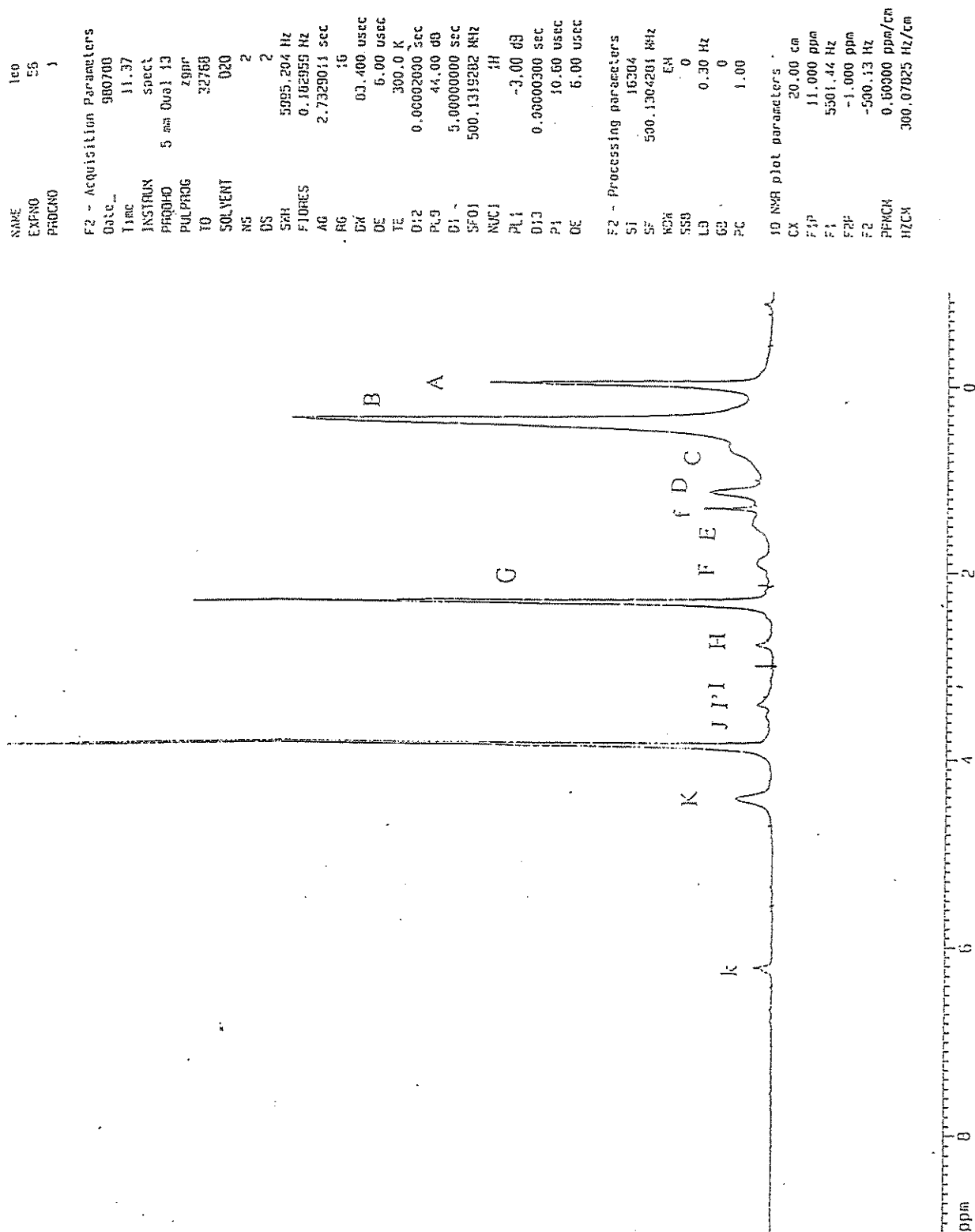


Figura 28: Espectro de ^1H -RMN (500MHz) da BVC:EPC (razão molar 1:3 na membrana) em pH 10,5 a 30°C. O pico do CH_3 -4 da EPC foi ajustado em 0,00 ppm.

Tabela 13: Deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos hidrogênios da EPC (A-K ver Tabela 12) e dos AL (ver Tabela 11) em vesículas unilamelares de EPC. Amostras foram ajustadas em relação ao pico da metila terminal (em 0,00 ppm), 500 MHz, tampão carbonato 0,2M pH 10,5, a 30°C. [EPC]=65mM, razão molar AL:EPC: 1:3 (LDC, MVC e BVC) e 1:6 (EDC) na membrana.

Deslocamento químico (ppm)				Atribuição			
LDC	EDC	MVC	BVC	LDC	EDC	MVC	BVC
0,00	0,00	0,00	0,00	A	A	A	A
0,25	0,20			a	a		
0,38	0,38	0,40	0,40	B	B	B	B
0,69	0,68	0,70	0,70	C	C	C	C
		0,80				c	
		0,91				d	
1,15	1,15	1,15	1,15	D	D	D	D
1,30	1,30	1,30	1,35	b	f	f	f
1,50	1,50	1,50*	1,50	E	E	E (g)	E
1,80				c			
1,90	1,90	1,90*	1,90	F	F	F (h)	F
2,30	2,40	2,40	2,40	G	G	G	G
2,39				d			
2,70	2,80	2,80	2,80	H	H	H	H
3,20	3,20	3,20	3,20	I	I	I	I
3,40	3,42	3,40	3,40	I'	I'	I'	I'
3,50	3,51	3,50	3,50	J	J	J	J
4,40	4,40	4,40	4,40	K	K	K	K
6,20	6,20	6,21	6,19	e	j	i	k

* picos (do AL e da EPC) sobrepostos nos espectros.

Pelos espectros mostrados nas Figuras 25 a 28 podemos verificar que alguns dos picos dos anestésicos não aparecem pois, devido a baixa razão molar e alargamento (discutido adiante) acabam encobertos pelos picos do lipídio. Uma sobreposição parcial acontece, por exemplo, com o pico g da MVC (Figura 26) e pico E da EPC que é mais intenso, porém mais alargado. Pelas figuras podemos ainda verificar que os picos

identificáveis dos anestésicos estão todos alargados (quando comparados com as Figuras 20 a 23) e em sua maioria a constante de acoplamento não pode mais ser medida. Isto se dá pelo fato da molécula de anestésico estar inserida em um ambiente químico diferente (dentro da membrana), com restrição de seu movimento rotacional. Este alargamento constitui boa evidência da interação do AL:EPC e parece afetar todos os picos dos AL, indicando que a molécula inteira está inserida na membrana. Efeito semelhante de alargamento foi relatado para os AL procaina e tetracaina (Finer, 1972; Cerbon, 1972; Kuroda & Fujiwara, 1987) e dibucaina (Kuroda & Fujiwara, 1987). Os picos da EPC no entanto parecem inalterados na presença dos anestésicos.

4.6.4- ALTERAÇÕES NOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS

Pelos espectros de H^1 -RMN apresentados vimos que os picos dos hidrogênios da EPC praticamente não sofreram alteração de posição quando na presença dos AL, a não ser quando a LDC foi inserida ao sistema (pico G e H apresentaram um $\Delta C.S. = 0,10$ ppm, ver Tabelas 12 e 13). Já os hidrogênios dos AL tiveram seus espectros bastante alterados, quer seja pelo alargamento dos picos (comparar Figuras 20 e 25, 21 e 26, 22 e 27 e 23 e 28), quer pela alteração no deslocamento químico de alguns picos (dados da Tabela 11 vs 13) principalmente dos hidrogênios aromáticos. A variação de deslocamentos químicos dos AL pode ser vista na Tabela 14. A comparação dos deslocamentos nos espectros dos anestésicos em água e EPC é possível pelo fato do pico da água estar ajustado em 3,90 ppm para todos os espectros.

Tabela 14: Variação nos deslocamentos químicos dos hidrogênios dos AL, entre o meio aquoso (pH 10,5) e membranas de EPC (65mM).

AL	Pico	em D ₂ O (ppm)	em EPC (ppm)	Δ C.S (ppm)
LDC	a	0,16	0,25	0,09
	b	1,25	1,30	0,05
	c	1,86	1,80	0,06
	d	2,54	2,39	0,15
	e	6,34	6,20	0,14
EDC	a	0,17 ^a	0,20	0,03
	f	1,41 ^a	1,30	0,11
	j	6,43 ^a	6,20	0,23
MVC	a	0,40	0,45	0,05
	b	0,59	0,50 ^b	0,09
	c	0,73	0,80	0,07
	d	0,86	0,91	0,05
	e	1,05	1,10 ^b	0,05
	f	1,30	1,23	0,07
	g	1,34	1,50 ^b	0,16
	h	1,94	1,90 ^b	0,04
	i	6,23	6,21	0,02
BVC	f	1,20	1,35	0,15
	k	6,20	6,19	0,01

^a a pH 5,5; ^bDeterminado pelos experimentos de 2D.

É interessante notar que os hidrogênios do anel aromático (LDC e EDC) e/ou das metilas em substituição orto ao anel aromático na molécula do anestésico (BVC e MVC) sempre detectam mais intensamente variação do ambiente químico adjacente a eles. No entanto alguns outros hidrogênios dessas moléculas apresentam também alteração dos deslocamentos químicos. Esta alteração é atribuída, assim como o alargamento dos picos, à inserção destes anestésicos nas vesículas, e a possíveis modificações conformacionais.

Para a LDC foram observadas alterações no deslocamento químico de todos os hidrogênios da molécula, indicando sua inserção no ambiente químico diferente, dentro da bicamada. As maiores alterações foram observadas para os hidrogênios d e e. No caso do hidrogênio d provavelmente tal variação ocorra devido a uma mudança na conformação da molécula. Visto que o carbono onde encontram-se estes hidrogênios é o que determina a conformação do grupamento amina, é provável que, ao inserir-se no interior da bicamada necessite encontrar, uma conformação mais estável e adequada a

intercalação entre as moléculas lipídicas. Já os hidrogênios do pico e que pertencem ao grupamento aromático da molécula devem estar sofrendo alguma interação com grupamentos dos fosfolipídios (como as carbonilas, fosfato, etc) causando tal alteração.

Para a EDC, foram observados alterações apenas nos hidrogênios identificáveis na membrana, ou seja, a, f e j. As maiores alterações referem-se aos hidrogênios aromáticos (picos f e j) e assim como discutido para a LDC devem-se ao fato desta molécula estar inserida no interior da bicamada lipídica. As alterações são maiores que as observadas para a LDC, mesmo com a menor proporção de AL na membrana.

Para a MVC, temos que as maiores alterações ocorreram nos hidrogênios do grupamento piperidínico, visto que provavelmente este grupamento deva causar um grande impedimento estérico (por ser volumoso) e por não apresentar uma flexibilidade rotacional (como discutido para o próton d da LDC), não podendo desta forma assumir outra conformação, mais estável no interior da bicamada. Com isso a maioria dos hidrogênios deste anel sofreram alterações, enquanto que os ^1H do anel aromático (pico i) pouco se alteraram. Entretanto é importante ressaltar aqui, assim como para a LDC e EDC, a ocorrência de tais alterações constituem evidência concreta da inserção da MVC no interior dos membranas.

Para a BVC, foram observadas alterações apenas nos hidrogênios identificáveis em vesículas, ou seja o pico f e k (hidrogênios aromáticos). O pico f mostrou-se bastante alterado e como essas metilas em orto no anel aromático são volumosas, essa alteração indica um impedimento estérico a intercalação da BVC no interior da bicamada. Provavelmente se os demais picos do anel piperidínico fossem identificáveis, grandes alterações proveriam ser observadas, assim como para a MVC, dada a presença do anel piperidínico.

É interessante notar que para a LDC e EDC, as maiores alterações ocorreram nos hidrogênios do anel aromático, enquanto que para a MVC e BVC as maiores alterações ocorreram nas metilas em orto do anel aromático e no anel piperidínico (MVC). Embora não possamos explicar coerentemente as alterações específicas para cada AL todas devem estar relacionadas a uma diferença no ambiente químico experimentado por estas moléculas, ao passarem de uma conformação no ambiente aquoso, para outra, na membrana.

4.6.5- MEDIDAS DE TEMPO DE RELAXAÇÃO LONGITUDINAL: NO SISTEMA ANESTÉSICO:EPC

Nos estudos de tempos de relaxação longitudinal (T_1) para os sistemas anestésico:lipídio foram empregados duas abordagens: na primeira demonstraremos a alterações nos valores de T_1 dos hidrogênios da EPC, em ausência e presença dos anestésicos em estudo (LDC, EDC, MVC e BVC). Na segunda, demonstraremos alterações nos valores de T_1 dos hidrogênios dos AL em D_2O , contra os valores em membrana.

