

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE ANESTÉSICOS LOCAIS E HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA

Carolina Moraes Moraes, Priscila Abrami, Marcos Moisés Gonçalves e Newton Andréo Filho

Universidade de Sorocaba, Cidade Universitária, Rodovia Raposo Tavares, km 92,5, 18023-000 Sorocaba – SP, Brasil

Sérgio Antonio Fernandes e Eneida de Paula

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Leonardo Fernandes Fraceto*

Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Sorocaba, Av. Três de Março, 511, 18087-180 Sorocaba - SP, Brasil

Recebido em 9/1/06; aceito em 27/10/06; publicado na web em 28/5/07

PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF INCLUSION COMPLEXES BETWEEN LOCAL ANESTHETICS AND HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN. S(-) Bupivacaine (S(-)BVC) and Lidocaine (LDC) are widely used local anesthetics (LA). Hydroxypropyl β -cyclodextrin (HP- β -CD) is used as a drug-carrier system. The aim of this work was to characterize inclusion complexes between LA and HP- β -CD. The affinity constants determined at different pHs show favourable complexation. The release kinetics experiments showed that S(-)BVC and LDC changed the released profiles in the presence of HP- β -CD. Nuclear magnetic resonance experiments gave information about the interaction between LA and the cyclodextrin cavity. This study focused on the physicochemical characterization of drug-delivery formulations that come out as potentially new therapeutic options for pain treatment.

Keywords: S(-) Bupivacaine; lidocaine; cyclodextrin.

INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais (AL) são moléculas anfifílicas utilizadas no controle da dor crônica ou aguda e que possuem toxicidade proporcional à potência¹. Evitam ou aliviam a dor por interromperem a condução nervosa através da ligação específica aos canais de Na⁺ voltagem-dependente dos axônios, bloqueando, assim, o movimento de íons sódio para o interior da célula nervosa², impedindo a propagação do estímulo nervoso.

Os anestésicos locais têm efeito direto nos canais de sódio e interagem com diferentes graus de afinidade com esta proteína, dependendo do estado funcional (ativado, inativado, em repouso) da mesma. Até a década de 90, acreditava-se que a forma ionizada dos AL seria a responsável pelo efeito anestésico (ligação direta ao canal de sódio) e que caberia a forma neutra dos AL (mais hidrofóbica) a função de facilitar a penetração dos anestésicos nas membranas^{3,4}. No entanto, trabalhos do grupo de Catterall⁵⁻⁶, usando mutação sítio-específica, demonstraram que anestésicos locais, em sua forma neutra, interagem e modificam a função de canais de sódio.

Em clínica, os anestésicos locais mais amplamente utilizados na terapia da dor aguda e crônica são os do tipo amino-amida⁷, como bupivacaína, BVC e lidocaína, LDC (Figura 1).

A bupivacaína é mais cardiotoxica 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: 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

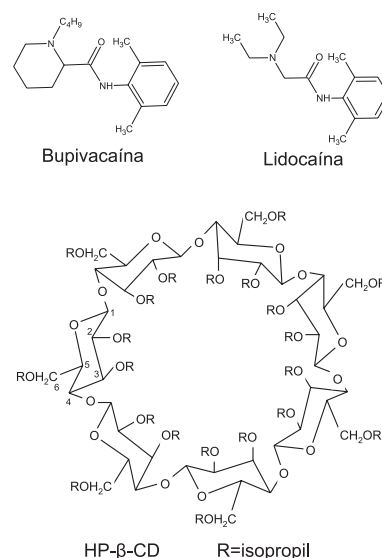


Figura 1. Estruturas químicas dos anestésicos locais (bupivacaína e lidocaína) e representação esquemática da estrutura da HP- β -CD apresentando sete monômeros de glicose

da no final da diástole com bupivacaína⁸. Portanto, o bloqueio com bupivacaína é cumulativo e substancialmente maior do que seria previsível por sua potência anestésica local.

A bupivacaína, por possuir estereocentro, possui dois isômeros R e S. Durante muito tempo se utilizou a mistura racêmica de bupivacaína, porém, testes *in vitro* com animais, injetando-se intravenosamente a forma enantiomérica S(-) da bupivacaína (levobupivacaína) apresenta menor efeito cardiotoxico e menores efeitos tóxicos no sistema nervoso central em comparação com R(+)-bupivacaína e bupivacaína racêmica⁹.

*e-mail: leonardo@sorocaba.unesp.br

Estudos clínicos com o enantiômero levógiro da bupivacaína (S(-)BVC) confirmaram este resultado e mostraram maior segurança clínica em função da menor cardiotoxicidade, além de não apresentarem diferenças na duração do bloqueio sensorial^{10,11}. A potência da levobupivacaína e da mistura racêmica é igual, porém o fato de sua toxicidade ser reduzida torna este isômero um anestésico local com muito mais vantagens para ser utilizado na prática clínica¹¹.

Sabe-se, desde o final do século XIX, que a hidrofobicidade dos anestésicos locais é diretamente proporcional ao tempo de duração de anestesia, bem como à toxicidade¹². Como as características desejáveis para uma molécula anestésica incluem, além de longa duração de ação e da seletividade para o bloqueio sensorial em relação ao bloqueio motor, a diminuição da toxicidade local e/ou sistêmica¹³, uma alternativa, que atualmente tem se mostrado capaz de promover estes efeitos desejáveis, é a liberação modificada desses fármacos, através de formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas^{14,15}.

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de glicose unidas através de ligações α -1,4, originados da degradação do amido pelas enzimas ciclodextrina-glicosiltransferases, sintetizadas por alguns microrganismos^{16,17}.

As três ciclodextrinas naturais são a alfa (α -CD), a beta (β -CD) e a gama (γ -CD), compostas de 6, 7 e 8 unidades de D-(+)-glicopirranose, respectivamente. Na ciclodextrina, grupos hidroxila primários e secundários estão orientados para o exterior do anel formado pelas unidades de glicose, conferindo-lhe um exterior bastante hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica. Tal cavidade permite a formação de complexos de inclusão entre as ciclodextrinas e moléculas que apresentem dimensões compatíveis com esta cavidade interna¹⁸⁻²⁰.

