



Grupo Ser Educacional  Gente criando o futuro

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM MESTRADO**

**JULIANA SOUZA DE FREITAS DOMINGUES**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA NOVA  
FORMULAÇÃO DE BUPIVACAÍNA COMPLEXADA EM  
SULFOBUTILETER-BETA-CICLODEXTRINA**

**Guarulhos**

**2020**

**JULIANA SOUZA DE FREITAS DOMINGUES**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA NOVA  
FORMULAÇÃO DE BUPIVACAÍNA COMPLEXADA EM  
SULFOBUTILETER-BETA-CICLODEXTRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Guarulhos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Nunes Ferreira

**Guarulhos**

**2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Fernando Gay da Fonseca**

D671d

Domingues, Juliana Souza de Freitas  
Desenvolvimento e avaliação de uma nova formulação de  
Bupivacaína complexada em Sulfobutileter- $\beta$ -Ciclodextrina. / Juliana  
Souza de Freitas Domingues. - 2020.  
33 f.; 31 cm.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Luiz Eduardo Nunes Ferreira

Dissertação (Mestrado em ciências) – Programa de pós-graduação  
em enfermagem, Universidade Guarulhos, 2020.

1. Bupivacaína 2. Sulfobutileter- $\beta$ -Ciclodextrina 3. Sistemas de  
liberação de fármacos I. Título II. Ferreira, Luiz Eduardo Nunes  
(orientador) III. Universidade Guarulhos.

CDD. 610.73



Grupo Ser Educacional



Gente criando o futuro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, intitulada “**Desenvolvimento e avaliação de uma nova Formulação de Bupivacaína complexada em Sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina**”, em sessão pública realizada em 28 de fevereiro de 2020, considerou a candidata Juliana Souza de Freitas Domingues aprovada.

1. Prof. Dr. Luiz Eduardo Nunes Ferreira

2. Profa. Dra. Priscila Luiza Mello

3. Profa. Dra. Camila Batista da S. de Araujo Candido

*É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua produção total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que citada a fonte.*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a Deus por ter me sustentado, colocado verdadeiros anjos no meu caminho, e aberto portas que sozinha eu jamais conseguiria. E ao meu melhor amigo, companheiro de vida e esposo, Filipe Domingues, que desde sempre me apoia e luta ao meu lado em todas as circunstâncias.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, o meu agradecimento especial ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Luiz Eduardo Nunes Ferreira por toda dedicação, compartilhamento, ensinamento e paciência. Sem dúvida, essa orientação contribuiu imensamente para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Agradeço ao meu eterno mestre, Prof.<sup>o</sup> José Renato Romero pela confiança, apoio e incentivo na decisão de trilhar essa surpreendente jornada acadêmica.

Gostaria de agradecer aos alunos de iniciação científica da universidade Guarulhos Julia das Neves Rodrigues Ferreira, Bianca Miguel Monti, Jamiliam Valeria de Jesus Camargo e Guilherme Ferreira da Silva pela grande contribuição nesse processo.

O meu agradecimento também à Prof.<sup>a</sup> Dr. Eneida de Paula pelas contribuições, escuta ativa e incentivo durante as etapas do trabalho, bem como pela solicitude em apoiar os estudos de caracterização.

Agradeço à Universidade Guarulhos (UNG) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelo suporte técnico e estrutural.

Por fim, agradeço ao apoio da CAPES no desenvolvimento deste trabalho através da concessão de bolsa de pesquisa.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Anestésico local com ligação amida (lidocaína) .....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da BVC.....	<b>6</b>
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da SBE $\beta$ CD.....	<b>9</b>
<b>Figura 4.</b> Dois exemplos de estequiometria adotados por complexos de inclusão de drogas em ciclodextrinas.....	<b>9</b>
<b>Figura 5.</b> Espectro de absorção da BVC a uma concentração de 1mM .....	<b>17</b>
<b>Figura 6.</b> Curva padrão da BVC .....	<b>18</b>
<b>Figura 7.</b> Diagrama de solubilidade de fases para bupivacaína e SBE $\beta$ CD. Os pontos representam a média e as barras de erros indicam o desvio padrão (n=3) .....	<b>19</b>
<b>Figura 8.</b> Cinética de complexação entre bupivacaína e SBE $\beta$ CD (1:1). As médias são representadas pelos pontos e as barras de erros representam o desvio padrão (n=3) .....	<b>20</b>
<b>Figura 9.</b> Estequiometria de complexação por variação contínua (job plot) revelando razão molar 1:1. As médias são representadas pelos pontos e as barras de erros representam o desvio padrão (n=3) .....	<b>20</b>
<b>Figura 10.</b> Espectroscopia por infravermelho das amostras de bupivacaína (A), SBE $\beta$ CD (B), mistura física (C) e do complexo de inclusão bupivacaína-SBE $\beta$ CD (D).....	<b>21</b>
<b>Figura 11.</b> Viabilidade (média e desvio padrão) das células HaCaT (A) e SH-SY5Y (B) após 24 h de exposição as formulações de BVC e do complexo BVC-SBE $\beta$ CD. Eixo Y= a viabilidade das células em % relativa ao grupo controle. Eixo X= log da concentração das formulações em $\mu$ M. Linhas pontilhadas representam a curva de regressão não linear dos tratamentos.....	<b>23</b>

**Figura 12.** Imagens representativas da viabilidade celular em células de neuroblastoma (SH-SY5Y) após exposição por 24 horas ao controle (A), bupivacaína (B) e complexo bupivacaína-SBE $\beta$ CD (C). A marcação fluorescente foi realizada utilizando o reagente LIVE/DEAD. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio de fluorescência com aumento de 10x, com sobreposição das imagens. A barra de escala representa 100  $\mu$ m. Os núcleos das células danificadas estão marcados em vermelho pelo EthD-1 e as células viáveis estão marcados pela fluorescência verde devido a distribuição intracelular da calceína AM.....**23**

**Figura 13.** Imagens representativas da avaliação da perda do potencial mitocondrial nas células SH-SY5Y, no tratamento controle (A) e após 24 h de exposição à BVC 215 mM por 24 h (B). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio de fluorescência com aumento de 40x, com sobreposição das imagens. A barra de escala representa 20  $\mu$ m.....**24**



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Espectroscopia por infravermelho: principais bandas de absorção....**22**

## LISTA DE ABREVIações

**AL:** Anestésico (s) local (is)

**BVC:** Bupivacaína

**$\beta$ -CD:** Beta ciclodextrina

**CD:** Ciclodextrina (s)

**DM $\beta$ -CD:** dimetil- $\beta$ -ciclodextrina

**FBS:** soro fetal bovino

**HP $\beta$ -CD:** 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina

**Ks:** constante de associação

**PK<sub>a</sub>:** *log dissociation constant*

**SBE $\beta$ CD:** sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina

DOMINGUES JSF. Título: **Desenvolvimento e avaliação de uma nova formulação de bupivacaína complexada em sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina**. Guarulhos (SP): Universidade Guarulhos; 2020.

## RESUMO

**Introdução:** Durante os últimos anos, vários estudos vêm sendo realizados a fim de desenvolver novas formulações anestésicas utilizando sistemas de liberação modificados, com objetivo de aprimorar os efeitos farmacológicos e minimizar os efeitos adversos. O presente estudo teve como objetivo preparar, caracterizar e avaliar o perfil citotóxico da formulação de bupivacaína (BVC) complexada em sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE $\beta$ CD). **Métodos:** O pico de absorção máxima e a curva padrão foram mensurados por espectrofotometria. As propriedades físico-químicas, de solubilidade, cinética de formação do complexo e definição da estequiometria foram avaliadas por meio do estudo de solubilidade de fases, tempo de complexação e Job's Plot. A confirmação da complexação foi evidenciada por meio de espectroscopia por infravermelho. Análises de viabilidade celular foram realizadas em células de neuroblastoma (SH-SY5Y) por meio do ensaio de redução do MTT, e confirmado por microscopia de fluorescência (ensaio de LIVE/DEAD). Também foi testado a perda do potencial mitocondrial. **Resultados:** O pico de absorção máxima da BVC foi 262 nm e a curva padrão apresentou uma função linear com  $R^2=0,9998$ . Os experimentos de solubilidade de fases demonstraram um aumento linear da solubilidade da BVC nas menores concentrações de SBE $\beta$ CD até alcançar o platô entre as concentrações de 30 e 40 mM de SBE $\beta$ CD. O valor encontrado da constante de associação foi 13,17. A formação do complexo de inclusão atingiu o equilíbrio em 12 horas e o método de Job's Plot revelou a estequiometria de 1:1. A espectroscopia por infravermelho confirmou a formação do complexo através das mudanças nas bandas de absorção do complexo em relação à BVC livre. Os testes de viabilidade celular não apresentaram diferença significativa entre a BVC livre e o complexo de inclusão, contudo, análise de regressão não-linear indicou um  $IC_{50}$  de 216 mM e 150 mM para BVC livre e complexo respectivamente. **Conclusão:** Foi demonstrada a formação do complexo de inclusão SBE $\beta$ CD-BVC, sendo o perfil citotóxico semelhante a BVC

livre. Essa formulação apresenta potencial para aplicações clínicas, porém testes *in vivo* devem ser conduzidos para testar sua eficácia.

**Descritores:** bupivacaína, sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina, sistemas de liberação de fármacos.

DOMINGUES JSF. Title: **Development and evaluation of a new formulation of bupivacaine complexed in sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin**. Guarulhos (SP): Universidade Guarulhos; 2020.

### ABSTRACT

**Introduction:** During the last years, several studies have been conducted in order to develop new anesthetic formulations using drug delivery systems in order to improve pharmacological effects and minimize adverse effects. This study aimed to prepare, characterize and test the cytotoxicity profile of a bupivacaine (BVC) formulation complexed in sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE $\beta$ CD).

**Methods:** Maximum absorption peak and standard curve were measured by spectrophotometry. The physicochemical properties of solubility, complex formation kinetics and definition of stoichiometry properties were evaluated by the phase solubility study, complexation time and Job's Plot respectively. The complex formation was demonstrated by infrared spectroscopy. The formulations cytotoxicity was evaluated in neuroblastoma cells (SH-SY5Y) by MTT assay and confirm with fluorescent microscopy (LIVE/DEAD). The loss of mitochondrial potential was also tested. **Results:** The maximum absorption peak of BVC was 262 nm and the standard curve showed a linear function with  $R^2 = 0.9998$ . The phase solubility experiments showed a linear increase of BVC solubility in the lowest SBE $\beta$ CD concentrations until reached a plateau between 30 and 40 mM SBE $\beta$ CD concentrations. The value found for the association constant was 13.17. Inclusion complex formation reached equilibrium within 12 hours and the Job's Plot method revealed a stoichiometry of 1: 1. Infrared spectroscopy showed the complex formation by changing the complex SBE $\beta$ CD-BVC absorption bands in relation to plain bupivacaine. Cell viability assay did not show statistical difference between bupivacaine formulations. However, nonlinear regression analysis indicated an  $IC_{50}$  value of 216 mM and 150 mM for plain BVC and SBE $\beta$ CD-BVC respectively. **Conclusion:** The inclusion complex formation between BVC and SBE $\beta$ CD was demonstrated, and the cytotoxic profile of the complex was similar to the plain BVC. Thus, this formulation may have clinical applications, but *in vivo* tests must be conducted to test its effectiveness.

