

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

HEITOR RODRIGUES NETO

**ESTUDO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE ANESTÉSICO
LOCAL ROPIVACAÍNA/2-HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA EM
LIPOSSOMAS FURTIVOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2016

HEITOR RODRIGUES NETO

**ESTUDO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE ANESTÉSICO
LOCAL ROPIVACAÍNA/2-HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA EM
LIPOSSOMAS FURTIVOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do Curso2 de Licenciatura em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça

LONDRINA
2016

TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE ANESTÉSICO LOCAL ROPIVACAÍNA/2-HIDROXIPROPIL- β -CICLODEXTRINA EM LIPOSSOMAS FURTIVOS

por

HEITOR RODRIGUES NETO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 05/12/2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciatura em Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Professor Orientador
Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça

Membro titular
Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana

Membro titular
Prof. Dr. Fabio Vandresen

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso –

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me permitido a força para enfrentar as dificuldades decorrentes da graduação, por me conceder com saúde e por ouvir-me nos momentos difíceis.

Aos meus pais e irmãos pelo amor e apoio incondicional, que nos momentos da minha ausência dedicados aos estudos, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente!

Aos meus tios, meus primos e as minhas vozinhas, Vó Cida que já não se faz presente, mas tenho certeza que está super feliz por minha conquista. Todos da minha família de alguma maneira me incentivaram enquanto estive na universidade, apoiando e contribuindo para que esse trabalho se realizasse.

Ao Professor Dr. Luis Fernando Cabeça pela sua dedicação, oportunidade, o privilégio de trabalharmos juntos e o quanto veio a somar para a realização deste. Obrigado pelos momentos de aprendizado que vão além da conclusão desse trabalho.

O Programa de Bolsas de Fomento às Ações de Graduação da UTFPR, por apoiar as atividades que contribuem para o fortalecimento dos cursos de graduação, e também ao Programa de Apoio à Execução de Trabalhos de Conclusão de Curso, que subsidiou financeiramente recursos necessários para conclusão da pesquisa desse trabalho.

Aos meus amigos de graduação, agradeço pela convivência, conselhos e apoio nos momentos em que mais precisei. Sem vocês isso tudo não faria sentido. Sou grato também aos companheiros de iniciação científica, ao compartilharem de seus conhecimentos imprescindíveis para minha pesquisa e pelos momentos de descontração nos laboratórios e na viagem.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Estadual de Londrina - UEL, seus servidores e técnicos por contribuírem para a obtenção de grande parte dos resultados deste trabalho.

Aos pesquisadores e professores da banca examinadora pela atenção e contribuição dedicadas a este estudo.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigado.

EPÍGRAGE

“Você deve experimentar de tudo e entender o que serve e o que não serve para você. Quando estiver triste, você precisa ser o seu maior suporte. Precisa encarar sozinho. Não procure pela mão de outra pessoa, Levante-se sozinho. E diga a si mesmo: Ninguém é perfeito. Quanto mais você busca a perfeição, mais longe ficará da realidade”.

Jessie J

RESUMO

RODRIGUES NETO, Heitor. **Estudo do complexo de inclusão entre anestésico local ropivacaína/2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em lipossomas furtivos**. 2016. 58 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR. Londrina, Paraná.

O sistema de liberação controlada de fármacos tem como objetivo principal o controle temporal da concentração de fármacos para que o benefício clínico da administração do fármaco seja maximizado e os efeitos colaterais minimizados. Sendo assim, é um ramo de pesquisa que envolve o domínio de conhecimentos associados a áreas científicas como a medicina, farmácia, bioquímica, química, materiais e também a nanotecnologia. Atualmente existem inúmeras formulações para liberação controlada com variados tipos de fármacos, entre eles estão os anestésicos locais (AL), utilizados como bloqueadores na condução de estímulos nervosos que geram a sensação de dor. Este trabalho tem como fundamento o estudo de uma formulação para liberação controlada do anestésico local ropivacaína (RVC) utilizando sistemas de duplo carregamento, característico de vesículas lipídicas (lipossomas furtivos) e 2-hidropropil- β -ciclodextrina. O objetivo principal é a caracterização da formulação desenvolvida, entretanto, foi necessário realizar a caracterização físico-química do complexo como topologia, solubilidade, eficiência de encapsulação entre outros. Para caracterização do complexo foi utilizado técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H) e Uv-vis.

Palavras-chave: Anestésico local. Ropivacaína. Ciclodextrinas. RMN de ^1H . Lipossomas furtivos.

ABSTRACT

RODRIGUES NETO, Heitor. **Study of the inclusion complex between local anesthetic ropivacaine/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in furtive liposome.** 2016. 58 p. Final Paper (Teaching Certificate in Chemistry). Federal University of Technology – Paraná. Londrina, Paraná.

The controlled release system of drugs has a main objective the temporary control of drug's concentration to clinical benefit of the drug's administration be maximized and minimize side effects. It is a line of studies what involves the domain of associated knowledge scientific areas like medicine, pharmacy, biochemistry, chemistry, materials and nanotechnology. Actually, there are numerous formulations for controlled release with various types of drugs, these include local anesthetics (LA), used as blockers in conducting nerve stimuli that generate a sensation of pain. This work was based in the study of formulation of local anesthetic ropivacaine (RVC) using as host two vehicle for release: lipid vesicles (furtive liposomes) and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. The main objective is the characterization of the developed formulation, however, was important to perform the complex physical-chemical characterization like: topology, solubility, encapsulation efficiency and among others. The complex characterization was studied by experiments nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) and Uv-vis.

Keywords: Local anesthetic. Ropivacaine. Cyclodextrins. $^1\text{H-NMR}$. Furtive liposomes.

LISTA DE ABREVIATURAS

DSPE-PEG-2000	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolaminaN[metoxi(polietilenoglicol)]-2000
HP- β -CD	2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina
α -CD	α -ciclodextrinas
β -CD	β -ciclodextrinas
γ -CD	γ -ciclodextrinas
CD	Ciclodextrina
CHCl_3	Clorofórmio
b	Coeficiente angular da reta
K_a	Constante de associação
D	Coeficiente de difusão
D_{compl}	Coeficiente de difusão do complexo livre
D_{livre}	Coeficiente de difusão do ligante livre
K_D	Constante de dissociação
ΔI	Diferença dos espectros
DOSY	Diffusion-ordered spectroscopy
EC	Eficiência da complexação
FDA	Food and drug administration
EPC	Fosfatidilcolina de ovo
f_x	Fração do complexo
f_{compl}	Fração do ligante complexado
GRAS	Generally recognized as safe
LP	Lipossoma
LF	Lipossoma furtivo
D_2O	Óxido de deutério
PEG	Polietilenoglicóis
rf	Radiofrequência
RMN	Ressonância magnética nuclear
RVC	Ropivacaína
STD	Saturation transfer difference
SLC	Sistema de liberação controlada
MLV	Vesícula multilamelar

MUV	Vesícula multiviscular
GUV	Vesícula unilamelar gigante
LUV	Vesícula unilamelar grande
SUV	Vesícula unilamelar pequena

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	JUSTIFICATIVA	14
4	REFERENCIAL TEÓRICO	15
4.1	QUÍMICA SUPRAMOLECULAR, LIPOSSOMAS E LIPOSSOMAS FURTIVOS	15
4.2	CICLODEXTRINAS.....	21
4.3	ANESTÉSICOS LOCAIS.....	24
4.4	SISTERMA TERNÁRIO: COMPLEXO DO ANESTÉSICO E CICLODEXTRINA EM LIPOSSOMA	26
4.5	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1	TIPO DE PESQUISA	30
5.2	MATERIAL EM ESTUDO	30
5.3	MÉTODOS	30
5.3.1	Preparação do complexo binário RVC/HP- β -CD	30
5.3.2	Preparação do complexo ternário RVC/HP- β -CD/LF	31
5.3.3	Eficiência de complexação por Uv-vis	31
5.3.4	Ressonância magnética nuclear	32
5.3.5	Experimento de DOSY.....	32
5.3.6	Experimento de STD.....	33
6	RESULTADOS	34
6.1	EFICIENCIA DE COMPLEXAÇÃO	35
6.2	ANÁLISE DOS ESPECTROS DE RESSONÂNCIA (RMN DE ^1H)	37
6.3	ANÁLISE DOS ESPECTROS DE RMN DOS EXPERIMENTOS DOSY	42
6.4	AVALIAÇÃO DO COMPLEXO TERNÁRIO RVC/HP- β -CD/LF PELO EXPERIMENTO DE STD.....	47
8	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Todos os fármacos possuem efeitos principais pretendidos e efeitos secundários não-pretendidos; os efeitos não-pretendidos são conhecidos como efeitos colaterais ou efeitos adversos. Como o desenvolvimento de uma nova molécula de fármaco é caro e demorado, estratégias apontam para uma forma de melhorar a relação eficácia e segurança dos medicamentos. Uma alternativa é a utilização de métodos de liberação controlada do fármaco (TIWARI et al., 2012) através da encapsulação em sistemas carreadores.

O estudo dos sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos teve início na década de 70, com o intuito de entregar o fármaco a taxas pré-determinadas e períodos de tempo predefinido, o que tem atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores da área (QIU; PARK, 2001; JEONG et al., 2002). Por outro lado, a entrega de fármacos é uma área emergente focada no direcionamento do fármaco ou genes para um grupo desejado de células. O objetivo é a distribuição direcionada para o transporte de quantidades apropriadas do fármaco aos locais desejáveis (tais como tumores, tecidos doentes, etc.), enquanto se minimizam os efeitos colaterais indesejados dos medicamentos sobre outros tecidos (TRAN et al., 2009).

Nesse aspecto, o uso da tecnologia de SLC de fármaco e a tecnologia de encapsulamento de princípios ativos (medicamentos, vacinas, perfumes, corantes, etc.) dentro de moléculas hospedeiras estão atraindo muita atenção das áreas da química, de materiais, biologia, medicina, farmacologia e da nanotecnologia (ZUCKER et al., 2009; YANG et al., 2013).

Atualmente são encontrados muitos exemplos de sistemas de liberação controlada como ciclodextrinas, calixarenos (LIU et al., 2004), lipossomas (BATISTA et al., 2007), entre outros. Um sistema de grande importância é o de geração de lipossomas com superfície de membrana modificada, a qual dá origem aos lipossomas de longo tempo de circulação, conhecidos como lipossomas furtivos (LF) (BOERMAN et al., 2000). Essa alternativa protege a camada lipídica superficial dos lipossomas, impedindo sua rápida eliminação do organismo.

Os maiores benefícios dos carreadores de fármaco são o aumento da solubilidade, o longo tempo de exposição, o direcionamento seletivo ao sítio de ação

e o aumento do índice terapêutico. A farmacocinética desses carreadores depende das características físico-químicas como tamanho, carga superficial, lipídios formadores de membrana, biopolímeros estabilizadores, dose e via de administração (ZAMBONI 2008).

A classe de princípio ativo a ser estudado e encapsulado neste trabalho é a dos anestésicos locais (AL). O anestésico em estudo é a ropivacaína (RVC) e os sistemas de carreadores utilizados serão α -2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e lipossomas furtivos (LF), ou seja, um sistema ternário. O intuito é promover a liberação lenta, redução da concentração plasmática, baixa toxicidade e consequentemente o aumento da anestesia (FRANZ-MONTAN et al., 2012).

Para caracterização dos complexos será utilizado técnicas de RMN de ^1H para a investigação de interações intermoleculares, promovendo evidências sobre a topologia e a formação de complexos através do núcleo do hidrogênio (KAPUR et al., 2000) o qual tem alta sensibilidade e permite extrair um grande volume de informações a partir da análise de seus espectros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como foco caracterizar a formulação para o anestésico local ropivacaína (RVC) em sistema ternário, através de sua complexação em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) seguido da encapsulação em lipossomas furtivos (LF). Após o processo de encapsulação realizará o estudo das interações do complexo utilizando como ferramenta básica a espectroscopia RMN e espectrofotometria UV-vis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar a estrutura vesicular dos lipossomas com membrana modificada (lipossomas furtivos) através do uso de lipídios de fosfatidilcolina de ovo (EPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[metoxi(polietilenoglicol)]-2000 (DSPE-PEG-2000) e colesterol;
- Preparar o complexo de inclusão do anestésico local ropivacaína em 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, (RVC/HP- β -CD) e o complexo de sistema ternário entre os lipossomas furtivos e o complexo (RVC/HP- β -CD), ([RVC/HP- β -CD]/LF);
- Estudar a topologia, dinâmica e caracterização da encapsulação do complexo ternário ([RVC/HP- β -CD]/LF) através de técnicas de RMN (utilizando as técnicas de DOSY e STD) e espectrofotometria UV-vis;

3 JUSTIFICATIVA

Embora estudos de sistemas de liberação controlada de fármacos através de lipossomas como carreadores datem de algumas décadas existem um vasto campo de pesquisa com uma literatura ainda restrita. Quando se leva em consideração o estudo físico-químico das formulações, em relação à dinâmica e topologia dos complexos de lipossomas modificados a literatura ainda é mais restrita. Neste aspecto, o estudo das interações de anestésicos locais com lipossomas buscará compreender as alterações na eficiência dos fármacos encapsulados, liberação e toxicidade. O desenvolvimento de uma formulação mais potente, eficiente e com menor toxicidade é a grande justificativa que move o estudo de novas formulações.

Contudo, as intenções dos estudos são positivas, de maneira que o conhecimento a respeito de liberação controlada de fármacos poderá ser utilizado para outros ativos de interesse industriais (outros fármacos, cosméticos, pesticidas e herbicidas) o que atrelada a uma visão de mercado poderá gerar produtos agregando valores aos conhecimentos científicos.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR, LIPOSSOMAS E LIPOSSOMAS FURTIVOS

Em 1988 Jean-Marie Lehn introduziu pela primeira vez o conceito de química supramolecular, que definiu a química supramolecular como a “química além das moléculas”. Ela se caracteriza por sistemas de alta complexidade resultante da associação de duas ou mais espécies químicas unidas por forças intermoleculares (DIEDERICH, 2006). Interação estas de natureza não covalente como ligações de van der Waals, ligação de hidrogênio, interações iônicas e coordenação de metal (PINA,1996). Um exemplo de sistemas de química supramolecular são os lipossomas, os quais são sistemas transportadores (carreadores) eficientes de biomoléculas (LASIC et al., 1995; LASIC et al., 1996; NUNEZ, 2000; MAREUIL et al., 2002).

Há 53 anos, Alec Bangham relatava pela primeira vez a formação espontânea de estruturas de membranas fechadas, que consistem de vesículas esféricas microscópicas de tamanhos variados (em escalas de nm a μm), após a dispersão de fosfolípidos num meio aquoso (RANADE, 1989). O termo lipossoma (LP)surgiu posteriormente devido a Weissman, que deu origem a uma só palavra dois elementos de origem grega: lipo (significando gordura) e soma (significando corpo) (SESSA; WEISSMANN, 1968).

LP contém uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por compartimentos aquosos, em que as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior e as cabeças polares para o exterior da bicamada (Figura 1), mantendo contato com a fase aquosa (RANADE, 1989). Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas em seu cerne aquoso e as hidrofóbicas e anfifílicas em suas bicamadas (CABEÇA, 2009).