As β -CDs são as ciclodextrinas (Figura 1) mais amplamente utilizadas na complexação de várias classes de fármacos²⁰⁻²². As aplicações farmacêuticas das ciclodextrinas vão desde aumento da solubilidade do fármaco, aumento da biodisponibilidade do fármaco, aumento da estabilidade química do fármaco, modificações no odor e sabor até redução na taxa de hemólise de fármacos^{20,23,24}.

No entanto, a administração parenteral das CDs e, particularmente da β -CD, pode causar nefrotoxicidade devido à formação de um complexo de baixa solubilidade entre β -CD e colesterol, que precipita e impede a filtração glomerular nos rins²⁵. A administração de β -CD também pode causar hemólise de eritrócitos humanos²⁶. Por isso, foram desenvolvidas ciclodextrinas modificadas, de forma a melhorar as propriedades de carreamento e diminuir os efeitos tóxicos intrínsecos da β -CD. Como exemplo destes derivados sintéticos das ciclodextrinas naturais pode-se citar a 2-hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD, Figura 1), o 2,6-dimetil- β -ciclodextrina e o sulfobutiléter de β -ciclodextrina^{19,27}.

Os derivados hidroxialquilados de CD são poderosos solubilizadores de fármacos e não formam, nos rins, os precipitados de complexos cristalinos observados quando a β -CD é utilizada²⁸.

Na literatura existem relatos da caracterização dos AL (lidocaína e bupivacaína) em β -CD²⁹ e são apresentados dados de modelagem molecular e caracterização dos complexos por DSC. Os resultados deste trabalho mostraram que a complexação destes anestésicos é 1:1 AL: β -CD e a análise dos termogramas mostra o desaparecimento do pico endotérmico do AL quando inserido na cavidade interna das ciclodextrinas. Em outro trabalho que apresenta a caracterização físico-química de benzocaína com β -CD utilizando medidas de calorimetria, DSC, microscopia eletrônica de varredura, ressonância magnética nuclear e modelagem molecular³⁰ observou-se a complexação de 1:1 para BZC: β -CD com a inserção do anel aromático do anestésico no interior da cavidade da ciclodextrina.

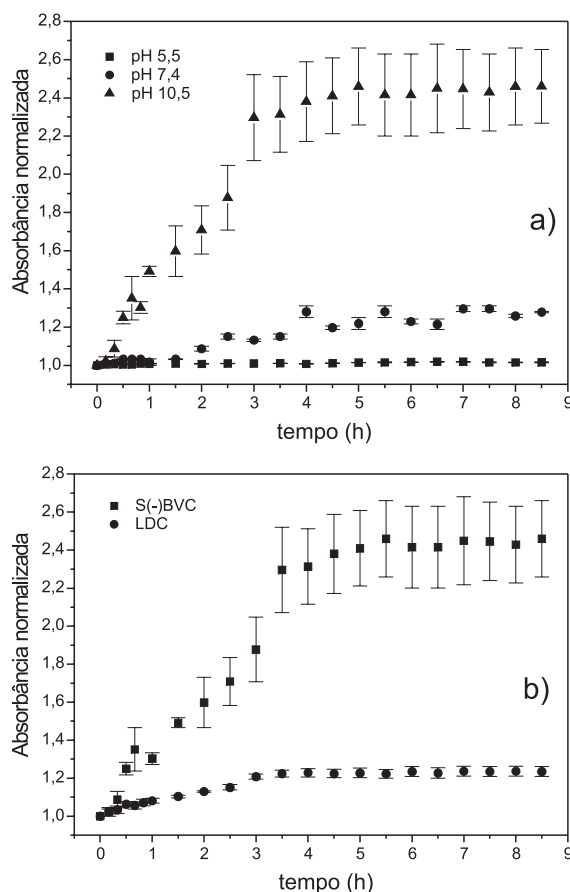


Figura 2. Curva de cinética de complexação da: a) S(-) BVC 1 mM em presença de HP- β -CD, em diferentes pHs; b) LDC (1 mM) em presença de HP- β -CD e para S(-) BVC (1 mM) em presença de HP- β -CD, em pH 10,5. Ambos experimentos à razão molar 1:1 e temperatura ambiente ($n=3$)

Neste trabalho, foram preparados complexos de inclusão entre os anestésicos locais S(-) BVC e LDC em HP- β -CD (diferentemente dos outros trabalhos da literatura que utilizaram β -CD); foi realizada uma análise mais detalhada da complexação, através de medidas de constante de afinidade (em função de pH), ensaios de liberação *in vitro* e caracterização dos complexos por ressonância magnética nuclear. Desta forma, este trabalho apresenta uma caracterização físico-química dos complexos AL-HP β -CD, fato este importante para estudos futuros *in vitro* e *in vivo*, a fim de ser uma potencial alternativa para a anestesia local.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e métodos

Os cloridratos de S(-) bupivacaína e lidocaína foram obtidos por doação da empresa Cristália Indústria Química e Farmacêutica Ltda. A HP- β -CD foi obtida por doação da multinacional francesa Roquette. Todos os demais reagentes, como sais para preparo dos tampões (fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, ácido acético, acetato de sódio, carbonato de sódio, carbonato de cálcio) apresentavam grau espectroscópico ou analítico.

Cinética de complexação

Para avaliação da cinética de formação dos complexos, quantidades apropriadas de AL e HP- β -CD (razão molar 1:1) foram mis-

turadas em água (pH 5,5), tampão fosfato pH 7,4 ou tampão carbonato pH 10,5, sob agitação e em temperatura ambiente. Posteriormente, alíquotas foram retiradas - durante 12 h de experimentação - e analisadas por espectrofotometria UV (Femto), no comprimento de onda de absorção máxima (260 nm) dos AL em estudo, caminho ótico 1 cm, sendo as análises realizadas em triplicata³¹. As curvas cinéticas foram analisadas através das regressões lineares das curvas (absorbância vs tempo; ln absorbância vs tempo; 1/absorbância vs tempo) utilizando o software Microcal Origin®. A partir do melhor ajuste para cada curva cinética foi determinada a ordem e o valor da constante cinética de complexação³².

Preparo do complexo de inclusão AL:HP-β-CD

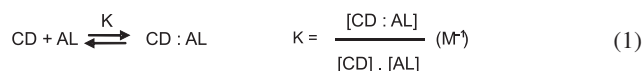
Os complexos foram preparados de acordo com o procedimento descrito por Pinto³³. Complexos foram preparados misturando-se HP-β-CD e AL em água e agitados por 24 h até atingir o equilíbrio.