**Keywords:** bupivacaine; sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin; drug delivery systems.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Anestésicos locais.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Bupivacaína.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Sistemas de liberação controlada .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Ciclodextrinas .....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Objetivo geral. ....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Objetivos específicos. ....</b>	<b>9</b>
<b>4. MÉTODO.....</b>	<b>10</b>
<b>4.1 Tipo de estudo.....</b>	<b>10</b>
<b>4.2 Local de Estudo .....</b>	<b>10</b>
<b>4.3 Reagentes.....</b>	<b>10</b>
<b>4.4 Análise do Espectro de Absorção por UV-Vis da Bupivacaína.....</b>	<b>11</b>
<b>4.5 Curva padrão da Bupivacaína.....</b>	<b>11</b>
<b>4.6 Avaliação da solubilidade da bupivacaína: isotermas de solubilidade .....</b>	<b>11</b>
<b>4.7 Cinética da formação de complexos: Modificação do espectro de absorção da bupivacaína .....</b>	<b>12</b>
<b>4.8 Determinação da estequiometria do complexo de inclusão .....</b>	<b>12</b>
<b>4.9 Preparação do complexo.....</b>	<b>13</b>
<b>4.9.1 Bupivacaína livre.....</b>	<b>13</b>
<b>4.9.2 Preparações da bupivacaína complexada em sulfobutileter-<math>\beta</math>-ciclodextrina (SBE<math>\beta</math>CD/BVC) .....</b>	<b>13</b>
<b>4.10 Espectroscopia por infravermelho .....</b>	<b>14</b>
<b>4.11 Cultura celular .....</b>	<b>14</b>
<b>4.12 Análise de citotoxicidade por redução do MTT.....</b>	<b>14</b>
<b>4.13 Análise da Citotoxicidade por Microscopia de Fluorescência.....</b>	<b>15</b>

4.14 Avaliação da perda de potencial da mitocôndria .....	15
4.15 Análise estatística .....	16
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
5.1 Análise do espectro de absorção por UV-Vis da bupivacaína .....	16
5.2 Curva padrão da bupivacaína .....	17
5.3 Avaliação da solubilidade da bupivacaína: isotermas de solubilidade .....	18
5.4 Cinética de formação de complexos: Modificação do espectro de absorção da BVC .....	19
5.5 Determinação da estequiometria do complexo de inclusão .....	19
5.6 Espectroscopia por infravermelho .....	20
5.7 Análise de citotoxicidade por redução do MTT .....	22
5.8 Avaliação da perda do potencial mitocondrial .....	23
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial<sup>1</sup>. Ao longo dos anos, o controle da dor se tornou uma das áreas mais estudadas pela medicina<sup>2</sup>.

Embora estudos avancem na busca de métodos mais eficientes de controle da dor, o mais utilizado continua sendo o farmacológico, através de substâncias químicas introduzidas no organismo capazes de alterar mecanismos periféricos ou centrais de detecção e elaboração da informação dolorosa, reduzir a reação emocional à dor ou interferir no estado de consciência necessário à percepção dolorosa<sup>3</sup>.

As duas principais classes de fármacos utilizadas são os analgésicos, incluindo os opioides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Os analgésicos não opioides são vantajosos no alívio da dor aguda, porque estão prontamente disponíveis sem receita médica, possuem custo relativamente baixo e são fáceis de usar<sup>4</sup>. No entanto, muitos desses medicamentos não opioides podem ser eficazes apenas para dores leves a moderadas. Para pacientes com dor moderada a intensa, são considerados analgésicos opioides ou analgésicos não opioides combinados com outros agentes farmacológicos<sup>5</sup>.

Opioides como a morfina são considerados o padrão-ouro para o tratamento da dor. Contudo, os tratamentos envolvendo esses medicamentos estão frequentemente associados a uma ampla gama de efeitos colaterais como: dependência, sedação, náusea, vômito, motilidade intestinal prejudicada e desenvolvimento de tolerância (particularmente no caso do manejo da dor crônica)<sup>4,5</sup>.

Uma outra opção medicamentosa utilizada para controle e eliminação da dor, é o anestésico local (AL). Seu uso possui muitas vantagens potenciais em comparação com a administração sistêmica de analgésicos opioides, em situações em que a causa e a fonte da dor são limitadas a um local ou região em particular<sup>6</sup>. É frequentemente usado como um complemento da analgesia sistêmica ou para fornecer anestesia, e permite o uso de quantidades menores de medicamentos sistêmicos, diminuindo assim os riscos de efeitos colaterais e potencial toxicidade<sup>7</sup>.



Os AL possuem atividade farmacológica capaz de bloquear reversivelmente a condução nervosa por meio de inibição da excitação-condução de nervos periféricos<sup>8,9</sup>.

Diferentemente dos analgésicos, os AL não são seletivos para fibras de dor, podendo causar bloqueio de fibras sensoriais, motoras e autônomas. Esse bloqueio não-seletivo pode desencadear outros efeitos no organismo como: ação em alvos capazes de modular vias celulares relacionadas a resposta inflamatória, cicatrização, apoptose e necrose celular ou construir uma fonte de toxicidade<sup>9,10,11</sup>. Estes fatores também permitem novas possibilidades de estudos destes medicamentos.

Uma opção amplamente utilizada na clínica médica, sobretudo em procedimentos cirúrgicos, é a bupivacaína (BVC), comercializada principalmente na forma de cloridrato<sup>7</sup>. Este AL combina características como: início de ação moderado, longa duração e seleção significativa entre bloqueio sensorial e motor, o que torna interessante a exploração deste medicamento com a finalidade de promover analgesia prolongada. No entanto, infusões contínuas ainda são dispendiosas e elevam o risco de toxicidade sistêmica<sup>12</sup>.

Novas formulações capazes de aumentar a duração de ação e com liberação controlada, podem diminuir a frequência de administração diária, a toxicidade sistêmica e os efeitos adversos, beneficiando principalmente, pacientes que apresentam dor crônica ou que estão em outras condições que necessitem da utilização contínua do medicamento com administrações repetidas<sup>13</sup>.

Pesquisas com diferentes tipos de sistemas carreadores têm sido desenvolvidas, tornando possível a alteração de propriedades farmacológicas dos AL<sup>14</sup> prolongando seus efeitos, promovendo melhora da solubilidade e redução da toxicidade<sup>15,16,17</sup>.

Um dos carreadores mais utilizados em sistemas de liberação controlada são as ciclodextrinas (CD). As CD são cadeias cíclicas contendo um número variado de unidades de glicoses ligadas, e a complexação com outras moléculas se dá por meio do deslocamento das moléculas de água na cavidade interna<sup>18</sup>. Essas moléculas também sofreram modificações estruturais ao longo do tempo,

originando derivados mais hidrossolúveis como a sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE $\beta$ CD), utilizada no presente estudo como carreador do cloridrato de BVC<sup>19</sup>.

Diante disso, o presente estudo propôs preparar, caracterizar e avaliar o perfil citotóxico de um novo complexo de inclusão entre BVC e SBE $\beta$ CD sob a hipótese de que o complexo de inclusão seria capaz de melhorar as propriedades farmacológicas do AL em relação à solubilidade, biodisponibilidade e toxicidade.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Anestésicos locais

AL são compostos químicos cuja atividade farmacológica primária envolve o bloqueio reversível da condução nervosa<sup>9</sup>.

O primeiro AL a ser utilizado foi a cocaína, proveniente das folhas do arbusto coca (*Erythroxylon coca*). A cocaína foi isolada pela primeira vez em 1860 por Albert Niemann, que observou seus poderes de produzir entorpecimento. Em 1886, Carl Koller introduziu a cocaína na prática clínica como anestésico oftalmológico tópico<sup>8,20</sup>. Entretanto, suas propriedades aditivas e toxicidade levaram à pesquisa de substitutos como: benzocaína, procaína, prilocaína, lidocaína, mepivacaína, bupivacaína, ropivacaína, levobupivacaína entre outros<sup>8,20,21</sup>.

Na anestesia local, os medicamentos são depositados no local de ação desejado, interrompendo a transmissão de sinais de dor para o sistema nervoso central. As formas de aplicação incluem: injeção em todo o tecido a ser afetado (anestesia por infiltração), em um nervo periférico específico que leva à anestesia de todas as estruturas inervadas por este (bloqueios de nervos periféricos), ou ao redor da medula espinhal (bloqueios espinhais e epidurais)<sup>8</sup>. Os AL podem ser usados para tratar tanto a dor aguda (ex.: dor perioperatória) quanto a dor crônica (ex.: dor relacionada ao câncer)<sup>22</sup>.

Os AL agem principalmente nos canais de Na<sup>+</sup> voltagem dependentes que são integrados às proteínas de membrana responsáveis por despolarização inicial rápida do potencial de ação nas células nervosas e musculares, podendo apresentar três conformações: fechado, aberto ou inativo<sup>23</sup>. Há uma constante diferença de tensão entre o interior e exterior da célula, que se dá em função de

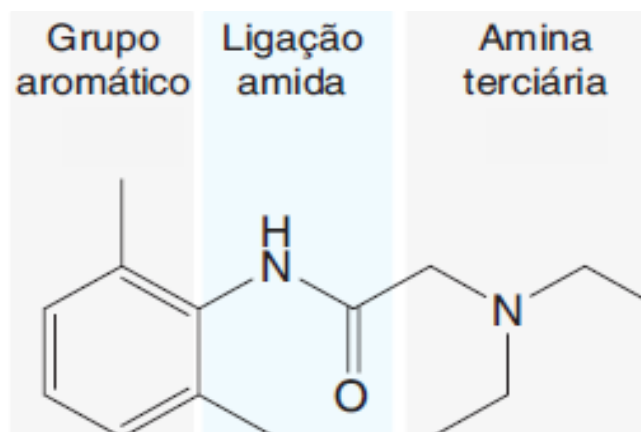
uma distribuição desigual dos íons na membrana plasmática. Nos potenciais de membrana negativos, a maioria dos canais de  $\text{Na}^+$  se encontram fechados e em repouso. Em resposta à despolarização da membrana, os canais são abertos em milissegundos, resultando em influxo de  $\text{Na}^+$ , e em seguida são convertidos para um estado inativo. Neste período, o canal permanece sem função, impossibilitando uma nova abertura mesmo em caso de um novo estímulo de despolarização<sup>9</sup>.

A principal função do AL é se ligar à proteína de membrana dos canais de  $\text{Na}^+$  a fim de mantê-los em seu estado inativo, desta forma ocorre a interrupção da propagação do estímulo nervoso e conseqüentemente a ausência de sensação (anestesia)<sup>21</sup>. Como o sítio de ligação do AL (proteína de membrana) atravessa a membrana e se comunica tanto com interior quanto com exterior da célula e cobre a bicamada lipídica, as moléculas do AL precisam de difundir pela membrana celular. Por esse motivo, a difusão é facilitada quando o fármaco está na sua forma não ionizada (lipossolúvel), sofrendo alteração também do pH do meio por se tratar de uma base fraca, fator que limita a ação do fármaco em tecidos lesionados por exemplo<sup>24</sup>.

Os AL possuem, em geral, três características distintas em sua estrutura: um grupo aromático, uma cadeia intermediária e um grupo amino ionizável<sup>9</sup> (Figura 1).