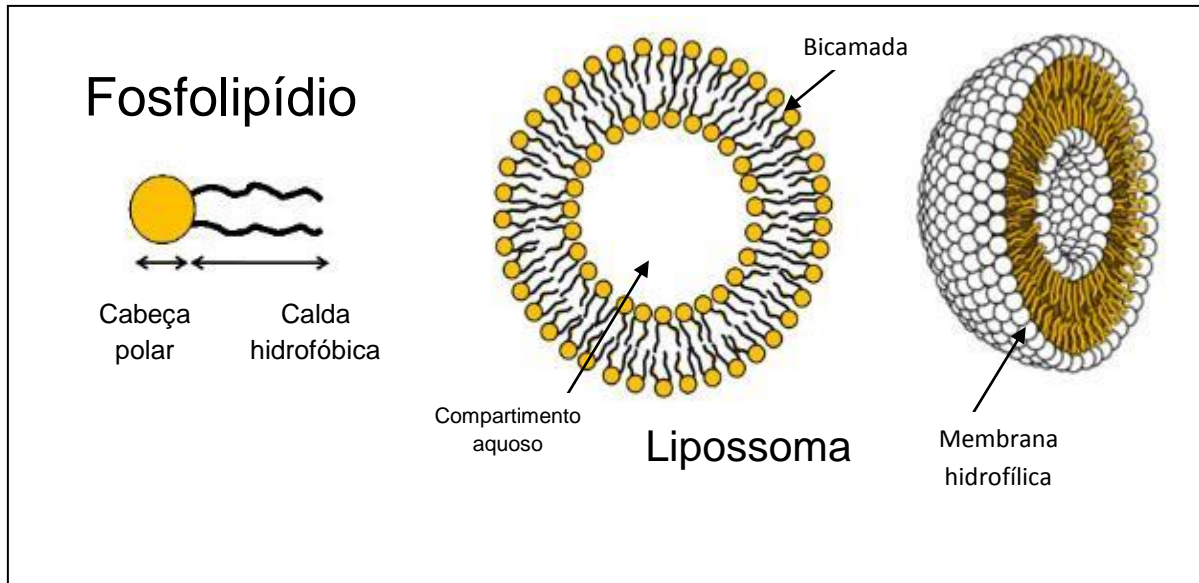


Figura 1 - Representação esquemática da organização de um lipossoma unilamelar

Fonte: Adaptada de Zeineldin e Skandani (2012).

Os lipossomas apresentam baixa toxicidade, são biodegradáveis e capazes de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação, de forma que, quando alcançam os tecidos alvos podem liberar doses concentradas do medicamento, aumentando a eficácia do tratamento (SANTOS et al., 2002; GONIOTAKI et al., 2004; PUGLIA et al., 2004).

A degradação dos lipossomas está associada principalmente às opsoninas presentes no sangue que aderem facilmente à membrana dos lipossomas convencionais (KLÜPPEL et al., 2007), devido a isto, são rapidamente capturados pelo sistema fagocitário mononuclear, levando a sua eliminação (BATISTA et al., 2007). Para solucionar esse problema foram desenvolvidos sistemas lipídicos modificados, essencialmente pela inserção de determinadas moléculas em sua camada exterior com o objetivo de evitar sua eliminação pelo sistema retículo-endotelial (LOPES; OLIVEIRA, 2000;). Os lipossomas que apresentam este tipo de superfície modificada são denominados lipossomas furtivos (lipossomas de longa circulação) (SANTOS; CASTANHO, 2002; ANCHIÊTA-JÚNIOR et al., 2014).

Um método muito utilizado para modificar as vesículas lipossômicas tornando-os lipossomas de longa circulação é o revestimento da superfície lipossômica com componentes hidrofílicos naturais, como polímeros hidrofílicos sintéticos, especificamente os polietilenoglicóis (PEG) (Figura 2) (BATISTA et al., 2007; KLÜPPEL et al., 2007). O PEG é um polímero biologicamente inerte usado em carreadores farmacológicos para criar uma barreira estérica e uma estrutura aquosa

ao redor dos lipossomas, para protegê-los contra as proteínas plasmáticas do corpo (LOPES; OLIVEIRA, 2000; ANCHIÊTA-JÚNIOR et al., 2014).

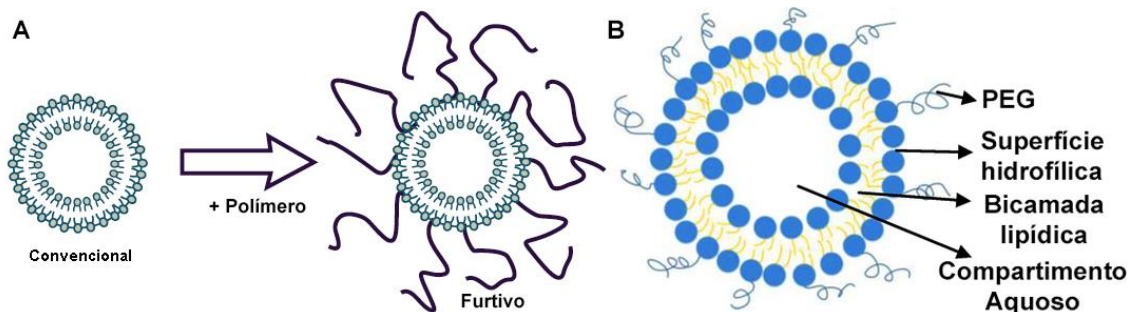


Figura 2 - A) Transformação do lipossoma convencional em furtivo e B) componentes do lipossoma furtivo
 Fonte: Adaptada de Azonano (2005).

A superfície polarizada (hidrofílica) criada pelos polímeros aumenta o tempo de circulação dos lipossomas inibindo o processo de reconhecimento molecular. Além disso, previne a fusão, agregação e ruptura dos lipossomas (ANCHIÊTA-JÚNIOR, et al., 2014).

Tendo em vista que a principal limitação dos lipossomas convencionais é a sua eliminação de circulação pelo sistema mononuclear fagocitário, reduzindo seu período de circulação no organismo, consegue-se obter com lipossomas furtivos tempos de meia vida em circulação 100 vezes superiores aos dos lipossomas convencionais (SANTOS; CASTANHO, 2002). Fato este que está associado a utilização o PEG como componente do lipossoma furtivo, o peso molecular bem como sua concentração na superfície da bicamada são fatores que determina essa maior duração (LOPES; OLIVEIRA, 2000).

Quando o fármaco é liberado controladamente dos sistemas lipossomais tem-se uma melhor resposta farmacológica e com maior absorção do que os mesmos livres (DISAPIO, 1999), aumentando, dessa forma, a eficiência da ação terapêutica e retenção da sua estrutura e atividade por mais tempo (MORAES, 1996; ZALLOUM, 2001; FRACETO et al., 2002).

Para a formulação dos LP os lipídios mais utilizados são os que se aproximam de uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas e fosfatidilgliceróis. As fosfatidilcolinas (Figura 3) são as mais empregadas em estudos de formulação de lipossomas (FRÉZARD et al, 2005; KLÜPPEL et al, 2007) pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (BATISTA et al., 2007).

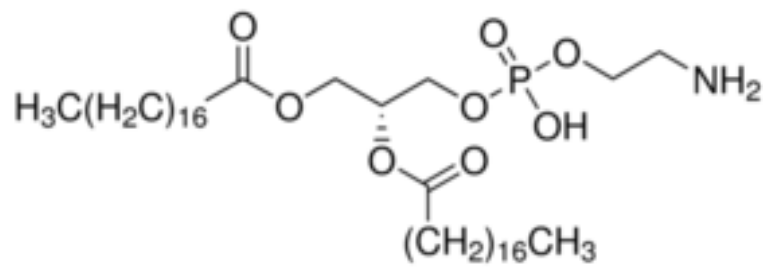


Figura 3 - Estrutura de linhas da fosfatidilcolina de ovo (EPC)
Fonte: Adaptada de Christie (2016).

Os lipossomas podem ser classificados com relação ao seu tamanho e ao número de lamelas existentes, podendo ser divididos de acordo com os diâmetros médios das lamelas (Tabela 1):

Tabela 1 – Classificação de lipossomas quanto ao tamanho

Classificação	Diâmetro das vesículas
Vesícula Multilamelar (MLV)	400 a 3500nm
Vesícula Multiviscular (MUV)	50 a 100 nm
Vesícula Unilamelar Gigante (GUV)	> 1000 nm
Vesícula Unilamelar Grande (LUV)	200 a 1000 nm
Vesícula Unilamelar Pequena (SUV)	20 a 100 nm

Fonte: Adaptada de Cabeça (2009).

O método de preparação de vesículas lipídica mais utilizada inclui a hidratação de um filme lipídico (Figura 4), normalmente em um solvente orgânico e seguido da evaporação do solvente com conseqüente formação do filme. A hidratação deste filme pode ser efetuada com água ou solução tampão, sob agitação magnética vigorosa, promovendo a formação da dispersão de lipossomas multilamelares (MLV). O fármaco a ser encapsulado pode ser incorporado na solução tampão ou dissolvido na mistura lipídica (lipofílicos) (CABEÇA, 2009).

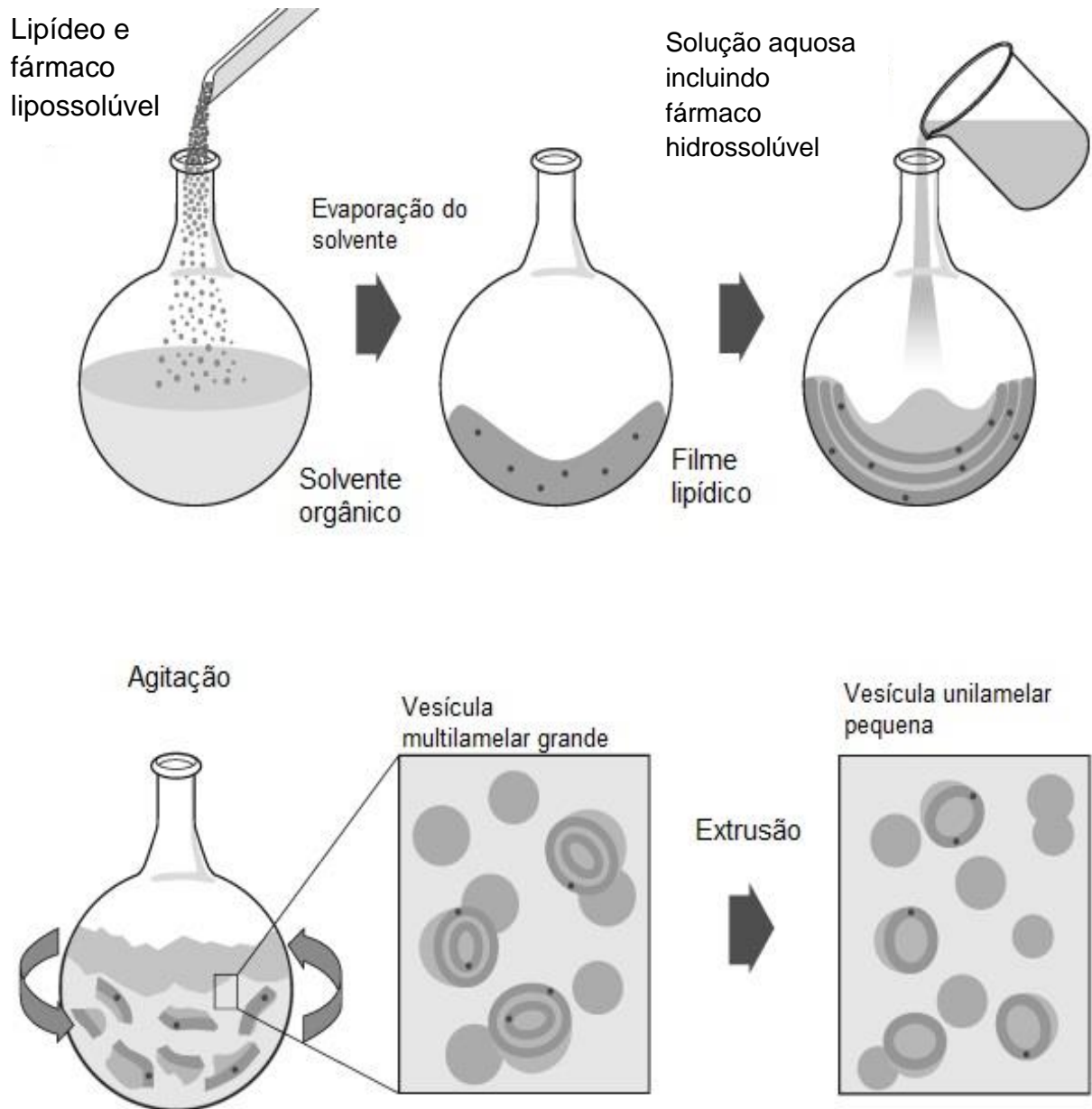
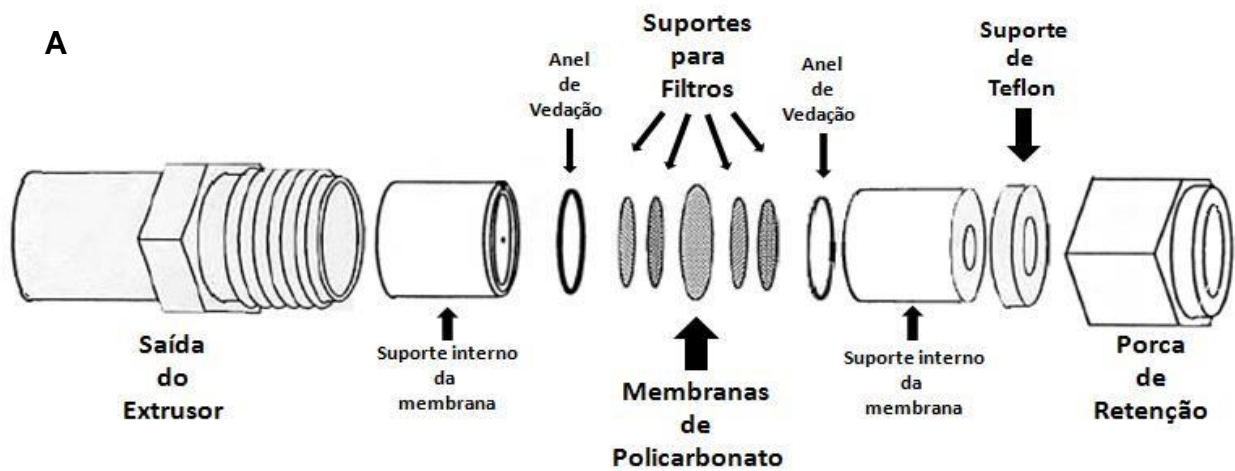


Figura 4 – Possibilidade preparação de lipossomas pela hidratação de filme lipídico
Fonte: Adaptada de Lasic (1997).

A obtenção de vesículas unilamelares grandes e pequenas (LUV e SUV) tem como base a utilização de uma suspensão de vesículas multilamelares. A partir da dispersão de MLV, utilizam-se vários métodos para produzir dispersões homogêneas de SUV e LUV: como processos mecânicos, eletrostáticos ou químicos. Os processos mais frequentes são os mecânicos, que podem incluir a sonicação ou a extrusão dos lipídios através de membranas de polycarbonato com diferentes porosidades (SANTOS; CASTANHO, 2002).

O processo de extrusão geralmente é realizado utilizando-se um extrusor com pressão a base de nitrogênio, mas o processo de extrusão também pode ser

realizado utilizando um mini-extrusor (Figura 5). Neste caso, a pressão exercida pelo usuário força a passagem das vesículas lipossomais MLV de uma seringa para outra através de filtros (normalmente de policarbonato) com tamanho de poros adequados ao tamanho do lipossoma desejado (CABEÇA, 2009).



B



Figura 5 - A) Componentes que compõem o mini extrusor e B) Imagem de um mini-extrusor
 Fonte: Cabeça (2009).

