

Ti, Tseng L., de Paula, E.

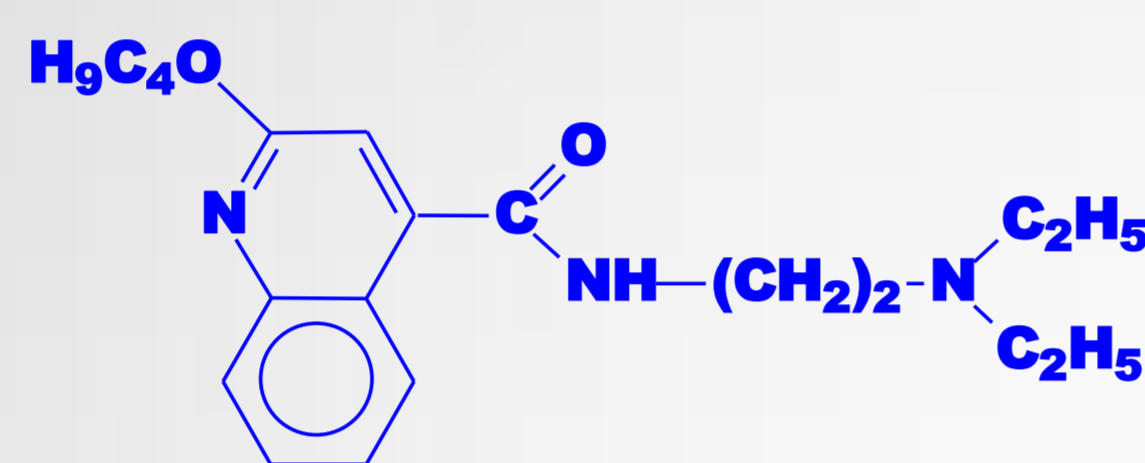
<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Campinas, SP, Brasil.

Palavras-chave: Dibucaína – anestésico local - Hidroxipropil-β-ciclodextrina - Complexos de inclusão.

## INTRODUÇÃO

Anestésicos locais (AL) são moléculas anfífilas que têm grande afinidade pela membrana celular e sua principal ação é a de inativar o canal de sódio voltagem dependente, impedindo a propagação do impulso nervoso em fibras nervosas periféricas. Muitos AL usados clinicamente apresentam toxicidade que é proporcional à potência, sendo um grande desafio o desenvolvimento de novos compostos mais potentes e menos tóxicos. A modificação das características da molécula anestésica através do desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada é uma alternativa interessante. Há relatos na literatura que mostram que a complexação em ciclodextrinas (CDs), aumenta a duração da anestesia e/ou diminui a toxicidade intrínseca dos AL. A inclusão em CDs aumenta a solubilidade aquosa do fármaco, e sua estabilidade química, além de não desenvolver nenhuma resposta imunológica em humanos. Neste trabalho, relatamos o desenvolvimento de uma formulação para o anestésico local dibucaína (DBC, esquema 1), através de sua complexação em 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) buscando melhorar as propriedades farmacológicas da dibucaína, objetivando futura aplicação clínica.

Esquema 1 - Estrutura química da Dibucaína: o grupamento amina 1<sup>o</sup> se ioniza em pK 8,3.



## METODOLOGIA

### Preparo do complexo de inclusão dibucaína: HP-β-CD por co-solubilização

Soluções de fármaco e ciclodextrina (HP-β-CD) em água foram mantidas sob agitação por 24 h (Araújo, 2005), em temperatura ambiente. Após esta etapa os complexos foram liofilizados e armazenados em dessecador para posterior utilização.

### Aumento da solubilidade da DBC

A solubilidade da forma neutra foi acompanhada pela absorção da DBC em 327nm. Em pH ácido determinou-se a variação da fluorescência da DBC ( $\lambda_{ex} = 327\text{nm}$ ,  $\lambda_{em} = 350\text{-}550\text{nm}$ ). Para avaliar a estequiometria da reação, a variação da emissão de fluorescência foi analisada de acordo com a equação 1 (Banerjee et al, 2004):

$$\frac{C_{DBC}}{(AUC - AUC_0)} = 1/[C_{CD}]^n \quad (1)$$

Onde  $C_{DBC}$  e  $C_{CD}$  representam a concentração de dibucaína e CD, respectivamente e AUC a área sob a curva de fluorescência.

### Avaliação da toxicidade *in vitro* da DBC livre e complexada: ensaios em culturas de células fibroblásticas tipo 3T3

Fibroblastos 3T3 foram cultivados em meio DMEM, contendo antibióticos e suplementos. Células cultivadas por 24 horas (até semi-confluência) foram tratadas com DBC (1  $\mu\text{M}$  - 1 mM) livre ou complexada em HP-β-CD na proporção molar de 1:1. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído e as células incubadas com o corante MTT por 3 horas; após tratamento com 0,1 mL de álcool etílico absoluto, leu-se o formazan produzido pela redução do corante em 570 nm.