Isotermas de solubilidade

Os estudos de solubilidade foram realizados de acordo com o método descrito por Higuchi e Connors³⁴. O ensaio consistiu na adição, a um excesso de AL em solução tampão, de quantidades crescentes de HP-β-CD (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 mM), em diferentes valores de pH. As concentrações de S(-) BVC e LDC usadas foram, respectivamente: 3 e 5 mM em tampão carbonato 50 mM, pH 10,5 e 15 mM para S(-) BVC em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4.

As soluções foram agitadas e, após um período de 24 h, centrifugadas por 15 min à 280 g, para retirada do excesso de AL, não solubilizado. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas e filtradas em membranas de 0,22 µm, medindo-se a absorbância (λ=260 nm) correspondente à concentração de anestésico solubilizado. Foram utilizadas para análise quantitativa dos fármacos curvas de calibração cujas para LDC (pH 10,5; y=3,667x + 0,0555; r=0,9999) e S(-) BVC (pH 5,5; y=0,430x + 0,00419; r=0,9999; pH 7,4; y=0,434x + 0,00076; r=0,9999; pH 10,5; y=0,930x + 0,00313; r=0,9995). Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de AL, utilizando-se as constantes de absorvidade molar obtidas para cada uma das curvas de calibração descritas acima. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Em solução, o sistema AL:ciclodextrina (na proporção estequiométrica de 1:1) atinge o estado de equilíbrio, descrito pela equação da constante de estabilidade, associação ou formação do complexo (K) (Equação 1)^{23,35}.



A isoterma de solubilidade (concentração de AL solubilizado vs concentração de HP-β-CD) para a complexação de anestésicos locais em ciclodextrinas apresenta um comportamento linear onde o intercepto no eixo y é representado pela solubilidade do AL no meio e a inclinação da reta é dada pela Equação 2, descrita por Higuchi e Connors³⁴

$$\text{Inclinação} = \frac{K \cdot S_0}{1 + K S_0} \quad (2)$$

Rearranjando-se a Equação 2 obtém-se o cálculo da constante a partir da Equação 3

$$K = \frac{\text{inclinação}}{S_0(1 - \text{inclinação})} \quad (3)$$

onde S_0 é a concentração para saturação do anestésico local em solução.

A quantificação dos anestésicos locais foi realizada utilizando-se as curvas analíticas descritas acima para LDC e S(-) BVC.

Testes de liberação *in vitro*

Nos testes de liberação foram utilizados sistemas de dois compartimentos, separados por membranas de celulose (Spectrapore) de poro para exclusão molecular de 1000 Da, que permitiram observar a liberação dos AL livres e complexados, desde o compartimento doador (1 mL) até o compartimento aceptor (80 mL), contendo tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 sob agitação leve³⁶. Amostras do compartimento aceptor foram coletadas, durante 5 h, e a concentração de AL foi determinada por espectrofotometria UV (λ=260nm). A liberação modificada foi observada através de gráficos de %AL liberado em função do tempo. Os experimentos foram realizados em triplicata. A quantificação da porcentagem de AL liberada foi realizada utilizando-se as curvas de calibração descritas. Análise estatística permitiu a comparação da área sobre a curva para os grupos fármaco livre e complexado; o teste t não pareado (com correção de Welch). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando os softwares, Graph Pad InStat e Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., versão 3.0, 1997-1998).

Caracterização dos complexos por ressonância magnética nuclear

Os experimentos de RMN de ¹H foram realizados a 25 °C em D₂O em espectrômetro Varian Inova-500 (B₀ = 11,7 T), operando a 499,885 MHz para ¹H (número de pontos 64 k, ângulo do pulso de excitação 30° e duração de 2,2 µs, janela espectral de 6 kHz, tempo de aquisição 3,3 s e delay de relaxação de 10 ms) em sonda de 5 mm com detecção inversa. As amostras de anestésicos (LDC e S(-) BVC) foram realizadas em pH 7,4 (tampão fosfato, 20 mM) e pH 10 (tampão carbonato, 20 mM) em D₂O, em tubos de 5 mm. Os experimentos de ROESY 1D foram obtidos com uma sequência de pulsos padrão (pulso de 180° seletivo e pulso de 90° não seletivo), e um tempo de mistura de 500 ms durante a trava de spin. Foram utilizados pulsos seletivos gerados automaticamente, de forma a atenuar a potência e a duração do pulso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinética de complexação

Inicialmente determinou-se a cinética de complexação da S(-)BVC com a HP-β-CD através da medida da absorbância do AL em solução em função do tempo, na proporção molar de 1:1 (BVC:ciclodextrina). Este ensaio foi realizado em três valores de pH (água = 5,5, tampão fosfato = 7,4 e tampão carbonato = 10,5).

A Figura 2a apresenta as curvas obtidas durante um período de 8 h, nos três pH analisados. Para fins de comparação foi feita a normalização nos valores de absorbância da S(-) BVC (considerando-se absorbância normalizada = Absorbância no tempo t / Absorbância no tempo zero), para cada intervalo de leitura.

Para todas as curvas apresentadas observa-se um aumento significativo no valor de absorção medido nas primeiras 4 h de ensaio, após as quais o sistema tende ao equilíbrio.

Muitos fármacos, após inclusão em ciclodextrinas, sofrem mudanças em suas propriedades físico-químicas, que podem se refletir no espectro de absorção UV/Visível, causando modificações nos comprimentos de onda ou aumento/diminuição do pico de absorção

máxima²⁶. Estas modificações são, muitas vezes, similares ao efeito causado por solventes de diferentes polaridades, sugerindo que a molécula complexada foi transferida de um meio polar para a cavidade apolar das ciclodextrinas²⁶. Essas mudanças podem ser causadas por perturbação da nuvem eletrônica da molécula complexada - causada pela interação direta com as CD, pela exclusão de moléculas de água da cavidade ou por uma combinação desses dois efeitos. Para os complexos aqui estudados não foram observadas modificações no comprimento de onda e sim, na intensidade de máxima absorção do espectro (dados não mostrados).