Como afirma Mamot et al. (2003), atualmente, o mercado farmacológico comercial dispõe de diversas formulações utilizando lipossomas como carreadores, como de exemplo o no tratamento de câncer. Por ser uma estratégia para a redução de toxicidade sistêmica, perante utilização de fármacos antineoplásticos.

Na fabricação de vacinas os lipossomas são aplicados como veículos de liberação de antígenos como auxiliar imunológico, apresentando vantagens como a fácil preparação, baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, assim como a liberação lenta de antígenos encapsulados (BEN-YEHUDA et al., 2003;

MAZUMDAR et al., 2004). Também pode ser encontrado na terapia de doenças infecciosas e parasitárias. Pesquisas realizadas em camundongos exibiram liberação controlada dos fármacos encapsulados em lipossomas para doenças como tuberculose e leishmaniose (LABANA et al., 2002; FREZARD et al., 2005).

Outra aplicação das vesículas lipossomais é no encapsulamento de anestésicos locais (ALs), aumentando o tempo de meia-vida dos ALs *in vivo*, prolongando o efeito da anestesia e diminuindo os efeitos colaterais (PAULA et al., 1996; PINTO et al., 2000; FRACETO et al., 2002; CEREDA et al., 2004; UHRIKOVA et al., 2004).

4.2 CICLODEXTRINAS

Os estudos a respeito das ciclodextrinas (CDs) vêm despertando grande interesse na comunidade científica e na química de macromoléculas (VENTURINI, et al., 2008). As CDs são oligossacarídeos cíclicos (MONTANARI, et al., 1998), compostos por unidades de glicose unidas através de ligações α -1,4, produzidas naturalmente por micro-organismos e plantas que são capazes de degradar o amido em produtos cíclicos chamados ciclodextrinas (ARAÚJO et al., 2003; VENTURINI et al., 2008; LYRA et al., 2010).

O maior rendimento para obtenção das ciclodextrinas é através das CDs naturais, que contêm seis, sete ou oito unidades de D-(+)-glucopirranose, sendo denominadas de α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrinas (β -CD) e γ -ciclodextrinas (γ -CD) respectivamente (Figura 6). Estes compostos possuem exterior hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica. Sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas. (ARAÚJO et al., 2003; CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; FRACETO et al., 2007; VENTURINI et al., 2008; LYRA et al., 2010).

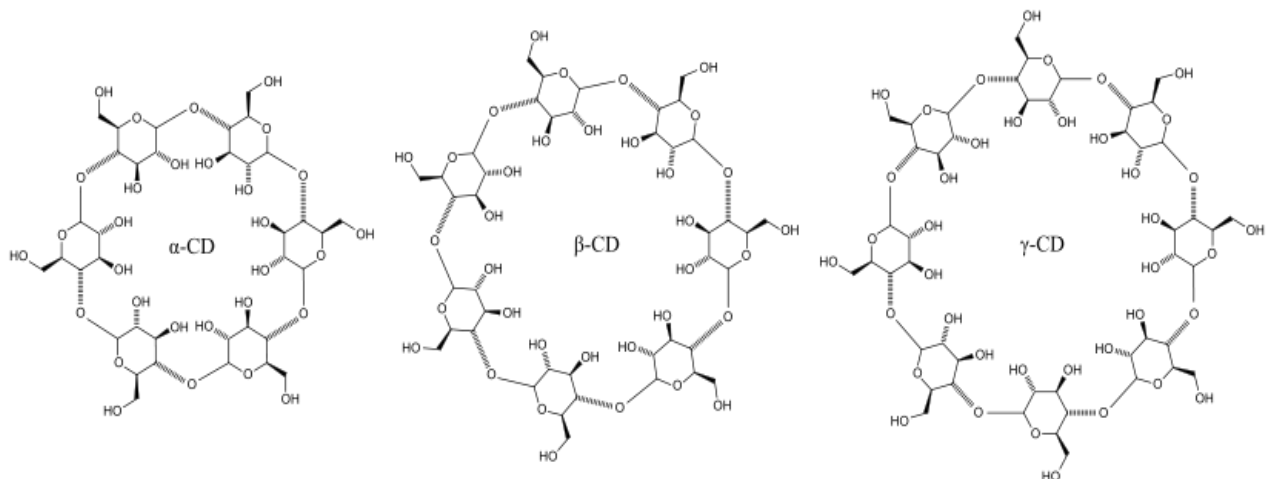


Figura 6 - Estrutura das principais ciclodextrinas naturais, α , β e γ
Fonte:Skowron (2016).

Entretanto, as ciclodextrinas naturais, em particular a β -ciclodextrina, possui solubilidade aquosa limitada (16,4 mM ou 18,6 mg/mL), o que ocasiona na formação de complexos com compostos lipofílicos geralmente uma precipitação dos complexos sólidos, se o limite de solubilidade for atingido (RAJEWSKI; STELLA, 1996). As β -CDs são as dextrinas cíclicas mais largamente utilizadas para a complexação com várias classes de fármacos, já que sua cavidade interna tem diâmetro grande o bastante para acomodar um hexanel aromático (ARAÚJO et al., 2003; CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

A 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) (Figura 7) é um derivado de hidroxialquil, sendo uma alternativa das ciclodextrina naturais com propriedades de solubilidade melhoradas quando em contato com água. (UEKAMA et al., 1998; YOSHIDA et al., 1988) e pode ser um pouco mais toxicologicamente benignos (GOULD; SCOTT, 2005).

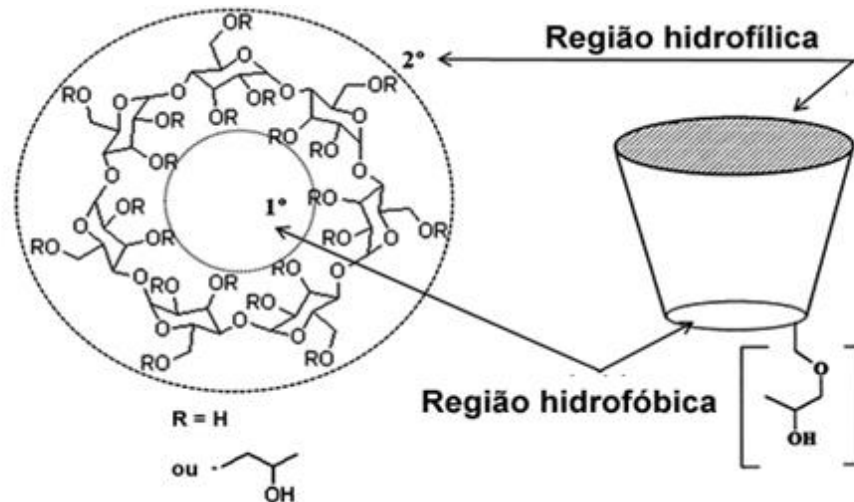


Figura 7 -Forma da molécula de 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina
 Fonte: Própria.

De um modo geral, por via oral a biodisponibilidade de ciclodextrinas é muito baixa, e, devido à sua falta de absorção a partir do período gastrointestinal, a HP- β -CD parece ser o mais seguro (STELLA; HE, 2008). A HP- β -CD vem sendo muito utilizada pela Food and Drug Administration (FDA) por ser autorizada como recipiente para fármacos, e é classificada pela Generally Recognized as Safe (GRAS) como segura na aplicação em alimentos (Food e Drug Administration, 2015).

Sua cavidade interna hidrofóbica promove a encapsulação de fármacos poucos solúveis, sendo uma alternativa para aumento da solubilização do mesmo. Além deste, a maioria de compostos farmacológicos ativos apresentam alguma degradação e, frequentemente, a atividade terapêutica é prejudicada pela instabilidade do fármaco (LOFTSSON et al., 1996). O uso de complexos fármaco-ciclodextrina diminui a toxicidade local e/ou sistêmica e favorece o prolongamento da atividade (ARAUJO et al., 2003).

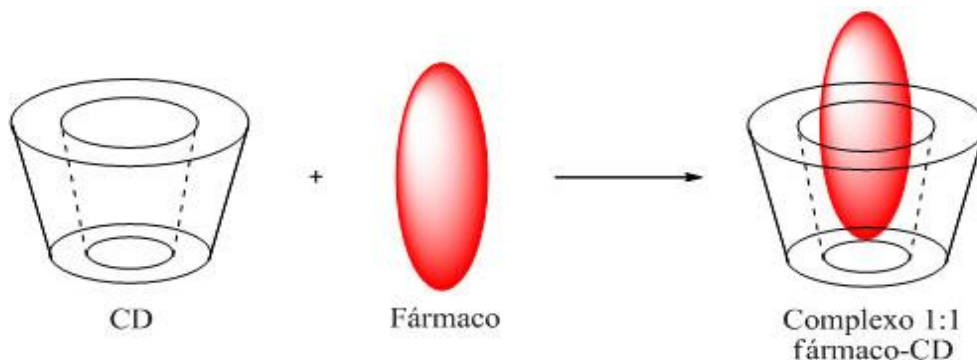


Figura 8 - Complexo fármaco-ciclodextrina
 Fonte: Adaptada de Loftsson (2001).

Entretanto, fármacos encapsulados em ciclodextrinas são rapidamente removidos da circulação sanguínea quando passam pelo sistema renal, fazendo moléculas de β -ciclodextrinas induzirem toxicidade nos rins, especialmente depois de uso crônico (FRANK et al., 1976; MCCORMACK et al., 1996; FATOUROS et al., 2001). Quando injetados intravenosamente uma rápida dissociação ocorre, quer por diluição ou por deslocamento do fármaco por outros componentes do sangue. Portanto, ciclodextrinas aumentam a disponibilidade, sem alterar a farmacocinética dos fármacos (MCCORMACK et al., 1998).

Para solucionar esse problema propõe utilizar o encapsulamento de agentes terapêuticos em sistemas multicomponentes (ternário) como fármaco-ciclodextrina-lipossoma (MCCORMACK et al., 1996; LOUKAS et al., 1998; MCCORMACK et al., 1998; FATOUROS et al., 2001; HAGIWARA et al., 2006; MAESTRELLI et al., 2006; PIEL et al., 2006).

As propriedades da complexação em CDs convêm a um futuro bastante promissor, uma vez que uma série de produtos na forma de complexo de inclusão com diferentes tipos de ciclodextrinas são estão sendo comercializados, tais como: albandazol, cloranfenicol, fluoxetina, indometacina, cetoprofeno, miconazol, nifedipino, piroxican, tacrolimus (LOFTSSON; MASSON, 2011).

4.3 ANESTÉSICOS LOCAIS

Anestésicos locais (AL) são fármacos que determinam bloqueio reversivo da condução nervosa, com perda de sensações em área circunscrita do organismo, sem alteração do grau de consciência (BRASIL, 2010), as quais constituem de um grande número de moléculas, de diferentes estruturas químicas, como amino-ésteres, amino-amidas, amino-cetonas, amidas - ionizáveis próximo ao pH fisiológico (LAGAN; MCLURE, 2004) - álcoois, tio-ésteres, tio-amidas, derivados de uréia, poliéteres, capazes de bloquear reversivelmente a condução do estímulo nervoso (GUPTA, 1991; DE JONG, 1994).

Albert Niemann (1834-1861) utilizou o primeiro composto como AL, a cocaína, um alcalóide isolado das folhas de *Erithroxylon coca*, com ação anestésica

oftalmológica (GRZYBOWSKI, 2008). Após ter sido utilizado durante longo tempo foi substituída por outros fármacos, devido aos seus efeitos tóxicos, como dependência química e psíquica (RUETSCH et al., 2001). Desta forma surgiram vários outros compostos sintéticos como: benzocaína, procaína, prilocaína, lidocaína, mepivacaína, bupivacaína, ropivacaína, levobupivacaína entre outros (STRICHARTZ, 1987; DE PAULA; SCHREIER, 1996; MALAMED, 2001) que possuem funções e aplicações variadas.

A ação regional dos ALs e a forma como são aplicados é o que os diferem dos anestésicos gerais, sendo os últimos aplicados intravenosa ou subcutâneos. (DE JONG, 1994). A ação é caracterizada pela cadeia de hidrocarbonetos e a estrutura do anel aromático, as quais determinam a lipossolubilidade. Fármacos lipossolúveis penetram mais facilmente na membrana celular para exercer seu efeito (BRASIL, 2010).

O composto (S) – N-(2,6-dimetilfenil) – 1 – propilpiperidina-2-carboxamida, conhecido como ropivacaína (RVC) (Figura 9) é um AL do tipo amina, que apresenta estrutura e propriedades farmacológicas similares a bupivacaína e mepivacaína, (ZUO et al., 2004) sendo um agente de longa duração, que promove bloqueio sensitivo de duração igual ou discretamente inferior, com período de bloqueio motor e toxicidade nervosa e cardíaca menores que outros anestésicos (WOLFF et al., 1995; FELDMAN et al., 1996).

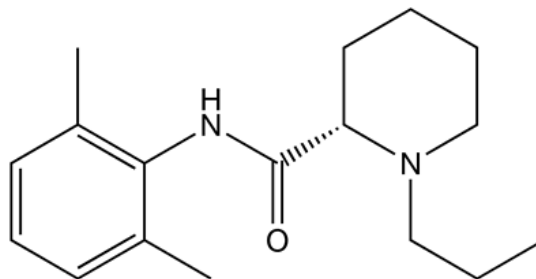


Figura 9 - Molécula de ropivacaína
Fonte: Própria.

É muito utilizada como AL em consultórios oftalmológicos e clínicas veterinárias (STILES et al., 2001; DINCEL et al., 2007). Estudos mostram sua eficácia imediata em dores pós-operatória, atingindo a sua intensidade máxima dentro de 6-8 horas de funcionamento como um resultado da liberação de mediadores químicos (SEYMOUR et al., 19985).

Estudos apontam a RVC como melhor alternativa ao uso comparada a bupivacaína, por induzir menor toxicidade para o sistema nervoso central sistema cardíaco (KENNEDY et al., 2001), sendo útil na administração epidural, infiltração e alívio da dor pós-operatória (WHITESIDE; WILDSMITH, 2001).

4.4 SISTEMA TERNÁRIO: COMPLEXO DO ANESTÉSICO E CICLODEXTRINA EM LIPOSSOMA

É uma proposta inicialmente realizada por Loukas et al (1998), evidenciando o avanço da tecnologia para a produção de complexos de inclusão com ciclodextrinas e de vesículas lipossomais como carreadores de fármacos. O termo carregamento ternário é o uso combinado desses dois carreadores, isto é: fármaco sob a forma de complexo de inclusão com ciclodextrina encapsulado em lipossomas.

Fatouros et al. (2001) por estudos mostraram que a principal eficácia/característica de um sistema de duplo carregamento é que o fármaco em ciclodextrina em lipossoma possui a habilidade de complexar-se, em altas quantidades, com as moléculas da ciclodextrina.

Ensaio de liberação *in vitro* mostraram liberação mais prolongada para o sistema de duplo carregamento (betametasona-ciclodextrina-lipossomas) que fármaco encapsulado em lipossomas, comprovando a principal propriedade do lipossoma como “reservatório”, mesmo quando encapsularam complexos com ciclodextrinas (PIEL et al., 2006).

Além disso, a encapsulação do complexo AL/CD em lipossomas mostrou ser capaz de aumento na duração de ação anestésica do fármaco e reduzir o tempo de latência, em relação ao AL em LP. Estes resultados mostraram que o sistema ternário aumentou a eficácia terapêutica do fármaco, evitando o uso de vasoconstritores para prolongar o efeito anestésico (BRAGAGNI et al., 2010).

A presunção da maioria dos estudos está voltada na tentativa de obter formulações lipossomais química e fisicamente estáveis, capazes de tardar a cinética de liberação do fármaco e apresentar um índice de toxicidade menor.