4.6.5.1- ALTERAÇÕES NOS VALORES DE T_1 DOS HIDROGÊNIOS DA EPC

A partir da atribuição dos hidrogênios da EPC mostrados na Tabela 12, apresentamos os dados de tempo de relaxação longitudinal (T_1) do sistema AL:EPC, na Tabela 15 para a série de anestésicos amino-amidas (LDC, EDC, MVC e BVC), com seus respectivos controles.

Tabela 15: Media dos valores de T_1 observados para os hidrogênios (A-K) do lipídio com e sem anestésicos locais (LDC, EDC, MVC e BVC). Amostras em D_2O , pH 10,5, EPC (65mM), razão molar AL:EPC 1:3 (LDC, MVC e BVC) e 1:6 (EDC), na membrana. 500MHz, a 30 °C.

	EPC	EPC +LDC	EPC	EPC +EDC	EPC	EPC +MVC	EPC	EPC +BVC
	T_1 (ms)		T_1 (ms)		T_1 (ms)		T_1 (ms)	
G	531±02	576±25	519±20	589±45	509±11	551±50	519±20	587±14
H	556±21	594±10	536±14	586±02	537±25	570±24	536±14	577±11
I	620±08	601±05	593±12	636±02	633±22	557±05	593±12	647±43
I'	614±09	599±03	608±01	658±12	656±11	583±08	608±01	639±11
J	608±02	607±03	591±11	661±59	660±33	556±01	591±11	675±36
E	--	---	561±12	547±18	--	---	561±12	575±29
C	575±29	569±30	570±01	546±36	--	---	570±01	583±39
B	687±04	703±04	728±04	702±03	696±05	701±12	728±04	710±02
D	647±11	663±03	664±01	645±06	661±04	650±05	664±01	657±08
K	726±24	752±12	772±06	733±12	811±35	768±14	772±06	741±20
F	--	---	703±12	624±47	--	---	703±12	667±40
A	898±19	926±23	993±11	927±29	931±36	916±05	993±11	962±25

-- Não determinado; --- Não determinado, por problemas de sobreposição de picos.

Nesses gráficos os picos nas abscissas (identificados pelas letras de A a K, Tabela 15) estão arranjados de acordo com a estrutura da molécula da EPC, forma estendida, indo da colina à esquerda até as cadeias acila à direita. Desta forma procuramos evidenciar a (s) região (ões) de maior alteração da bicamada, na presença dos AL em sua forma neutra.

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 T_1 indicando fusão e aumento do tamanho das partículas. Medidas de espalhamento de luz quase-elástico mostraram que as vesículas recém preparadas têm diâmetro pequeno, de cerca de 150 nm. Por isso passamos a preparar as SUV no dia do experimento e sempre em pares: EPC, EPC+AL. Além disso os experimentos foram realizados em duplicata.

Na Figura 29 A, verificamos um aumento nos valores de T_1 do pico G e H (notar que somente a LDC foi capaz de alterar o deslocamento químico do ^1H -RMN da EPC, justamente nos picos G e H) da EPC, indicando provável liberação desses hidrogênios da colina de sua interação com grupamentos fosfatos vizinhos, pela inserção da LDC na membrana. Esse efeito, observado também com os outros anestésicos, sugere um espaçamento maior entre os lipídios pela intercalação dos AL (Skou, 1954) e modificação na conformação das cabeças polares (Seelig, 1978). Ainda pela Figura 29 A pudemos verificar uma diminuição nos valores de T_1 do pico I e I', indicando uma restrição na mobilidade destes hidrogênios, provavelmente pela possível inserção do anel aromático da LDC nesta posição, o que explicaria as alterações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios da LDC quando inseridos em membrana. Não foi observada grande alteração na mobilidade rotacional dos ^1H da cadeia acila embora, de maneira geral os valores de T_1 sejam maiores na presença de LDC.

Na Figura 29 B observamos aumento nos T_1 dos picos G, H, I, I' e J da EPC, isto é, liberação dos hidrogênios da EPC da colina até o glicerol, possivelmente causada por localização um pouco mais profunda da EDC na bicamada (em relação a LDC), justificável pela maior hidrofobicidade da EDC. Ainda na Figura 29 B, observamos uma diminuição do T_1 dos hidrogênios dos carbonos 1 e 2 da cadeia acila (picos E e C), provavelmente causada pela inserção do anel aromático das moléculas de EDC próximo a

tal localização. A diminuição de T_1 estende-se aos demais ^1H da cadeia acila. A cadeia lateral da EDC lhe confere uma maior hidrofobicidade em relação à LDC, justificando sua inserção mais profunda na cadeia acila e não observada para a LDC. Esses efeitos da EDC são mais marcantes se considerarmos que a mesma foi adicionada em concentração menor (razão molar 1:6 AL:EPC na membrana) que dos outros AL, por problemas de solubilidade.

Na **Figura 29 C**, verificamos, como para os dois anestésicos anteriores, uma liberação dos hidrogênios da cabeça polar da EPC (aumento de T_1 dos picos G e H), causada pela MVC. No entanto a MVC causa também grande diminuição nos valores de T_1 dos picos I, I' e J. Esse efeito de restrição é mais evidente que o causado pra a LDC e deve-se certamente à cadeia lateral da MVC, que possui um anel piperidínico com substituinte metila na posição 1 (ver **Figura 1**). Esses substituintes são bastantes volumosos e devem justificar a maior restrição nos hidrogênios da região do glicerol da EPC observada aqui, bem como as alterações nos deslocamentos químicos dos hidrogênios do anel piperidínico da MVC (**Tabela 14**).

Na **Figura 29 D**, observamos que a BVC causa alterações nos hidrogênios do fosfolípido muito semelhante aos efeitos encontrados para a EDC, onde observa-se uma grande aumento nos valores de T_1 dos picos G, H, I, I' e J possivelmente causada por uma localização mais profunda (justificável por sua maior hidrofobicidade) na bicamada, do que a de seu análogo, a MVC. Observamos ainda uma diminuição do T_1 dos hidrogênios da cadeia acila, provavelmente causada pela inserção das moléculas de BVC nessa região. Além disso, a cadeia lateral da BVC confere uma maior hidrofobicidade à molécula (em relação à MVC) levando-a a inserir-se mais profundamente no core hidrofóbico.

Os gráficos mostram que é possível determinar regiões de interação preferencial para cada anestésico. De uma maneira geral os AL aumentam a mobilidade rotacional da cabeça polar dos lipídeos nos valores de T_1 (T_1 das metilas da colina e metilênico amínico, picos G e H). Essa maior liberdade de rotação dos hidrogênios da colina parece indicar uma maior separação (expansão lateral) entre as cabeças polares, devido a inserção dos AL na membrana (Boulanger et al., 1981).

Na presença do anestésico os fosfolípidios devem estar mais separados, aumentando a área de superfície ocupada pela cabeças polares e diminuindo a interação entre os grupamentos amina da colina e fosfato vizinhos (que são responsáveis pela curvatura da cabeça polar, Seelig, 1978), justificando a maior liberdade de rotação dos hidrogênios G e H e o aumento de T_1 . Os gráficos também indicam que uma parte volumosa da molécula da LDC e MVC deve esta localizada na região próxima aos hidrogênios metilênicos vizinhos ao grupamento fosfato, que ficam mais restritos. Já para a EDC e BVC observamos restrição apenas nos hidrogênios da cadeia acila, justificável pela maior hidrofobicidade destes AL e em concordância com resultados de fluorescência e IV (estiramento da carbonila).

De maneira geral as alterações na cadeia acila não foram tão evidentes como nos hidrogênios do glicerol e cabeça polar. Esse resultado é curioso pois há na literatura clássicos relatos da desorganização do core hidrofóbico nas bicamadas causada por AL (ver revisão em de Paula & Schreier, 1996) além de resultados nossos de RPE em vesículas multilamelares (de Paula & Schreier, 1995) e unilamelares (item 4.2). Uma possível explicação advem da não resolução espectral dos picos da cadeia acila levando a determinação de valores médios de T_1 . Por exemplo, os grupos metilênicos da cadeia acila (3-8 e 14-18) são vistos como um único pico (B), talvez escondendo ou compensando possíveis alterações mais localizadas dos AL ao longo da cadeia do ácido graxo. Nesses casos as medidas de RPE e Fluorescência (itens 4.2 e 4.3) são mais esclarecedoras, em relação à cadeia acila.

Gawricsh também considera que a variação nos tempos de correlação rotacional dos ^1H em diferentes regiões da bicamada devem influenciar na relaxação de maneira diferente, (Huster *et al*, 1999) justificando a maior “sensibilidade” das regiões mais organizadas como o glicerol. Esse autor sugere que os espectros de ^1H -RMN e medidas de T_1 e T_2 sejam feitas com uso de Magic-Angle Spinning (MAS) (Holte & Gawrisch, 1997, Huster *et al*, 1999 e comunicação pessoal).

4.6.5.2- ALTERAÇÕES NOS VALORES DE T_1 DOS HIDROGÊNIOS DOS AL

Foram realizadas medidas dos tempos de relaxação longitudinal dos hidrogênios dos AL. A partir da atribuição feita para os hidrogênios dos AL (ver Tabela 11) construiu-se a Tabela 16 com os valores de T_1 dos AL em meio isotrópico (D_2O) e anisotrópico (sistema membranas). Para os anestésicos EDC e BVC as medidas de T_1 em meio isotrópico foram realizadas em pH 5,5, isto deve-se ao fato deste anestésicos apresentarem uma baixa solubilidade em pH 10,5 o que dificulta a aquisição dos espectros e conseqüentemente, dos valores de T_1 .

Tabela 16: Valores de T_1 (em segundos) para os hidrogênios dos AL, em vesículas unilamelares de EPC e em meio isotrópico (amostras em D_2O). LDC e MVC tampão carbonato 0,2M pH 10,5; EDC e BVC, pH 5,5. Nas vesículas de EPC, as condições são idênticas às da Tabela 13.

	LDC		EDC		MVC		BVC	
	D_2O	EPC	D_2O	EPC	D_2O	EPC	D_2O	EPC
a	1,426	0,741	1,095	-	0,515	-	1,155	-
b	1,448	0,898	0,925	-	0,543	-	1,116	-
c	0,817	0,626	0,851	-	0,524	-	0,639	-
d	0,914	0,638	0,648	-	0,535	-	0,530	-
e	2,744	1,164	0,461	-	0,483	-	0,396	-
f			1,191	0,840	0,697	0,561	1,012	0,784
g			0,485	-	1,651	0,925	0,357	-
h			0,475	-	1,357	-	0,346	-
i			0,967	-	2,284	0,911	0,459	-
j			2,060	1,187			0,933	-
k							1,833	1,035

- Não determinado por sobreposição com picos da EPC.

Através dos valores encontrados na Tabela 16, observamos que há uma diminuição nos valores de T_1 pela inserção no meio anisotrópico de membrana, o que constitui uma evidência incontestável da partição desse AL na bicamada lipídica. Além disso, a diminuição nos valores de T_1 é observada para todos os hidrogênios observáveis de todos os anestésicos, mostrando que os AL estão todos imersos na membrana (e não somente parte deles), como também indicava o alargamento dos picos dos hidrogênios dos AL com a inserção na membrana (espectros de 1H -RMN, Figuras 25 a 28).

Além disso, os valores de T_1 dos AL na membrana são em média ligeiramente maiores que os dos hidrogênios da EPC (controle sem AL, **Tabela 15**), refletindo a maior liberdade de rotação dos hidrogênios da molécula do anestésico, que é pequena, em relação ao fosfolipídio.

4.6.6 - EXPERIMENTOS DE 2D-NOE

Foram realizados vários experimentos de NOE bidimensionais para o sistema AL:EPC utilizando a série de anestésicos em estudo: LDC, EDC, MVC e BVC.. Utilizamos a sequência ROESY, ao invés da NOESY (ver métodos - item 3.6.2) e tempo de “mixing” curtos para evitar a difusão de spins. Espectros de ROESY podem ser vistos nas **Figuras 30** (LDC), **31** (EDC), **32** (MVC) e **33** (BVC)

Os picos na diagonal correspondem aos hidrogênios (AL+EPC) cujas atribuições podem ser vistas nas **Figuras 25 a 28** e **Tabela 13**. Os picos fora da diagonal indicam os NOEs. Os resultados desses “cross-peaks”, determinados nas **Figuras 30 a 33**, com tempos de mixing de 50 ms podem ser vistos nas **Tabelas 17** (LDC), **18** (EDC), **19** (MVC) e **20** (BVC).