### Ensaio hemolíticos

Sangue humano obtido do hemocentro/Unicamp foi centrifugado (10 minutos a 10000xg). As hemáceas foram ressuspensas em tampão PBS 5 mM ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4mM e NaCl 154 mM) pH 7 e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Após ressuspensão do concentrado de hemáceas para um hematócrito de 0,15%, adicionou-se concentrações crescentes de DBC livre e complexada - entre 0,5mM -3mM. As amostras e controles (tampão e água) foram incubados durante 30 min. a 37 °C e centrifugados (5 min., 25 °C, 10000xg); o sobrenadante foi usado para determinação da hemoglobina em solução (412 nm). A porcentagem de hemólise foi dada de acordo com a equação 2 (Malheiros et al, 2004):

$$\% \text{ hemólise} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \times 100 \quad (2)$$

onde  $A_a$ ,  $A_{c1}$  e  $A_{c2}$  referem-se as absorbâncias da amostra, dos controles  $c_1$  (hemácias em PBS) e  $c_2$  (hemácias em  $\text{H}_2\text{O}$ ) em 412 nm.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, D. R., 2005. Desenvolvimento e avaliação farmacológica de formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-amidas cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína. Tese de Doutorado; Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Frömming, K. H. & Szejtli, J., 1994; Topics in Inclusion Science - Cyclodextrins in Pharmacy, Hungria: Kluwer Academic Publishers.
- Bannerjee, R., Chakraborty, H., Sarkar, M. 2004. Host-guest complexation of oxycam NSAIDs with β-Cyclodextrin. n Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/bip.20147
- Malheiros et al, 2004 A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4 Biophys. Chem. 110: 213.

## RESULTADOS

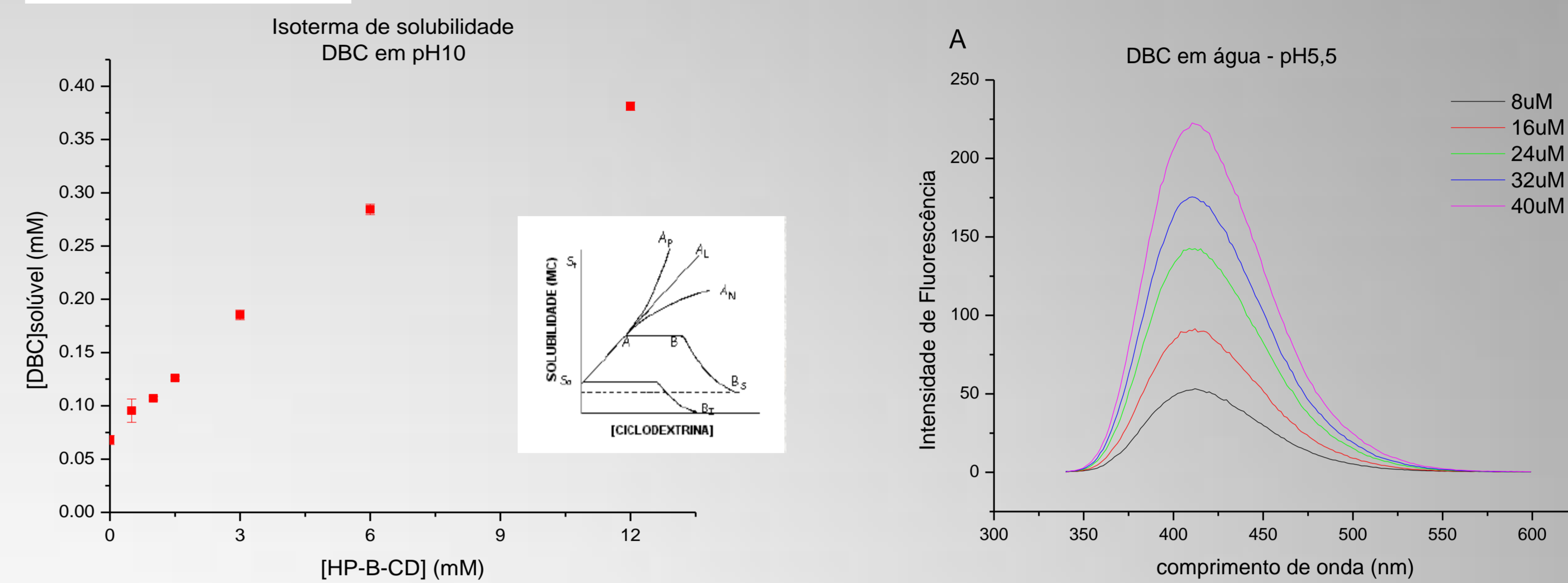


Figura 1 - Variação da solubilidade da DBC neutra (solução saturada) na presença de concentrações crescentes de HP-β-CD. Tampão carbonato 50 mM (pH 10,0), temperatura ambiente (25 °C). O inserto indica que o aumento aparente ser do linear (tipo  $A_1$ ), de acordo com Frömming & Szejtli.

