

Mistura com Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) de Bupivacaína Complexada com Ciclodextrinas e Anestesia por Via Subaracnóidea em Ratos*

Complexation of 50% Enantiomeric Excess (S75-R25) Bupivacaine with Cyclodextrins and Spinal Block Anesthesia in Rats

Daniele Ribeiro de Araujo¹; Angélica de Fátima de Assunção Braga TSA²; Carolina Moraes Moraes³; Leonardo Fernandes Fraceto⁴; Eneida de Paula⁵

RESUMO

Araujo DR, Braga AFA, Moraes CM, Fraceto LF, Paula E – Mistura com Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) de Bupivacaína Complexada com Ciclodextrinas e Anestesia por Via Subaracnóidea em Ratos

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Com a finalidade de prolongar a duração de ação e reduzir a toxicidade sistêmica, têm-se desenvolvido formulações de anestésicos locais (AL) complexados com ciclodextrinas (CD). Este estudo realizou a caracterização físico-química e avaliou, em ratos, os efeitos dos complexos de inclusão de bupivacaína racêmica (S50-R50) e da mistura com excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) de bupivacaína com hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP-β-CD), comparando-os com as soluções atualmente utilizadas na clínica.

MÉTODO: Os complexos de inclusão de S75-R25 em HP-β-CD (razão molar 1:1) foram caracterizados por estudos de solubilidade de fases variando-se as concentrações de HP-β-CD e a temperatura. Determinaram-se as constantes de afinidade (K) pela HP-β-CD e os parâmetros termodinâmicos para a complexação. Os bloqueios motor e sensitivo foram avaliados, por meio da administração subaracnóidea das formulações na concentração clínica de 0,5%.

RESULTADOS: A formação de complexos de inclusão foi observada pelo aumento da solubilidade aquosa do AL sob diferentes temperaturas e concentrações de HP-β-CD. Os testes *in vivo* mostraram que S50-R50_{HP-β-CD} e S75-R25_{HP-β-CD} reduziram a latência ($p < 0,001$) sem alterar o tempo de recuperação do bloqueio motor,

tempo para efeito máximo e efeito total dos fármacos. Além disso, ambas as formulações aumentaram a intensidade (1,5 vez, $p < 0,001$) e prolongaram a duração da analgesia, com relação aos fármacos livres.

CONCLUSÕES: Os complexos S50-R50_{HP-β-CD} e S75-R25_{HP-β-CD} potencializaram o bloqueio nervoso diferencial, podendo ser utilizados para reduzir a frequência de administrações ou a dose de AL para indução de um mesmo efeito. A formulação contendo a mistura com excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) de bupivacaína mostrou-se interessante no desenvolvimento de formulações seguras e úteis para o tratamento da dor aguda no período pós-operatório.

Unitermos: ANESTÉSICOS, Local: bupivacaína; ANIMAIS: ratos.

SUMMARY

Araujo DR, Braga AFA, Moraes CM, Fraceto LP, Paula E – Complexation of 50% Enantiomeric Excess (S75-R25) Bupivacaine with Cyclodextrins and Spinal Block Anesthesia in Rats.

BACKGROUND AND OBJECTIVES: In order to prolong the action and reduce systemic toxicity, formulations of local anesthetic (LA) complexed with cyclodextrins (CD) have been developed. This study determined the physical-chemical characterization and evaluated the effects of inclusion complexes of racemic bupivacaine (S50-R50) and 50% enantiomeric excess (S75-R25) bupivacaine with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-β-CD) in rats, and comparing them with the solutions currently used in the clinical practice.

METHODS: Inclusion complexation of S75-R25 with HP-β-CD (equimolar ratio 1:1) was characterized by phase-solubility studies varying the concentrations of HP-β-CD and the temperature. Affinity constants (K) for HP-β-CD and the thermodynamic parameters for complexation were determined. Motor and sensitive anesthetics were evaluated through the subarachnoid administration of the formulations in the concentration of 0.5%.

RESULTS: Inclusion complexation was observed through the increase in aqueous solubility of LA in different temperatures and concentrations of HP-β-CD. The *in vivo* tests demonstrated that S50-R50_{HP-β-CD} and S75-R25_{HP-β-CD} reduced latency ($p < 0.001$) without changing the recovery time of the motor block, time for maximal effect, and total effect of the drugs. Besides, both formulations increased the intensity (1.5 times, $p < 0.001$) and prolonged the duration of analgesia compared to the free drugs.

CONCLUSIONS: The complexes S50-R50_{HP-β-CD} and S75-R25_{HP-β-CD} potentiated the differential nervous block, and can be used to reduce the frequency of administration or the dose of the LA to induce the same effect. The formulation containing enantiomeric excess (S75-R25) bupivacaine showed to be interesting in the development of safer formulations, and useful for the treatment of acute pain in the postoperative period.