4.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As técnicas de RMN de ^1H no estudo da química supramolecular são utilizadas por serem capazes de definir as interações intermoleculares, promovendo evidências sobre a topologia e formação de complexos através do núcleo do hidrogênio (RMN de ^1H) (KAPUR et al., 2000).

O estudo das interações moleculares é importante para entender e explicar as topologias dos complexos em solução. Neste sentido, as ligações de hidrogênio não só desempenham um papel importante para a estabilidade dessas estruturas, mas também são importantes em todos os processos bioquímicos.

Dessa maneira, diversos métodos de RMN de ^1H serão utilizados para triagem e caracterização dos complexos supramoleculares, tais como Diffusion-ordered Spectroscopy (DOSY) (MORRIS et al., 1992) e Saturation Transfer Difference (STD) (MEYER et al., 2003; CARLOMAGNO, 2005).

Diffusion-ordered Spectroscopy (DOSY): O experimento DOSY, que significa espectroscopia de difusão ordenada, é crescentemente utilizado para a determinação da difusão, levando em consideração o tamanho e forma das moléculas. Os números de aplicações desta técnica em diferentes áreas refletem a importância dos experimentos de difusão como uma valiosa ferramenta para o estudo de associações e movimentos moleculares (PRICE, 1998; SCHLORER et al., 2002).

O coeficiente de difusão é um valor que representa a facilidade com que cada soluto em particular se move em um solvente determinado. Depende de três fatores: tamanho e forma do soluto, viscosidade do solvente e temperatura. Este pode fornecer informações importantes sobre organização molecular, uma vez que o coeficiente de difusão de uma determinada molécula sob certas condições depende do seu peso molecular, tamanho e forma, fica evidente a utilização da difusão para estudo das interações moleculares ou eventos de complexações (STILBS, 1987).

O DOSY é um experimento rápido e proporciona uma visão global da dinâmica translacional dos constituintes de uma mistura, sejam eles moléculas pequenas, macromoléculas, complexos ou agregados moleculares.

O coeficiente de difusão para um complexo é obtido através da troca entre um estado livre e complexado do ligante. Assim, o coeficiente de difusão do complexo livre e ligante livre é representado por D_{compl} e D_{livre} . Desta maneira pode-se obter o valor da fração do ligante complexado (f_{compl}) e a constante de associação (K_a) através das Equações 1 e 2, respectivamente.

$$f_{\text{compl}} = (D_{\text{livre}} - D_{\text{comp}}) / (D_{\text{livre}} - D_{\text{macro}}) \quad (1)$$

$$K_a = f_{\text{compl}} / ((1 - f_{\text{compl}}) [\text{molécula receptora}] - f_{\text{compl}} [\text{ligante}]) \quad (2)$$

Com os valores de difusão obtidos experimentalmente na equação 1, calculam-se os valores aproximados da percentagem das populações de moléculas receptoras complexadas com os ligantes. A partir da fração complexada é possível obter o valor para a constante de associação (K_a) para complexo, utilizando a equação 2.

Saturation Transfer Difference (STD): O método de (STD), do inglês a diferença na transferência de saturação, é um experimento de RMN baseado na transferência de magnetização de hidrogênios da molécula receptora (baixa mobilidade molecular) e hidrogênios lábeis, para hidrogênios do ligante (alta mobilidade molecular) (KALK et al., 1976; MAYER et al., 1999; YAN et al., 2003). Sendo um experimento capaz de identificar interações de baixa afinidade entre ligantes ligados em receptores específicos com constante de dissociação (K_D) entre 10^{-8} a 10^{-3} M.

O método de STD envolve a comparação de espectros de RMN de ^1H do complexo (ligante e molécula receptora) com espectros de complexos sobre irradiação (*pulso on*) e fora de irradiação (*pulso off*). Para o complexo com *pulso on* somente a magnetização dos hidrogênios do receptor é afetada. Os pulsos de radiofrequência (*rf*) são seletivo, e aplicado numa frequência onde ocorrem sinais do receptor e não dos ligantes. Para a irradiação no *pulso off* da ressonância, usa-se a mesma irradiação com o mesmo *rf* no mesmo intervalo de tempo, porém *fora* da ressonância do receptor e do ligante. A diferença dos espectros (ΔI) é gerada pela subtração dos espectros de RMN de ^1H *on* ressonância e *off* da ressonância ($\Delta I = I_{\text{off}} - I_{\text{on}}$) (MAYER et al., 2001).

A magnetização do ligante que interage com a macromolécula é saturada, o que resulta em um sinal com intensidade reduzida na irradiação do *pulso on* ($I_{\text{off}} > I_{\text{on}}$).

O experimento fornece um mapa de interação (Equação 3) que é fornecido somente para os hidrogênios que receberam magnetização, ou seja, os que estão dentro do complexo. Calcula-se a interação através da área dos sinais do espectro de STD dividido pela área dos sinais *fora* de ressonância (CABEÇA, 2009).

$$A_{STD} = I_{fora} - I_{em} / I_{fora} = I_{STD} / I_{fora} \quad (3)$$

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 TIPO DE PESQUISA

A presente pesquisa tem cunho experimental, tendo por finalidade a análise de interações intermoleculares do complexo ternário formado pelo anestésico local ropivacaína e os carreadores 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e o lipossoma de longa circulação (lipossoma furtivo – LF) (RVC/HP- β -CD/LF) através de experimentos de espectroscopia Uv-vis e espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H). Com isso pode-se determinar a proximidade intermolecular, o que indicará a orientação e posicionamento preferenciais do AL no interior da vesícula lipossomal, as forças de interação do complexo ternário, a eficiência e cinética de liberação do fármaco.

5.2 MATERIAL EM ESTUDO

Os solventes, o AL ropivacaína e a HP- β -CD foram adquiridos da Sigma Aldrich. Amostras de fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol e o 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)] – 2000(DSPE-PEG-2000) obtidos da Avast Lipids.

Os presentes reagentes foram adquiridos via recursos do Projeto Universal CNPq Processo: 448908/2014-0.

5.3 MÉTODOS

5.3.1 Preparação do complexo binário RVC/HP- β -CD

Em uma solução tampão fosfato em pH 7,4 foi preparada uma solução de HP- β -CD variando na concentração de 1, 2, 3, 5, 6 e 8 mM e em seguida adicionado um excesso da solução tampão de RVC de 10 mM. A mistura foi agitada por 5 minutos e deixada por 24 horas em mesa agitadora. Uma alíquota de 200 μ L foi retirada, filtrada em membrana (millexfilter, Millipore, USA com poro de 0,45 μ m) e analisadas em espectrofotômetro UV-vis (item 6.3.3.1).

Amostras do complexo com concentrações de 10 mM de RVC e 10 mM de HP- β -CD (1:1 razão molar) (Araujo et al., 2008) foram preparadas em D₂O com o objetivo de adquirir os espectros de RMN de ¹H.

5.3.2 Preparação do complexo ternário RVC/HP- β -CD/LF

Os lipossomas furtivos foram preparados a partir dos compostos de fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol (Sigma Aldrich) e de DSPE-PEG-2000 (Avast lipids) a uma razão molar de 54:41:5. Os componentes foram solubilizados em clorofórmio (CHCl₃), que posteriormente foi retirado à temperatura ambiente para obtenção de um filme lipídico (HAERI et al., 2013). Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com o complexo binário (RVC/HP- β -CD), levado ao vortex por 15 minutos e levado a mesa agitadora por 24 horas. A suspensão lipossomal formou lipossomas multilamelares, que por sua vez foram extrusados em membrana de policarbonato de 400 nm por um mini-extrusor Avanti, para a obtenção de vesículas unilamelares pequena (SUV).

Outro filme lipídico de mesma concentração foi hidratado com o complexo binário, preparado anteriormente em D₂O para a aquisição de espectros de RMN de ¹H, e atribuir os referentes hidrogênios pertencentes ao complexo.

5.3.3 Eficiência de complexação por Uv-vis

Qualquer metodologia utilizada para mapear a complexação de anestésicos locais em ciclodextrinas será pautada nas mudanças nas propriedades físico-químicas do complexo, como exemplo a determinação de parâmetros como a solubilidade, a constante de associação (K_a), alterações na absorbância (UV-vis) e a eficiência da complexação (EC) (LOFTSSON et al., 2007).

Para cálculo da eficiência de complexação utilizou-se o complexo binário (solução de HP- β -CD variando na concentração de 1, 2, 3, 5, 6 e 8 mM com excesso de ropivacaína) e análise espectroscopia de UV-vis (Spectrometer Lambda 25). A partir disso foi possível calcular a eficiência da complexação (EC) de acordo com a Equação 4 (LOFTSSON et al., 2005, 2007):

$$EC = \frac{\frac{[RVC]}{[CD]}}{[CD]} = \frac{b}{1-b}$$

onde b = coeficiente angular da reta.

5.3.4 Ressonância magnética nuclear

Para as atribuições dos referentes hidrogênios pertencentes a cada molécula do complexo binário de ternário. Alíquotas de 600 μ L foram levadas ao espectrômetro de ressonância em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro. Os experimentos foram conduzidos a 25 °C usando-se como referência o pico do deutério residual (4,70 ppm) utilizado como trava do campo e ajuste da homogeneidade do campo magnético.

Os experimentos de RMN foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade de Londrina – UEL, o equipamento utilizado foi o Bruker 400 MHz para a frequência de hidrogênio, realizados com “softwares” padrões Bruker sob condições típicas.

5.3.5 Experimento de DOSY

Foram utilizadas 16 amplitudes diferentes de gradientes e com otimização do tempo de difusão de 0,06 s para os experimentos. O programa de processamento de

dados utilizado foi o DOSY Toolbox. Através da média aritmética foram calculados os coeficientes para cada sinal de cada espécie, com os respectivos desvios padrões. Coeficientes com valores diferentes daqueles apresentados pela maioria foram descartados.

Os resultados do método de análise DOSY são espectros de duas dimensões (2D) com deslocamentos químicos de RMN de ^1H em um eixo e o coeficiente de difusão calculado ($10^{-10}\text{m}^2\text{s}^{-1}$) no outro eixo.

5.3.6 Experimento de STD

Todos os experimentos de STD foram seletivamente saturados usando sequência de pulsos Gaussianos em -0,5 ppm para aquisição *on* ressonância e 30 ppm para a aquisição *off* ressonância. Os experimentos foram processados utilizando o software TOP SPIN.

6 RESULTADOS

Para obter a adsorção máxima do fármaco RVC foi realizada uma curva para encontrar sua linearidade por meio do espectro de varredura (Figura 10) em triplicata, a qual foi observada que o maior pico de absorção foi em 263 nm e com maior intensidade para a concentração de 3,6 mM. Após foi realizado curva de calibração da RVC com concentrações variando de 0,75-3,6 mM (Figura 11) pela sua respectiva absorvidade, que apresentou coeficiente de correlação linear de 0,97686.

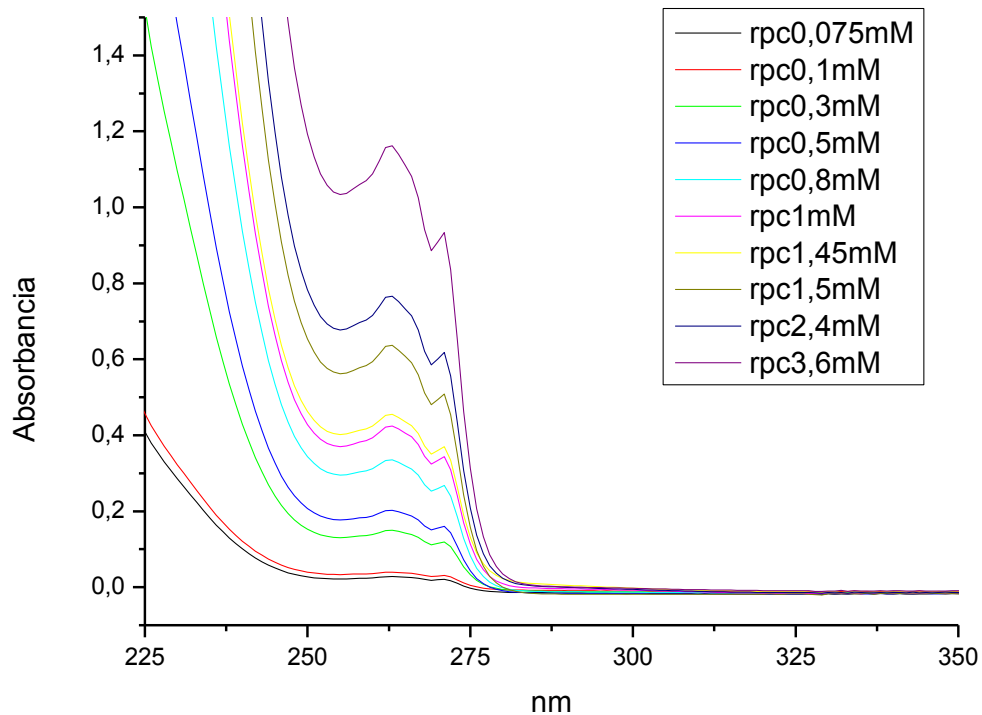


Figura 10 – Espectro de absorbância da RVC [0,075-3,6 mmol L⁻¹]
Fonte: Dados da pesquisa.

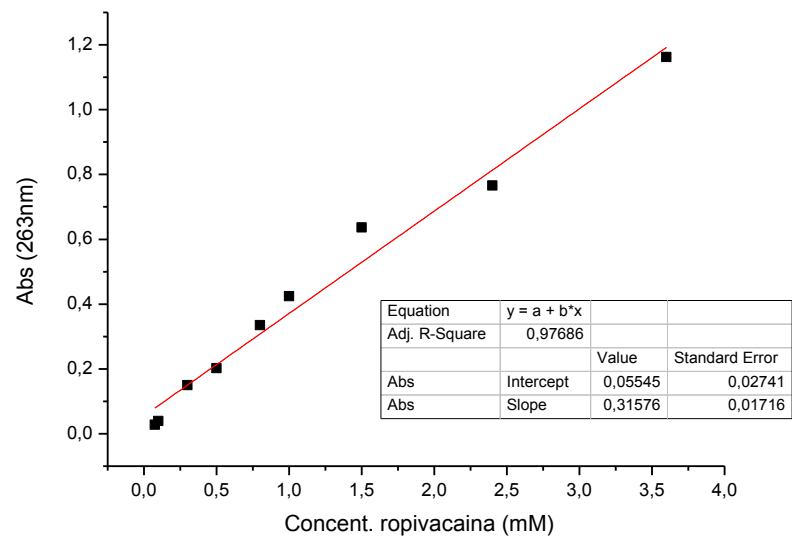


Figura 11 - Curva de calibração para RVC medida por absorção em 263 nm
Fonte: Dados da pesquisa.

Com a curva de calibração pôde-se correlacionar e obter os valores para o coeficiente linear e coeficiente angular. Por entremeio destes obtêm-se o valor da concentração de RVC, com y = absorbância e x = concentração de RVC.

6.1 EFICIENCIA DE COMPLEXAÇÃO

A eficiência de encapsulação foi determinada através da espectroscopia Uv-vis, realizada com amostras do complexo binário RVC/HP- β -CD, porém a concentração do fármaco foi mantida fixa (10 mM) enquanto a concentração de ciclodextrina variava de 1-8 mM. O espectro pode ser observado na Figura 12.