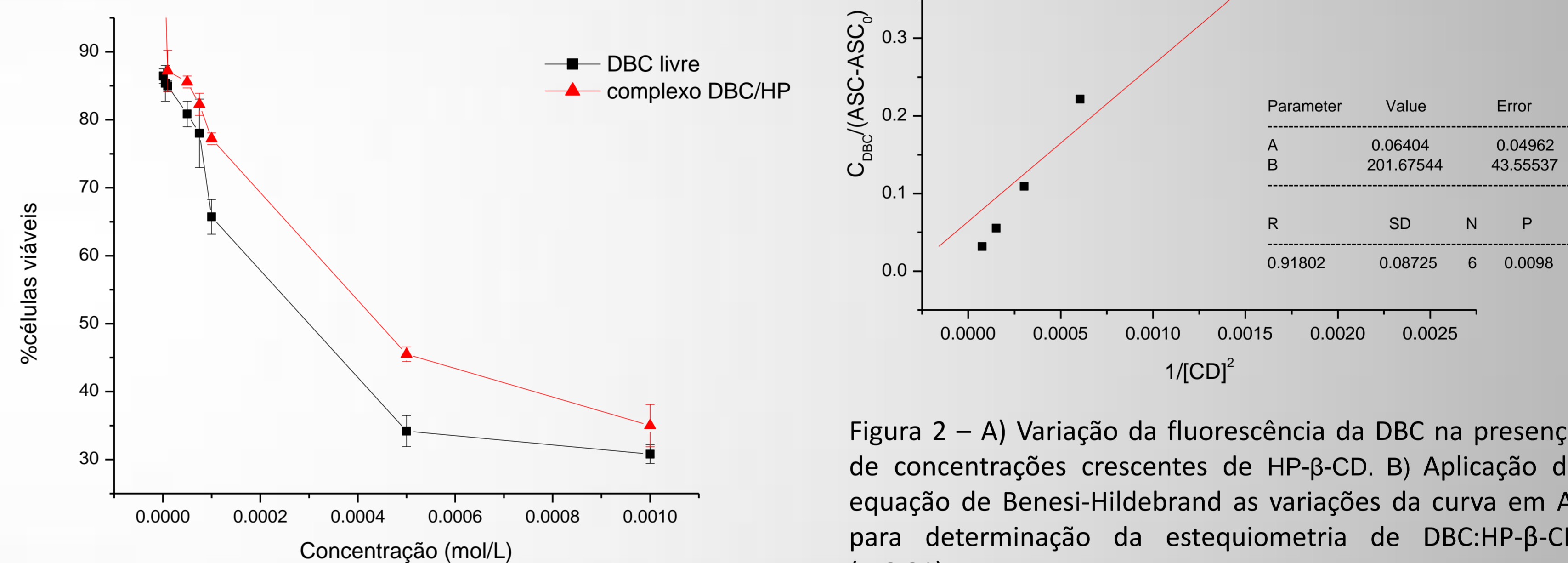


Figura 2 – A) Variação da fluorescência da DBC na presença de concentrações crescentes de HP-β-CD. B) Aplicação da equação de Benesi-Hildebrand as variações da curva em A, para determinação da estequiometria de DBC:HP-β-CD (r=0,91).

Figura 3 - Efeito citotóxico da DBC (preto) e do complexo DBC:HP-β-CD (vermelho) em células 3T3 (incubação por 24 h a 37 °C e 5%  $\text{CO}_2$ ) avaliados pela redução do corante MTT. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT.