Os resultados apresentados na Figura 2a mostram ainda que existe grande influência do pH na quantidade de S(-)BVC em solução, indicando que a complexação está diretamente relacionada ao estado de ionização da S(-) BVC, cujo pKa é 8,1¹³, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da S(-) BVC e LDC.

Propriedade	S(-) BVC	LDC
Solubilidade - ionizado (pH 5,5) M	0,07	2,30
Solubilidade - neutro (pH 10,5) mM	0,58	13,1
pKa	8,1	7,8
Partição - ionizado (pH 5,5)	96 ± 6	32 ± 5
Partição - neutro (pH 10,5)	798 ± 147	144 ± 54

A mesma abordagem experimental seria realizada para estudo da cinética de complexação da lidocaína (pKa 7,8, Tabela 1), no entanto, devido à grande solubilidade aquosa deste AL (1,4 M em pH 7,4) não foi possível a realização destes ensaios nestes pH.

A cinética de complexação foi determinada apenas para a forma neutra da LDC, em pH 10,5 e os resultados estão apresentados na Figura 2b, em comparação com a cinética de complexação da S(-)BVC, no mesmo pH. Os resultados indicam que as variações na absorbância da forma neutra da LDC são menores que as observadas para a S(-) BVC neutra, refletindo diferenças nas propriedades físico-químicas destes anestésicos, como maior solubilidade da LDC (Tabela 1) em comparação com a da S(-) BVC^{31,37} que, por consequência, diminuiria a tendência à complexação da LDC com a cavidade hidrofóbica da HP-β-CD. Não foi observada alteração no tempo necessário para equilíbrio (aproximadamente 4 h) entre os dois AL.

A partir das curvas cinéticas (Figura 2a e b) foi realizada a análise matemática, onde o melhor ajuste dos dados foi encontrado para o gráfico de ln absorbância vs tempo ($r > 0,9$), indicando uma cinética de complexação de primeira ordem ($n=1$)⁸. O valor da constante cinética (k) para cada uma das curvas, determinada a partir da inclinação das curvas para o complexo S(-) BVC:HP-β-CD apresentaram para os pH 5,5; 7,4 e 10,5 o valor de $1,17 \times 10^{-3} \pm 1,20 \times 10^{-4}$; $3,24 \times 10^{-2} \pm 2,69 \times 10^{-3}$; $2,11 \times 10^{-1} \pm 1,56 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Para o complexo LDC:HP-β-CD o valor de k determinado foi $5,39 \times 10^{-2} \pm 2,50 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$.

A análise dos valores das constantes cinéticas indica que, assim como observado pelas curvas cinéticas (e dados de constante de afinidade apresentados abaixo), a interação da forma neutra da S(-) BVC com a cavidade interna da ciclodextrina é mais intensa quando comparada com outras formas da S(-) BVC (pH 5,5 e 7,4) e também com a forma neutra da LDC, isto provavelmente devido a maior hidrofobicidade da forma neutra deste anestésico local quando comparado com a forma ionizada e com a lidocaína neutra (Tabela 1).

Isotermas de solubilidade

Como citado anteriormente, a formação de complexos de inclusão com CD pode alterar as propriedades físico-químicas da molécula complexada, levando ao aumento da solubilidade, o que

– em geral – é bastante interessante do ponto de vista farmacêutico por acelerar ou retardar a absorção e estabilizar ou desestabilizar o fármaco em solução. Além disso, existe uma correlação direta entre o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água e a estabilidade do complexo formado com ciclodextrinas³⁴.

Dentre os métodos usados para determinar a constante de estabilidade (K) dos complexos estão as isotermas de solubilidade, em que se mede alterações na solubilidade aquosa da molécula “convidada”, em sistemas compostos por CD e água³⁴.

A Figura 3 mostra a isoterma de solubilidade da S(-) BVC em presença de HP-β-CD, em pH 7,4 e 10,5. Os diagramas de fases da S(-) BVC em presença de HP-β-CD apresentam um aumento linear na solubilidade do anestésico em função das concentrações crescentes de ciclodextrina, sugerindo que os complexos formados são de primeira ordem (considerando-se uma estequiometria de complexação = 1:1)³⁸. Em ambos pH houve um aumento de solubilidade para a molécula de S(-) BVC em presença de HP-β-CD, sendo que em pH 10,5 o aumento na solubilidade do anestésico foi de aproximadamente 4,5 vezes e em pH 7,4 o aumento foi de 1,5 vezes. A maior solubilização em pH 10,5 deve-se à maior complexação da forma neutra da BVC. Muitos trabalhos relatam resultados semelhantes do efeito da ionização dos fármacos em sua afinidade por CD³⁴. A partir do método descrito por Higuchi e Connors³⁴ e utilizando os valores obtidos das regressões lineares da Equação 1 das isotermas de solubilidade, calculou-se a constante de estabilidade aparente (K) dos complexos de S(-) BVC e HP-β-CD em pH 7,4 e 10,5; os valores obtidos foram $13,1 \pm 2,8 \text{ M}^{-1}$ e $95,4 \pm 11,8 \text{ M}^{-1}$, respectivamente.

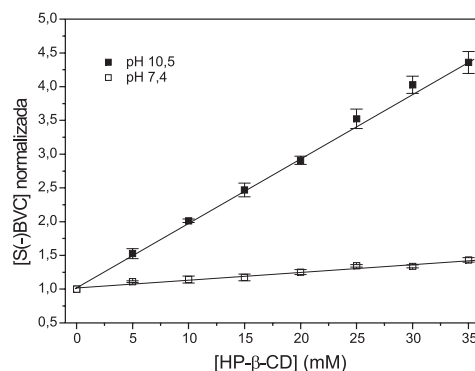


Figura 3. Diagrama de solubilidade de fases para S(-) BVC em HP-β-CD, pH 7,4 e 10,5, à temperatura ambiente ($n=3$)

A representação dos possíveis complexos formados entre S(-) BVC e HP-β-CD, em ambos pHs, é dada na Figura 4. Em pH 7,4 observam-se complexos envolvendo tanto a forma neutra quanto a protonada, cuja proporção em pH 7,4 foi calculada considerando-se o pKa da S(-) BVC, de acordo com a Equação de Henderson-Hasselbalch (Figura 4a).