Current Data Parameters
NAME 1cc
EXPNO 42
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 06/05/01
Time 1:22
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT DMS
NS 24
DS 16
SWH 5252.361 MHz
FIDRES 2.5085656 Hz
AQ 0.1320820 sec
RG 456.1
GB 64.000 kHz
DE 8.00 MHz
TE 300.0 K
TO 2048
LO 1
L1 45
SFO1 500.1325242 MHz
P1 0.0000000 sec
PL1 0.0000000 dB
PL2 0.0000000 dB
PL3 0.0000000 dB
PL4 0.0000000 dB
PL5 0.0000000 dB
PL6 0.0000000 dB
PL7 0.0000000 dB
PL8 0.0000000 dB
PL9 0.0000000 dB
PL10 0.0000000 dB
PL11 0.0000000 dB
PL12 0.0000000 dB
PL13 0.0000000 dB
PL14 0.0000000 dB
PL15 0.0000000 dB
PL16 0.0000000 dB
PL17 0.0000000 dB
PL18 0.0000000 dB
PL19 0.0000000 dB
PL20 0.0000000 dB
PL21 0.0000000 dB
PL22 0.0000000 dB
PL23 0.0000000 dB
PL24 0.0000000 dB
PL25 0.0000000 dB
PL26 0.0000000 dB
PL27 0.0000000 dB
PL28 0.0000000 dB
PL29 0.0000000 dB
PL30 0.0000000 dB
PL31 0.0000000 dB
PL32 0.0000000 dB
PL33 0.0000000 dB
PL34 0.0000000 dB
PL35 0.0000000 dB
PL36 0.0000000 dB
PL37 0.0000000 dB
PL38 0.0000000 dB
PL39 0.0000000 dB
PL40 0.0000000 dB
PL41 0.0000000 dB
PL42 0.0000000 dB
PL43 0.0000000 dB
PL44 0.0000000 dB
PL45 0.0000000 dB
PL46 0.0000000 dB
PL47 0.0000000 dB
PL48 0.0000000 dB
PL49 0.0000000 dB
PL50 0.0000000 dB
PL51 0.0000000 dB
PL52 0.0000000 dB
PL53 0.0000000 dB
PL54 0.0000000 dB
PL55 0.0000000 dB
PL56 0.0000000 dB
PL57 0.0000000 dB
PL58 0.0000000 dB
PL59 0.0000000 dB
PL60 0.0000000 dB
PL61 0.0000000 dB
PL62 0.0000000 dB
PL63 0.0000000 dB
PL64 0.0000000 dB
PL65 0.0000000 dB
PL66 0.0000000 dB
PL67 0.0000000 dB
PL68 0.0000000 dB
PL69 0.0000000 dB
PL70 0.0000000 dB
PL71 0.0000000 dB
PL72 0.0000000 dB
PL73 0.0000000 dB
PL74 0.0000000 dB
PL75 0.0000000 dB
PL76 0.0000000 dB
PL77 0.0000000 dB
PL78 0.0000000 dB
PL79 0.0000000 dB
PL80 0.0000000 dB
PL81 0.0000000 dB
PL82 0.0000000 dB
PL83 0.0000000 dB
PL84 0.0000000 dB
PL85 0.0000000 dB
PL86 0.0000000 dB
PL87 0.0000000 dB
PL88 0.0000000 dB
PL89 0.0000000 dB
PL90 0.0000000 dB
PL91 0.0000000 dB
PL92 0.0000000 dB
PL93 0.0000000 dB
PL94 0.0000000 dB
PL95 0.0000000 dB
PL96 0.0000000 dB
PL97 0.0000000 dB
PL98 0.0000000 dB
PL99 0.0000000 dB
PL100 0.0000000 dB

F1 - Acquisition Parameters

NAME 1cc
EXPNO 42
PROCNO 1
SFO1 500.1325242 MHz
P1 0.0000000 sec
PL1 0.0000000 dB
PL2 0.0000000 dB
PL3 0.0000000 dB
PL4 0.0000000 dB
PL5 0.0000000 dB
PL6 0.0000000 dB
PL7 0.0000000 dB
PL8 0.0000000 dB
PL9 0.0000000 dB
PL10 0.0000000 dB
PL11 0.0000000 dB
PL12 0.0000000 dB
PL13 0.0000000 dB
PL14 0.0000000 dB
PL15 0.0000000 dB
PL16 0.0000000 dB
PL17 0.0000000 dB
PL18 0.0000000 dB
PL19 0.0000000 dB
PL20 0.0000000 dB
PL21 0.0000000 dB
PL22 0.0000000 dB
PL23 0.0000000 dB
PL24 0.0000000 dB
PL25 0.0000000 dB
PL26 0.0000000 dB
PL27 0.0000000 dB
PL28 0.0000000 dB
PL29 0.0000000 dB
PL30 0.0000000 dB
PL31 0.0000000 dB
PL32 0.0000000 dB
PL33 0.0000000 dB
PL34 0.0000000 dB
PL35 0.0000000 dB
PL36 0.0000000 dB
PL37 0.0000000 dB
PL38 0.0000000 dB
PL39 0.0000000 dB
PL40 0.0000000 dB
PL41 0.0000000 dB
PL42 0.0000000 dB
PL43 0.0000000 dB
PL44 0.0000000 dB
PL45 0.0000000 dB
PL46 0.0000000 dB
PL47 0.0000000 dB
PL48 0.0000000 dB
PL49 0.0000000 dB
PL50 0.0000000 dB
PL51 0.0000000 dB
PL52 0.0000000 dB
PL53 0.0000000 dB
PL54 0.0000000 dB
PL55 0.0000000 dB
PL56 0.0000000 dB
PL57 0.0000000 dB
PL58 0.0000000 dB
PL59 0.0000000 dB
PL60 0.0000000 dB
PL61 0.0000000 dB
PL62 0.0000000 dB
PL63 0.0000000 dB
PL64 0.0000000 dB
PL65 0.0000000 dB
PL66 0.0000000 dB
PL67 0.0000000 dB
PL68 0.0000000 dB
PL69 0.0000000 dB
PL70 0.0000000 dB
PL71 0.0000000 dB
PL72 0.0000000 dB
PL73 0.0000000 dB
PL74 0.0000000 dB
PL75 0.0000000 dB
PL76 0.0000000 dB
PL77 0.0000000 dB
PL78 0.0000000 dB
PL79 0.0000000 dB
PL80 0.0000000 dB
PL81 0.0000000 dB
PL82 0.0000000 dB
PL83 0.0000000 dB
PL84 0.0000000 dB
PL85 0.0000000 dB
PL86 0.0000000 dB
PL87 0.0000000 dB
PL88 0.0000000 dB
PL89 0.0000000 dB
PL90 0.0000000 dB
PL91 0.0000000 dB
PL92 0.0000000 dB
PL93 0.0000000 dB
PL94 0.0000000 dB
PL95 0.0000000 dB
PL96 0.0000000 dB
PL97 0.0000000 dB
PL98 0.0000000 dB
PL99 0.0000000 dB
PL100 0.0000000 dB

F2 - Processing Parameters

SI 2048
SF 500.1325242 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0
GB 0
PC 1.00

F1 - Processing Parameters

SI 2048
SF 500.1325242 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0
GB 0
PC 1.00

2D NMR plot parameters

DSZ 15.00 cm
CA1 15.00 cm
F2P0 5.014 cm
F2P1 4.000 cm
F2P2 4.000 cm
F2P3 4.000 cm
F2P4 4.000 cm
F2P5 4.000 cm
F2P6 4.000 cm
F2P7 4.000 cm
F2P8 4.000 cm
F2P9 4.000 cm
F2P10 4.000 cm
F2P11 4.000 cm
F2P12 4.000 cm
F2P13 4.000 cm
F2P14 4.000 cm
F2P15 4.000 cm
F2P16 4.000 cm
F2P17 4.000 cm
F2P18 4.000 cm
F2P19 4.000 cm
F2P20 4.000 cm
F2P21 4.000 cm
F2P22 4.000 cm
F2P23 4.000 cm
F2P24 4.000 cm
F2P25 4.000 cm
F2P26 4.000 cm
F2P27 4.000 cm
F2P28 4.000 cm
F2P29 4.000 cm
F2P30 4.000 cm
F2P31 4.000 cm
F2P32 4.000 cm
F2P33 4.000 cm
F2P34 4.000 cm
F2P35 4.000 cm
F2P36 4.000 cm
F2P37 4.000 cm
F2P38 4.000 cm
F2P39 4.000 cm
F2P40 4.000 cm
F2P41 4.000 cm
F2P42 4.000 cm
F2P43 4.000 cm
F2P44 4.000 cm
F2P45 4.000 cm
F2P46 4.000 cm
F2P47 4.000 cm
F2P48 4.000 cm
F2P49 4.000 cm
F2P50 4.000 cm
F2P51 4.000 cm
F2P52 4.000 cm
F2P53 4.000 cm
F2P54 4.000 cm
F2P55 4.000 cm
F2P56 4.000 cm
F2P57 4.000 cm
F2P58 4.000 cm
F2P59 4.000 cm
F2P60 4.000 cm
F2P61 4.000 cm
F2P62 4.000 cm
F2P63 4.000 cm
F2P64 4.000 cm
F2P65 4.000 cm
F2P66 4.000 cm
F2P67 4.000 cm
F2P68 4.000 cm
F2P69 4.000 cm
F2P70 4.000 cm
F2P71 4.000 cm
F2P72 4.000 cm
F2P73 4.000 cm
F2P74 4.000 cm
F2P75 4.000 cm
F2P76 4.000 cm
F2P77 4.000 cm
F2P78 4.000 cm
F2P79 4.000 cm
F2P80 4.000 cm
F2P81 4.000 cm
F2P82 4.000 cm
F2P83 4.000 cm
F2P84 4.000 cm
F2P85 4.000 cm
F2P86 4.000 cm
F2P87 4.000 cm
F2P88 4.000 cm
F2P89 4.000 cm
F2P90 4.000 cm
F2P91 4.000 cm
F2P92 4.000 cm
F2P93 4.000 cm
F2P94 4.000 cm
F2P95 4.000 cm
F2P96 4.000 cm
F2P97 4.000 cm
F2P98 4.000 cm
F2P99 4.000 cm
F2P100 4.000 cm

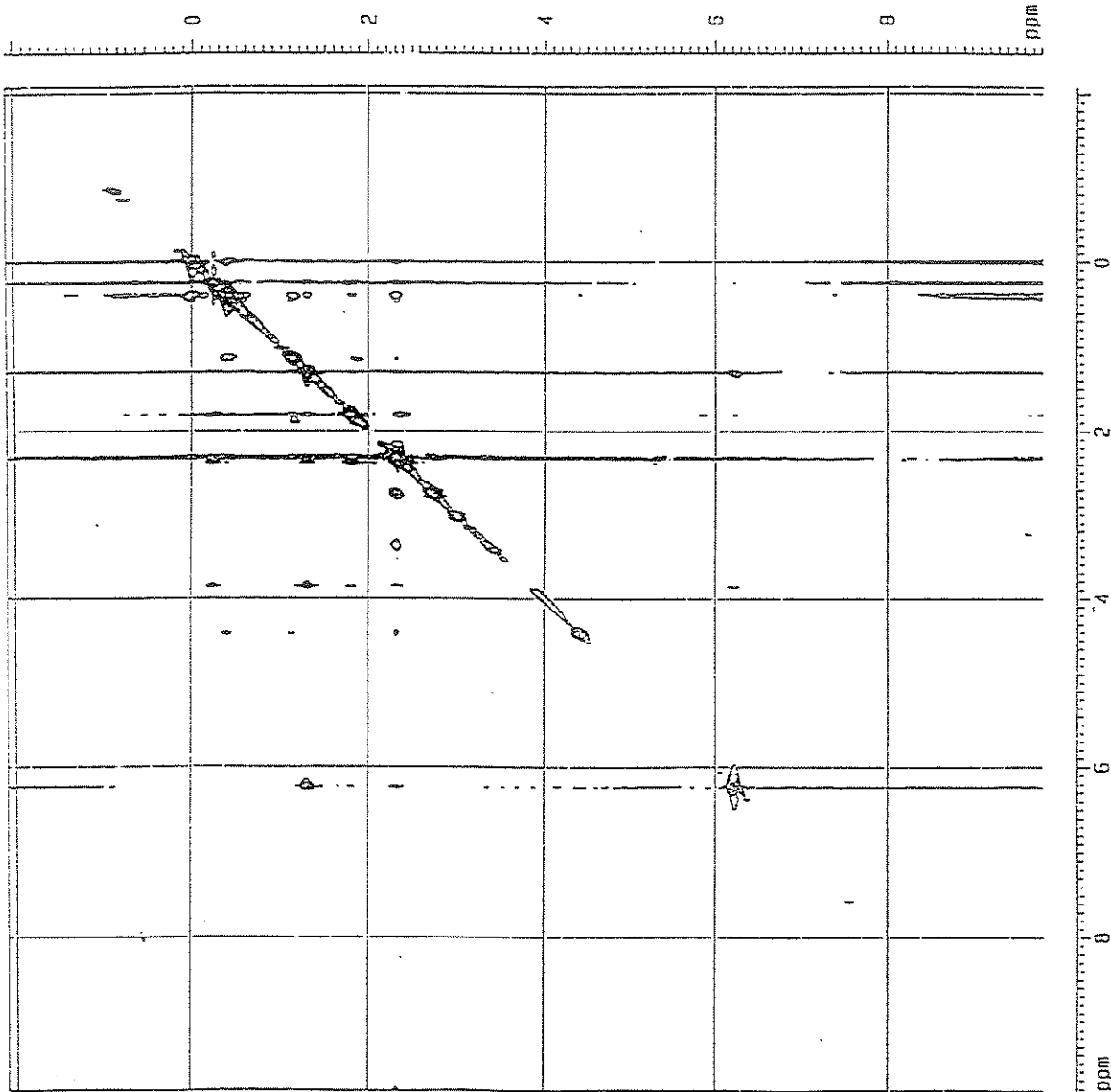


Figura 30: Espectro de 2D-RMN (500MHz) do sistema LDC:EPC (razão molar 1:3 na membrana) cm