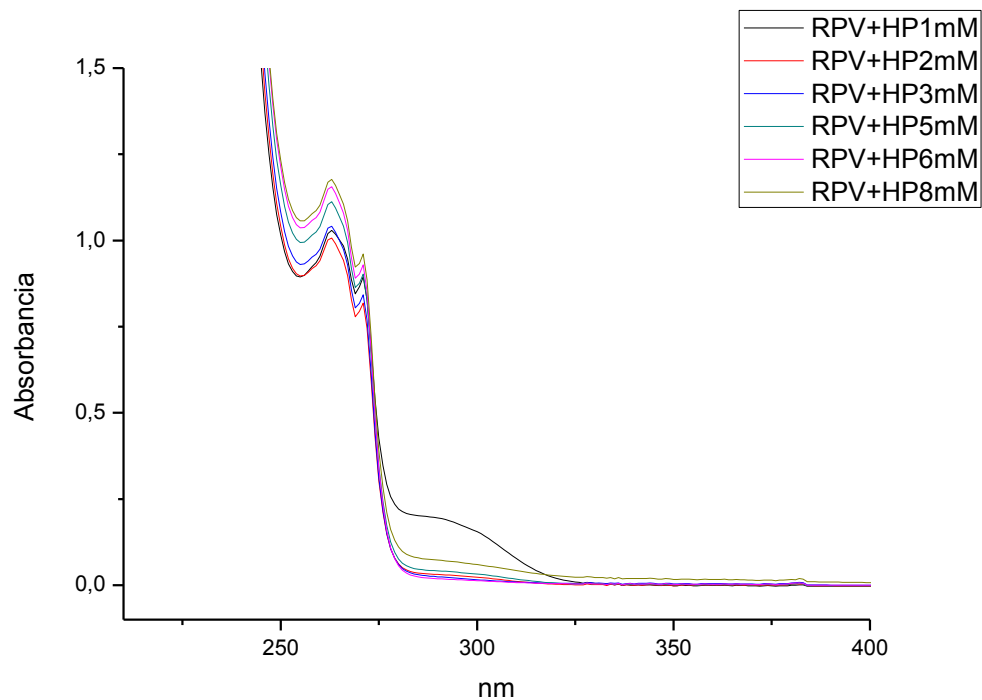


Figura 12 - Espectro de Uv-vis para amostra de RPV (5 mM) e HP-β-CD com massa variável
Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de absorvância obtidos na Figura 12 foram usados para encontrar o valor da concentração de RVC encapsulada, com auxílio da equação da reta da curva de titulação (Figura 10). Esse resultado forneceu o gráfico da Figura 13, onde lê-se concentração de RVC no eixo y e concentração de HP-β-CD no eixo x.

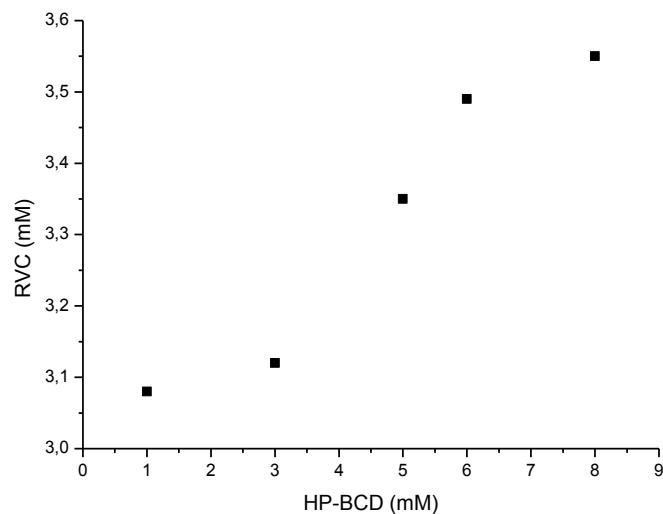


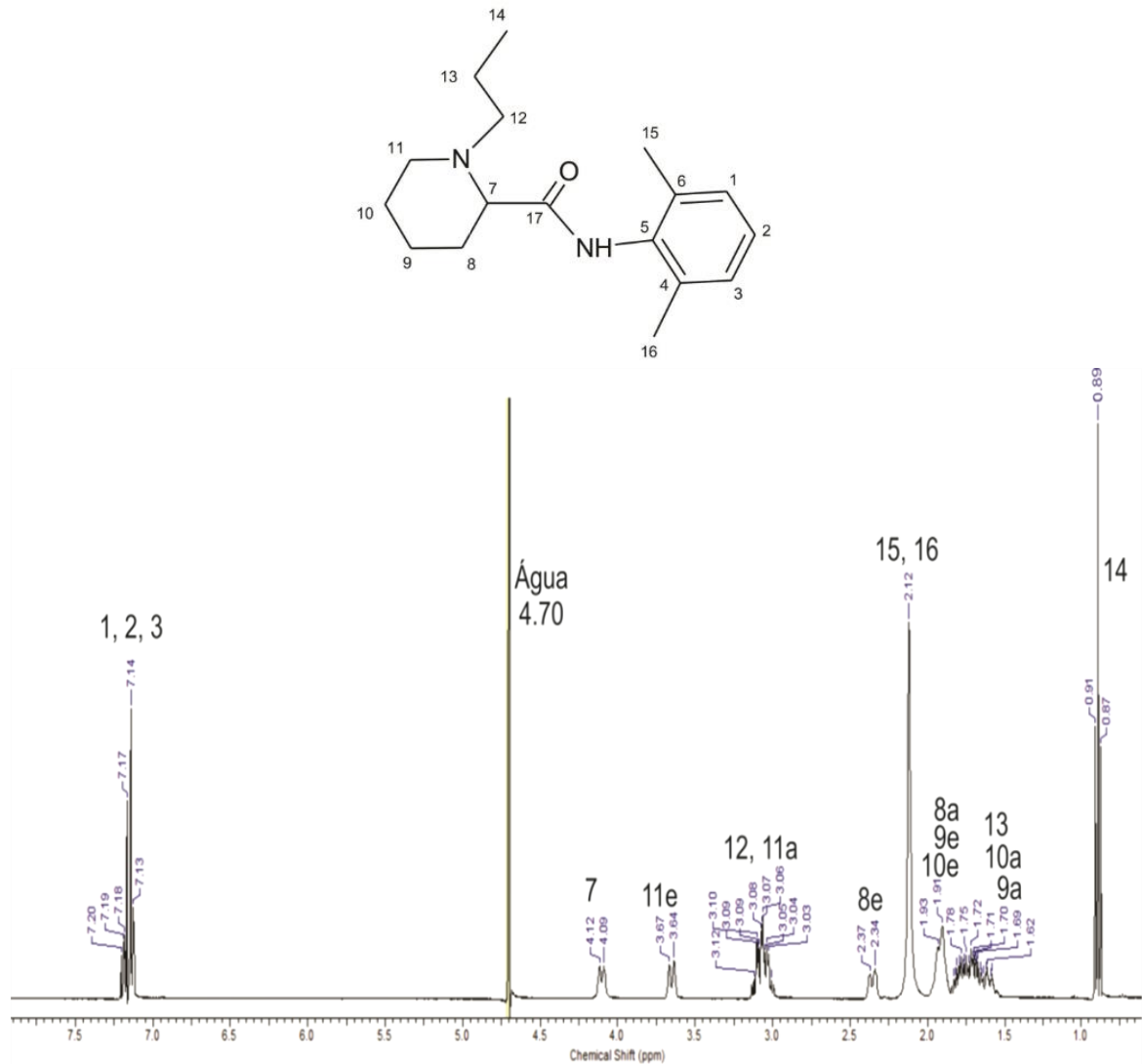
Figura 13 -Diagrama para RVC com aumento de HP-β-CD
Fonte: Dados da pesquisa.

A partir do valor de b (coeficiente angular 0,075) da Figura 13 pode-se obter a eficiência de complexação através da Equação 4 apresentada no item 5.3.3. O valor encontrado foi de 0,0810, o que corrobora com os valores encontrados na literatura 0,0896 (ARAUJO et al., 2008), e está de acordo devido a hidrofobicidade intermediária da RVC. A pequena variação de resultado pode ser explicada pelo baixo valor de $R = 0,91046$. O resultado mostra que ocorreu formação do complexo, entretanto com baixa afinidade.

6.2 ANÁLISE DOS ESPECTROS DE RESSONÂNCIA (RMN DE ^1H)

A topografia e caracterização do complexo de inclusão proposto no trabalho foram realizadas primeiramente por de experimentos de ressonância magnética nuclear de ^1H . Os experimentos realizados abrangeram o complexo por inteiro, feito para as moléculas de RVC, HP- β -CD, LF, RVC/HP- β -CD e RVC/HP- β -CD/LF, fornecendo evidências diretas da formação dos complexos.

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam os espectros de RMN de ^1H do anestésico local RVC, ciclodextrina (HP- β -CD) e do lipossoma furtivo (LF), respectivamente. O deslocamento químico dos hidrogênios de ambas as moléculas, assim como a atribuição dos hidrogênios foram identificados com auxílio de dados da literatura (PIRNAU et al., 2013; FRACETO et al., 2007).



**Figura 11 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) da RVC [10 mmol L^{-1}]; a (axial), e (equatorial)
Fonte: Dados da pesquisa.**

As atribuições feitas para a molécula de RVC livre no espectro de RMN da Figura 11 tem-se sinais em 7,14 ppm que são atribuídos aos hidrogênios aromáticos da molécula. O hidrogênio do carbono 7 se encontra no pico 4,12 ppm. Os hidrogênios 12 e 11_{a(axial)} estão localizados entre 3-3,12 ppm seguidos dos hidrogênios 8_a, 9_e (equatorial) e 10_e localizados entre 1,9-1,94 ppm (ARAUJO, 2008). Os hidrogênios 13, 10_a e 9_a estão localizados entre 1,6-1,8ppm. As metilas 15 e 16 estão presentes como um singlete em 2,12 ppm. O sinal da metila 14, apresenta-se como um tripleto localizado em 0,89 ppm.

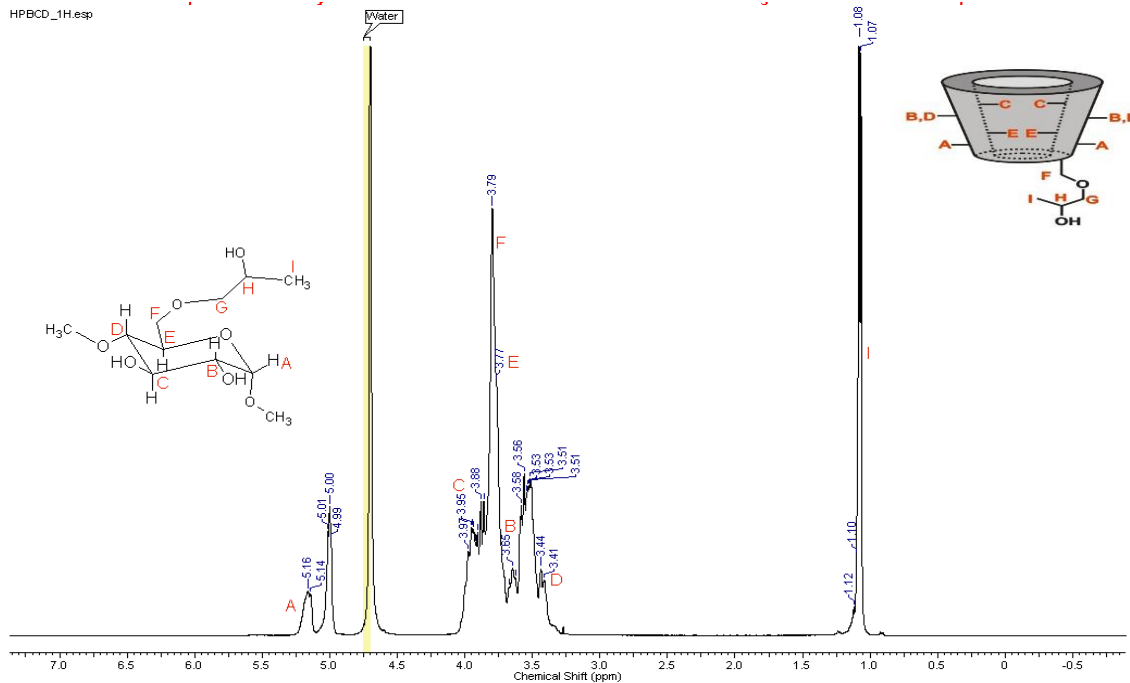


Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) da molécula de 2-hioxipropil- β -ciclodextrina [10mmol L^{-1}]
Fonte: Dados da pesquisa.

O espectro de RMN de ^1H obtido para a molécula de HP- β -CD (Figura 12) apresenta hidrogênios nomeados de A até I. O deslocamento referente ao sinal 1,07 ppm é atribuído à metila da hidroxipropil ligada à ciclodextrina ao hidrogênio da HI. Em 5,16 ppm observa-se o H anomérico. Entre 3,4 ppm e 4 ppm estão localizados os demais hidrogênios da molécula.

A Figura 13 mostra o espectro de ^1H do LF, observam-se sinais largos em função do tamanho da macroestrutura.

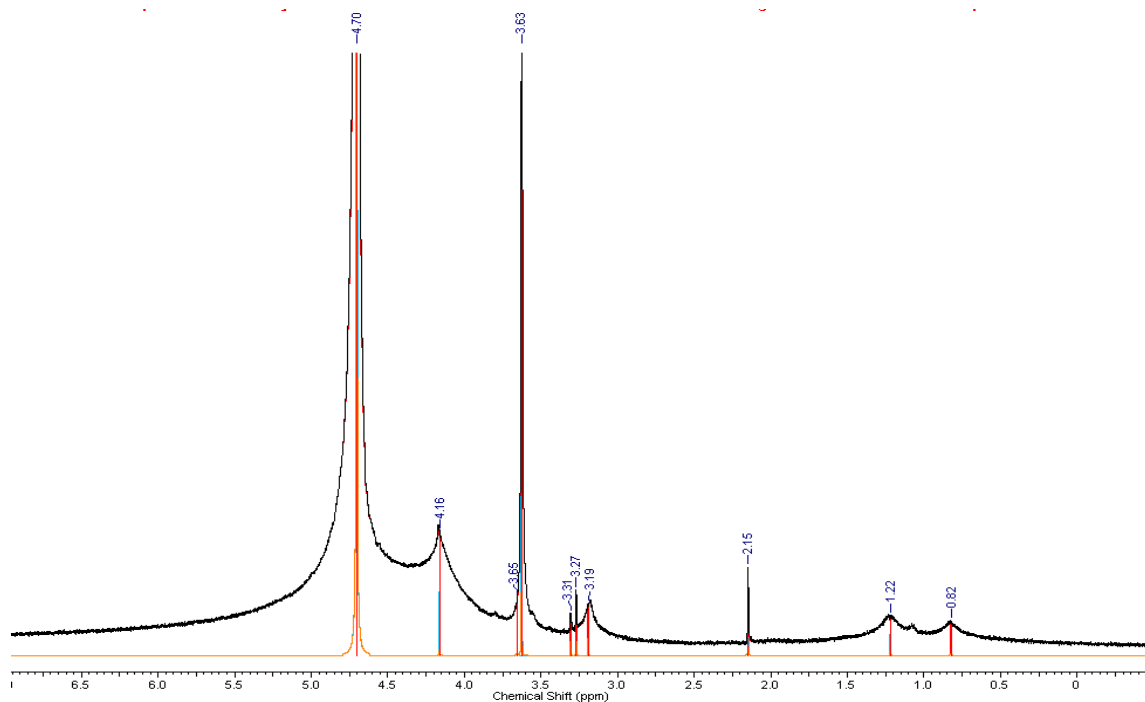


Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do Lipossoma Furtivo [10 mmol L^{-1}]
Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 14 e 15 apresentam os espectros de RMN de ^1H pertencentes ao complexo binário RVC/HP- β -CD e ao complexo ternário, respectivamente.