A estrutura do grupo aromático influencia na hidrofobicidade do fármaco, a natureza do grupo amina influencia a velocidade de início e a potência do fármaco, e a estrutura do grupo amida ou éster influencia a duração de ação e os efeitos colaterais do fármaco<sup>21</sup>.

Os AL podem ser classificados de acordo com o tipo de ligação entre o grupo aromático e a cadeia intermediária. Os agentes que possuem uma ligação éster entre o grupo aromático e a cadeia intermediária são denominados amino-ésteres e incluem compostos como a procaína e a tetracaína. Já os AL com uma ligação amida entre a cadeia intermediária e o grupamento aromático são conhecidos como amino-amidas, por exemplo a lidocaína, mepivacaína, bupivacaína, ropivacaína, prilocaína, etidocaína, entre outros<sup>8</sup>.



**Figura 1.** Anestésico local com ligação amida (lidocaína)<sup>9</sup>

A principal diferença entre grupos ésteres e amidas está relacionada à estabilidade química. Em geral, os anestésicos locais com ligação éster são facilmente hidrolisados a ácido carboxílico e a um álcool na presença de água e esterases. Em comparação, as amidas são muito mais estáveis em solução e possuem geralmente maior duração de ação do que os anestésicos com ligação éster<sup>8,9</sup>.

As propriedades clinicamente importantes dos AL incluem: potência, velocidade de início e duração da atividade<sup>8,25</sup>. A solubilidade lipídica parece ser a principal determinante da potência anestésica intrínseca. Considerando a composição bioquímica da membrana neuronal, existe uma lógica, visto que a membrana é composta basicamente de uma matriz lipoproteica. Contudo, a solubilidade em água é essencial para o transporte do fármaco até as fibras nervosas, ou seja, o equilíbrio da característica anfifílica do AL garante o transporte do fármaco até a célula-alvo e a penetração deste na membrana celular<sup>26</sup>.

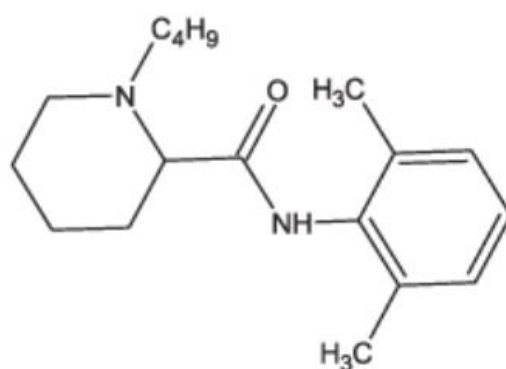
A velocidade de início da ação do AL é determinada pelo pKa, ou seja, o pH em que as formas ionizada e não ionizada do produto químico se encontram em quantidades iguais<sup>8</sup>. Como a forma não ionizada (base) do agente anestésico local é principal responsável pela difusão em toda a bainha e membrana nervosa, o início da ação estará diretamente relacionado à quantidade de droga que existe nessa forma (não ionizada)<sup>26,27</sup>. A porcentagem de um anestésico local específico, que está presente na forma não ionizada quando injetada no tecido de pH 7,4, é inversamente proporcional ao pKa desse agente, por exemplo, o

pKa da BVC é 8,1, o que significa que 15% desse agente está presente no meio não ionizado a um pH tecidual de 7,4, e 85% existe na forma ionizada<sup>8,27</sup>.

A duração da anestesia está relacionada principalmente ao grau de ligação às proteínas dos vários locais anestésicos. Acredita-se que o bloqueio da condução ocorre após a interação dos AL com um receptor de proteína localizado dentro do canal de Na<sup>+</sup> da membrana nervosa. Compostos químicos que possuem uma maior afinidade e se ligam mais firmemente ao local do receptor permanecem dentro do canal por um longo período, resultando em uma duração prolongada do bloqueio da condução<sup>8,28</sup>.

## 2.2 Bupivacaína

Dentre os AL do grupo amino-amida, a BVC (Figura 2) é o AL mais utilizado em procedimentos cirúrgicos, principalmente para anestésias regionais prolongadas<sup>29</sup>. E foi o primeiro anestésico local que combinou propriedades como início de ação moderado, longa duração, bloqueio da condução e seleção significativa entre bloqueio sensorial e motor<sup>8,30</sup>. O cloridrato de bupivacaína é considerado um anestésico local de longa duração, com janela terapêutica de 4 a 8 horas. Sua aplicação pode ser realizada em anestesia cirúrgica ou regional em diversos procedimentos médicos e odontológicos<sup>31,32</sup>.



Bupivacaína

**Figura 2.** Estrutura química da BVC<sup>9</sup>.

As propriedades farmacológicas, em relação a outros AL do tipo amino-amida, incluem uma hidrofobicidade relativamente maior, o que o torna altamente potente em decorrência de um grupo butila fixado ao nitrogênio terciário<sup>9</sup>, pKa mais elevado (8,1) e maior potência, contudo, apresenta também uma maior toxicidade<sup>32,33,34</sup>.

Todos os anestésicos locais são capazes de produzir toxicidade alérgica, local e sistêmica, e embora esses efeitos sejam raros nos AL modernos, a toxicidade do sistema nervoso (SNC) e sistema cardiovascular têm sido um problema desde a primeira utilização e desde então, novos estudos buscam aprimorar as características farmacológicas dos AL<sup>8</sup>.

### **2.3 Sistemas de liberação controlada**

Uma alternativa utilizada para minimizar os efeitos adversos e melhorar as características farmacológicas dos AL, é o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada contendo AL em carreadores, como lipossomas e ciclodextrinas, que possibilitam a manipulação de algumas propriedades físico-químicas além de melhorarem os efeitos terapêuticos, favorecendo sua utilização clínica<sup>35</sup>.

A exemplo da utilização desses sistemas associados aos AL, recentes estudos demonstram que a bupivacaína lipossomal fornece analgesia local por até 72 horas e foi recomendada a sua inclusão nos protocolos de analgesia multimodal, principalmente em situações em que os opioides não podem ou não devem ser usados<sup>36,37</sup>. Contudo, a única forma de comercialização desta formulação é por meio do Exparel<sup>®</sup>, e estudos descreveram resultados inconsistentes em relação à sua efetividade farmacológica, uma vez que o uso de BVC lipossomal não induziu analgesia clinicamente relevante em comparação aos opiáceos<sup>37</sup>, não reduziu o consumo de opioides no pós-operatório<sup>38</sup> e não diminuiu o número de dias no hospital<sup>39</sup>.

Diante disso, as CD representam substituintes hidrofílicos interessantes para resolver esses desafios e ajudar no desenvolvimento de medicamentos com maior solubilidade em água bem como na liberação aprimorada de medicamentos.

## 2.4 Ciclodextrinas

As CD são oligossacarídeos cíclicos contendo um número variado de unidades de glicoses<sup>13</sup> produzidas pela hidrólise de amido que resulta em complexos ligados a seis ( $\alpha$ -CD), sete ( $\beta$ -CD) ou oito ( $\gamma$ -CD) unidades de  $\alpha$ -1,4 D-glicose<sup>40,41</sup>.

As moléculas de CD contêm uma superfície hidrofílica responsável pela solubilidade aquosa e o interior hidrofóbico. A complexação com outras moléculas se dá por meio do deslocamento das moléculas de água na cavidade interna que permite alteração de propriedades físico-químicas, da estabilidade e biodisponibilidade dos fármacos complexados<sup>41</sup>.

Dentre as CD naturais, a  $\beta$ -CD apresenta menor solubilidade aquosa devido às ligações de hidrogênio formadas entre as hidroxilas que estão voltadas para o interior (hidrofóbico), o que diminui a interação com água<sup>41</sup>. A fim de aumentar a solubilidade desses compostos e diminuir a toxicidade, modificações foram realizadas na estrutura química das  $\beta$ -CD, originando derivados como 2,6-dimetil- $\beta$ -ciclodextrina (DM $\beta$ -CD), 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ -CD) e sulfobutileter- $\beta$ -CD (SBE $\beta$ -CD)<sup>19</sup>, utilizada como excipiente da BVC no presente estudo. A SBE $\beta$ -CD é composta por sete unidades de  $\alpha$ -D glicopiranosose, apresentando um grupo butil hidrofóbico<sup>42,43</sup> (figura 3).

As CD permitem a criação de diferentes complexos reversíveis de inclusão e diferentes estequiometrias (Figura 4), a depender da estrutura e propriedades da molécula convidada. Os complexos hospedeiro-convidado fornecem refúgio e proteção para moléculas convidadas no ambiente biológico, levando a um aprimoramento na solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade das moléculas convidadas<sup>44</sup>.

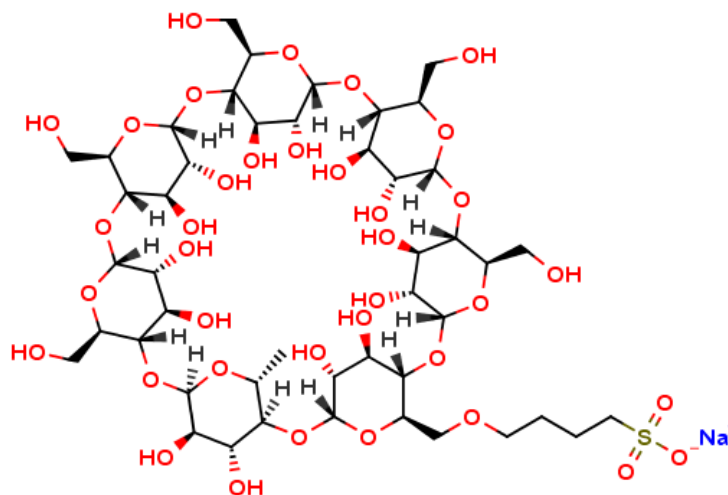


Figura 3. Estrutura química da SBEβCD.

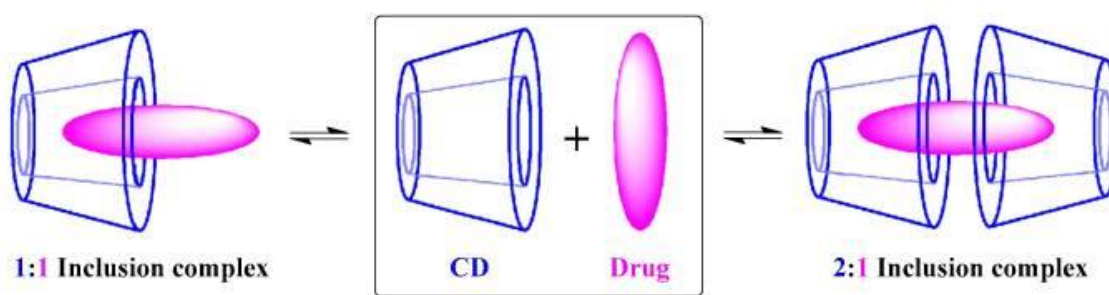


Figura 4. Dois exemplos de estequiometria adotados por complexos de inclusão de drogas em ciclodextrinas<sup>44</sup>.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Desenvolver uma nova formulação de bupivacaína complexada em sulfobutileter-β-ciclodextrina e avaliar o perfil citotóxico da formulação.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Identificar a absorvância da bupivacaína e da sulfobutileter-β-ciclodextrina;
- Analisar as alterações no perfil de solubilidade da bupivacaína;



- Determinar a estequiometria da formulação;
- Confirmar a formação do complexo;
- Testar a formulação sobre a viabilidade celular (*in vitro*).