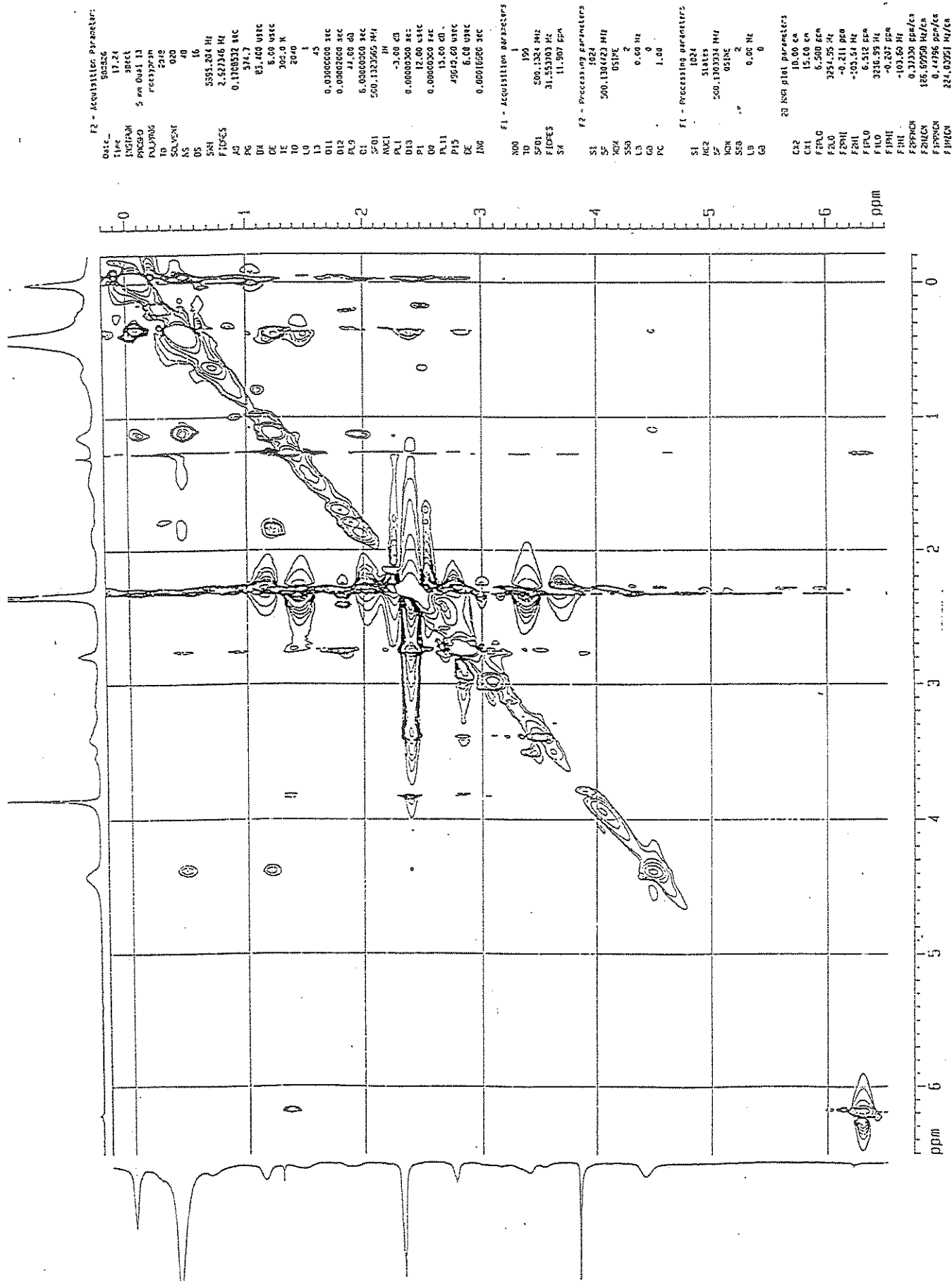


Figura 31: Espectro de 2D-RMN (500MHz) do sistema EDC:EPC (razão molar 1:6 na membrana) em

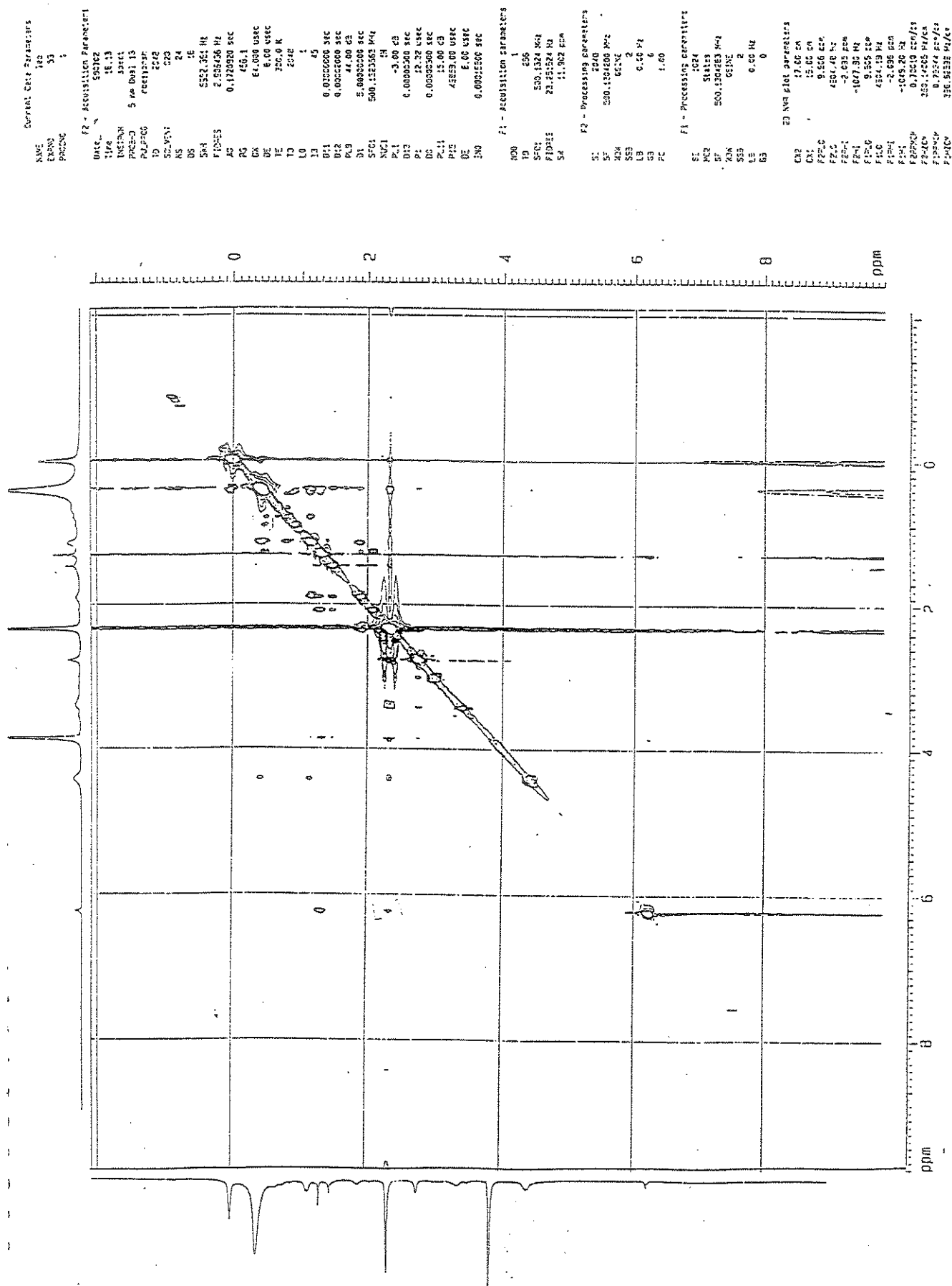


Figura 32: Espectro de 2D-RMN (500MHz) do sistema MVC:EPC (razão molar 1:3 na membrana) em

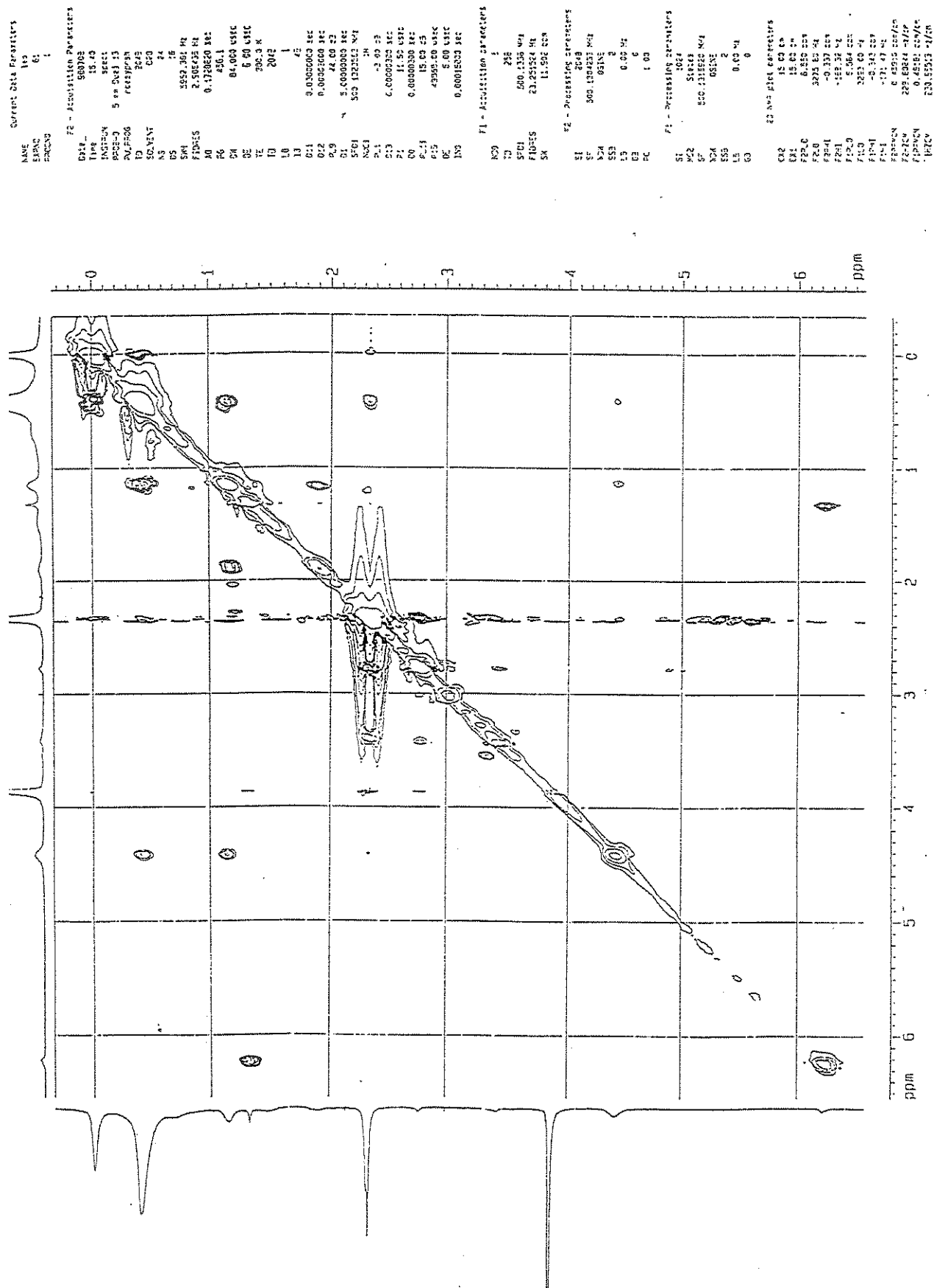


Tabela 17: Atribuição dos hidrogênios do sistema LDC:EPC e “cross-peaks” encontrados da análise do experimento de ROESY com um tempo de mixing de 50 ms, 500MHz, **Figura 30.**

EPC:EPC (intramoleculares)		AL:AL (intramoleculares)	LDC:EPC (intermoleculares)
A-B	G-B	a-água	G-e
B-K	G-A	d-a	G-b
B-D		a-c	B-b*
D-F		e-b	
G-água		e-água	
G-K		c-água	
G-H		d-c	

* De menor intensidade que os outros intermoleculares.