A solubilidade de fármacos básicos, como a S(-)BVC, decresce com o aumento do pH. Em meio francamente alcalino a forma não ionizada do fármaco é predominante e a energia de dessolvatação da mesma, para formação do complexo, é significativamente menor que a da forma protonada. Por isso a S(-) BVC possui maior afinidade pela cavidade interna (hidrofóbica) das ciclodextrinas, quando em pH 10,5, favorecendo assim a formação do complexo (maior K, Figura 4b).

Medidas da isoterma de solubilidade foram realizadas com o anestésico LDC, somente em pH 10,5, i.e., para o AL na forma neutra. Para efeitos de comparação a Figura 5 mostra as isotermas de solubilidade determinadas com S(-) BVC e LDC, em pH 10,5. O cálculo da constante de afinidade para a LDC em pH 10,5 foi de

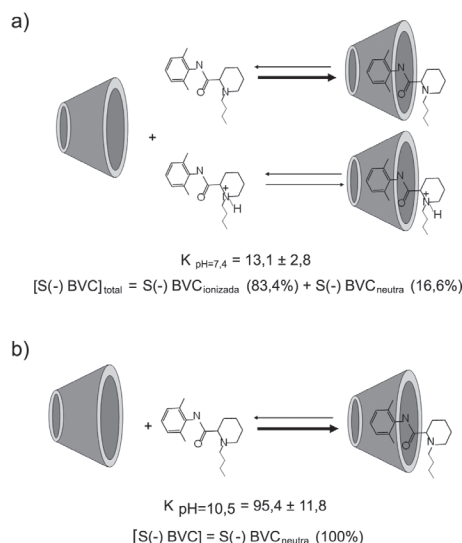


Figura 4. Representação esquemática da influência da ionização da S(-) BVC na complexação na cavidade da HP-β-CD em a) pH 7,4 e b) pH 10,5, à temperatura ambiente

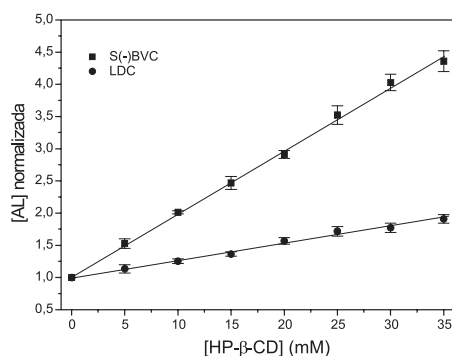


Figura 5. Comparação entre os diagramas de solubilidade de fases da S(-) BVC e da LDC, em pH 10,5. Concentrações de S(-) BVC e de LDC normalizadas em função da concentração de HP-β-CD (n=3)

$35,7 M^{-1} \pm 4,7$, indicando que a LDC neutra forma um complexo estável com a HP-β-CD. Porém, em comparação com a constante determinada para a S(-) BVC neutra, verifica-se que esta última apresenta uma complexação 2,7 vezes mais intensa que a da LDC neutra ($K_{S(-)BVC}/K_{LDC} = 95,4/35,7=2,7$).

Como o valor do coeficiente de partição destes AL em pH 10,5, determinado entre lipossomas de lecitina de ovo e água é de 798 ± 147 e 144 ± 54 , respectivamente³¹, conclui-se que a hidrofobicidade influencia diretamente a complexação destes fármacos com a cavidade hidrofóbica da HP-β-CD, justificando a maior interação da S(-) BVC neutra, em relação à LDC neutra, em concordância com os resultados de cinética de complexação.

A constante de formação dos complexos dos anestésicos locais aqui em estudo é baixa, quando comparada à de outras classes de fármacos, como hormônios esteroidais, antiinflamatórios etc ($K > 1000 M^{-1}$). Mesmo entre compostos anestésicos locais, os amino-ésteres apresentam valores de constante de formação maiores, $K = 549 M^{-1}$ para a benzocaína³⁰, $K = 351 M^{-1}$ para a tetracaína protonada (dados não publicados) e $K = 282 M^{-1}$ e $1536 M^{-1}$ para a novocaína protonada e neutra, respectivamente³⁹, que os anestésicos do tipo amino-amida.

Uma possível explicação para os baixos valores de constante das amino-amidas está na presença de metilas orto-aromáticas, que causariam um impedimento estérico para a interação mais eficaz

com a cavidade interna das ciclodextrinas, desta forma diminuindo possíveis interações do tipo van der Waals e hidrofóbicas. É preciso ressaltar que a cavidade das β-ciclodextrinas é capaz de acomodar as moléculas de anestésicos, como indicam os resultados de modelagem molecular²⁹ e os valores de constante de afinidade determinados neste trabalho. No entanto, um estudo mais detalhado, com outras técnicas e maior número de compostos, se faz necessário para justificar esta hipótese.

Teste de liberação *in vitro*

Os sistemas de liberação modificados devem apresentar para o fármaco complexado as concentrações terapêuticas ao longo do tempo, além da eliminação ser reduzida o suficiente para que as concentrações do fármaco sejam retidas no local^{40,41}. Nesse sentido, os testes de liberação *in vitro* possibilitam avaliar a permeação de fármacos através de membranas, onde as formulações que apresentem menores taxas de liberação têm, possivelmente, maior constante de estabilidade na interação fármaco/ciclodextrina.

A partir dos testes de liberação foi possível observar a liberação dos AL em presença e ausência de HP-β-CD, em função do tempo. Neste ensaio, o fármaco possui a capacidade de atravessar os poros da membrana, porém as moléculas de HP-β-CD (Massa Molar 1480 Da) não a atravessam e, desta forma, é possível observar o efeito da complexação na velocidade de liberação do fármaco.