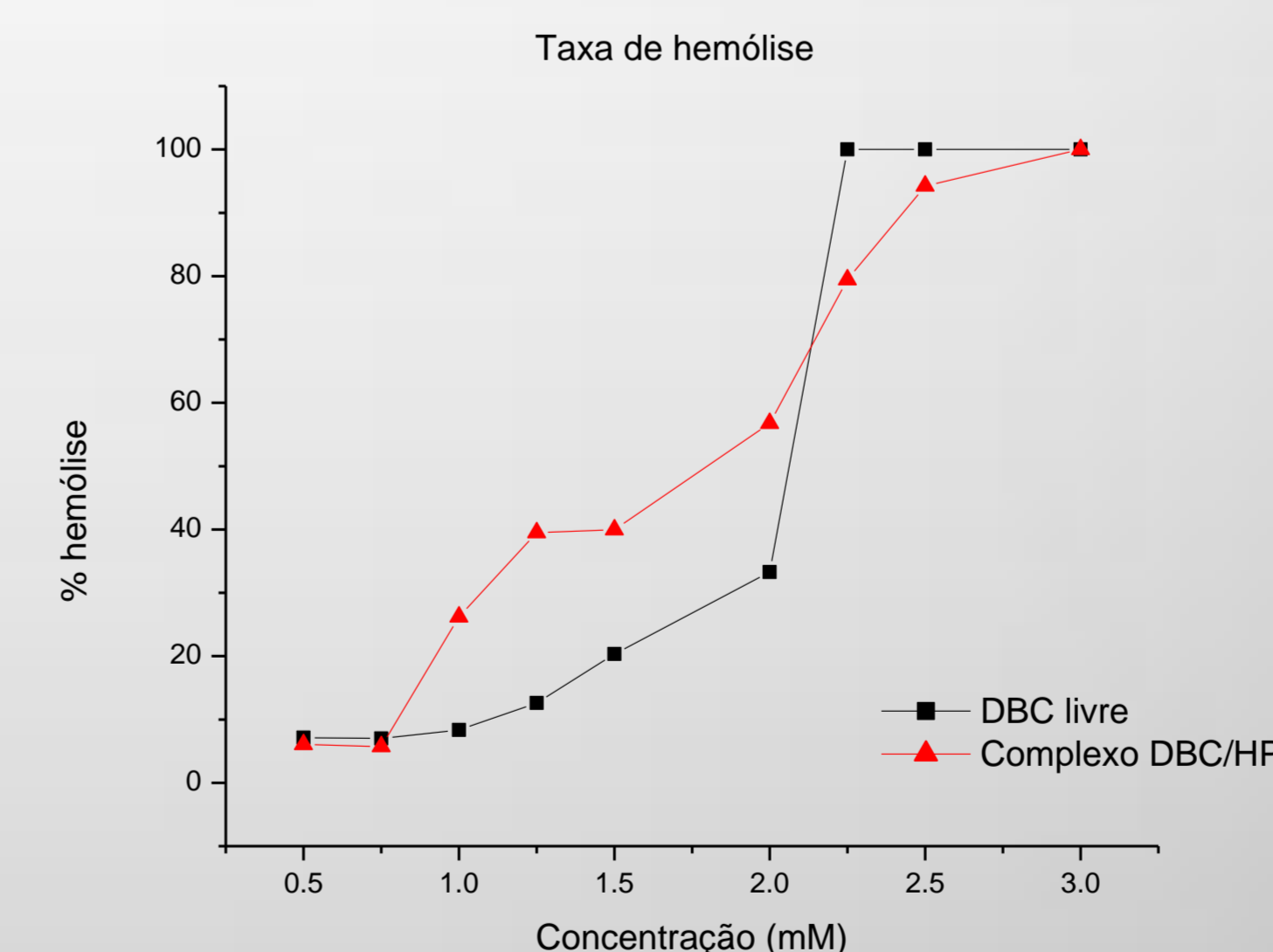


Figura 4 – Hemólise de eritrócitos humanos induzida pela DBC livre (preto) e complexada com a HP-β-CD (vermelho). Ht = 0,15%, lise medida pela liberação de hemoglobina (Abs em 412nm), em solução tampão PBS pH=7,0.

## CONCLUSÃO

-A DBC interage com a HP-β-CD, tanto na forma neutra (fig. 1) quanto protonada (Fig. 2). A estequiometria da interação é de 1:1 (DBC: HP-β-CD) para a forma neutra - pH 10,0 e de 1:1 ou 1:2 para a forma protonada, em pH 5,0.

- A complexação com HP-β-CD leva a aumento de solubilidade aquosa da DBC, tanto na forma neutra quanto na protonada.

- A complexação aumenta o efeito hemolítico da DBC, demonstrando que mais AL tornou-se disponível (solúvel), causando a lise da membrana eritrocitária, de acordo com resultados anteriores de nosso laboratório (Malheiros et al, 2004)

- Já no teste de citotoxicidade detectou-se maior porcentual de células 3T3 viáveis após tratamento com DBC complexada com HP-β-CD, indicando que a formação do complexo de inclusão diminui a toxicidade intrínseca do anestésico local.

Em conjunto esses resultados apontam que a HP-β-CD constitui em bom carreador para desenvolvimento de um sistema de liberação sustentada para o anestésico local DBC, em pH 7,0.