Tabela 18: Atribuição dos hidrogênios do sistema EDC:EPC e “cross-peaks” encontrados da análise do experimento de ROESY com um tempo de mixing de 50 ms, 500MHz, **Figura 31.**

EPC:EPC (intramoleculares)		AL:AL (intramoleculares)	EDC:EPC (intermoleculares)
A-B	F-G	f-j	B-f
A-D	F-H	f-água	
B-J	G-H		
B-D	G-I		
D-J	G-J		
D-F			

Tabela 19: Atribuição dos hidrogênios do sistema MVC:EPC e “cross-peaks” encontrados da análise do experimento de ROESY com um tempo de mixing de 50 ms, 500MHz, **Figura 32.**

EPC:EPC (intramoleculares)		AL:AL (intramoleculares)	MVC:EPC (intermoleculares)
B-A	G-K	d-f	G-i
B-K	G-B	f-i	G-f
B-D	G-I	i-água	
B-C	H-I		
D-K			
D-F			

Tabela 20: Atribuição dos hidrogênios do sistema BVC:EPC e “cross-peaks” encontrados da análise do experimento de ROESY com um tempo de mixing de 50 ms, 500MHz, **Figura 33**.

EPC (intramoleculares)		AL (intramoleculares)	BVC:EPC (intemoleculares)
A-B	G-H	f-k	--
B-D	J-F		
B-K	J-A		
D-K	J-D		
D-F	J-B		
G-B			
G-A			
G-D			
G-I			

Pelos espectros das Figuras 30 a 33 e Tabelas 17 a 20 pudemos verificar a existência de alguns “cross-peaks” entre os anestésicos e os fosfolipídios, mesmo utilizando pequenos tempos de mixing (50 ms). A utilização de tempos de mixing pequenos visa evitar a difusão de spins no sistema. Segundo Kuroda & Kitamura (1984) em tempos inferiores a 200ms não há difusão de spins em qualquer pico da EPC estudado. Ellena (Ellena & Cafiso, 1995) mostram, resultados semelhantes com as curvas de saturação (build-up) de NOE dos diferentes ^1H observáveis da EPC, atingindo o platô acima de 400 ms. Gawrisch (Huster *et al*, 1999) mostra de forma inequívoca que a difusão de spins não predomina nesses sistemas lipídicos, de modo que os valores de NOE encontrados são confiáveis. Foram observadas ainda interações do tipo intramoleculares tanto para fosfolipídios como para as moléculas de anestésico. Se os tempos de mixing são pequenos, controla-se a difusão de spins e prevalecem os cross-peaks de NOE; no entanto se o tempo for muito curto, não se detecta o Efeito Nuclear Overhauser, isto é, há problemas de sensibilidade do método.

Para a LDC, temos que as interações intermoleculares (G-b; G-e) ocorreram entre os hidrogênios aromáticos e a cabeça polar do fosfolipídios, indicando uma localização superficial desta molécula na bicamada. Com menor intensidade observamos interação entre o pico b da LDC e os hidrogênios da cadeia acila dos fosfolipídios (B). Infelizmente o pico B representa vários grupos metilênicos da cadeia acila, não esclarecendo muito sobre a localização da LDC. Esses dados poderiram indicar inserção

do anel aromático da LDC nas posições iniciais da cadeia acila (os ^1H dos carbonos 3 a 8 fazem parte do pico B), enquanto os primeiros indicam uma localização superficial do AL.

Para a EDC, observamos interações entre o pico f do anestésico (CH_3 em orto no anel aromático) e os picos da região da cadeia acila (picos B), o que está de acordo com uma inserção um pouco mais profunda (que a da LDC), justificável pela maior hidrofobicidade da EDC.

Para a MVC registramos, assim como para a LDC, interações (G-f e G-i) entre a cabeça polar do lipídio e os ^1H do anel aromático, resultado compatível com a hidrofobicidade semelhante desses 2 AL.

Para a BVC, não observamos interação, o que pode ser atribuído aos baixos tempos de mixing ou falta de sensibilidade do método, principalmente considerando que esperava-se interações na cadeia acila (ver dados de T_1), onde as informações (exemplo: pico B) são menos específicas.

4.7 – MODELAGEM MOLECULAR

A **Figura 34** mostra as conformações de mínima energia dos quatro anestésicos desprotonados, calculados pelo programa GAMESS (ver métodos item 3.7). Os resultados mostrados são para os AL no vácuo. Tais cálculos foram realizados para obter informações a respeito da dimensão das moléculas (secções transversais e longitudinais). Tais distâncias podem ser observadas na **Tabela 21**, bem como os valores de volume e área de Van der Waals.

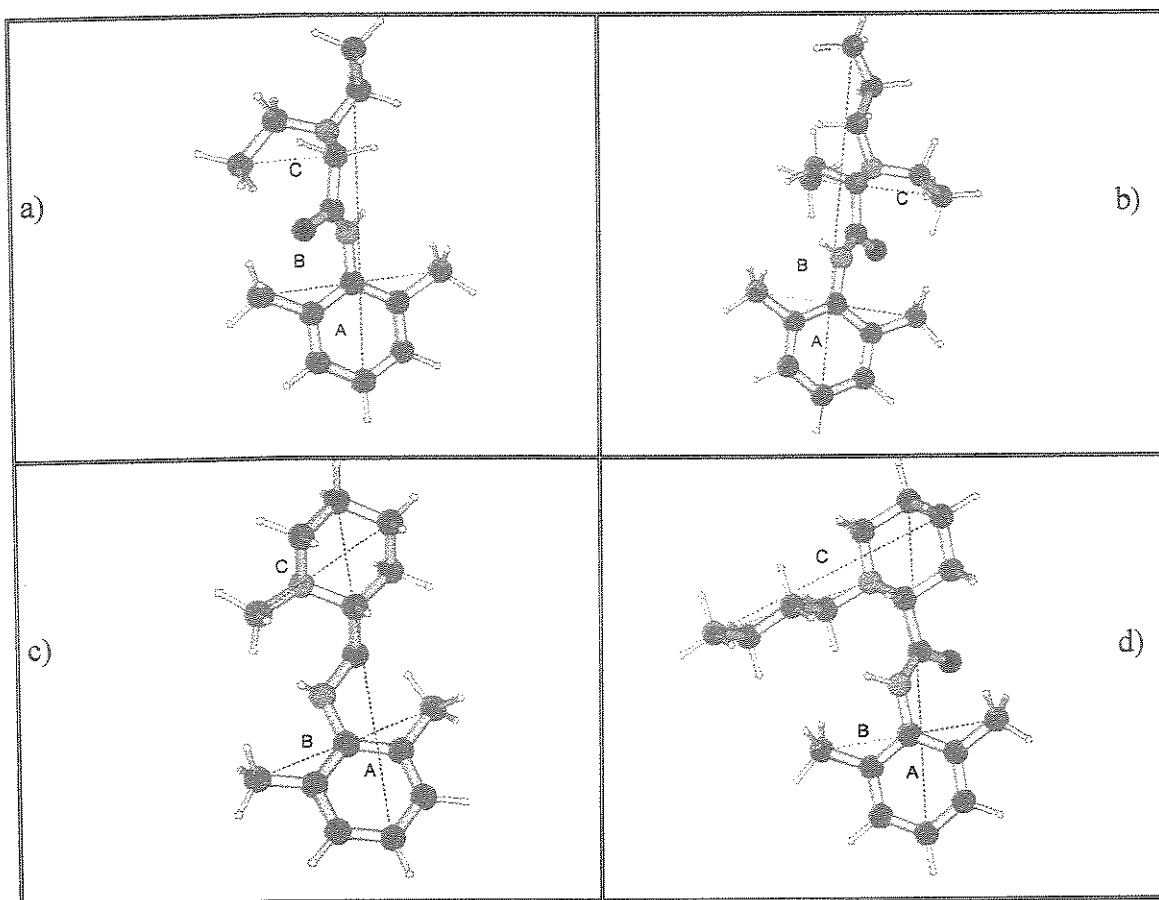


Figura 34: Modelagem Molecular dos AL: a) LDC, b) EDC, c) MVC e d) BVC. Conformação de mínima energia dos AL desprotonados, no vácuo. Cálculos feitos através do programa GAMESS. Seção longitudinal (A) e transversais (B e C).

Tabela 21: Valores de distância (em angstroms) de seções das moléculas de AL, como mostrado na **Figura 34**. Valores para o Volume e Área de Van der Waals.

AL	A	B	C	Volume vdw ($\text{\AA}^3$) ^a	Área total ($\text{\AA}^2$) ^a
LDC	9,42	5,05	3,00	228,5	433
EDC	10,68	5,05	4,55	270,3	483
MVC	8,91	5,05	4,12		396
BVC	9,43	5,05	7,20	280,9	451

^a Valores de literatura (Gupta, 1991).

Tais resultados de modelagem estão bem correlacionados com o trabalho de Neto & Alencastro (1997) e outros (Gupta, 1991) envolvendo modelagem de AL.

A secção longitudinal (A) mostra que a EDC, em sua conformação no vácuo, tem comprimento maior que os demais AL. A secção B mostra que o substituinte metila em orto no anel aromático confere um diâmetro mínimo de 5,05 Angstrons a todos esses AL (apresentando uma forma globular), isto é, uma largura bem superior aos AL do grupo amino-éster como a TTC, cujo diâmetro no anel aromático é de 2,50 Angstrons, conferindo a molécula uma forma cilíndrica (Boulanger et al, 1981; de Paula, 1993).

Já a secção transversal C buscou medir o maior diâmetro da cadeia lateral dos AL e mostra que o anel piperídínico constitui um substituinte volumoso para BVC e MVC em relação aos não cíclicos (LDC) e que causa os efeitos mostrados nos resultados de T_1 , pois os AL com as maiores secções causam as maiores alterações nos valores de T_1 das vesículas unilamelares de EPC (comparar LDC e MVC).

As estruturas químicas dos AL mostradas na **Figura 34** ajudaram-nos a construir o modelo de inserção dos AL aqui estudados (Discussão Geral a seguir).

5 – DISCUSSÃO GERAL

Neste item faremos uma racionalização dos resultados obtidos, chegando a modelos de inserção para cada anestésico nas membranas fosfolipídicas e a um esquema representativo geral, para a interação dos AL - em sua forma neutra - com a proteína canal de sódio.

5.1 – MODELO DE INSERÇÃO PARA OS AL

A partir dos resultados obtidos através das diversas técnicas espectroscópicas utilizadas, construímos tópicos gerais de efeitos causados pelos AL nos fosfolípidios, que são mostrados abaixo, para cada um dos anestésicos.

Observamos que os anestésicos mais hidrofílicos (LDC e MVC) apresentam efeitos em regiões mais superficiais, enquanto que os efeitos encontrados para os mais hidrofóbicos foram em regiões mais profundas da bicamada. É interessante notar a existência de variações nos efeitos entre os dois grupos, ou seja, a MVC causa mais alteração que a LDC na cabeça polar, provavelmente pela presença do anel piperidínico (com maior secção, dados de modelagem) nesta região. Já a EDC causa efeitos maiores que a BVC no interior hidrofóbico do lipídio.

❖ Lidocaína

A LDC insere-se superficialmente nas vesículas unilamelares de EPC e seu anel aromático se posiciona um pouco acima do glicerol e próximo ao grupamento fosfato e a cabeça polar visto que:

- Sua cadeia lateral altera o deslocamento químico dos picos da colina (G e H) da EPC.
- Seus hidrogênios aromáticos sofrem grande deslocamento quando na membrana.
- Sua cadeia lateral libera os hidrogênios da colina (picos G e H) de outras interações, aumentando o T_1 desses.
- Seu anel aromático restringe a mobilidade dos hidrogênios próximos ao grupo fosfato (picos I, I' e J)

- Seu anel aromático apresenta NOE com o a metila da colina (pico G).

A LDC altera:

- ligeiramente, o deslocamento químico do grupamento fosfato.
- a frequência da banda de estiramento do fosfato (IV).
- ligeiramente, a frequência da banda de estiramento da carbonila (IV).

A LDC ainda apresenta o maior efeito desorganizador da cadeia acila, visto que: causa um aumento na mobilidade rotacional dos hidrogênios (resultados de T_1) em todos os picos da cadeia acila; os hidrogênios das metilas do anel aromático têm NOE com o pico B da EPC. Dentro da cadeia acila a LDC causa uma grande alteração nos marcadores mais superficiais, como visto por RPE (5-MeSL) e por fluorescência (4-py).

Um modelo de inserção para a LDC é mostrado na Figura 35 onde mostramos que a LDC, em sua forma neutra, localiza-se - na maior parte do tempo - na região da interface (glicerol) das vesículas de EPC. Cabe ressaltar que a molécula pode ter uma segunda localização, um pouco mais profunda, nas vesículas como indicam alguns resultados de RPE e fluorescência.