## 4. MÉTODO

### 4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental quanti-qualitativo.

### 4.2 Local de Estudo

As etapas do presente estudo foram realizadas em diferentes instituições, conforme exposto a seguir:

- a) Laboratório de Biomembranas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP): experimentos de caracterização;
- b) Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade Guarulhos: preparação das formulações e meios de cultura para ensaios *in vitro*;
- c) Laboratório de Odontologia da Universidade Guarulhos: testes *in vitro* de viabilidade celular;
- d) Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), onde foram realizados os experimentos de viabilidade celular por microscopia de fluorescência e perda do potencial mitocondrial.

### 4.3 Reagentes

Foram utilizados o cloridrato de bupivacaína (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, Itapira, SP), tampão HEPES, Meio Eagle de Dulbecco modificado/ F12 – DMEM/F12 e MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina (Dexolve<sup>TM</sup>) da CycloLab Cyclodextrin Research and Development Laboratory Ltda (Budapeste, Hungria). O soro fetal bovino e os antibióticos penicilina e estreptomicina foram adquiridos junto a empresa GIBCO<sup>®</sup>, Reino Unido).

Foram utilizados também, os reagentes LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity for mammalian cells (Invitrogen Life Technologies) e o kit DePsipher (R&D Systems, Inc. Minneapolis, EUA).

#### **4.4 Análise do Espectro de Absorção por UV-Vis da Bupivacaína**

Para análise do espectro de absorção da BVC, foi produzida uma solução padrão de 1 mM de BVC diluída em água destilada e tampão HEPES 20 mM com NaCl 150 mM (pH ajustado para 7,4). Após a dissolução da BVC, o pH das soluções foi medido.

Posteriormente, a leitura de absorção foi realizada em triplicata, com espectrofotômetro (Varian® UV-VIS, Bio 50) no intervalo de 240- 300 nm, utilizando células de quartzo com comprimento de percurso otimizado de 1 cm. Água destilada foi utilizada para definir o branco da reação. A absorção máxima foi definida pelo comprimento de onda que apresentou a maior absorbância. Este comprimento de onda foi utilizado para realizar as leituras da BVC no espectrofotômetro. A absorbância da SBE $\beta$ -CD também foi analisada (na concentração de 1 mM) a fim de identificar possível interferência da molécula de CD na leitura da BVC.

#### **4.5 Curva padrão da Bupivacaína**

Foi realizado uma curva de calibração para quantificar a concentração de BVC nas amostras durante os experimentos de caracterização físico-químicas. A BVC foi diluída seriadamente nas concentrações 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM e 0,0625 mM em água destilada. A absorbância foi mensurada utilizando espectrofotômetro (Varian® UV-VIS, Bio 50) com células com comprimento de percurso otimizado de 1 cm. O comprimento de onda utilizado foi de 262 nm (definido a partir do espectro de absorção da BVC).

#### **4.6 Avaliação da solubilidade da bupivacaína: isotermas de solubilidade**

Os experimentos de solubilidade foram determinados adicionando quantidades em excesso de BVC (30 mM) em sistemas contendo SBE $\beta$ CD (0,5,10,20,30,40,50 e 60 mM) em solução aquosa (HEPES 60 mM em NaCl 150 mM, pH 7,4). As suspensões foram submetidas a agitação em temperatura

ambiente a 400 rotações por minuto (RPM), durante 24 horas. Após esse período, os frascos foram agitados no vórtex por 30 segundos e as soluções foram filtradas com membrana poliestersulfônica (PES) com tamanho de poro de 0,22 $\mu$ M e realizada novamente a leitura no espectrofotômetro em alíquotas 10 vezes diluídas. O comprimento de onda utilizado foi 262 nm.

A porção linear da curva foi utilizada para determinar a constante de associação ( $K_s$ ) através da fórmula abaixo<sup>30</sup>.

$$K_s = \frac{\text{inclinação}}{S_0 (1 - \text{inclinação})}$$

Sendo:  $S_0$  a solubilidade inicial da BVC; inclinação: porção linear da curva.

#### **4.7 Cinética da formação de complexos: Modificação do espectro de absorção da bupivacaína**

A avaliação da cinética de formação dos complexos, foi realizada a partir de uma solução em quantidade adequada de SBE $\beta$ CD e BVC na razão molar de 1:1, em solução aquosa sob agitação. Posteriormente, alíquotas foram retiradas e analisadas por espectrofotometria UV no comprimento de onda de 262 nm durante 24 horas, em intervalos de 10 minutos na primeira hora, 30 minutos para segunda e terceira horas, 60 minutos até a 8 horas de experimentação e finalmente, a cada 12 horas.

#### **4.8 Determinação da estequiometria do complexo de inclusão**

A avaliação da estequiometria de complexação da BVC com SBE $\beta$ CD foi realizada por meio de job plot<sup>31</sup>.

Utiliza-se concentrações crescentes de BVC e decrescentes de SBE $\beta$ CD sendo a concentração molar final estabelecida em 2mM. As concentrações são utilizadas para encontrar o valor de  $r$  (razão molar BVC/ SBE $\beta$ CD) de acordo com a seguinte fórmula:

$$r = \frac{[BVC]}{\{[BVC]_{\text{total}} + [SBE\beta CD]_{\text{total}}\}}$$

Este método de variação contínua, permite que um parâmetro físico diretamente relacionado com a concentração do complexo possa ser medido e representado graficamente em função de  $r$ . O valor máximo para este parâmetro ocorre em:  $r=m/(m+n)$ , onde  $m$  e  $n$  são as proporções de BVC e SBE $\beta$ CD no complexo, respectivamente. Isto quer dizer que, se a estequiometria é 1:1 ( $m,n=1$ ) o valor máximo para o parâmetro examinado é observado em  $r=0,5$ . Neste método, se observam as mudanças na intensidade da absorção UV por variação na concentração de BVC e SBE $\beta$ CD.

A análise foi realizada a partir da preparação de soluções crescentes de SBE $\beta$ CD (razões molares SBE $\beta$ CD:BVC de 0:2; 0,25:1,75; 0,5:1,5; 1:1; 1,5:0,5; 1,75:0,25; 2:0 mM) utilizando como veículo, tampão HEPES 5mM (pH ajustado para 7,4). Os frascos permaneceram sob agitação por 12 horas em temperatura ambiente a 400 rpm. Após esse período, foi realizada a leitura em triplicata por meio de espectrofotometria UV no comprimento de onda de 262 nm.

Em seguida, foi construído um gráfico a partir das variações determinadas pelo delta de absorbância:  $\Delta A = A_0 - A$ , sendo  $A_0$  = absorbância da BVC sem SBE $\beta$ CD e  $A$  = absorbância da BVC com SBE $\beta$ CD. Os resultados foram plotados no gráfico como descritos a seguir: eixo  $y$  = delta da BVC x a concentração de BVC, e o eixo  $x$  = valor de  $r$ .

## **4.9 Preparação do complexo**

### **4.9.1 Bupivacaína livre**

Foi utilizado o cloridrato de BVC, que para os testes in vitro foi diluído em meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) e esterilizado por filtração com membranas de 0.22  $\mu$ M (TPP, Zollstrasse, Suíça).

### **4.9.2 Preparações da bupivacaína complexada em sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE $\beta$ CD/BVC)**

Os complexos de inclusão sólido foram obtidos misturando-se quantidades apropriadas de SBE $\beta$ CD e o cloridrato de BVC em água deionizada, para obtenção de razão molar de 1:1. A amostra permaneceu sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi liofilizada e guardada a -20°C para posterior uso<sup>10,39</sup>.

O complexo foi preparado em quantidade suficiente para obter a concentração adequada do anestésico e, posteriormente, foi dissolvido em RPMI 10% FBS. Após a ressuspensão do liofilizado, as soluções foram esterilizadas por filtração com membranas de 0.22  $\mu\text{M}$  (TPP, Zollstrasse, Suíça).

#### **4.10 Espectroscopia por infravermelho**

O experimento foi realizado utilizando um espectrômetro (Cary 630 – FTIR Spectrometer, Agilent) em uma faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando acessórios para refletância total atenuada, com 64 digitalizações e amostras com 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolução. Foram obtidos os espectros da BVC livre, SBE $\beta$ CD, mistura física e complexo SBE $\beta$ CD/ BVC. As amostras foram analisadas utilizando suportes do tipo KBr.

#### **4.11 Cultura celular**

Foram utilizadas células SH-SY5Y, cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de FBS, glutamina (4 mM), glicose (4500 mg/L), piruvato de sódio (1 mM) e bicarbonato de sódio (1500 mg/L), penicilina (100 U/mL) estreptomomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e gentamicina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). As células foram crescidas em placas de petri para cultura de tecidos (100 x 20 mm) e mantidas em uma estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Os experimentos foram conduzidos utilizando uma confluência de aproximadamente 80%.

#### **4.12 Análise de citotoxicidade por redução do MTT**

As células SH-SY5Y ( $2 \times 10^4$  células/poço) foram transferidas para a placas de cultura de células 96 poços. As formulações de BVC, SBE $\beta$ CD e SBE $\beta$ CD-BVC foram diluídas em meio de cultura, e permaneceram expostas aos tratamentos por 24 h. DMEM 10% FBS foi utilizado como controle. As células foram expostas a concentrações crescentes das formulações (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  e 5000  $\mu\text{M}$ ) com o objetivo de determinar o  $\text{IC}_{50}$ .

Após o período de incubação, a citotoxicidade foi verificada por meio do ensaio de redução do MTT. Os poços foram lavados com PBS (pH 7,4) e adicionados 200  $\mu\text{L}$  de DMEM/F12 contendo 0,5 mg/mL de MTT. As células foram incubadas por 4h, em seguida, o meio foi removido e 100  $\mu\text{L}$  de álcool

absoluto foi adicionado aos poços para dissolver os cristais de formazan. Os poços foram homogeneizados e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle.

#### **4.13 Análise da Citotoxicidade por Microscopia de Fluorescência**

Os resultados do MTT para a viabilidade celular foram confirmados por microscopia de fluorescência através da marcação pelos reagentes LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity for mammalian cells (Invitrogen Life Technologies).

As células SH-SY5Y foram expostas às formulações na concentração equivalente ao IC<sub>50</sub> da BVC livre (determinado no ensaio de redução do MTT) por 24 h. Células tratadas apenas com DMEM/F12 suplementado com 10% FBS foram utilizadas como controle.

Os reagentes EthD-1 e calceína-AM foram combinados formando uma solução com concentração final de 2 µM de calceína-AM e 4 µM de EthD. Aproximadamente 300 µL dessa solução foram adicionados às placas de cultura de células, cobrindo toda a extensão. As células foram incubadas por 30 a 45 minutos em temperatura ambiente.

As imagens foram feitas no microscópio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL acoplado a câmera AxioCam MEC (Carl Zeiss, Alemanha). A calceína foi visualizada utilizando filtro na faixa de comprimento de onda 450-490 nm (Ex)/ 515-565 (Em). Já as células marcadas em vermelho foram visualizadas na faixa de comprimento de onda de 528-546 nm (Ex)/ 590-617nm (Em).