A Figura 6a apresenta as curvas de porcentagem de liberação para a molécula de LDC em presença e ausência de HP-β-CD em função do tempo (220 min em pH 7,4, na temperatura ambiente). Pela análise das curvas observa-se que a liberação total da LDC (100%) em solução ocorreu após 150 min de diálise, em contraste com os resultados obtidos para a LDC complexada, em que somente uma menor quantidade de LDC havia sido liberada neste mesmo intervalo de tempo. A análise estatística da área sobre a curva dos dois conjuntos de dados foi realizada utilizando-se teste t não pareado

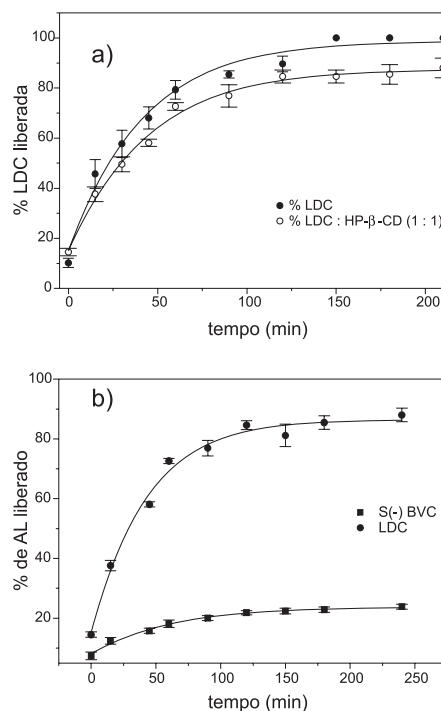


Figura 6. Teste de liberação *in vitro* para: a) LDC livre e em presença de HP-β-CD, pH 7,4, temperatura ambiente, em função do tempo (n=3) e b) comparação dos testes de liberação *in vitro* para a S(-) BVC e LDC em presença de HP-β-CD, pH 7,4, temperatura ambiente, em função do tempo (n=3)

Tabela 2. Valores de deslocamento químico (ppm) de hidrogênio da LDC, complexo LDC:HP-β-CD e variação no deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{LDC livre}} - \delta_{\text{LDC complexada}}$). Atribuição dos hidrogênios de acordo com dados da literatura

Hidrogênios	LDC δ	LDC/HP-β-CD δ	$\Delta\delta$ pH 7,4	LDC δ	LDC/HP-β-CD δ	$\Delta\delta$ pH 10,0
N(C-CH ₃) ₂	1,268	1,265	0,003	1,009	1,014	-0,005
φ-CH ₃	2,097	2,100	-0,003	2,077	2,084	-0,007
N(CH ₂ -C) ₂	3,264	3,258	0,006	2,604	2,611	-0,007
COCH ₂ N	4,208	4,201	0,007	3,296	3,301	-0,005
φ-3,4,5	7,158	7,158	0,000	7,117	7,118	-0,001

(com correção de Welch), apresentando diferença significativa entre as curvas ($p < 0,05$). Desta forma, a presença de HP-β-CD no sistema retarda a liberação da LDC em comparação à solução controle.

A Figura 6b compara a liberação da S(-) BVC e da LDC em pH 7,4, quando complexadas com HP-β-CD. Após 240 min, aproximadamente 88% da LDC e somente 24% da S(-) BVC haviam sido liberadas, apresentando uma diferença estatística significativa entre os dois conjuntos de dados ($p < 0,01$).

Estes resultados comprovam os experimentos de cinética de complexação e isotermas de solubilidade, uma vez que a interação da S(-) BVC com ciclodextrina é maior que a da LDC. Estas diferenças estão diretamente relacionadas às propriedades físico-químicas dos dois fármacos (Tabela 1).

Após a análise estatística dos dados de liberação do anestésico LDC livre e complexado pode-se afirmar que a explicação é que na liberação da LDC em presença de ciclodextrina (mesmo com uma constante de afinidade baixa) uma competição ocorre no interior do compartimento doador (compartimento de diálise) como mostrado na Figura 7.

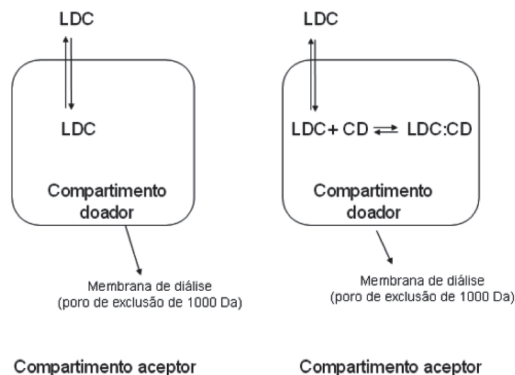


Figura 7. Representação esquemática dos possíveis equilíbrios existentes para a LDC e complexo nos ensaios de liberação

Uma liberação menor de lidocaína frente à membrana de diálise é devida à existência do equilíbrio de complexação do fármaco com a cavidade interna das ciclodextrinas dentro do compartimento doador, uma vez que devido ao poro da membrana de diálise ser de 1000 Da de massa e a HP-β-CD possuir massa média de 1480 Da, esta não atravessa a membrana, ficando retida no compartimento doador. Porém, com a liberação da molécula de LDC em função do tempo através da membrana a proporção de ciclodextrina/LDC vai aumentando, fazendo com que ocorra um deslocamento do equilíbrio em função da formação de complexo, o que faz com que a liberação seja mais lenta em função do tempo, ou seja, modificada.

Caracterização dos complexos por ressonância magnética nuclear

A associação dos anestésicos locais LDC e S(-) BVC com a HP-β-CD foi inicialmente avaliada pela variação de deslocamento

químico de hidrogênio ($\Delta\delta$) induzida pela inserção destes na cavidade interna da ciclodextrina (complexos LDC:HP-β-CD e S(-) BVC:HP-β-CD). A variação de deslocamento químico no espectro de RMN de ¹H entre os hidrogênios da LDC livres e nos complexos LDC:HP-β-CD em pH 7,4 e 10 é muito pequena e está apresentada na Tabela 2 (valores menores que 0,01 ppm). Já para o complexo S(-) BVC:HP-β-CD em pH 7,4 observou-se uma variação de deslocamento químico da ordem de 0,1-0,3 ppm, ou seja, bem maior que o encontrado para o sistema LDC:HP-β-CD, dando indícios de um complexo mais efetivo (Tabela 3). Nestes experimentos foram observadas somente um sinal para cada ressonância dos hidrogênios das moléculas quando livres e complexadas, ocorrendo (em alguns casos) apenas a variação nos valores de deslocamento químico

Tabela 3. Valores de deslocamento químico (ppm) de hidrogênio da S(-)BVC, complexo S(-)BVC:HP-β-CD e variação no deslocamento químico ($\Delta\delta = \delta_{\text{S(-)BVC livre}} - \delta_{\text{S(-)BVC complexada}}$)

Hidrogênios	S(-)BVC δ	S(-)BVC: HP-β-CD δ	$\Delta\delta$ pH 7,4
CH ₃ -butil grupo	0,821	0,717	0,104
N-C-C-CH ₂ -C	1,284	1,179	0,105
N-C-CH ₂ -C-C,	1,619	1,514	0,105
	1,721	1,616	0,105
	1,896	1,789	0,107
φ-CH ₃ ,	2,097	1,997	0,100
N-CH ₂ -C-C-C	2,338	2,229	0,109
	3,073	2,967	0,106
	3,629	3,294	0,335
φ-NHCO-	4,066	3,740	0,326
φ-3,4,5	7,164	7,059	0,105

co indicando, assim, a existência de um rápido equilíbrio de associação/dissociação entre os anestésicos locais e a ciclodextrina⁴².