❖ Etidocaína

A EDC insere-se mais profundamente em vesículas unilamelares de EPC, em uma região entre o glicerol e os primeiros carbonos da cadeia acila dos fosfolípidios visto que:

- Seus hidrogênios aromáticos sofrem grande deslocamento químico quando em membrana.
- Seu anel aromático restringe a mobilidade dos carbonos α e β da cadeia acila.
- Todos os hidrogênios da colina e glicerol tem seus T_1 aumentados na presença de EDC.
- Altera ligeiramente o deslocamento químico do grupamento fosfato.
- Altera a frequência da banda de estiramento da carbonila (mais que LDC e MVC).

A EDC, assim como a LDC, apresenta um grande efeito desorganizador na cadeia acila, que é evidenciado quando comparamos os 4 anestésicos numa mesma proporção na membrana. A EDC altera os marcadores de RPE e fluorescência 92

posicionados em regiões mais profundas da bicamada e seu anel aromático apresenta NOE com o pico B da cadeia acila. A EDC ainda apresenta o maior efeito supressor de fluorescência (quando comparado aos outros AL), o que indica que o seu grupamento amina (supressor de fluorescência) esteja próximo ao fluoróforo, como mostra o modelo de inserção para a EDC, na Figura 35.

❖ Mepivacaína

A MVC insere-se superficialmente nas vesículas unilamelares de EPC, sendo que seu anel aromático, assim como o da LDC, localiza-se na região um pouco acima do glicerol e próximo ao grupamento fosfato, na cabeça polar. Seu anel piperidínico causa grande perturbação na cabeça polar, visto que:

- O deslocamento químico de seus hidrogênios (no anel piperidínico) sofrem grande alteração quando em membrana.
- a MVC restringe a mobilidade dos hidrogênios vizinhos ao grupamento fosfato, sendo este efeito bem maior que o da LDC, indicando que o anel piperidínico esteja aí alocado.
- Seu anel aromático apresenta NOE com a cabeça polar (pico G) dos lipídios.
- Afeta a frequência da banda de estiramento do fosfato e carbonila.

A MVC é o anestésico de menor efeito desorganizador no interior hidrofóbico da membrana pois não causa aumento na mobilidade rotacional dos hidrogênios da cadeia acila; altera pouco os marcadores, tanto em RPE quanto em fluorescência (em relação aos outros AL), e seu efeito simplesmente reflete o gradiente de mobilidade da bicamada – em que os marcadores superficiais são mais afetados – sem evidenciar região de maior alteração.

A partir dos resultados acima construímos um modelo de inserção para a forma neutra da MVC nas vesículas unilamelares de EPC, mostrado na Figura 35.

❖ **Bupivacaína**

A BVC, junto com a EDC, é o AL de inserção mais profunda no interior da vesículas unilamelares de EPC; seu anel aromático provavelmente está em uma região próxima ao da EDC, visto que:

- Os hidrogênios de seu anel aromático sofrem grande alteração no deslocamento químico, quando na membrana.
- Todos os hidrogênios da colina, glicerol e carbonos α e β tem seus T_1 aumentados na presença de BVC.
- Altera o deslocamento químico do grupamento fosfato, porém não causa variação na largura do pico.
- Altera a frequência da banda da carbonila, mais que a LDC e MVC.

A BVC ainda apresenta efeito desorganizador na cadeia acila, pois restringe a mobilidade da hidrogênios no core hidrofóbico (pico *B*); não apresentou NOE com cabeça polar indicando que estaria mais profunda; em relação aos outros anestésicos altera os marcadores mais profundos (fluorescência) e, assim como a EDC, estaria com sua amina voltada para o interior da cadeia acila devido ao efeito supressor da fluorescência, deixando o grupamento butila inserir-se mais profundamente, em direção ao interior hidrofóbico da bicamada.

A partir dos dados acima, propusemos um modelo de inserção para a BVC no interior de vesículas unilamelares de EPC, mostrado na **Figura 35**.

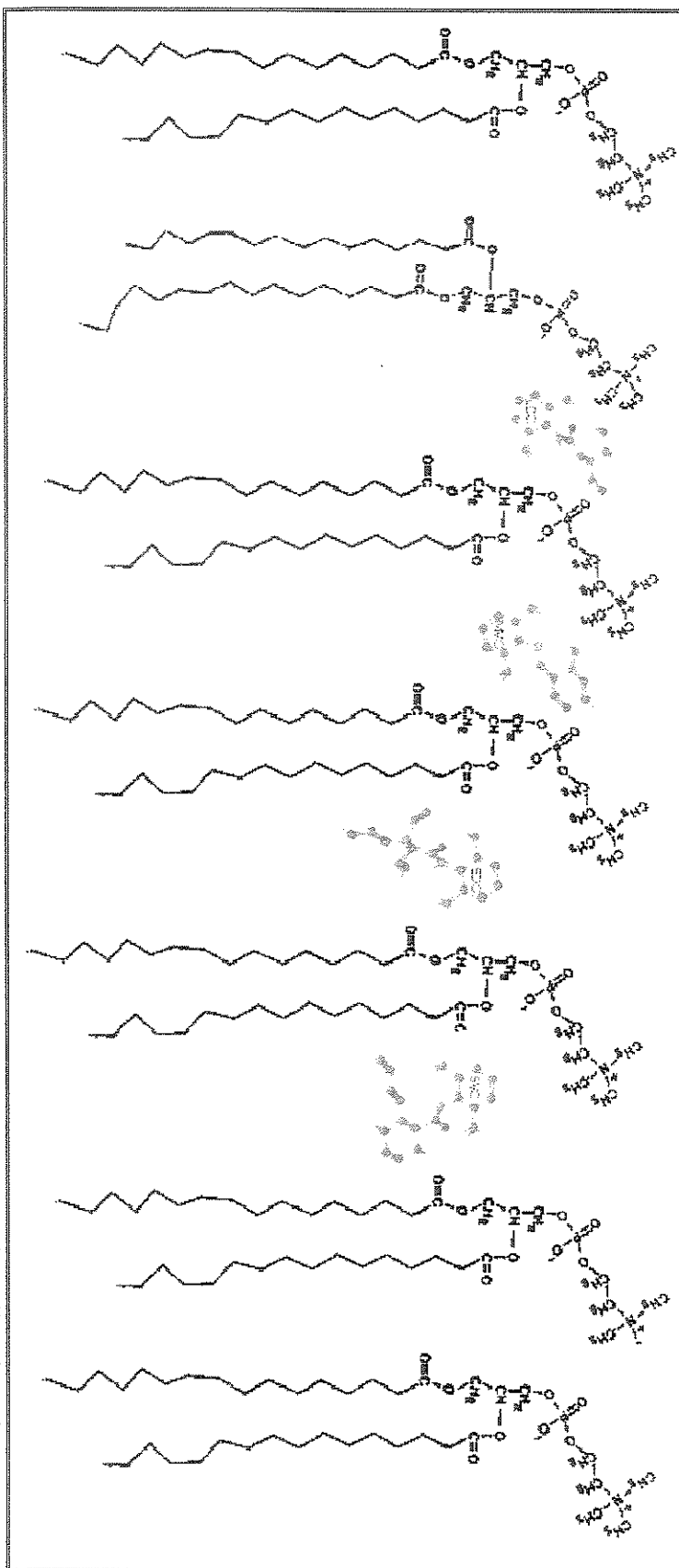


Figura 35: Modelos de inserção dos quatro anestésicos da família das amino-amidas (LDC, EDC, MVC e BVC) em vesículas unilamelares de EPC.

5.2- ESQUEMA REPRESENTATIVO DA AÇÃO DOS AL EM SUA FORMA NEUTRA

A partir da localização dos AL deste estudo pudemos observar que justamente os que apresentam os maiores potências anestésicas são os AL mais hidrofóbicos, que por sua vez inserem-se mais profundamente no interior da bicamada (EDC e BVC).

Os trabalhos de Ragsdale e colaboradores (1994, 1996), evidenciaram um possível sítio de ação de AL no segmento transmembranar S6, no domínio IV do canal de sódio voltagem dependente; que seria formado por dois aminoácidos hidrofóbicos: fenilalanina-1764 e tirosina-1771. Tais aminoácidos seriam importantes no ancoramento do AL, via interações hidrofóbicas, no segmento transmembranar S6. Esses autores mostraram ainda que esse “sítio hidrofóbico” seria adequadamente acessado por AL como a EDC, pelo interior da bicamada.

Nós aqui propomos que os anestésicos atingem este sítio de ação via intercalação na membrana, sendo que os AL mais hidrofóbicos como a EDC e BVC (por inserirem-se mais profundamente na bicamada) o atingiriam mais facilmente que os mais hidrofílicos LDC e MVC (**Figura 36**) causando uma maior inativação do canal e justificando sua maior potência anestésica.

Essa facilitação, na verdade, seria resultante da correta orientação da molécula e de seu maior tempo de residência (considerando a frequência de distribuição da molécula no interior da bicamada) no sítio de ação. Essa hipótese é reforçada ainda se considerarmos a membrana como um reservatório de AL para interação neste sítio de ação.

Em analogia a “modulated receptor hypothesis” (De Jong, 1994), que descreve as diferentes afinidades dos estados conformacionais do canal de sódio aos anestésicos, a distribuição dos AL no interior da bicamada com concentração dos mais hidrofóbicos, orientados e em profundidade compatível com o sítio hidrofóbico proposto pelo grupo de Catterall (Ragsdale et al, 1994, 1996; Ragsdale & Avoli, 1998) pode ser descrita como a lipid-modulated hypothesis. Note-se que nessa abordagem integradora não se descartam as alterações na organização da membrana e/ou conformacionais da proteína, relacionadas ou não a ela.

Evidências experimentais da importância desse “entreposto” ou reservatório vêm da maior atividade anestésica da forma neutra dos AL (que particiona mais na membrana) e de nossos resultados quantitativos, com uma mesma proporção AL:lipídio na membrana onde, por efeito de uma limitação de solubilidade aquosa (de Paula & Schreier, 1995), AL mais hidrofóbicos como a EDC não atingem razões molares altas na membrana e seu efeito desorganizador máximo é menor que o de AL + hidrofílicos (como a LDC); se, porém, compararmos o efeito desses dois AL quando presentes numa mesma razão molar na membrana, vemos que a EDC é tão eficiente quanto a LDC.

A partir destas observações propusemos um esquema representativo de ação para estes AL apresentado na **Figura 36**. Neste esquema quisemos destacar o acesso facilitado dos anestésicos etidocaina e bupivacaina ao sítio hidrofóbico da proteína canal de sódio voltagem-dependente, justificado pela inserção mais profunda desses AL no interior da bicamada lipídica. Esses resultados estão de acordo com valores experimentais de potência anestésica, onde os mais hidrofóbicos são mais potentes que os hidrofílicos (Covino & Vassalo, 1985).

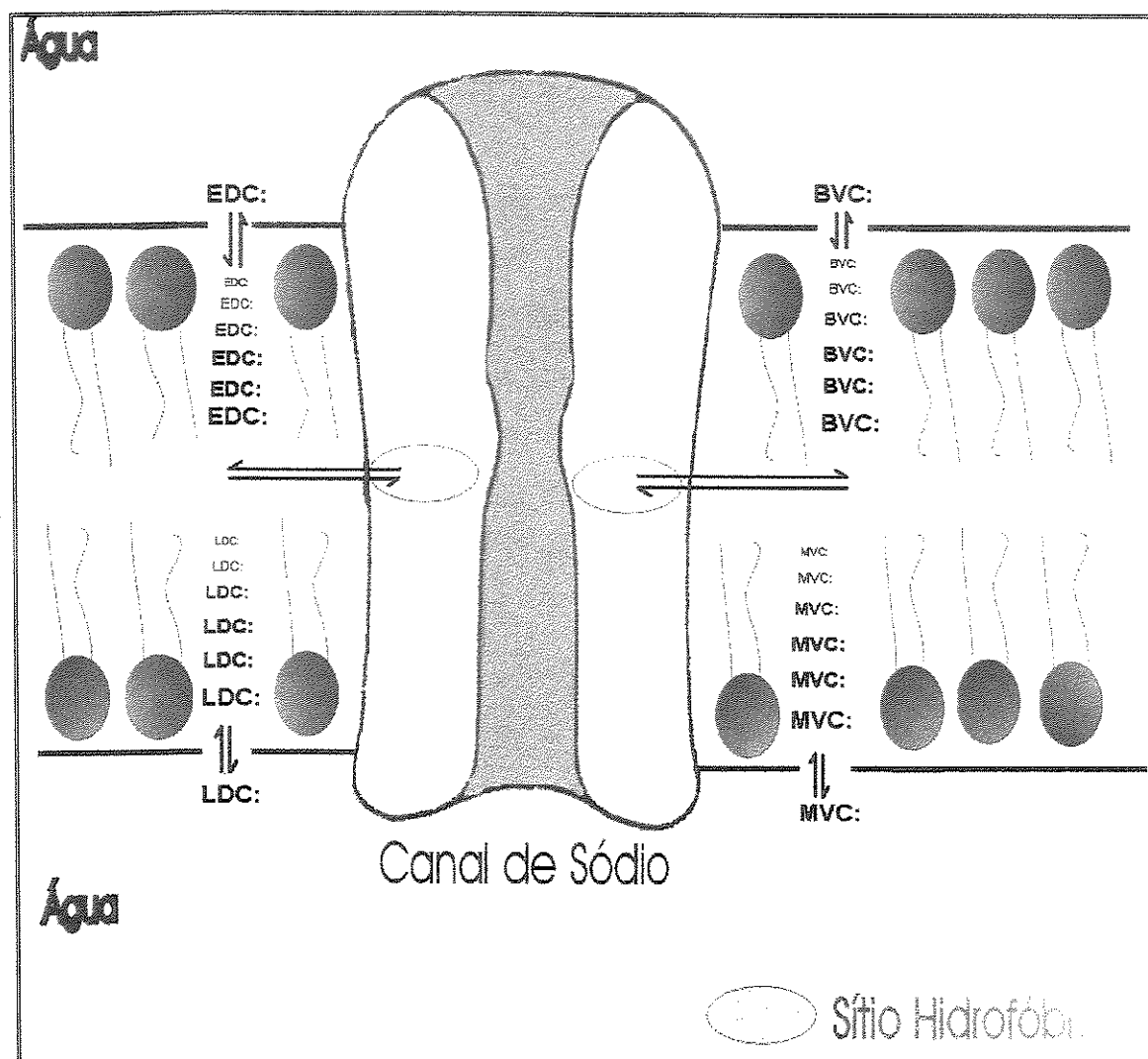


Figura 36: Esquema representativo da ação dos AL estudados neste trabalho sobre a proteína canal de sódio voltagem-dependente. A representação não considera diferenças entre as monocamadas interna e externa da membrana.