#### **4.14 Avaliação da perda de potencial da mitocôndria**

O efeito da BVC sobre a perda do potencial mitocondrial foi avaliado por microscopia da fluorescência utilizando o kit DePsipher (R&D Systems, Inc. Minneapolis, EUA). As células SH-SY5Y (1x10<sup>5</sup>/mL) foram cultivadas em placas de cultura de células de 96 poços e expostas à BVC 215 µM (concentração próxima ao IC<sub>50</sub>) por 24 horas.

Decorrido o período de incubação, as células foram lavadas com PBS 1x e o reagente DePsipher foi adicionado seguindo o protocolo do fabricante. Também foi adicionado o Hoechst (5 µg/mL) para marcar o núcleo das células.

As placas foram novamente incubadas no escuro por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com o tampão de reação acrescido da solução estabilizadora. Por fim, as células foram observadas no microscópio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL acoplado a câmera AxioCam MEC (Carl Zeiss, Alemanha). Os efeitos do anestésico local sobre o potencial da membrana mitocondrial foram observados utilizando os filtros na faixa de comprimento de onda 450-490 nm (Ex)/ 515-565 (Em) e 528-546 nm (Ex)/ 590-617nm (Em). Os núcleos marcados com Hoechst foram observados utilizando o filtro no comprimento de onda ultravioleta (358 Ex / 461 Em).

#### **4.15 Análise estatística**

Os dados foram testados quanto à sua normalidade de distribuição (teste de Shapiro-Wilks) e equivalência das variâncias (teste de Levene). Posteriormente os resultados da viabilidade celular foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA dois critérios). O teste de ANOVA Tukey foi utilizado para comparar as formulações em relação ao controle. Também foi aplicada a análise de regressão não linear sobre os resultados de viabilidade celular. Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico Bioestat<sup>®</sup> 5.0 (Instituto Mimirauá, Tefé, AM, Brasil) e o software GraphPad Prism (version 6, San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Análise do espectro de absorção por UV-Vis da bupivacaína**

A análise da absorbância da BVC foi realizada no intervalo de 240-300 nm, sendo que o espectro de absorção máximo apresentou comprimento de onda de 262 nm (Figura 5). Esse comprimento de onda foi adotado como padrão para leitura nos experimentos de caracterização posteriores.

A absorvância da SBE $\beta$ CD também foi analisada (na concentração de 1 mM) e não apresentou interferência na leitura do BVC, sendo próxima a zero.

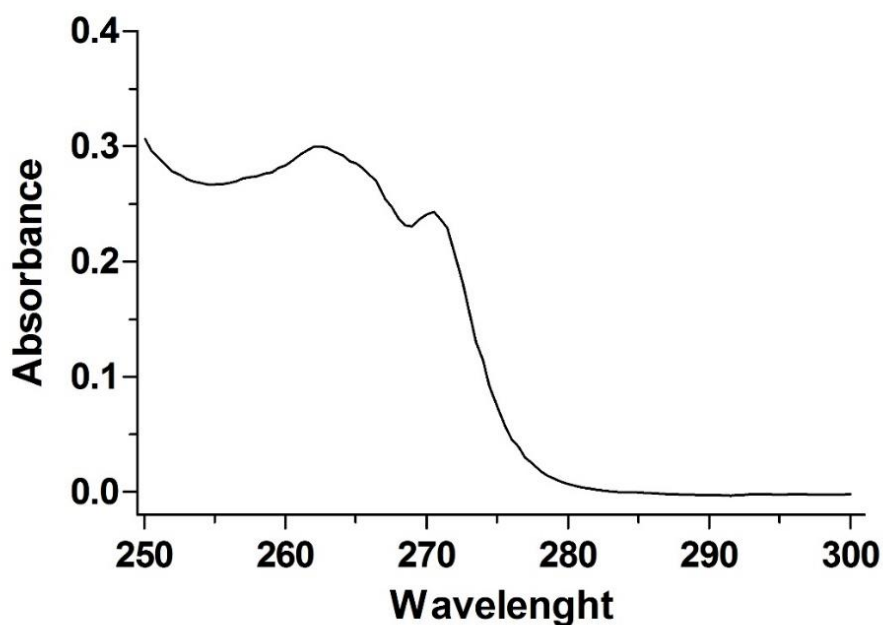


Figura 5. Espectro de absorção da BVC a uma concentração de 1mM.

## 5.2 Curva padrão da bupivacaína

Com intuito de determinar as concentrações de BVC nas amostras utilizadas nos experimentos de caracterização, foi realizada uma curva padrão com AL nas concentrações que variaram entre 0,062 a 2 mM (Figura 6). A curva apresentou uma função linear, com  $R^2=0,9998$ .

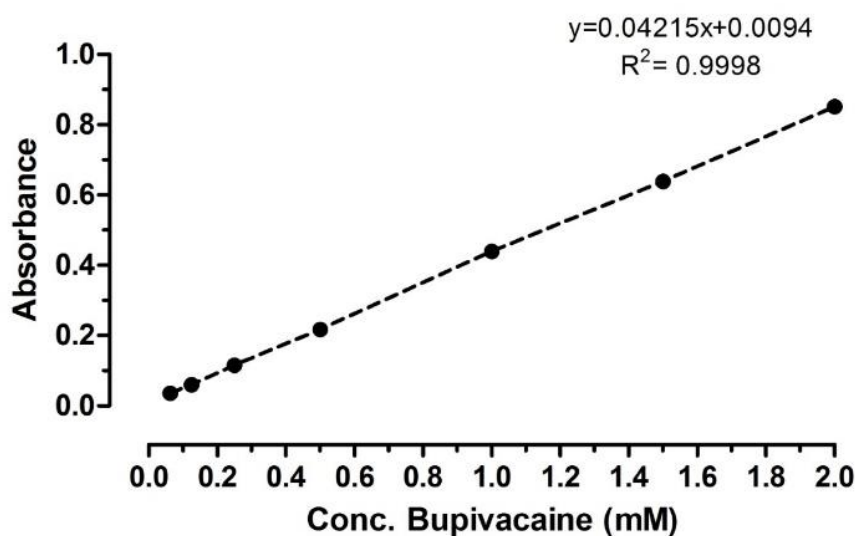


Figura 6. Curva padrão da BVC.

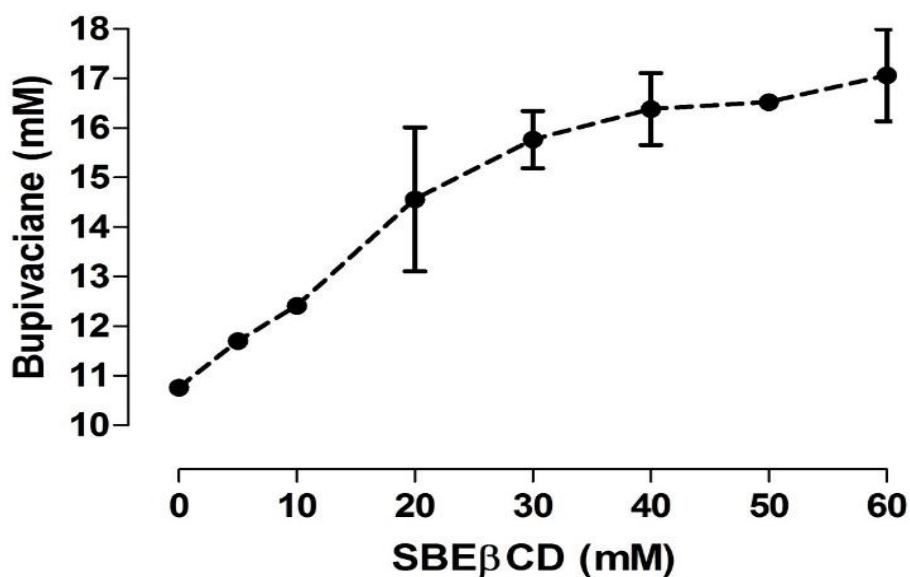


### 5.3 Avaliação da solubilidade da bupivacaína: isotermas de solubilidade

Experimentos de solubilidade de fases foram realizados utilizando diferentes concentrações para observar as alterações na solubilidade da BVC e determinar a constante de associação ( $K_s$ ). Os resultados são apresentados na figura 7.

Com o aumento das concentrações de  $SBE\beta CD$ , houve um aumento linear da solubilidade da BVC até alcançar uma concentração próxima a razão molar de 1:1. A curva atingiu o platô entre as concentrações de 30 e 40 mM de  $SBE\beta CD$ .

O gráfico apresenta um comportamento de solubilidade de fases do tipo  $A_N$ , seguindo o modelo de Higuchi & Connors<sup>19</sup>. A  $K_s$  foi calculada a partir da inclinação da curva, utilizando apenas a porção linear, sendo resultado igual a 13,17. O valor da inclinação foi de 0,171 com  $R^2 = 0,9911$ .

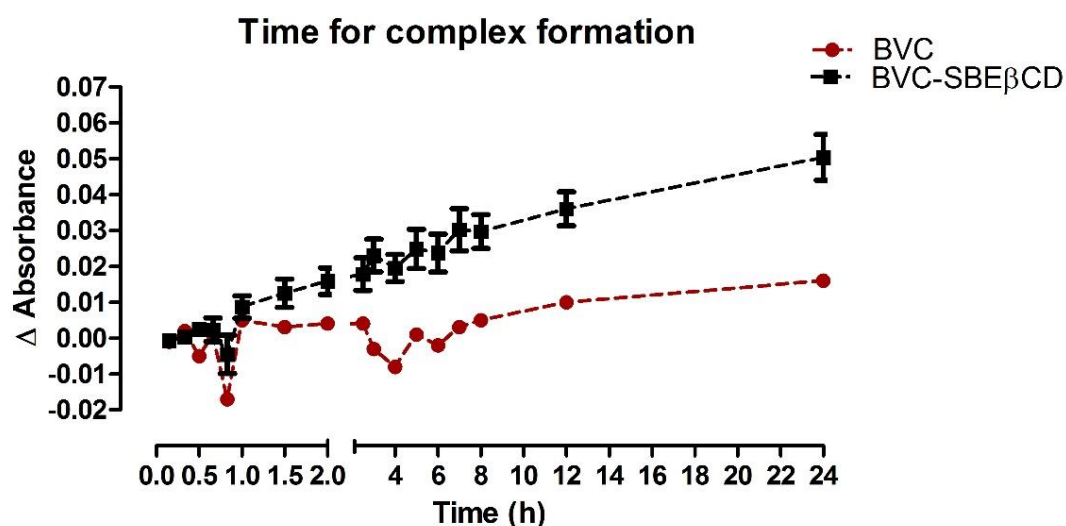


**Figura 7.** Diagrama de solubilidade de fases para BVC e  $SBE\beta CD$ . Os pontos representam a média e as barras de erros indicam o desvio padrão ( $n=3$ ).

#### 5.4 Cinética de formação de complexos: Modificação do espectro de absorção da BVC

Os experimentos de cinética tiveram a finalidade de determinar o tempo necessário para o equilíbrio na formação do complexo de inclusão da BVC com a SBE $\beta$ CD. A concentração de BVC e de SBE $\beta$ CD utilizada foi de 1 mM, o resultado está apresentado na Figura 8.