Na tentativa de entender os aspectos topológicos entre os complexos (LDC:HP- β -CD e S(-)BVC/HP- β -CD) realizaram-se experimentos de RMN de ^1H (ROESY 1D) que são usualmente empregados para medidas de NOEs em complexos com $\omega\tau_c \cong 1$ ⁴³. Os valores de NOEs são proporcionais ao inverso da sexta potência da distância intermolecular, e do ponto de vista quantitativo, se o NOE é observado, os dois núcleos interagem no espaço a uma distância $\leq 5 \text{ \AA}$ ⁴⁴.

Os experimentos de ROESY 1D para o sistema AL:ciclodextrina apresentaram sinais de ROE específicos entre os hidrogênios aromáticos ($\phi_{3,4,5}$) e as metilas aromáticas (ϕCH_3) dos anestésicos locais e os hidrogênios da cavidade interna da HP- β -CD (denominados H_3 e H_5)⁴⁵.

Os resultados obtidos em pH 10 para interação dos hidrogênios das metilas orto-aromáticas e do anel aromático da molécula de LDC estão apresentados na Figura 8. Os mesmos ROEs são observados para pH 7,4 e 10, o que sugere que as formas protonada e não protonada da LDC apresentam a mesma topologia de complexação. Resultados semelhantes foram encontrados para a molécula de S(-)BVC (em pH 10 – dados não mostrados).

Os resultados de RMN para o anestésico local LDC sugerem que a porção aromática (incluindo as metilas orto-aromáticas) está

inserida na cavidade da HP- β -CD (próxima aos hidrogênios H_3 e H_5), possuindo uma topologia como a apresentada na Figura 8 c. Os resultados de RMN aqui apresentados validam os cálculos de modelagem molecular, bem como a topologia do complexo proposta no trabalho de Pinto *et al.*²⁹.

CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta dados de caracterização físico-química da complexação de dois anestésicos locais, muito utilizados em clínica médica, com HP- β -CD. Os resultados indicam que a complexação de anestésicos locais causa mudanças nas propriedades destes fármacos, como aumento de solubilidade e modificação no perfil de liberação. Tais mudanças são importantes na aplicabilidade destes compostos, podendo causar melhoras na biodistribuição dos mesmos. Na interação de anestésicos locais com HP- β -CD mostrou-se que o estado de ionização do fármaco e sua hidrofobicidade são determinantes. Os resultados indicam ainda que o perfil de liberação dos fármacos é diferenciado e que a complexação não é suficientemente forte para impedir a liberação do anestésico; ao invés disso, os valores de constante de estabilidade são relativamente baixos, o que garante a liberação do fármaco, mas com velocidade mais lenta. Os experimentos de ressonância magnética nuclear forneceram informações específicas da interação entre os anestésicos locais estudados e a cavidade interna das ciclodextrinas. Este trabalho abre perspectivas para estudos futuros, de avaliação farmacológica e clínica de sistemas de liberação modificada, para anestésicos locais.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo auxílio financeiro e bolsas de iniciação científica (C. M. Moraes) e pós-doc (S. A. Fernandes). Os autores agradecem ao Probiic-Uniso pelo apoio financeiro e bolsa de iniciação científica (P. Abrami) e ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (E. de Paula, Proc. 300197/95-0).

REFERÊNCIAS

- Knudsen, K.; Suurkula, M. B.; Blomberg, S.; Sjøvall, J.; Edvardsson, N.; *Br. J. Anesth.* **1997**, 78, 507.
- Goodman, A. G.; Gilman, A. G.; *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 9ª ed., McGraw-Hill: Rio de Janeiro, 1996.
- Butterword, J. F. 4th; Strichartz, G. R.; *Anesthesiology* **1990**, 72, 711.
- Narahashi, T.; Yamada, M.; Frazier, D. T.; *Nature* **1969**, 223, 748.
- Ragsdale, D. S.; McPhee, J. C.; Scheuer, T.; Catterall, W. A.; *Science* **1994**, 265, 1724.
- Ragsdale, D. S.; McPhee, J. C.; Scheuer, T.; Catterall, W. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 9270.
- de Paula, E.; Schreier, S.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, 29, 877.
- Gupta, S. P.; *Chem. Rev.* **1991**, 91, 1109.
- Clarkson, C. W.; Hondeghem, L. M.; *Anesthesiology* **1985**, 62, 396.
- Côrtes, C. A. F.; Oliveira, A. S.; Castro, L. F. L.; Cavalcanti, F. S.; Serafim, M. M.; Taia, C.; Filho, S. T.; *Rev. Bras. Anestesiologia* **2003**, 53, 177.
- Ivani, G.; Borghi, B.; van Oven, H.; *Minerva Anestesiologia* **2001**, 67, 20.
- Covino, B. G.; Vassalo, H. G.; *Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico*, Colina: Rio de Janeiro, 1985.
- de Jong, R. H.; *Local Anesthetics*, C. C. Thomas: Springfield, Illinois, 1994.
- de Araújo, D. R.; Pinto, L. M. A.; Braga, A. F. A.; de Paula, E.; *Rev. Bras. Anestesiologia* **2003**, 53, 663.
- de Araújo, D. R.; Fraceto, L. F.; Braga, A. F. A.; de Paula, E.; *Rev. Bras. Anestesiologia* **2005**, 55, 316.
- Szejtli, J.; *Cyclodextrin Technology*, Klumer Academic Publisher: Boston, 1998.
- Duchêne, D.; *Cyclodextrin and their industrial uses*, Editions de Santé: Paris, 1987.
- Uekama, K.; *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 900.
- Matioli, G.; *Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais*, Ed. UEM: Maringá, 2000.