6 – CONCLUSÕES

- Os quatro AL aqui estudados interagem com lipossomos unilamelares de fosfatidilcolina de ovo, causando desorganização na bicamada lipídica, sendo esta maior em vesículas unilamelares que em multilamelares, estudadas anteriormente (de Paula, 1993; Pinto, 1998). Os maiores efeitos foram encontrados para os não-cíclicos (LDC e EDC).
- A partir das diversas técnicas utilizadas neste projeto pudemos obter informações sobre a inserção da forma neutra dos AL da família das amino-amidas nessas vesículas. Os resultados aqui apresentados mostram que os anestésicos assumem uma localização no interior da bicamada lipídica de acordo com suas propriedades químicas e estéricas, ou seja, os anestésicos mais hidrofílicos (LDC e MVC) localizam-se mais superficialmente que os hidrofóbicos (EDC e BVC). Um modelo de inserção para os quatro anestésicos estudados em vesículas unilamelares de EPC foi proposto na **Figura 35**.
- A localização da forma neutra dos AL da família das amino-amidas (muito utilizados clinicamente) pode indicar uma possível “via de acesso” do anestésico a sítios hidrofóbicos na proteína canal de Na^+ , isto é, a resíduos fenilalanina-1764 e tirosina-1771 na alfa hélice (S6) intramembranar no subdomínio VI do canal (Ragsdale et al, 1996; Ragsdale & Avoli, 1999). Neste caso a localização dos AL mais hidrofóbicos (EDC e BVC) no interior da bicamada estaria em concordância com seu grande efeito anestésico (**Figura 36**).
- Desta forma, a interpretação do mecanismo de anestesia deixa de ter uma abordagem restrita à importância da interação com o lipídio ou direta, com a proteína canal de Na^+ , passando para uma visão mais global em que os lipídios funcionariam como um entreposto, facilitando o acesso (concentrando e direcionando a molécula) do anestésico ao sítio específico da proteína canal de sódio, causando sua inativação.

7 - BIBLIOGRAFIA

- Abragan, A., (1961) *The principles of Nuclear Magnetism*, Oxford University Press, London.
- Arias, H.R., (1998) Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1376:173-220.
- Auger, M., Smith, I.C.P, Mantsch, H. & Wong, P.T.T. (1990) High-pressure infrared study of phosphatidylserine bilayers and their interactions with the local anesthetic tetracaine. *Biochemistry* 29:2008-2015.
- Auger, M., Jarrel, H.C. & Smith, I.C.P. (1988) Effects of the local anesthetic tetracaine on the structural and dynamic properties of lipids in model membranes: a high-pressure Fourier transform infrared study. *Biochemistry* 27:4660-4667.
- Auger, M., Jarrel, H.C., Smith, I.C.P., Wong, P.T.T., Siminovitch, D.J. & Mantsch, H.H. (1987) Pressure-induced exclusion of a local anesthetic from model and nerve membranes. *Biochemistry* 26:8513- 8516.
- 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.
- Barry, J. A., Gawrisch, K. (1994). Direct NMR evidence for ethanol binding to the lipid-water interface of phospholipid bilayers *Biochemistry* 33: 8082-8088.
- Bax, A., Davis, D.G. (1985). Practical aspects of two dimensional transverse NOE spectroscopy *J. Magn. Reson.* 63: 207-213.
- Bianconi, M.L. & Schreier, S. (1991). RPE study of membrane partitioning, orientation and membrane-modulated alkaline hydrolysis of a spin-labeled benzoic acid ester. *J. Phys. Chem.* 95:2483-2487.
- Blume, A., Hubner, W. & Messner, G. (1988) Fourier transform infrared spectroscopy of $^{13}\text{C=O}$ -labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry* 27: 8239-8249.
- 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.
 - Bradley, D.J. & Richards, C.D. (1984) Temperature-dependence of the action of nerve blocking agents and its relationship to membrane-buffer partition coefficients: thermodynamic implications for the site of action of local anaesthetics. **Br. J. Pharmacol.** **81**:161-167.
 - Browning, J.L., Akutsu, H. (1982) Local anesthetics and divalent cations have the same effect on the headgroups of phosphatidylcholine and phosphatidyl ethanolamine. **Biochim. Biophys. Acta** **684**:172-178.
 - Butterworth, J.F. 4th., Strichartz, G.R. (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: a review **Anesthesiol.** **72**:711-34
 - Catterall, W.A. (1992) Cellular and molecular biology of voltage-gated Na channels, **Physiol. Rev.** **72**: 515-548.
 - Caterrall, W. & Makie, K. (1996) Anestésicos Locais, em **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.
 - Cerbon, J. (1972) NMR evidence for the hydrophobic interaction of local anaesthetics. Possible relation to their potency **Biochim. Biophys. Acta** **290**:51-57.
 - Choe, S.; Kreusck, A.; Pfaffinge, P.J. (1999) Towards the three-dimensional structure of voltage-gated potassium channels, **TIBS** **24**:345:349.
 - Cokley, W.T.; Nwafor, A. & Deeley, J.O.T. (1983) **Biochim. Biophys. Acta** **727**: 303-312.
 - Covino, B.G. & Vassalo, H.G., (1976) **Local Anesthetics: mechanisms of action and clinical use**, Grune and Stratton, New York.
 - Covino, B.G. (1986). Pharmacology of local anaesthetic agents **Br. J. Anesth.** **58**: 701-716.
 - Cullis, P. R. & Verkleij, A. J. (1979) Modulation of membrane structure by Ca^{2+} and dibucaine as detected by ^{31}P -NMR. **Biochim. Biophys. Acta**, **552**: 546-551.
 - Darke, A. ,Finer, E.G., Flook, A.G., Phillips, M.C. (1972) Nuclear magnetic resonance

- study of lecithin-cholesterol interactions. *J. Mol. Biol.* **63**:265-279.
- De Bony, J., Dennis, E.A. (1981) Magnetic nonequivalence of the two fatty acid chains in phospholipids of small unilamellar vesicles and mixed micelles. *Biochemistry* **20**:5256-5260.
 - De Jong, R.H. (1994) *Local Anesthetics*, C.C. Thomas, Springfield, Illinois.
 - de Paula, E. (1993) *Estudos espectroscópicos dos efeitos de anestésicos locais sobre propriedades estruturais e dinâmicas de membranas Lipídicas*, tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.
 - de Paula, E. & Schreier, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficient to compare the effect of local anesthetics on membrane structure *Biochim. Biophys. Acta* **1240**: 25-33.
 - de Paula, E. & Schreier, S. (1996). Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction *Braz. J. Med. Res.* **29**: 877-894.
 - Derome, A.E. (1987). *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon Press, New York.
 - Dewar, J.S.M., Thiel, W.J. (1977) Ground states of molecules. The MNDO method approximations and parameters *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 4899-4907.
 - Dewar, J.S.M., Zoebisch, E.G., Healy, E.F., Stewart, J.J.P. (1985) AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 3902-3909.
 - Dobson, C.M.; Olejniczak, T.T.; Poulsen, F.M. & Ratcliffe, R.G. (1982) Time development of proton nuclear Overhauser effects in proteins. *J. Magn. Reson.* **48**: 97-110.
 - Doyle, A. D.; Cabral, J.M.; Pfuetzner, R.A.; Kuo, A.; Gubbis, J.M.; Cohen, S.L.; Chait, B.T. (1998) The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77.
 - Driscoll, D.A., Samarasinghe, S., Adamy, S., Jonas, J. & Jonas, A. (1991) Pressure effects on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers measured by ²H nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **30**:3322-3327.
 - 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.

- Ernandes, J.R., Chamovich, H. & Schreier, S. (1977) Spin label study of detergents in the region of critical micelle concentration. **Chem. Phys. Lipids** **18**: 304-315.
- Evans, J.N.S. (1995). **Biomolecular NMR Spectroscopy**. Oxford University Press, Oxford.
- Finer, E.G., Flook, A.G. & Hauser, H. (1972) Mechanism of sonication of aqueous egg yolk lecithin dispersion and nature of the resultant particles. **Biochim. Biophys. Acta** **260**: 49-58.
- Finer, E.G. (1972) Nuclear magnetic resonance studies of lipid-water systems **Chem. Phys. Lipids** **8**:327-332.
- 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.
- Gallová, J. & Balgavý, P. (1997) Interaction of local anesthetic heptacaine homologs with phosphatidylcholine bilayers: a ESR study. **Biochim. Biophys. Acta** **1325**: 189-196.
- Gallová, J., Bágelová, J., Cizmarik, J. & Balgavý, P. (1992) Calorimetric study of the interaction of local anesthetics and beta-blockers, [2-(alkyloxy)phenyl]-2-(1-piperidiny)ethyl esters of carbamic acid, with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. **Pharmazie** **47**:873-874.
- Gadian, D. G.; Radda, G.K.; Richards, R.E.; Seeley, P.J. (1979) **Biological Applications of Magnetic Resonance**, Academic Press.
- Gaffney, B. J. & McConnell, H.M. (1974) The paramagnetic resonance spectra of spin labels in phospholipid membranes **J. Magn. Res.** **16**:1-30.
- Gargiulo, R.J., Giotta, G.J. & Wang, H.H. (1973) Spin-labeled analogs of local anesthetics. **J. Med. Chem.** **16**:707-708.
- Garret, R.H. & Grisham, C.M. (1995) **Molecular aspects of cell biology**, Saunders College Publishing, Orlando.
- Gil, V.M.S. & Geraldles, C.F.G.C. (1987) **Ressonância Magnética Nuclear**, Fundação

Galouste Gulbenkian, Lisboa.

- Giotta, G.J., Chan, D.S. & Wang, H.H. (1974) Binding of spin-labeled local anesthetics to phosphatidylcholine and phosphatidylserine liposomes. *Arch. Biochim. Biophys.* **163**:453-458.
- 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.
- Goodman, A.G. & Gilman, A.G. (1996) *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ..
- Gupta, S.P. (1991). Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics *Chem. Rev.* **91**: 1109-1119.
- Guyton, A. C. & Hall, J.E. (1996) *Tratado de Fisiologia Médica*, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ.
- Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100.
- Hauster, D.; Arnold, K. & Gawrisch, K. (1999) Investigation of lipid organization in Biological Membranes by Two-Dimensional Overhauser Enhancement Spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **103**: 243-251.
- Hauser, H. & Dawson, R.M.C. (1968) The displacement of calcium ions from phospholipid monolayers by pharmacologically active and other organic bases. *Biochem. J.* **109**:909-916.
- Hill, M.W. (1974). The effect of anaesthetic-like molecules on the phase transition in smectic mesophases of dipalmitoyllecithin I. The normal alcohol up to C=9 and three inhalation anaesthetics *Biochim. Biophys. Acta* **356**: 117-124.
- Hille, B. (1977) Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* **69**:497-515.
- Hodgkin, A. L. & Katz, B. (1949) *J. Physiol.* **108**: 37-77.
- Hodgkin, A.L. & A. F. Huxley (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.* **117**: 500-544.
- Hondeghem, L.M. & Katzung, B.G. (1977) Time- and voltage-dependent interaction of antiarrhythmic drug with cardiac sodium channels, *Biochim. Biophys. Acta* **472**: 373-

398.