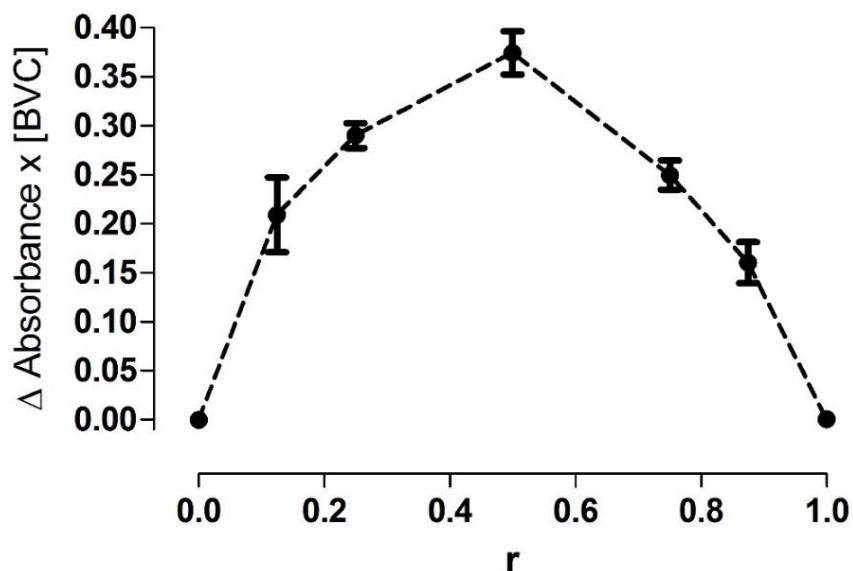
O gráfico apresenta a variação da absorbância ao longo do tempo, comparando a solução de BVC livre e associada a SBE $\beta$ CD. Mudanças na absorbância da bupivacaína podem indicar a formação do complexo. A formulação de SBE $\beta$ CD + BVC apresenta aumento na absorbância a partir de uma hora e meia em relação a BVC livre. O equilíbrio foi alcançado por volta de 12 horas.



**Figura 8.** Cinética de complexação entre BVC e SBE $\beta$ CD (1:1). As médias são representadas pelos pontos e as barras de erros representam o desvio padrão (n=3).

#### 5.5 Determinação da estequiometria do complexo de inclusão

A técnica de Job's plot foi realizada para determinar a estequiometria do complexo de inclusão. Mudanças na absorbância da BVC foram plotadas em relação ao r como descrito nos métodos (Item 3.5). O valor máximo de r foi em 0,5, o que significa que a estequiometria de complexação foi de 1:1, como demonstrado na figura 9.

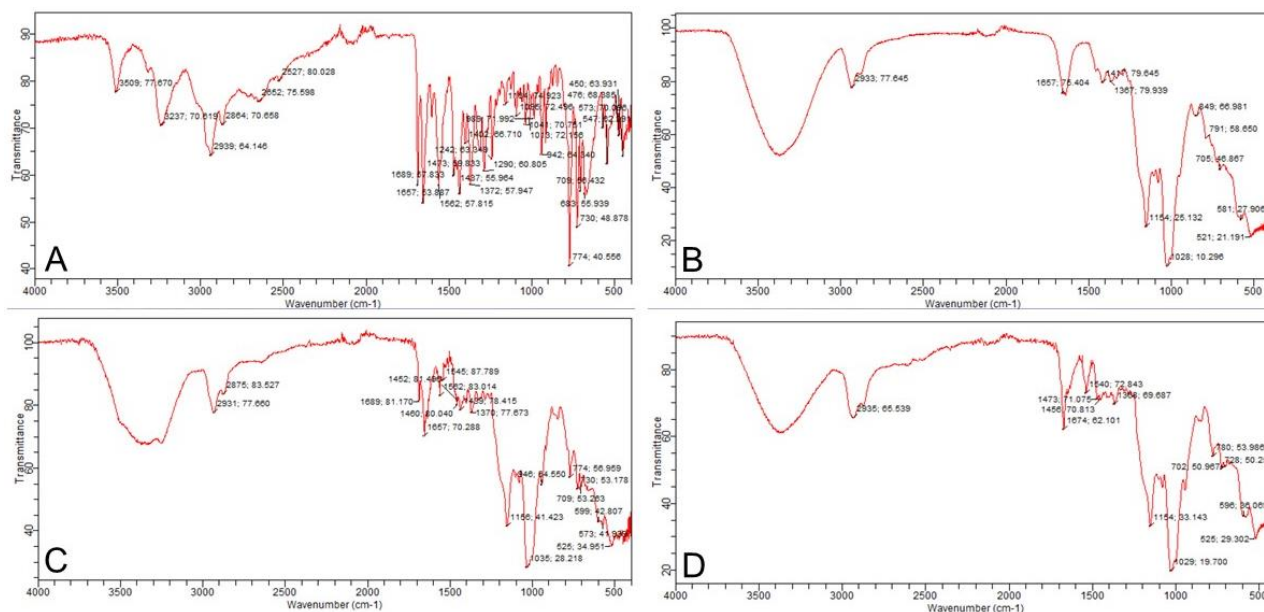


**Figura 9.** Estequiometria de complexação por variação contínua (job plot) revelando razão molar 1:1. As médias são representadas pelos pontos e as barras de erros representam o desvio padrão ( $n=3$ ).

## 5.6 Espectroscopia por infravermelho

Foi realizado a análise das amostras por espectroscopia por infravermelho na faixa de onda entre  $400-4000\text{ cm}^{-1}$ , os resultados são apresentados na figura 10. O espectro de infravermelho da bupivacaína apresenta as principais bandas de absorção nas frequências aproximadas de  $3509\text{ cm}^{-1}$  (vibrações das ligações O-H),  $3237\text{ cm}^{-1}$  (vibrações das ligações N-H) e  $2939\text{ cm}^{-1}$  (vibrações das ligações  $\text{CH}_3$ ). As principais bandas de absorção da SBE $\beta$ CD foram verificadas nas frequências  $3431\text{ cm}^{-1}$  (vibrações das ligações O-H),  $2933\text{ cm}^{-1}$  (vibrações das ligações C-H) e  $1028\text{ cm}^{-1}$  (vibrações das ligações C-O).

O espectro da mistura física apresenta uma sobreposição entre os espectros da bupivacaína e da SBE $\beta$ CD. No entanto, ao analisar o espectro infravermelho do complexo de inclusão, observa-se o desaparecimento de algumas bandas de absorção características da BVC. Desta forma, este resultado confirma a formação do complexo entre BVC e SBE $\beta$ CD (tabela 1).



**Figura 10.** Espectroscopia por infravermelho das amostras de bupivacaína (A), SBEβCD (B), mistura física (C) e do complexo de inclusão bupivacaína-SBEβCD (D).

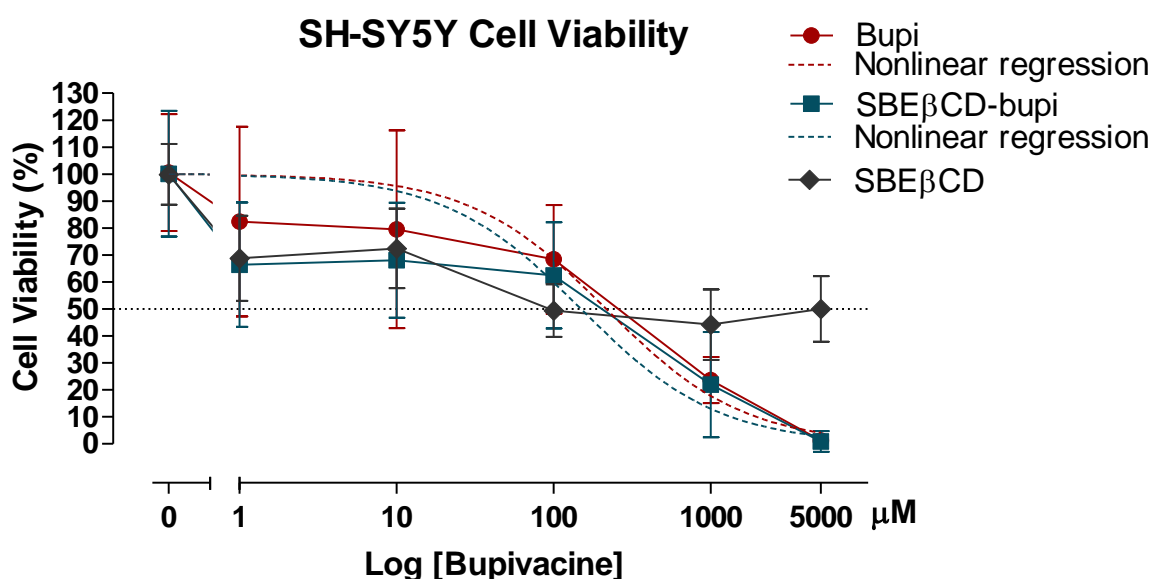
**Tabela 1.** Espectroscopia por infravermelho: principais bandas de absorção

Frequências (cm <sup>-1</sup> )			
Bupivacaína	SBEβCD	Mistura física	SBEβCD-bupi
3509			
	3431	3431	3431
3237		3237	
2939			
	2933	2931	2935
2864		2875	
1689		1689	
1657	1657	1657	1674
1562			
	1154	1156	1154
	1028	1035	1029
774		774	
730		730	

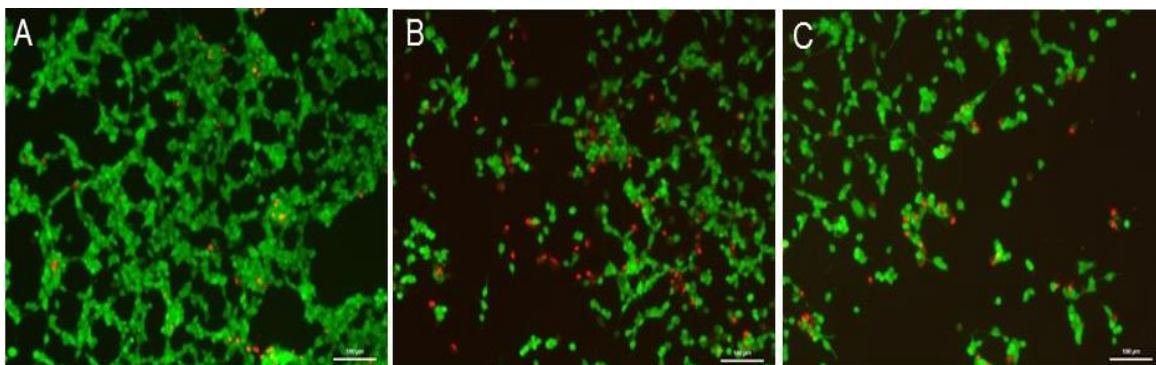
### 5.7 Análise de citotoxicidade por redução do MTT

A figura 11 apresenta os resultados da viabilidade celular realizadas pelo ensaio de redução do MTT. Não houve diferença estatística em relação a viabilidade nas células SH-SY5Y após exposição às formulações de bupivacaína e do complexo SBE $\beta$ CD-BVC ( $p > 0,05$ , ANOVA dois critérios).