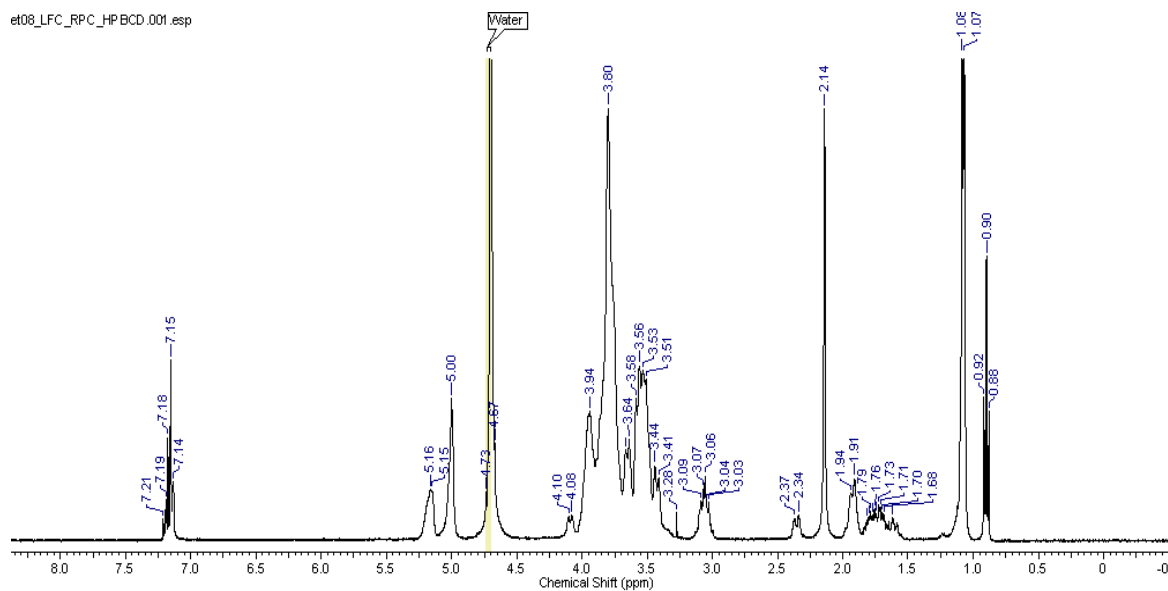


Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do complexo de inclusão RVC/HP- β -CD [10 mmol L^{-1}]
Fonte: Dados da pesquisa.

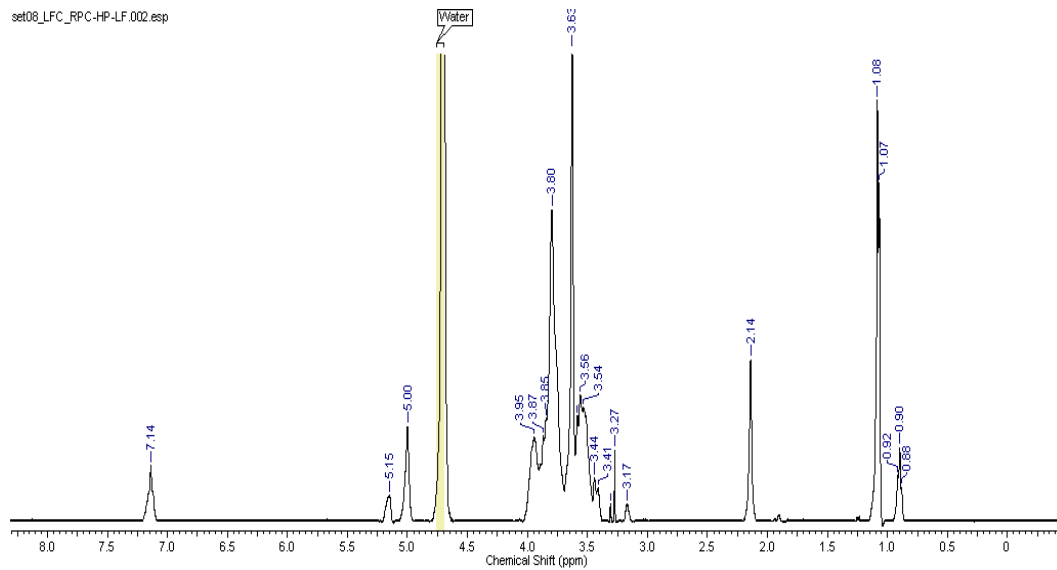


Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do complexo ternário RVC/HP- β -CD/LF [50 mmol L^{-1}]

Fonte: Dados da pesquisa.

O primeiro indício de formação de complexo é a variação no deslocamento químico. Assim, quando a RVC, molécula hospede, está inserida na cavidade interna da ciclodextrina, causa mudanças no ambiente químico dos hidrogênios tanto da ciclodextrina quanto da RVC. Os valores de deslocamento químico do composto RVC livre e do complexo RVC/HP- β -CD foram apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Atribuição e deslocamento químico dos ^1H da RVC (10 mM), HP- β -CD (10 mM) e LF (10 mM), em D_2O

H	RVC (ppm)	RVC/HP- β CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	RVC/HP- β CD/LF (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
1,2,3 aromático	7,14	7,15	0,01	7,14	-
7	4,12	4,10	-0,02	-	-
8e	2,37	2,37	0	-	-
11e	3,67	?	-	-	-
12, 11 _a	3,08	3,06	-0,02	3,17	0,09
15, 16	2,12	2,14	0,02	2,14	0,02
14	0,89	0,9	-0,01	0,90	0,01

Fonte: Dados da pesquisa.

Os maiores valores de variação de deslocamento químico dos ^1H da RVC foram para os hidrogênios 11a, 12, 7, 15 e 16 ($\Delta\delta$ -0,02ppm). A pequena variação de deslocamento químico indica que a parte do ciclo piperidínico pode estar

interagindo com a cavidade da HP- β -CD com maior intensidade do que a parte aromática da RVC.

A Tabela 2 também apresenta valores de deslocamento químico da RVC em complexo RVC/HP- β -CD/LF. Observa-se que a variação no deslocamento químico foi muito pequena, com exceção dos H12 e H11_a, indicando que a molécula de RVC continua dentro do HP- β -CD, também dos os sinais H12 e H11_a em destaque, concluindo que a RVC continua encapsulada mesmo depois do segundo carreamento via LF.

Quando levamos em consideração a variação do deslocamento químico dos hidrogênios da HP- β -CD não se observa grandes variações (Tabela 3). A sobreposição dos sinais dificulta uma análise mais correta dos dados.

Tabela 3 - Sinais de RMN de ¹H da HP- β -CD, RVC/HP- β -CD e RVC/HP- β -CD/LF (Deslocamentos observados nos sinais de HP- β -CD)

H	HP- β -CD (ppm)	RVC/HP- β -CD (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
A	5,16	5,15	0,01
B	3,65	-	-
C	3,95	3,95	0
D	3,44	3,44	0
E	3,77	-	-
F	3,79	3,80	0,01
I	1,07	1,08	0,01

Fonte: Dados da pesquisa.

Desta maneira, para confirmar a formação complexo, utilizaremos os recursos adquiridos via experimentos de DOSY e STD.

6.3 ANÁLISE DOS ESPECTROS DE RMN DOS EXPERIMENTOS DOSY

O experimento RMN-DOSY foi realizado para obtenção de mais informações sobre o complexo binário e ternário, a partir dos valores para a fração molar (f_x) e a

constante de associação (K_a). Estes dados foram obtidos através dos coeficientes de difusão (D) resultantes dos experimentos.

Foram realizados experimentos DOSY para o RVC em sua forma livre (Figura 16), HP- β -CD livre (Figura 17), LF livre (Figura 18), para o complexo binário RVC/HP- β -CD (Figura 19) e para o complexo ternário (RVC/HP- β -CD/LF) (Figura 19).

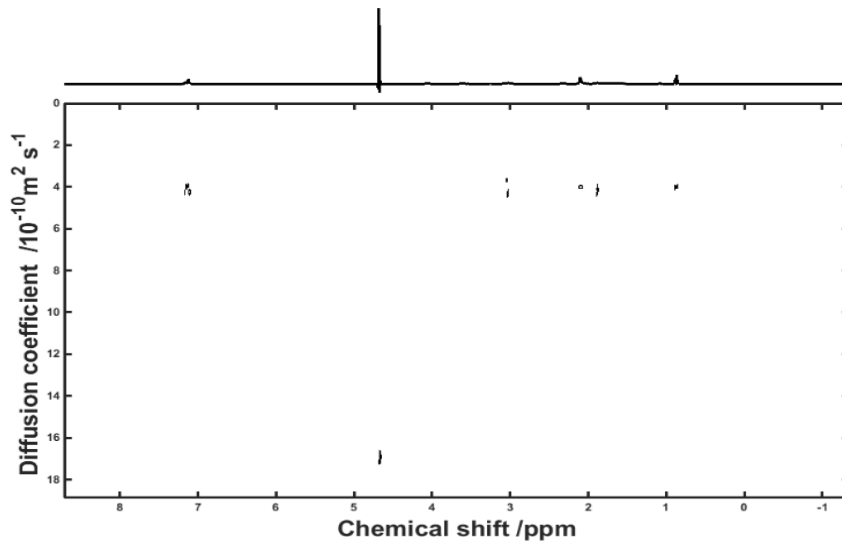


Figura 16 -Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) da RVC [10mmol L^{-1}]

Fonte: Dados da pesquisa.

Com o experimento obteve-se a média dos coeficientes de difusão da molécula e RVC: $4,08 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

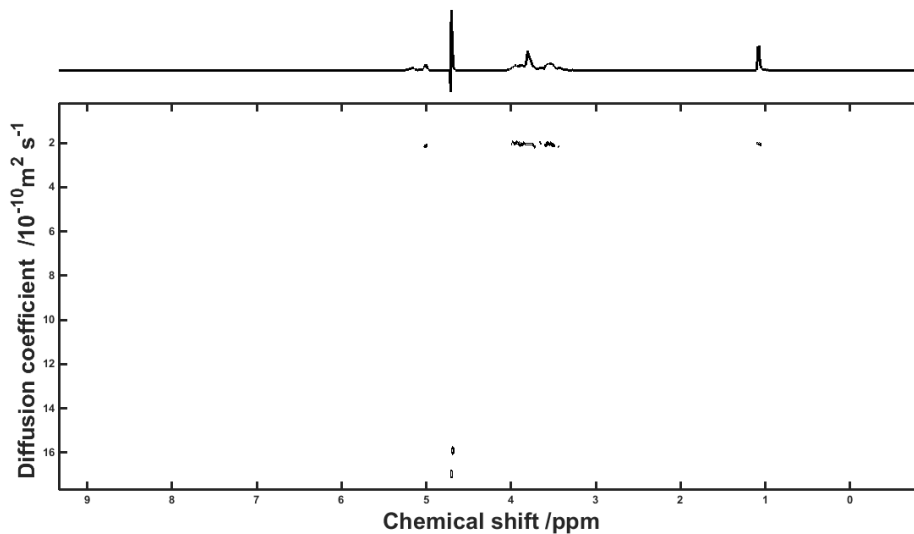


Figura 17 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) da HP- β -CD [10mmol L^{-1}]

Fonte: Dados da pesquisa.

Com o experimento obteve-se a dos coeficientes de difusão da molécula de HP- β -CD: $2,0410^{-10}m^2s^{-1}$.

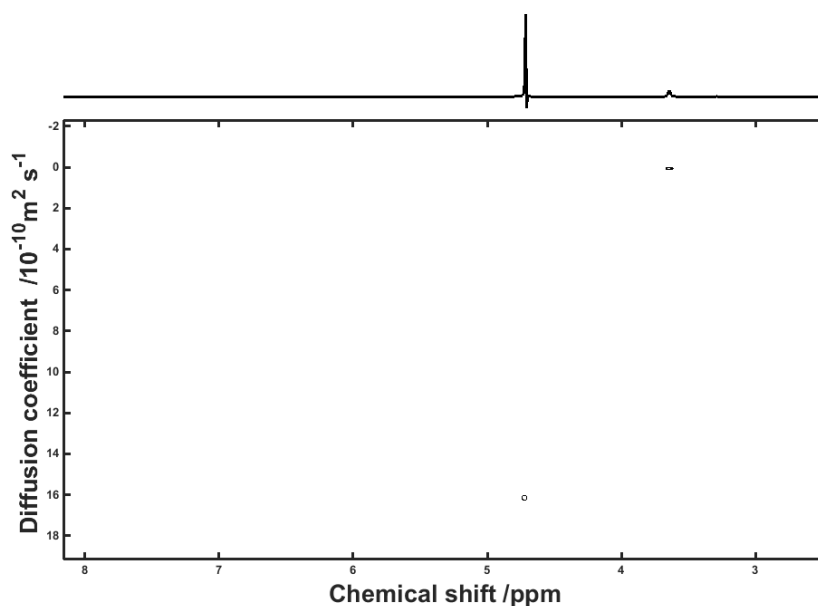


Figura 18 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do LF [10 mmol L^{-1}]
Fonte: Dados da pesquisa.

Com o experimento obteve-se a média dos coeficientes de difusão do Lipossoma Furtivo: $0,15 \cdot 10^{-10}m^2s^{-1}$.

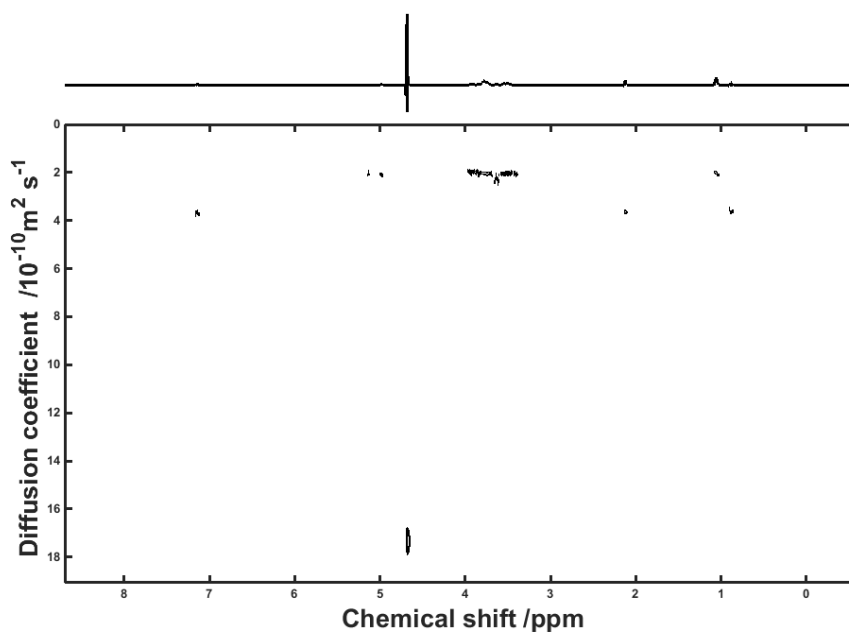


Figura 19 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do complexo de inclusão RVC/HP- β -CD [10 mmol L^{-1}].
Fonte: Dados da pesquisa.