- Holte, L.L., Gawrisch, K. (1997). Determining ethanol distribution in phospholipid multilayers with MAS-NOESY Spectra **Biochemistry** 36: 4669-4674.
- Homans, S.W. (1995). **A Dictionary of Concepts in NMR**, Oxford Science Publications, Oxford.
- 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.
- Hubbel, W.L.; Metcalfe, J.C.; Metcalfe, S.M. & McConnell, H.M. (1970) The interaction of small molecules with spin labelled erythrocyte membranes **Biochim. Biophys. Acta** 219:415-427.
- Hutterer, R., Kramir, K., Schneider, F.W., Hof, M. (1997). The localization of the anesthetic tetracaine in phospholipid vesicles: A fluorescence quenching and resonance energy transfer study **Chem. Phys. Lipids** 90: 11-23.
- Jendresiak, G.L., Smith, R. & Ribeiro, A.A. (1993). Chaotropic anion-phosphatidylcholine membrane interactions: an ultra high field NMR study. **Biochim. Biophys. Acta** 1145:25-32.
- Jones, G.R., Cossins, A.R.; (1990) **Physical Methods of Study**, em Liposomes a practical approach, New, R.R.C. (editor), Oxford University Press, Oxford.
- Jones, O.T. & Lee, A.G. (1985). Interactions 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.
- Kaminoh, Y, Kamaya, H. & Ueda, I.(1989) Differential affinity of charged local anesthetics to solid-gel and liquid-crystalline states of dimyristoyl phosphatidic acid vesicle membranes. **Biochim. Biophys. Acta** 987:63-68.
- Kaminoh, Y., Tashiro, C., Kamaya, H. & Ueda, I. (1988) Depression of phase-transition

- temperature by AL: nonzero solid membrane binding. **Biochim. Biophys. Acta** **946**:215-220.
- Kelusky, E.C. (1983) **Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Interaction of Local Anesthetics with Membranes and Motions in Solid n-Alkanes**, tese de doutorado, University of Ottawa, Ottawa, Canada.
 - 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. & 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.
 - Kuroda, Y.; Ogawa, M.; Nasu, H.; Terashima, M.; Kasahara, M.; Kiyama, Y.; Wakita, M.; Fujiwara, Y.; Fujii, N.; Nakagawa, T. (1996) Locations of Local anesthetic Dibucaine in model membranes and the interaction between Dibucaine and a Na^+ channel inactivation gate peptide as studied by ^2H - and ^1H -NMR Spectroscopies. **Biophys. J.** **71**: 1911-1207.
 - Lakovicz, J.R. (1983) **Principles of fluorescence spectroscopy**. Plenum Press, New York.
 - Lee, A.G. (1978) Effects of charged drugs on the phase transition temperatures of phospholipid bilayers. **Biochim. Biophys. Acta** **514**:95-104.
 - Lee, A.G. (1977) Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids **Biochim. Biophys. Acta** **472**:285-344.
 - Lee, A.G. (1976a) Model of action of local anaesthetics **Nature** **262**: 545-548.
 - Lee, A.G. (1976b). Interactions between anaesthetics and lipid mixtures amines **Biochim. Biophys. Acta** **448**: 34-44.
 - Lee, A.G., Birdsall, J.M. Levine, Y.K. & Metcalfe, J.C. (1972) High resolution proton relaxation studies of lecithins. **Biochim. Biophys. Acta** **255**:43-56.

-
- Lenhinger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. (1993). **Principles of Biochemistry**, cap. 10, 2nd. Ed., New York, NY.
 - Lever, M.J., Miller, K.W., Paton, W.D.M. & Smith, E.B. (1971). Pressure reversal of anaesthesia. **Nature** **231**:368-371.
 - Limbacher, Jr. H.P., Blickenstaff, G.R., Bowen, J.H. & Wang, H.H. (1985) Multi-equilibrium binding of a spin-labeled local anesthetic in phosphatidylcholine bilayers. **Biochim. Biophys. Acta** **812**:268-276.
 - 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.
 - Malheiros, S.V.P., de Paula, E., Meirelles, N.C. (2000) Pathways involved in Trifluoperazine, Dibucaine and Praziquantel induced hemolysis **Biophys. Chem.** **83**:89-100.
 - Malheiros, S.V.P., de Paula, E., Meirelles, N.C., (1998). Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis **Biochim. Biophys. Acta** **1373**: 332-340.
 - Marban, E.; Yamagishi, T.; Tomaselli, F. (1988) Structure and function of voltage-gated sodium channels. **J. Physiol.** **508**: 647-657.
 - Mushayakarara, E.C. & Lewin, I.W. (1982). Determination of acyl chain conformation at the lipid interface region: Raman spectroscopic study of the carbonyl stretching mode region of dipalmitoyl phosphatidylcholine and structurally related molecules. **J. Phys. Chem.** **86**: 2324-2327.
 - Mushayakarara, E.C., Wong, P.T.T. & Mantsch, H.H. (1986) Detection by high pressure infrared spectrometry of hydrogen-bonding between water and triacetyl glycerol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **134**: 140-145.
 - Narahashi, T., Yamada, M. (1969) Cationic forms of local anaesthetics block action potentials from inside the nerve membrane **Nature** **223**:748-749.
 - Neto J.D.M. & Alencastro, R.B, (1997) Theoretical studies on local anesthetics: procaine, lidocaine, tetracaine, bupivacaine and dibucaine- neutral and monoprotinated, **Intl. J. Quant. Chem.** **61** : 959-980.
 - Noda, M.; Ideda, M.; Kayana T.; Suzuki, H.; Takeshima, H.; Kurasaki, M.; Takahashi, H.

- & Numa, S. (1986) Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain, **Nature** **320**: 188-192.
- Noda, M.; Shimizu, S.; Tanabe, T.; Takai, T.; Kayano, T.; Ideda, M.; Takahashi, H.; Nakayama, H.; Kanaoka, Y. & Numa, S. (1986) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence, **Nature** **312**: 121-127.
 - Pavia, D.L.; Lampman, G.M. & Kriz, G.S. (1996) **Introduction to Spectroscopy**, Saunders Golden Sunburst Series, New York.
 - Pinto, L.M.A. (1998) **Interação dos anestésicos locais benzocaína, lidocaína e tetracaína com membranas modelos**, tese de mestrado, UNICAMP, Campinas/SP.
 - Pinto, L.M.A., Fraceto, L., de Paula, E. Schreier, S., Franzoni, L. & Spisni, A. (1999) Specific location of Lidocaine in Phospholipid bilayers: A ^1H -NMR and RPE study (em preparação).
 - Racanský, V., Béderová, E. & Balgavý, P. (1984) **Studia Biophys.** **103**: 231-241.
 - Radda, G. K.; (1986) The use of NMR spectroscopy for the understanding of disease **Science** **233**: 641.
 - Ragsdale, D.S. & Avoli, M. (1998) Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs **Brain Res. Rev.** **26**: 16-28.
 - 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.
 - 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.
 - Rance, M. Jeffrey, K.R., Tullock, A.P., Butler, K.W. & Smith, I.C.P. (1980) Orientational order of unsaturated lipids in the membranes of *Acholeplasma laidlawii* as observed by ^2H -NMR. **Biochim. Biophys. Acta** **600**:245-262.
 - Ritchie, J.M., Ritchie, B.R. & Greengard, P. (1965). The active structure of local anesthetics. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **150**: 152-159.
 - Ritchie, J.M. & Ritchie, B.R. (1968). Local anesthetics: effect of pH on activity. **Science** **162**:1394-1395.
 - Rohl, C.A., Boeckman, F.A., Baker, C., Scheuer, T., Catterall, W.A., Klevit, R.E. (1999)

- Solution structure of the Sodium Channel Inactivation Gate. **Biochemistry** 38: 855-861.
- Rouser, G., Fleicher, S., Yamamoto, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. **Lipids** 5: 494-496.
 - Schopflin, M., Fingeli, U.P., & Perlia, X. (1987). A study on the interaction of local anesthetics with phospholipid model membranes by infrared ATR spectroscopy **J. Am. Chem. Soc.** 109: 2375-2380.
 - 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.
 - Schreier, S.; Amaral, A.T., Stachissini, A.S. & Bianconi, M.L. (1986) Electron spin resonance study of benzoic acid esters, analogs of local anesthetics. Interaction with membranes, aggregation and hydrolysis. **Bull. Magn. Res.** 8:166-171.
 - Scheuer, T. (1999) A Revised view of local anesthetic action: What channel state is really stabilized? **J. Gen. Physiol.** 113:3-6.
 - Seelig, J. (1978). ³¹P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes. **Biochim. Biophys. Acta** 515: 105-140.
 - Seelig, A. (1987) Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. **Biochim. Biophys. Acta** 899:196-204.
 - Seelig, A. & Seelig, J. (1975) Bilayers of dipalmitoyl-3-sn-phosphatidylcholine. conformational differences between the fatty acyl chains **Biochim. Biophys. Acta** 406: 1-5.
 - Seelig, J.; Gally, H. U. (1976) Investigation of phosphatidylethanolamine bilayers by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance **Biochemistry** 15: 5199-5204.
 - Seeman, P. (1966). Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetics and tranquilizers **Biochem. Pharmacol.** 15:1753-1766.
 - Sheetz, M.P. & Chan, S. (1972) Effect of sonication on the structure of lecithin bilayers. **Biochemistry** 11:4573-4581.

- 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.
- 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.
- Skou, J.C. (1954) Local anesthetics. V. The action of local anesthetics on monomolecular layers of stearic acid. **Acta Pharmacol.Toxicol.** **10**:317-324.
- Slater, J.S.; Kelly, M.B.; Larkin, J.D.; Ho, C.; Mazurek, A.; Taddeo, F.J.; Yeager, M.D. & Stubbs, C.D. (1997) Interaction of Alcohols and Anesthetics with Protein Kinase C α . **J. Biol. Chem.** **272**: 6167-6173.
- Smith, I.C.P.; Ekiel, I.; (1984) **Phosphorus-31 NMR: Principles and Applications** (ed.D.G. Gorenstein), Academic Press, New York.
- Strichartz, G.R. & Ritchie, J.M. (1987) **Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology**, (Strichartz, G.R. ed.), vol. 81, cap. 2, Springer-Verlag, Berlin.
- Thomas, J., Morgan, D. & Vine, J. (1976). Metabolism of etidocaine in man **Xenobiotica** **6**: 39-48.
- Trudell, J.R. (1977) A unitary theory of anesthesia based on lateral phase separations in nerve membranes. **Anesthesiol.** **46**:5-10.
- Ueda, I., Tashiro, C. & Arakawa, K. (1977) Depression of phase-transition temperature in a model cell membrane by local anesthetics. *Anesthesiology*. **Anesthesiol.** **46**:327-332.
- Ueda, I., Chiou, J.S., Krishma, P.R. & Kamaya, H. (1994) Local anesthetics destabilize lipid membranes by breaking hydration shell: infrared and calorimetry studies. **Biochim. Biophys. Acta** **1190**:421-429.
- Voet, D., Voet, J. (1995). **Biochemistry**, cap. 18, John Wiley & Sons Inc., New York.
- Wang, H.H., Earnest, J. & Limbacher, H.P. (1983). Local anesthetic membrane Interaction: a multiequilibrium model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **80**:5297-5301.
- 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.

-
- Wagner, G. & Wüthrich, K.J. (1979) Truncated driven nuclear Overhauser effect (TOE). A new technique for studies of selective H-H Overhauser effects in the presence of spin diffusion. **J. Magn. Reson.** **33**: 675-680.
 - Warren, R.C. (1987) **Physics and architecture of cell membranes**, Adam-Hilger, Bristol.
 - 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.
 - Wong, P.T.T. (1984). The phase behavior of aqueous dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayers at very high pressures. **J. Chem. Phys.** **81**: 6367-6370.
 - Wong, P.T.T. & Mantsch, H.H. (1985) Pressure effects on the infrared spectrum of 1,2-dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayers in water. **J. Chem. Phys.** **83**: 3268-3274.
 - Wong, P.T.T. & Mantsch, H.H. (1988). High-pressure infrared spectroscopy evidence of water binding sites 1,2diacylphospholipids. **Chem. Phys. Lipids** **46**: 213-224.
 - Yagle, P.L., (1987) ^{31}P -NMR and the phospholipid headgroups of membranes, in Phosphorus NMR in Biology, Tyler Burt (editor), CRC Press Inc., Florida, USA.
 - Yagle, P.L. & Martin, R.B. (1976). Hydrogen-bonding of the ester carbonyls in phosphatidylcholine bilayers. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **69**: 775-780.
 - Yokono, S., Ogli, K., Miura, S. & Ueda, I. (1989) 400MHz two-dimensional nuclear Overhauser spectroscopy on anesthetic interaction with lipid bilayer **Biochim. Biophys. Acta** **982**: 300-302.