A análise de regressão não linear foi utilizada para determinar a concentração inibitória 50 (IC<sub>50</sub>). O IC<sub>50</sub> calculado para as células SH-SY5Y foi de 216  $\mu$ M para bupivacaína e 150  $\mu$ M para o complexo SBE $\beta$ CD-BVC. Os resultados da viabilidade celular nas células SH-SY5Y foram confirmados por microscopia de fluorescência utilizando o método do LIVE/DEAD (figura 12). Todas as concentrações de SBE $\beta$ CD testadas reduziram significativamente a viabilidade celular das células SH-SY5Y em relação ao controle ( $p < 0,05$ , ANOVA Tukey).



**Figura 11.** Viabilidade (média e desvio padrão) nas células SH-SY5Y após 24 h de exposição às formulações de BVC e do complexo BVC-SBE $\beta$ CD. Eixo Y= a viabilidade das células em % relativa ao grupo controle. Eixo X= log da concentração das formulações em  $\mu$ M. Linhas pontilhadas representam a curva de regressão não linear dos tratamentos.

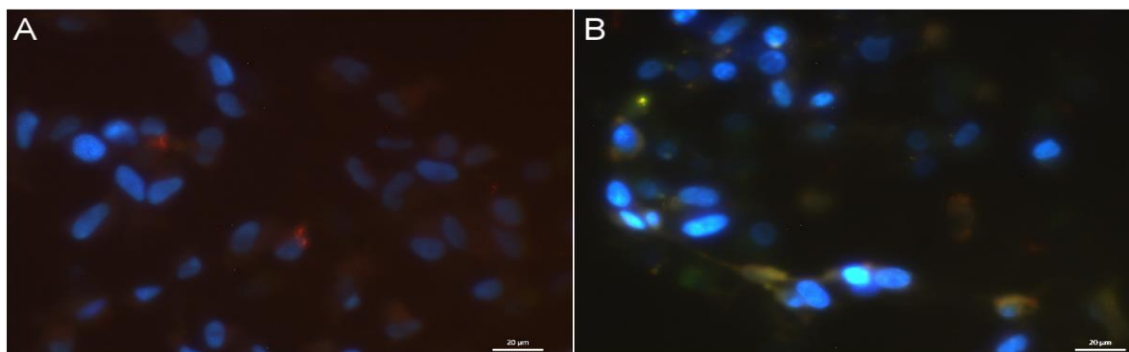


**Figura 12.** Imagens representativas da viabilidade celular em células de neuroblastoma (SH-SY5Y) após exposição por 24 horas ao controle (A), bupivacaína (B) e complexo bupivacaína-SBE $\beta$ CD (C). A marcação fluorescente foi realizada utilizando o reagente LIVE/DEAD. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio de fluorescência com aumento de 10 $\times$ , com sobreposição das imagens. A barra de escala representa 100  $\mu$ m. Os núcleos das células danificadas estão marcados em vermelho pelo EthD-1 e as células viáveis estão marcados pela fluorescência verde devido a distribuição intracelular da calceína AM.

### 5.8 Avaliação da perda do potencial mitocondrial

Foi avaliado o efeito da BVC sobre a perda do potencial mitocondrial nas células de neuroblastoma SH-SY5Y, utilizando a microscopia de fluorescência com o kit DePsipher. Os resultados estão apresentados na figura 13. A presença da fluorescência verde/amarela nas células tratadas com BVC 215  $\mu$ M por 24 h indica uma perturbação na membrana mitocondrial com consequente alteração no potencial da membrana.

A sonda utilizada apresenta uma coloração vermelho/laranja nas mitocôndrias em que o potencial da membrana mitocondrial se encontra em equilíbrio. Todavia, se o potencial for perturbado, a sonda não acessa o espaço transmembranar e permanece na sua forma monomérica que emite uma fluorescência no comprimento de onda da cor verde.



**Figura 13.** Imagens representativas da avaliação da perda do potencial mitocondrial nas células SH-SY5Y, no tratamento controle (A) e após 24 h de exposição à BVC 215 mM por 24 h (B). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio de fluorescência com aumento de 40 $\times$ , com sobreposição das imagens. A barra de escala representa 20  $\mu$ m.

## 6. DISCUSSÃO

O cloridrato de BVC foi o AL escolhido como objeto do presente estudo pois apresenta longa duração e maior seleção entre bloqueio sensorial e motor em comparação a outros AL<sup>8</sup>, o que o torna interessante para utilização com finalidade de analgesia prolongada.

Durante os últimos anos, vários estudos vêm sendo realizados a fim de desenvolver novas formulações anestésicas utilizando sistemas de liberação modificados, com objetivo de aprimorar os efeitos farmacológicos e minimizar os efeitos adversos<sup>14,32,45-48</sup>.

O processo de caracterização de novos complexos exige uma série de ensaios a fim de identificar o mecanismo de complexação. Um deles, é a avaliação de alterações no espectro de absorção por UV, pois mudanças mesmo que pequenas na absorbância das soluções podem ser utilizadas para acompanhamento da formação de complexo<sup>14,49</sup>, como observado no presente estudo pelo aumento na absorbância da BVC quando inserida na cavidade da SBE $\beta$ CD, que atingiu o equilíbrio na formação do complexo em 12 horas.

Duas propriedades são determinantes para que o complexo de inclusão exerça influência na molécula complexada, a estabilidade e solubilidade do complexo formado. Esses dois parâmetros distintos possuem relação direta, pois complexos mais estáveis apresentam uma maior solubilidade de fármacos pouco solúveis em água<sup>50</sup>. O estado de equilíbrio pode ser determinado por meio da Ks que indica estabilidade do complexo.

O valor da Ks encontrado no presente estudo corrobora com resultados na literatura<sup>48,51</sup>, e indica a capacidade de formação do complexo de inclusão em solução aquosa, contudo as forças que as mantêm são fracas, o que é desejável para que ocorra a liberação do fármaco na célula-alvo<sup>51</sup>. Outros fármacos também apresentam uma Ks fraca com CD, contudo, esses complexos ainda exibem propriedades biofarmacêuticas favoráveis<sup>52</sup>.

Os fármacos precisam ter um certo nível de solubilidade em água para serem prontamente entregues à membrana celular, e devem ser hidrofóbicos o suficiente para atravessá-la<sup>52</sup>. Um dos efeitos das CD é a capacidade de melhorar o sistema de entrega dos fármacos hidrofóbicos à membrana celular<sup>15</sup>.

No presente estudo, a melhora da solubilidade da BVC foi demonstrada pelo aumento no espectro de absorção do complexo quando comparado à BVC livre. A maior solubilidade pode resultar na melhora da biodisponibilidade, aumento do efeito farmacológico e consequente redução de administrações do medicamento<sup>19,53</sup>.

De acordo com análise da estequiometria de complexação por variação contínua (job's plot), o ponto máximo de interação entre a BVC e SBE $\beta$ CD ocorreu quando as substâncias apresentaram a mesma molaridade (em  $r=0,5$ ), confirmando a estequiometria de 1:1. Embora estequiometrias diferentes sejam possíveis, quando uma molécula do agente ativo se associa com uma molécula de CD para formar complexos reversíveis<sup>54</sup>.

Após determinar a estequiometria, as análises físico-químicas foram direcionadas para comprovar a formação do complexo de inclusão SBE $\beta$ CD-BVC. A espectroscopia por infravermelho é um método essencial para a caracterização de complexos de inclusão, pois permite detectar grupos funcionais, cuja presença pode ser difícil através de outros métodos. Quando se forma o complexo, pequenos deslocamentos das bandas das CD poderão mascarar as do hóspede<sup>53</sup>. No presente estudo, foi observado o desaparecimento de bandas de absorção características da BVC na amostra do complexo SBE $\beta$ CD-BVC, indicando a formação do complexo de inclusão. Esse resultado já havia sido observado em estudos contendo outras formulações com SBE $\beta$ CD<sup>54</sup>.

A análise do efeito citotóxico da SBE $\beta$ CD, da BVC livre e do complexo SBE $\beta$ CD-BVC foi realizada por meio do ensaio de viabilidade por redução do MTT sobre cultura de células SH-SY5Y. De maneira geral, todos os tratamentos obtiveram alteração na porcentagem de células viáveis de maneira dose-dependente. Esses dados foram confirmados por meio do experimento de microscopia de fluorescência (método LIVE/DEAD).

Embora não tenha sido observada diferença significativa da viabilidade celular entre as amostras analisadas, houve uma redução do IC<sub>50</sub> do complexo SBE $\beta$ CD-BVC livre em relação a BVC. Isso se explica pelo aumento da solubilidade do AL quando complexado, o que possibilita alterações na permeação do fármaco através das membranas celulares, aumentando consequentemente a citotoxicidade<sup>48,55</sup>. Além disso, a molécula de SBE $\beta$ CD



levou a uma perda de viabilidade celular, que pode ter contribuído para um menor  $IC_{50}$  do complexo em relação a BVC livre.

Com o objetivo de verificar como a BVC afeta a viabilidade celular, foi realizado uma avaliação da perda do potencial mitocondrial por microscopia de fluorescência. A análise das imagens revelou um distúrbio no potencial mitocondrial das células após exposição à BVC.

Alterações no potencial mitocondrial causadas pelo AL podem levar a indução da apoptose celular, sendo que a via intrínseca da apoptose é regulada pela mitocôndria<sup>56</sup>. Os anestésicos locais são aminas ligeiramente ácidas em sua forma protonada, apresentando uma constante de dissociação ácida de aproximadamente 8, sugerindo a hipótese de que os anestésicos locais agem como desacopladores mitocondriais, colapsando o gradiente de prótons<sup>57,58</sup>.

A BVC e outros anestésicos locais podem inibir o complexo I da cadeia respiratória da mitocôndria, desacoplar a fosforilação oxidativa, diminuir a produção de ATP, resultando em um colapso do potencial de membrana mitocondrial, levando a liberação do citocromo C e desencadeando o processo apoptótico, no qual a mitocôndria pode participar como iniciadora, efetora ou amplificadora de sinais<sup>59,60,61,62</sup>.

A exposição por 24 horas das células SH-SY5Y à BVC resultou na alteração do potencial mitocondrial, sugerindo que as alterações na viabilidade celular observadas no ensaio do MTT podem estar relacionadas, entre outros fatores, à ativação da apoptose pela via mitocondrial.

## **7. CONCLUSÃO**

A caracterização físico-química e os ensaios de viabilidade celular do complexo entre BVC e SBE $\beta$ CD foram descritos neste estudo. Os resultados confirmaram a formação de um complexo de inclusão estável e mais solúvel do que a BVC livre. O perfil citotóxico da formulação foi semelhante ao da BVC, porém o complexo SBE $\beta$ CD-BVC reduziu o  $IC_{50}$  do AL. Diante disso, a formulação desenvolvida apresenta potencial para aplicações clínicas, porém os benefícios terapêuticos sobre a dor e a inflamação ainda devem ser avaliados em estudos in vivo.