Com o experimento obteve-se a média dos coeficientes de difusão do complexo de inclusão RVC/HP- β -CD: $3,64 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

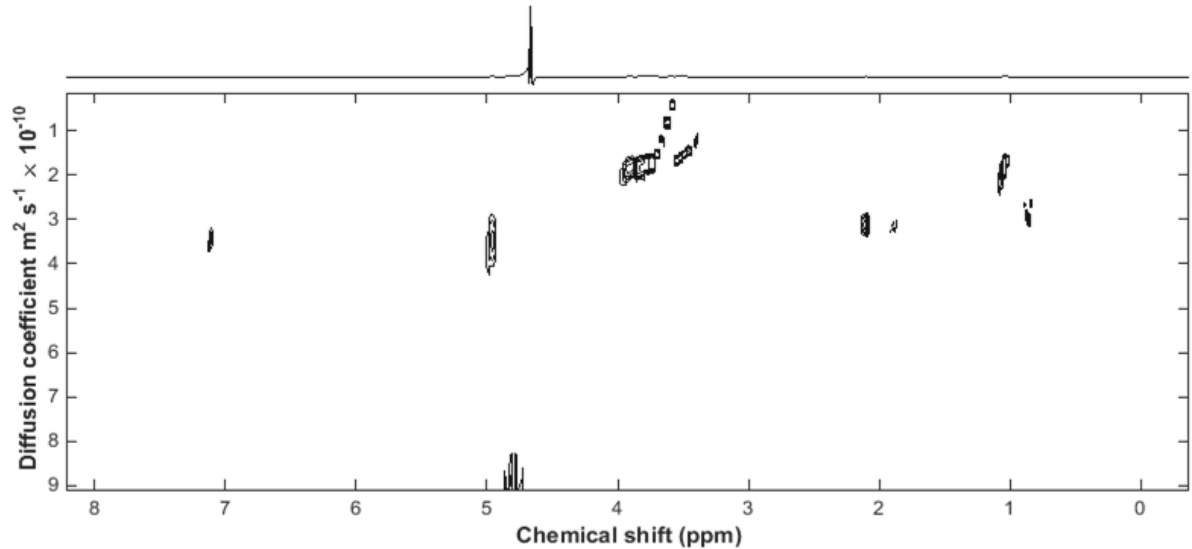


Figura 20 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em 4,7 ppm) do complexo inclusão RVC/HP- β -CD/LF [10mmol L^{-1}]
 Fonte: Dados da pesquisa.

Com o experimento obteve-se a média dos coeficientes de difusão do complexo de inclusão RVC/HP- β -CD/LF: $3,14 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

A partir dos valores de D obtidos, pôde-se calcular a do ligante complexado (f_{compl}) seguindo a Equação 2 (pág. 21) e com este valor determinou-se a constante de associação (K_a) Equação 3 (pág. 21). Os valores de D , f_x e K_a encontrados estão dispostos na Tabela 4, a qual os dados foram compilados para melhor assimilação e comparação dos resultados.

Tabela 4 – Coeficientes de Difusão (D) do RVC, HP- β -CD, RVC/HP- β -CD e RVC/HP- β -CD/LF. E constante de associação (K_a) e fração molar (f_x) dos complexos RVC/HP- β -CD e RVC/HP- β -CD/LF

Composto/ Complexo	D ($10^{-10}\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	Fração molar do complexo f_x 100	K_a L/mol
RVC	4,08	-	-
HP- β -CD	2,04	-	-
LF	0,15	-	-
RVC/HP- β -CD	3,64	0,22	37
RVC/HP- β -CD/LF	3,14	0,24	43

Fonte: Dados da pesquisa.

Ao analisar os espectros das substâncias livres pode-se observar uma grande diferença nos valores de $D=4,08 \cdot 10^{-10}\text{m}^2\text{s}^{-1}$ para a RVC livre e $D=2,04 \cdot 10^{-10}\text{m}^2\text{s}^{-1}$ para HP- β -CD (Tabela 4). Isso ocorre em função da molécula de RVC apresentar uma estrutura menor, o que gera uma difusão mais rápida em relação a HP- β -CD que se difunde mais lentamente devido a sua maior e mais complexa estrutura. A análise do espectro do complexo RVC/HP- β -CD (Figura 18) evidencia que a difusão do RVC em sua forma complexada sofreu uma redução ($D=3,64 \cdot 10^{-10}\text{m}^2\text{s}^{-1}$) comparada a sua forma livre, afirmando a formação do complexo de inclusão. Sobretudo, a redução no valor do coeficiente de difusão foi ainda maior para o complexo ternário (RVC/HP- β -CD/LF) com o valor médio de $D=3,14 \cdot 10^{-10}\text{m}^2\text{s}^{-1}$.

Assim como afirma Lin et al. (1989), a formação de complexo de inclusão numa solução contendo um fármaco e ciclodextrina pode ser observada por redução do seu coeficiente de difusão. Quanto maior a diferença entre D em solução com ciclodextrina comparativamente a D obtida a partir da solução sem ciclodextrina, maior a fração do complexo de inclusão de fármaco.

Nesse caso, foi obtida uma fração de complexo da ordem de 22% para o complexo RVC/HP- β -CD e 24% RVC/HP- β -CD/LF, ou seja, aproximadamente 20% da RVC esta complexada. Para a constante de associação tem-se 37 e 47 L/mol do complexo RVC/HP- β -CD e RVC/HP- β -CD/LF respectivamente. Observa-se valores baixos de K_a , uma vez que o baixo valor de eficiência de complexação, que vai de encontro com o trabalho de Araujo et al. (2008). O sistema ternário também apresentou um baixo valor para a fração complexada e conseqüentemente também para a constante de associação.

6.4 AVALIAÇÃO DO COMPLEXO TERNÁRIO RVC/HP- β -CD/LF PELO EXPERIMENTO DE STD

O experimento de STD proporcionou outra análise do complexo ternário RVC/HP- β -CD/LF, análise esta que fornece informações dos hidrogênios da molécula RVC e do HP- β -CD que estão encapsulados na vesícula do LF (Figura 21).

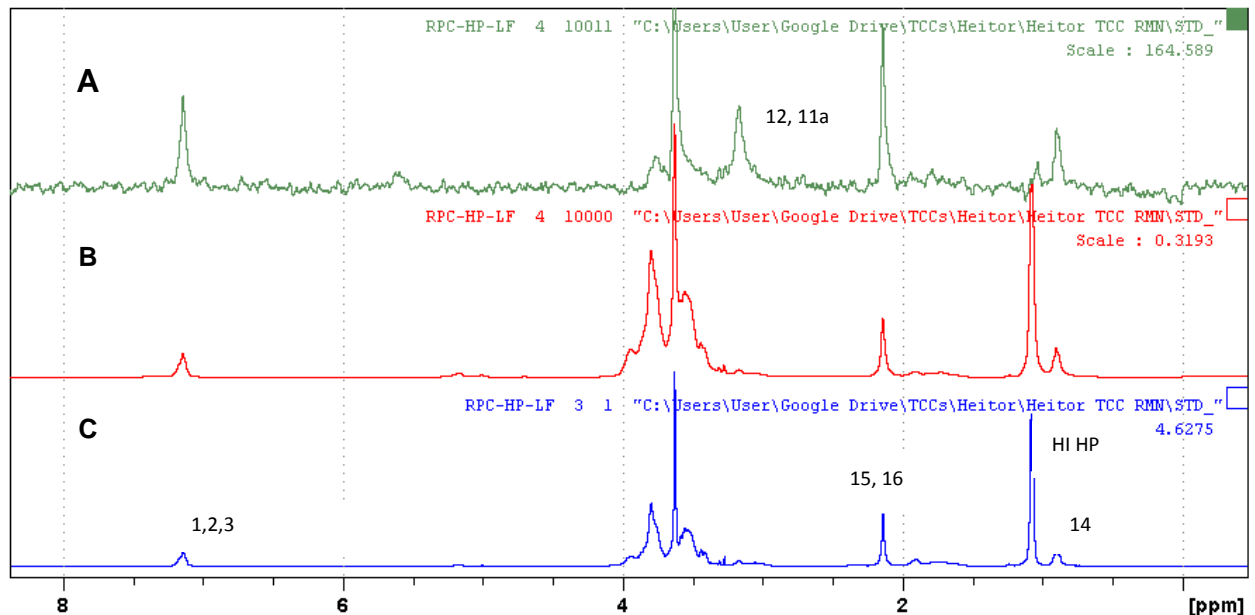


Figura 21 - A) Espectro de STD (irradiando em $-0,5$ ppm). B) Espectro controle (irradiando em 30 ppm). C) Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O / referência H_2O residual em $4,7$ ppm) do complexo RVC/HP- β -CD/LF [50 mmol L^{-1}]. Tempo total de saturação $2,55$ s
Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 21C refere ao espectro de ^1H RMN do complexo ternário e pode se observar que os sinais da RVC estão alargados devido ao grau de interação com a vesícula lipossomal. A Figura 21B refere-se ao espectro controle (fora de ressonância) e a Figura 21A ao espectro de STD. Na região de 3 a 4 ppm os sinais são mais intensos, pois são referentes aos hidrogênios da HP- β -CD do polímero PEG (que reveste a superfície do LF). Em função da sobreposição dos sinais essa região foi descartada para análises de STD.

O espectro de STD (irradiado em $-0,5$ ppm) indicou que ocorreu a transferência de saturação do lipossoma para hidrogênios da RVC e HP- β -CD indicando que ambas as moléculas foram encapsuladas no LF.

Os hidrogênios da RVC com maior intensidade de transferência de saturação foram os do anel aromático 100% (H1, H2, H3), seguidos do H15-H16 e H14 34% e

35% respectivamente. No espectro de STD também aparece o sinal H12 e H11_a, porém não foi possível calcular o valor de transferência de STD, pois sua intensidade não é significativa no espectro controle, ou seja, outros sinais apresentam maior intensidade e sobrepõem a sua intensidade máxima. Entretanto, pode-se considerar que ele está complexado na vesícula lipossomal.

Os hidrogênios da HP- β -CD também apresentaram transferência de saturação. Os hidrogênios da região entre 3-4 ppm não foram levados em consideração em função da sobreposição dos sinais. O H1 apresentou 0,4% na transferência de saturação, indicando o menor valor de transferência (Tabela 5).

Tabela 5 – Dados obtidos nos experimentos de STD

Frequência (ppm)	Área STD	Área fora de ressonância	Mapa de STD normalizado.
HI HP- β -CD: 1,07	0,00018	6,5079	0,4%
H14 RVC: 0,90	0,0035	1,3873	34%
H1, H2, H3 RVC:7,14	0,0074	1,0000	100%
H15, H16 RVC:2,14	0,0049	1,8851	35%

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de transferência de saturação do LF para os hidrogênios RVC e HP- β -CD confirmam a encapsulação do complexo de inclusão RVC/HP- β -CD nas vesículas de LF. O espectro de STD mostra que a parte aromática apresenta maior interação com a vesícula lipossomal, uma vez que os Hs da N-propil amina e do anel piperidínico também estão interagindo com o LF, porém, com menor intensidade.

8 CONCLUSÃO

O primeiro indício de complexação entre a molécula de RVC e HP- β -CD foi encontrado analisando o deslocamento químico nos espectros de RMN de ^1H da espécie livre RVC e complexada em HP- β -CD. Os valores de variação de deslocamento químico também sugerem que a parte do anel está inserida na cavidade hidrofóbica da HP- β -CD.

Os resultados RMN-DOSY mostraram que o coeficiente de difusão da RVC livre foi de $4,08 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ e depois de complexado pelo primeiro carregador (ciclodextrina) diminuiu para $3,64 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$, o que indica interação da molécula de RVC com a HP- β -CD. A fração complexada e a constante de associação foram baixas indicando fraca interação tanto para o sistema binário quanto para o sistema ternário. Entretanto, foi possível observar que no sistema ternário os resultados mostraram que a interação da RVC com o sistema hospede foi um pouco maior (K_a 43 L/mol) do que para o binário (37 L/mol).

A encapsulação do complexo RVC/HP- β -CD em LF foi comprovada através dos experimentos obtidos de RMN-STD. Ambas as moléculas de RVC e HP- β -CD foram encapsuladas, uma vez que o experimento de STD indicou transferências de saturação do LF para os hidrogênios externos da HP- β -CD e hidrogênios da molécula de RVC.

Após a comprovação da encapsulação pode concluir que o trabalho realizado com uso das técnicas de RMN foi de grande satisfação. O que abre portas para novos estudos, visando o melhor sistema para proteção do fármaco e liberação, uma vez que o campo de estudo em química supramolecular cresce exponencialmente.

REFERÊNCIAS

ANCHIÊTA-JÚNIOR, J. J.; LIMA, H. R. S.; CAVALCANTE, I. M. F.; LEITE, J. R. de S. de A.; MAGALHÃES, N. S. S.; ROLIM, H. M. L. Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de anuros: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas. **Rev. ciênc. farm. básica apl.**, v. 35, n. 1, p. 119-125, 2014.

ARAUJO, D. R.; DE PAULA, E.; FRACETO, L. F. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Qim. nova.** v. 31, n. 7, p. 1775-1783. 2008.

ARAUJO, D. R.; PINTO, L. M. A.; BRAGA, A. F. A.; PAULA, E. de. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. **Rev. bras. anesthesiol.**, v. 53, n. 5, p. 653-661, 2003.

BANERJEE, D.; BROEREN, M.; VAN GENDEREN, M.; MEIJER, B.; RINALDI, P. An NMR Study of the Supramolecular Chemistry of Modified Poly(propyleneimine) Dendrimers. **Macromolecules**, v. 37, n. 22, p. 8313-8318, 2004.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C.; Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Molecular Biology**, v. 13, p. 238-252, 1965.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. de; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Rev. bras. ciênc. farm.**, v. 2, n. 43, p. 167-179, 2007.

BEN-YEHUDA, A.; JOSEPH, A.; BARENHOLZ, Y.; ZEIRA, E.; EVEN-CHEN, S.; LOURIA-HAYON, I.; BABAI, I.; ZAKAY-RONES, Z.; GREENBAUM, E.; GALPRIN, I.; GLUCK, R.; ZURBRIGGEN, R.; KEDAR, E. Immunogenicity and safety of a novel IL-2-supplemented liposomal influenza vaccine (INFLUSOME-VAC) in nursing-home residents. **Vaccine**, v. 21, n. 23. 2003.

BOERMAN, O.C.; LAVERMAN, P.; OYEN, W.J.G.; CORSTENS, F.H.M.; STORM, G. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. **Progress in Lipid Research**, v. 39, p. 461-475, 2000.

BRAGAGNI, M.; MAESTRELLI, F.; MENNINI, N.; GHELARDINI, C.; MURA, P. Liposomal formulations of prilocaine: effect of complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin on drug anesthetic efficacy. **J Liposome Res.** 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário terapêutico nacional: Rename 2010.** Brasília, DF. 2010. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/formulario_terapeutico_nacional_2010.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2016.

CABEÇA, L.F. **Tese de doutorado “Topologia de complexos entre fármacos/ β -ciclodextrinas/lipossomas/células, aplicando técnicas de ressonância magnética nuclear”.** 2009. Instituto de Química, Departamento de Orgânica. Universidade de Campinas – Unicamp – Campinas-SP.

CARLOMAGNO, T. Ligand-target interactions: what can we learn from NMR? **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 3, p. 245-266, 2005.

CEREDA, C. M. S.; ARAUJO, D. R.; BRUNETTO, G. B.; DE PAULA, E. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** v. 235, n. 7. 2004.

CHRISTIE, W. W. Phosphatidylcholine and Related Lipids. **The lipidhome**, 2016. Disponível em: <<http://www.lipidhome.co.uk/lipids/complex/pc/index.htm>>. Acesso em: 11 jun. 2016.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev. ciênc. farm. básica apl.**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

DE JONG, R. H. **Local Anesthetics.** Illinois, Springfield, 1994.