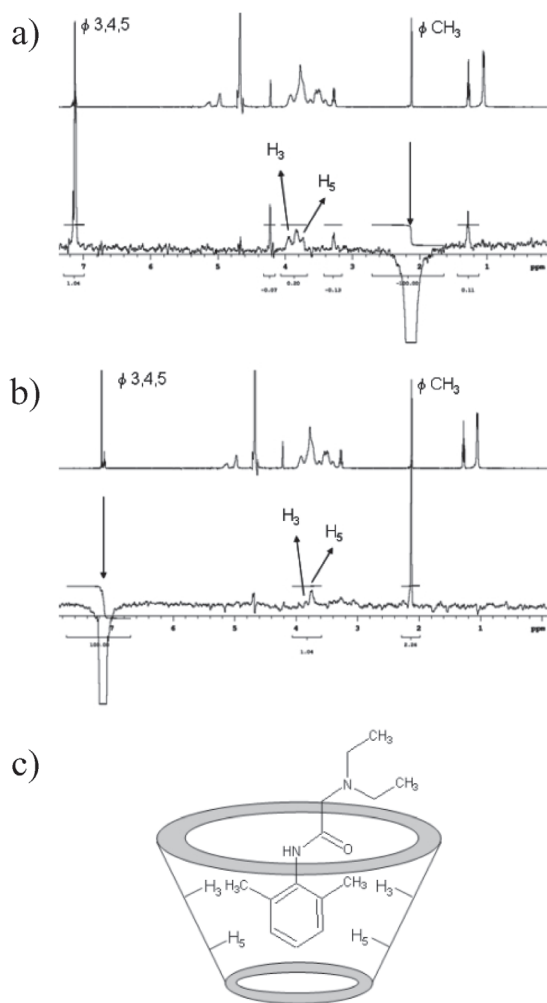


Figura 8. Espectro de ROESY 1D (pH 10, 25 °C) para: a) metilas orto-aromáticas da LDC foram irradiadas, b) hidrogênios aromáticos da LDC foram irradiados e c) topologia determinada pelos experimentos de RMN para o complexo LDC:HP- β -CD

20. Davis, M. E.; Brewster, M. E.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 1023.
21. Loftsson, T.; Masson, M.; *Int. J. Pharm.* **2001**, *225*, 15.
22. Irie, T.; Uekama, K.; *Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 147.
23. Frömming, K. H.; Szejtli, J.; *Topics in inclusion science – cyclodextrins in pharmacy*, Kluwer Academic Press: Hungria, 1994.
24. Dollo, G.; Thompson, D. O.; Lê Corre, P.; Chevanne, F.; Le Verge, R.; *Int. J. Pharm.* **1998**, *164*, 11.
25. Neufeulde, E. B.; Cooney, A. M.; Pitha, J.; Dawidowicz, E. A.; Dwyer, N. K.; Pentchev, P. G.; Blanchette-Mackie, E. J.; *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21604.
26. Bekers, O.; Uijtendaal, E. V.; Beijnen, J. H.; Bult, A.; Underberg, W. J. M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1991**, *17*, 1503.
27. Rajewski, R. A.; Stella, V. J.; *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1142.
28. Carpenter, T. O.; Gerloczy, A.; Pitha, J.; *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 222.
29. Pinto, L. M. A.; de Jesus, M. B.; de Paula, E.; Lino, A. C. S.; Alderete, J. B.; Duarte, H. A.; Takahata, Y.; *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2004**, *678*, 63.
30. Pinto, L. M. A.; Fraceto, L. F.; Santana, M. H. A.; Pertinhez, T. A.; Oyama, S.; de Paula, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 956.
31. de Paula, E.; Schreier, S.; *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1240*, 25.
32. Atkins, P.; Jones, L.; *Princípios de Química – Questionando a vida moderna e o meio ambiente*, 3ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2006.
33. Pinto, L. M. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002.
34. Higuchi, T.; Connors, K. A.; *Adv. Anal. Chem. Instr.* **1965**, *4*, 117.
35. Måsson, M.; Loftsson, T.; Måsson, G.; Stefánsson, E.; *J. Controlled Release* **1999**, *59*, 107.
36. Paavola, A.; Yliruusi, J.; Kajimoto, Y.; Kalso, E.; Wahlström, T.; Rosenberg, P.; *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 1997.
37. Malheiros, S. V. M.; Pinto, L. M. A.; Gottardo, L.; Yokaichiya, D. K.; Fraceto, L. F.; Meirelles, N. C.; de Paula, E.; *Biophys. Chem.* **2004**, *110*, 213.
38. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Princípios de Bioquímica*, Sarvier: São Paulo, 1995.
39. Iglesias, E.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4383.
40. Langerman, L.; Grant, G. J.; Zakowski, M.; Golomb, E.; Ramanathan, S.; Turndorf, H.; *Anesth. Analg.* **1992**, *75*, 900.
41. Mowat, J. J.; Mok, M. J.; MacLeod, B. A.; Madden, T. D.; *Anesthesiology* **1996**, *85*, 635.
42. Fraceto, L. F.; Spisni, A.; Schreier, S.; de Paula, E.; *Biophys. Chem.* **2005**, *115*, 11.
43. Bernini, A.; Spiga, O.; Ciutti, A.; Scarselli, M.; Bottoni, G.; Mascagni, P.; Niccolai, N.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *22*, 445.
44. Friebolin, H.; *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, Wiley-VCH: Heidelberg, 2005.
45. Veiga, F. J. B.; Fernandes, C. M.; Carvalho, R. A.; Geraldès, C. F. G. C.; *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1251; Kaukonen, A. M.; Kilpeläinen, I.; Mannermaa, J. P.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *159*, 159; Miyake, K.; Irie, T.; Hirayama, F.; Uekama, K.; Hirano, M.; Okamoto, Y.; *Int. J. Pharm.* **1999**, *179*, 237; Xiliang, G.; Shaomin, S.; Chuan, D.; Feng, F.; Wong, M. S.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2005**, *61*, 413.