## REFERÊNCIAS

1. Gracely RH. Pain measurement. *Acta Anaesthesiol Scand* (1999); 43(9):897-908.
2. Carpenter KJ, Dickenson AH (2002). Molecular aspects of pain research. *The Pharmacogenomics J.* 2, 87-95.
3. Way WL, Way EL, Fields HL (1998). Analgésicos e antagonistas opioides. In: Katzung, B. G. *Farmacologia Básica & Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
4. Kotani K (2004). Morphine Use for At-Home Cancer Patients in Japan. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 204(2), 119–123.
5. Furlan AD, Sandoval JA, Mailis-Gagnon A, Tunks E (2006). Opioids for Chronic Noncancer Pain: A Meta-Analysis of Effectiveness and Side Effects. *Canadian Medical Association Journal*, 174(11), 1589–1594.
6. White PF (2002). The Role of Non-Opioid Analgesic Techniques in the Management of Pain After Ambulatory Surgery. *Anesthesia & Analgesia*, 94(3), 577–585.
7. Becker DE, Reed KL (2012). Local Anesthetics: Review of Pharmacological Considerations. *Anesth. Prog.* 59 (2): 90-101.
8. Covino BG (1986). Pharmacology of local anesthetic agents. *Br. F. Anesth.* 58, 701-716.
9. Schulman JM, Strichart GR (2014). *Princípios de farmacologia (A base fisiopatológica da farmacologia)*. Rio de Janeiro: Guanabara.
10. Hollmann M, Durieux M (2000). Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology*. 93(3): 558-82.
11. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M (2006). Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta anesthesiol scand.* 50: 265-82.

12. Burnett A, Faley B, Nyirenda T, Bamboat ZB (2018). Liposomal bupivacaine reduces narcotic use and time to flatus in a retrospective cohort of patients who underwent laparotomy. *Int J Surg*, S1743-9191(18)31641-8 [Epub ahead of print].
13. Araújo DR, Braga AF, Moraes CM, Fraceto LF, Paula E (2006). Complexation of 50% enantiomeric excess (S75-R25) bupivacaine with cyclodextrins and spinal block anesthesia in rats. *Rev Bras Anesthesiol*; 56: 495-506.
14. Araújo DR, Tsuneda SS, Cereda CM, Carvalho FG, Preté PS, Fernandes SA (2008). Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta cyclodextrin inclusion complex *Eur. J Pharm Sci*; 33: 60-71.
15. Davis ME, Brewster ME (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews*. 3, 1023-1035.
16. Yaksh T, Jang J, Nishiuchi Y, Braun K, Goodman M (1992). The utility of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as a vehicle for the intracerebral and intrathecal administration of drugs. *Life Sci*. 48: 623-33.
17. Silva M, Cocenza D, Grillo R, Melo N de, Tonello P, Oliveira LC, Fraceto L. (2011). Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. *J Hazard Mater*. 190 (1-3): 366-74.
18. Devasari N, Dora C, Singh C, Paidi S, Kumar V, Sobhia M, Suresh S (2015). Inclusion complex of erlotinib with sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin: Preparation, characterization, in silico, in vitro and in vivo evaluation. *Carbohydr Polym*. 134: 547-56.
19. Rajewski RA, Stella VJ (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. In vivo Drug delivery. *J. Pharm. Sci*. 85: 1142-69.
20. Sambrook PJ, Goss NA (2011). Severe adverse reactions to dental local anaesthetics: prolonged mandibular and lingual nerve anaesthesia. *Aust Dent J*. 56: 154-9.

21. Strichartz GR (1987). Local anesthetics. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
22. Bagshaw KR, Hanenbaum CL, Carbone EJ, Lo KW, Laurencin CT, Walker J, Nair LS (2015). Pain management via local anesthetics and responsive hydrogels. *Therapeutic Delivery*, 6(2), 165–176.
23. Ragsdale DS (1998). Sodium Channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain. Rev*, 26, 16-28.
24. Butterworth JF, Strichartz, GR (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology*. 72 (4): 711-734.
25. Loftsson T, & Masson M (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.* 225:15-30.
26. Gupta SP (1991). Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. *Chem. Rev.* 91, 1109-1119.
27. de Jong RH (1994). Local anesthetics. U.S.A: Mosby-Year Book.
28. de Paula E, Schreier S (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. *Bioch. Biophys. Acta* 1240, 25-33.
29. Mather LE, Chang DH (2001). Cardiotoxicity with modern local anesthetics: is there a safer choice? *Drugs*; 61:333-342.
30. Malamed SF (2001). Manual de anestesia local. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
31. Li Y, Yu Y, Zhu P, Duan G, Li Y, Song F (2012). Chiral separation of bupivacaine hydrochloride by capillary electrophoresis with high frequency conductivity detection and its application to rabbit serum and pharmaceutical injection. *Pharmazie*. 67(1): 25-30.
32. Serpe L, Franz-Montan M, dos Santos CP, da Silva C, Nolasco F, Caldas C, Volpato MC, de Paula E, Groppo FC (2014). Anaesthetic efficacy of

bupivacaine- $\beta$ -cyclodextrin for dental anaesthesia after inferior alveolar nerve block in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 52(5):452-7.

33. Nava-Ocampo AA, Bello-Ramirez AM (2004). Lipophilicity affects the pharmacokinetics and toxicity of local anesthetic agents administered by caudal block. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 31: 116–8.

34. Cereda CM, Tofoli GR, Maturana LG, Pierucci A, Nunes LA, Franz-Montan M, de Oliveira AL, Arana S, de Araujo DR, de Paula E (2012). Local neurotoxicity and myotoxicity evaluation of cyclodextrin complexes of bupivacaine and ropivacaine. *Anesth Analg;* 115(5): 1234-41.

35. Araujo DR, Pinto LMA, Braga AFA et al (2003) - Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. *Rev Bras Anestesiologia;*53:663-671.

36. Mont MA, Beaver WB, Dysart SH, Barrington JW, Del Gaizo DJ (2018). Local infiltration analgesia with liposomal bupivacaine improves pain scores and reduces opioid use after total knee arthroplasty: results of a randomized controlled trial. *J Arthroplasty.*; 33(1):90-96.

37. Kuang M, Du Y, Ma J, et al (2017). The Efficacy of Liposomal Bupivacaine Using Periarticular Injection in Total Knee Arthroplasty: a Systematic Review and Meta-Analysis. *J Arthroplasty.*;32:1395–1402.

38. Pichler L, Poeran J, Zubzarreta N, et al (2018). Liposomal Bupivacaine Does Not Reduce Inpatient Opioid Prescription or Related Complications after Knee Arthroplasty.: a Database Analysis. *Anesthesiology;*10:689–699.

39. Rogobete AF, Dragomirescu M, Bedreag OH, et al (2016). New aspects of controlled release systems for local anaesthetics: A review. *Trend Anaesth Crit Care;* 9:27–34.

40. Duchêne D, Wouessidjewe D (1990). The current state of  $\beta$ -cyclodextrin in pharmaceuticals. *Acta Pharm Technol.* 36:1-6.

41. McCormack B, Gregoriadis G (1998). Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo. *Int. J. Pharm.* 162, 59-69.
42. Luke DR, Tomaszewski K, Damle B, Schlamm HT (2010). Review of the basic and clinical pharmacology of sulfobutylether-beta-cyclodextrin (SBECD). *J Pharm Sci*; 99(8): 3291-301.
43. Tabuchi R, Azuma K, Izumi R, Tanou T, Okamoto Y, Nagae T, Iohara D, Uekama K, Otagiri M, Hirayama F, Ifuku S, Anraku M (2016). Biomaterials based on freeze dried surface-deacetylated chitin nanofibers reinforced with sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin gel in wound dressing applications. *Int J Pharm.* Sep 25;511(2):1080-7.
44. Mihoub B, Larue A, Moussaron A, Youssef Z, Colombeau L, Baros F, ... Acherar S. (2018). Use of Cyclodextrins in Anticancer Photodynamic Therapy Treatment. *Molecules*, 23(8), 1936.
45. Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R (1996). Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives. I. Physicochemical characterization. *Int J Pharm*; 131: 165-174.
46. Dollo G, Thompson DO, Le Corre P, Chevanne, F, Le Verge R (1998). Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- $\beta$ -CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. *Int J Pharm*; 164: 11-19.
47. Dollo G, Le Corre P, Freville JC, Chevanne F, Le Verge R (2000). Biopharmaceutics of local anesthetic-cyclodextrin complexes following loco-regional administration. *Ann Pharm Fr*; 58: 425-432.
48. Moraes CM, Abrami P, Araújo DR, Braga AF, Issa MG, Ferraz HG, et al (2007). Characterization of lidocaine: hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *J Incl. Phenom Macrocycl Chem*; 57:313–316.

49. Prado AR, Yokaichiya F, Franco MK, Silva CM, Oliveira-Nascimento L, Franz-Montan M, et al (2017). Complexation of oxethazaine with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: increased drug solubility, decreased cytotoxicity and analgesia at inflamed tissues. *J Pharm Pharmacol*; 69:652-662.
50. Másson M, Loftsson T, Másson G, Stefánsson E (1999). Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. *J. Contr. Rel.* 59, 107-118.
51. de Araújo DR (2005). Desenvolvimento e avaliação farmacológica de formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-aminas cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína [tese]. Campinas: UNICAMP/IB.
52. Del Valle EMM (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 39 (2004) 1033–1046.
53. Bruschi ML (2015). Inclusion complex with cyclodextrins. Chapter 6. In: *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. Bruschi ML. Elsevier Ltd. UK.
54. Ren L, Zhou Y, Wei P, Li M, Chen G (2014). Preparation and pharmacokinetic study of aprepitant-sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin complex, *AAPS PharmSciTech.* 15. 121-130.
55. Ferreira LEN, Antunes GBM, Muniz BV, Burga-Sanchez J, de Melo NFS, Groppo FC, Fracetod LF, Volpato MC (2018). Effects of lidocaine and the inclusion complex with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on cell viability and proliferation of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 70(7), 874-882.
56. Chen Z, Jin Z, Xia Y, Zhao S, Xu X, Papadimos TJ, Wang (2017). The protective effect of lipid emulsion in preventing bupivacaine-induced mitochondrial injury and apoptosis of H9C2 cardiomyocytes. *Drug Deliv.* Nov;24(1):430-436. doi: 10.1080/10717544.2016.1261379. PMID: 28165812.

57. Sun X, Garlid KD (1992). On the mechanism by which bupivacaine conducts protons across the membranes of mitochondria and liposomes. *J Biol Chem*; 267: 19147–54.
58. Johnson ME, Saenz JA, DaSilva AD, Uhl CB, Gores GJ (2002). Effect of local anesthetic on neuronal cytoplasmic calcium and plasma membrane lysis (necrosis) in a cell culture model. *Anesthesiology*.; 97: 1466–76.
59. Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, Rosenberg A, Recio-Pinto E, Zhan J et al (2009). Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. *Anesth Analg*.; 108(3): 997-1007.
60. Terada H, Shima O, Yoshida K, Shinohara Y (1990). Effects of the local anesthetic bupivacaine on oxidative phosphorylation in mitochondria. Change from decoupling to uncoupling by formation of a leakage type ion pathway specific for H<sup>+</sup> in cooperation with hydrophobic anions. *J Biol Chem*; 265: 7837–7842.
61. Friederich P, Schmitz TP (2002). Lidocaine-induced cell death in a human model of neuronal apoptosis. *Eur J Anaesthesiol*; 19(8): 564-70.
62. Penninger JM, Kroemer G (2003). Mitochondria, AIF and caspases: Rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol*; 5: 97–9.