DE PAULA, E.; SHREIER, S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. **Braz. j. med. biol. Res.** v. 29, p. 877-894. 1996.

DIEDERICH, F. 40 Years of Supramolecular Chemistry. **Angewandte Chemie-International Edition**, v.46, n. (1-2), p. 68-69, 2007.

DINCEL, A.; BASCI, N. E.; ATILLA, H.; BOAURT, A. Development and validation of an HPLC-UV-Vis method for the determination of proparacaine in human aqueous humour. **Chromatographia**, v. 66, p. 51-56, 2007.

DISAPIO, A. J. Microporous entrapment polymers offer new options for formulators. **Global Cosmetic Industry**, v. 165, n. 3, p. 28-35, 1999.

FATOUROS, D. G.; HATZIDIMITRIOU, K.; ANTIMISIARIS, S. G. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: comparison of membrane integrity and drug release. **Eur. J. pharm. Sci.** n. 13(3), p. 287-296, 2001.

FELDMAN, H. S.; DVOSKIN, SOFYA, D. V. M.; RICHARD, A. G.; DOUCETTE, ANN MARIE, B. A. Antinociceptive and motor-blocking efficacy of ropivacaine and bupivacaine after epidural administration in the dog. **Regional Anesthesia**, v.21, n.4, p.318-326, 1996.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (U.S. FDA). GRAS notices, 2015.

FRACETO, L. F.; PINTO, L. D. A.; FRANZONI, L.; BRAGA, A. A. C.; SPISNI, A.; SCHREIER, S.; DE PAULA, E. Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. **Biophysical Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 229-243, 2002.

FRANK, D.W.; GRAY, J. E.; WEAVER, R. N. Cyclodextrinnephrosis in the rat. **Am J Pathol**, v. 83, p. 367-82, 1976.

FRANZ-MONTAN, M.; DE PAULA, E.; GROPPA, F. C.; RANALI, J.; VOLPATO, M. C. Efficacy of liposome-encapsulated 0.5% ropivacaine in maxillary dental anaesthesia. **Br j. oral**, v. 55, n. 5, p. 454-458, 2012.

FREZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Qim. nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GONIoTAKI, M.; HATZIANTONIOU, S.; DIMAS, K.; WAGNER, M.; DEMETZOS, C. Physicochemical Properties of Liposomal Formulations Encapsulating Naturally Occurring Flavonoids. In Vitro Cytotoxicity Studies of the Liposomal Preparations against Human Cancer Cell Lines. **Anticancer Research**, v. 25, n. 5, p. 3502-3503, 2004.

GRZYBOWSKI, A. Cocaine and the eye: a historical overview. **Ophthalmologica**, v. 222, n. 5, p. 296-301, 2008.

GUPTA, S. P. **Chem. Rev**, v. 91, p. 1109-1119, 1991.

HAERI, A.; SADEGHIAN, S.; RABBANI, S.; ANVARI, M.S.; LAVASANIFAR, A.; AMINI, M.; SIMIN, D. Sirolimus-loaded stealth colloidal systems attenuate neointimal hyperplasia after balloon injury: a comparison of phospholipid micelles and liposomes. **S. International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, p. 320–330, 2013.

HAGIWARA, Y.; ARIMA, H.; MIYAMOTO, Y.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Preparation and pharmaceutical evaluation of liposomes entrapping salicylic acid/gamma-cyclodextrin conjugate. **Chem. pharm. bull.** v. 54, p 26-32, 2006.

JEONG B.; KIM S. W.; BAE Y. H. **Adv. Drug Deliv**, v. 54, p. 37–51, 2002.

KALK, A.; BERENDSEN, H. J. C. Proton Magnetic-Relaxation and Spin Diffusion in Proteins. **J. magn. reson.** v. 24, n. 3, p. 343-366. 1976.

KAPUR, G. S.; CABRITA, E. J.; BERGER, S. The qualitative probing of hydrogen bond strength by diffusion-ordered NMR spectroscopy. **Tetrahedron Letters**, v. 41, n.37, p. 718, 2000.

KENNEDY, M.; READER, A.; BECK, M.; WEAVER, J. Anesthetic efficacy of ropivacaine in maxillary anterior infiltration. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** v. 91, p. 406-12, 2001.

KLÜPPEL, M. L. W.; MACHADO, L. C.; GNOATTO, S. A. Lipossomas em farmacologia: uma revisão da literatura. **Estud. Biol.**, v. 29, n. 67, p. 215-224, 2007.

LABANA, S.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. **Int. j. antimicrob. Agents.** v. 20, n. 4, p. 301-304. 2002.

LAGAN G.; MCCLURE H. A. Review of local anaesthetic agents. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 15, p. 247-254, 2004.

LASIC, D. D. Os lipossomas em 'Gene Delivery'. **CRC Press LLC**, 1997.

LASIC, D. D.; BARENHOLZ, Y. **Handbook of nonmedical applications of liposomes**. Boca Raton, CRC, 1996.

LASIC, D.; MARTIN, F. **Stealth liposomes**. Boca Raton, CRC, 1995.

LEHN, J.M. Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie - International Edition in English**, v. 27, n.1, p. 89-112, 1988.

LIN, S.Y.; KAO, Y.H. Solid particles of drug-beta-CD inclusion complexes directly prepared by a spray-drying technique. **Int. J. Pharm.** v. 56, p.249-259, 1989.

LIU, Y.; YANG, Y.W.; YANG, E.C.; GUAN, X.D. Molecular Recognition Thermodynamics and Structural Elucidation of Interactions between Steroids and Bridged Bis(β -cyclodextrin)s. **J. org. chem.** v. 69(20), p. 6590-6602, 2004.

LOFTSSON, T.; HREINDÓTTIR, D.; MÁSSON, M. The complexation efficiency. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.** v. 57, p. 545-552. 2007

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int J Pharm**, v. 225, p. 15-30, 2011.

LOPES, L. B.; OLIVEIRA, A. G. de. Lipossomas de longa circulação: estrutura e aplicações. **Infarma**, v. 12, n. 7-8, p 66-69, 2000.

LOUKAS, Y. L.; VRAKA, V.; GREGORIADIS, G. Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. **Int. j. pharm.** v. 162, p 137-142, 1998.

LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Rev. ciênc. farm. básica apl.** v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.

MACDONALD, J. C.; LUO, T. J. M.; PALMORE, G. T. R. Supramolecular behavior of an isomorphous series of five bis (2-methylimidazolium 2, 6-dicarboxypyridine) M (II) complexes. **Crystal Growth & Design**, v. 4, n. 6, p. 1203-1209, 2004.

MAESTRELLI, F.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. L.; RABASCO, A. M.; MURA, P. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. **Int. j. pharm**, v. 312 , p. 53-60, 2006.

MALAMED, S. F. **Manual de Anestesia Local**. Rio de Janeiro, Guanabara, 2001.

MAMOT, C.; DRUMMOND, D. C.; HONG, K.; KIRPOTIN, D. B.; PARK, J. W. Liposome based approaches to overcome anticancer drug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 5, p. 271-279. 2003.

MAREUIL, J. de; MABROUK, K.; DORIA, E.; MOULARD, M.; DE CHASTEIGNER, S.; OUGHIDENI, R.; VAN RIETSCHOTEN, J.; ROCHAT, H.; DE WAARD, M.; SABATIER, J. M. Liposomal encapsulation enhances antiviral efficacy of SPC3 against human immunodeficiency virus type-1 infection in human lymphocytes. **Antiviral Research**, v. 54, n. 3, p. 175-188, 2002.

MAYER, M.; MEYER, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. **Angewandte Chemie-International Edition**. v. 38, n. 12, p. 1784-1788. 1999.

MAYER, M.; MEYER, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. **Journal of the American Chemical Society**. v. 123, v. 25. p. 6108-6117. 2001

MAZUMDAR, T.; ANAM, K.; ALI, N. A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of Leishmania vaccine instructs Th1 responses and resistance to Leishmania donovani in susceptible BALB/c mice. **Vaccine**, v. 22, n. 9-10, p. 1162-1171. 2004.

MCCORMACK, B.; GREGORIADIS, G. Comparative studies of the fate of free and liposome-entrapped hydroxypropyl-beta-cyclodextrin/drug complexes after intravenous injection into rats: Implications in drug delivery. **Biochimica Et BiophysicaActa - General Subjects**, v. 1291, n.3, p. 237-244, 1996.

MCCORMACK, B.; GREGORIADIS, G. Drugs-in-cycle dextrans-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162 n. 1-2, p. 59-69, 1998.

MEURE, L. A.; Knott, R.; Foster, N. R.; Dehghani, F. The Depressurization of an Expanded Solution into Aqueous Media for the Bulk Production of Liposomes. **Langmuir**, v. 25, p. 326-337, 2009.

MEYER, B.; PETERS, T. NMR Spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 42(8), p. 864-890, 2003.

MO, H. P.; POCHAPSKY, T. C. Intermolecular interactions characterized by nuclear Overhauser effects. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 30, p. 1-38, 1997.

MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A.; PILÓ-VELOSO, D.; BEEZER, A. E.; MITCHELL, J. C. Sistema transportadores de drogas. **Química Nova**, v.21, n.4, p. 470-475, 1998.

MORAES, A. M. **Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade de lipossomas contendo o-carboranilpropilamina, L- ρ -boronofenilalanina e doxorubicina.** (1996) Tese de Doutorado; Universidade de Campinas (Unicamp). Campinas, 1996.

MORRIS, K. F.; JOHNSON, C. S. Diffusion-Ordered 2-Dimensional Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114(8), p. 3139-3141, 1992.

NEW, R. R. C.; RICKWOOD D.; HAMES B. D. Lipossomes-a practical approach. **Eds. IRL Press**, Oxford, 1990.

NUNEZ, M. M., A.; SORIANO, V.; PODZAMCZER, D.; GONZALEZ-LAHOZ, J. Clearance of human herpesvirus type 8 viraemia in HIV-1-positive patients with Kaposi's sarcoma treated with liposomal doxorubicin. **Aids**, v. 8, n 14, p 913-919, 2000.

PAULA, E.; SHREIER, S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 29, p.877-984. 1996.

PIEL, G.; PIETTE, M.; BARILLARO, V.; CASTAGNE, D.; EVRARD, B.; DELATTRE, L. Betamethasone-incyclodextrin-in-liposome: the effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 312, p. 75-82, 2006.

PINA, F. O que há de “novo” na Química Supramolecular. **Química**, v. 60, p. 20-24, 1996.

PINTO, L. D. A.; YOKAICHIYA, D. K.; FRACETO, L. F.; DE PAULA, E. Interaction of benzocaine with model membranes, v. 87, n. 2-3, p. 213-223. 2000.

PRICE, W. S. Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion. Basic theory. **Concepts in Magnetic Resonance**, v. 9, p. 299-336, 1997.

PUGLIA, C.; TROMBETTA, D.; VENUTI, V.; SAIJA, A.; BONINA, F. Evaluation of in-vivo topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 10, p. 1225-1232, 2004.

QIU, Y.; PARK K. **Adv. Drug Deliv**, v. 53, p. 321–339, 2002.

RAJEWSKI, R.; STELLA, V. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. In vivo drug delivery. **J Pharm Sci**, v. 85, p. 1142-1169, 1996.

RANADE, V. Drug delivery systems, site-specific drug delivery using liposomes as carriers. **J Clin Pharmacol**, v. 29, 685-94, 1989.

RUETSCH, Y. A.; BONI, T.; BERGEAT, A. From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetics drugs. **Curr. Top. Med. Chem.**, v 3, p 175-182, 2001.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Quimica Nova**, v. 25, p. 1181-1185, 2002.

SCHLORER, N. E.; CABRITA, E. J.; BERGER, S. Characterization of reactive intermediates by diffusion-ordered NMR spectroscopy: A snapshot of the reaction of (CO₂)-C-13 with [Cp₂Zr(Cl)H]. **Angewandte Chemie-International Edition**. v. 41, n. 1, p. 107-109. 2002.

SESSA, G.; WEISSMANN, G. **Phospholipidspherules (liposomes) as a model for biological membranes**. **J. Lipid Res.**, v. 9, p. 310-318, 1968.

SEYMOUR, R. A.; MEECHAN, J. G.; BLAIR, G. S. An investigation into post-operative pain after third molarsurgery under local analgesia. **Br J Oral MaxillofacSurg**, v. 23, 1985.

SKOWRON, S. **Cyclodextrin**. Disponível em: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclodextrin>>. Acesso em: 11 jun. 2016.

STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**, v. 36, p. 31–42,2008.

STILBS, P. Fourier transform pulsed-gradient spin-echo studies of molecular diffusion. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**. v. 19, p. 1-45. 1987.

STILES, J.; KROHNE, S.; RANKIN, A.; Chang, M. The efficacy of 0.5% proparacaine stored at room temperature. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n.3, p. 205-207, 2001.

STRICHARTZ, G. R. Local anesthetics. **Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 1987.

TIWARI, G., TIWARI, R.; SRIWASTAWA, B.; BHATI, L.; PANDEY, S.; PANDEY, P.; BANNERJEE, S. K. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, India, v. 2, n. 1, Jan-Mar. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

TRAN P. A.; ZHANG L.; WEBSTER T. J. **Adv. Drug Deliv**, v. 61, p. 1097–1114, 2009.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier system. **Chem. Rev**, v. 98, p. 2045–2076, 1998.

UHRIKOVA, D.; RAPP, G.; YARADAIKIN, S.; GORDELIY, V.; BALGAVY, P. Influence of local anesthetics on the phosphatidylcholine model membrane: small-angle synchrotron X-ray diffraction and neutron scattering study. **Biophysical Chemistry**. v. 109, n. 3, p. 361-373. 2004.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v.31, n.2, p. 360-368, 2008.

WHITESIDE, J.; WILD SMITH, J. Developments in local anaesthetic drugs. **Br J Anaesth**, v. 87, p. 27-35, 2001.

WOLFF, A.P.; HASSELSTRÖM, L.; KERKKAMP, H. E.; GIELEN, M. J. Extradural ropivacaine and bupivacaine in hip surgery. **British Journal of Anaesthesia**, v.74, n.4, p.458-460, 1995.

YANG, S.; LIU, C.; LIU, W.; YU, H.; ZHENG, H.; ZHOU, W.; HU, Y. Preparation and Characterization of Nanoliposomes Entrapping Medium-Chain Fatty Acids and Vitamin C by Lyophilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 19763-19773, 2013.

YOSHIDA, A.; YAMAMOTO, M.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, F. Improvement of chemical instability of digitoxin in aqueous solution by complexation with beta-cyclodextrin derivatives. **Chem. Pharm. Bull**, v. 36, p. 4075-4080. Tokyo, 1988.

ZALLOUM, N. L. **Encapsulamento e caracterização físico-química do antibiótico em lipossomas, 2001**. 80 f. Dissertação de Mestrado; Universidade de Campinas, 2001.

ZAMBONI, W. C.; *The Oncologist*, v. 13, n. 248, 2008.

ZEINELDIN, R.; SKANDANI A. A.; AL-HAIK M. Effect of chirality and length on the penetrability of single-walled carbon nanotubes into lipid bilayer cell membranes. **Langmuir**, v. 28, n. 20, p.7872-7879, 2012.

ZUCKER, D.; MARCUS, D.; BARENHOLZ, Y.; GOLDBLUM, A. Liposome drug's loading efficiency: a working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties. **Journal of Controlled Release**, v. 139, p.73–80, 2009.

ZUO, M.; DUAN, G. & GE, Z. Simultaneous determination of ropivacaine and antipyrine by high performance liquid chromatography and its application to the in vitro transplacental study. **Biomed Chromatogr**, v. 18, 2004.