Key Words: ANESTHETICS, Local: bupivacaine; ANIMALS: rats.

*Recebido do (Received from) Laboratório de Biomembranas e Sistemas Biomiméticos, Departamento de Bioquímica – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP e Laboratório de Química da Universidade de Sorocaba – UNISO

1. Doutora em Biologia Funcional e Molecular – Bioquímica, Instituto de Biologia-UNICAMP
2. Professora-Associada do Departamento de Anestesiologia, FCM-UNICAMP
3. Graduanda do Curso de Farmácia, Universidade de Sorocaba – UNISO
4. Professor Doutor do Curso de Farmácia, Universidade de Sorocaba – UNISO
5. Professora-Associada do Departamento de Bioquímica – Instituto de Biologia, UNICAMP

Apresentado (Submitted) em 30 de novembro de 2005
Aceito (Accepted) para publicação em 30 de junho de 2006

Endereço para correspondência (Correspondence to):
Dra. Daniele Ribeiro de Araujo
Depto. de Bioquímica – Instituto de Biologia
Cidade Universitária Zeferino Vaz s/n
13083-970 Campinas, SP
E-mail: draraujo2003@yahoo.com.br

© Sociedade Brasileira de Anestesiologia, 2006

INTRODUÇÃO

Os avanços nas pesquisas básica e clínica têm expandido as opções na farmacoterapia da dor. Entre as várias classes de fármacos utilizados para aliviar ou eliminar a dor, encontram-se os anestésicos locais (AL), que apresentam a propriedade de bloquear o processo de excitação-condução em nervos periféricos. Apesar da grande aplicabilidade clínica da bupivacaína, a ropivacaína, a levobupivacaína e, mais recentemente, a mistura com excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) de bupivacaína têm se apresentado como novas opções para anestésias regionais prolongadas. No entanto, os AL atualmente utilizados apresentam limitações devido à sua duração de ação relativamente curta e à toxicidade para os sistemas nervoso central e cardiovascular ^{1,2}.

Com a finalidade de prolongar a duração de ação e reduzir a toxicidade sistêmica desses fármacos, têm sido desenvolvidas formulações contendo AL complexados com ciclodextrinas (CD), oligossacarídeos cíclicos resultantes da hidrólise enzimática do amido ^{3,4}. Além da estabilização físico-química, os efeitos significativos da complexação com CD são observados, sobretudo na modificação da solubilidade aquosa, da razão de liberação e das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, alterando a duração e a intensidade de seus efeitos farmacológicos dos fármacos complexados ^{5,6}.

Estudos em animais de laboratório indicam que a complexação com betaciclodextrinas (β -CD) e alguns de seus derivados, como a hidroxipropil-betaciclodextrina (HP- β -CD) (Figura 1), aumentaram a solubilidade aquosa e a duração do bloqueio nervoso induzido pela bupivacaína racêmica ⁷⁻¹¹.

Além disso, em estudo recente demonstrou-se que a complexação de bupivacaína racêmica (S50-R50) e da mistura com excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) de bupivacaína com HP- β -CD potencializou a intensidade e a duração da analgesia após bloqueio do nervo isquiático de camundongos, sendo de potencial interesse para o alívio da dor no período pós-operatório ¹².

Considerando-se o menor potencial tóxico da bupivacaína (S75-R25) com relação à bupivacaína racêmica (S50-R50), o presente estudo teve por objetivo realizar a caracterização físico-química e avaliar, em ratos, os efeitos dos complexos de inclusão de bupivacaína racêmica (S50-R50) e da mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25) com HP- β -CD, administrados por via subaracnóidea, comparando-os com as soluções livres, atualmente utilizadas na clínica.

MÉTODO

Os complexos sólidos foram preparados misturando-se quantidades apropriadas de HP- β -CD e S75-R25 em água, tal que a razão molar fosse 1:1. As amostras foram deixadas sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Após isso, a solução foi liofilizada e guardada a -20° C para posterior uso. Os complexos sólidos foram pesados em quantidades suficientes para obter as concentrações desejadas e, posteriormente, dissolvidos em tampão (HEPES 20 mM pH 7,4, com NaCl 154 mM). A caracterização físico-química do complexo foi realizada por meio de estudos de solubilidade de acordo com método já descrito ¹³. Adicionou-se excesso de AL (15mM) em solução tampão 50 mM pH 7,4, na presença de quantidades crescentes de HP- β -CD (0, 5, 10, 20, 25, 30, 35 mM).

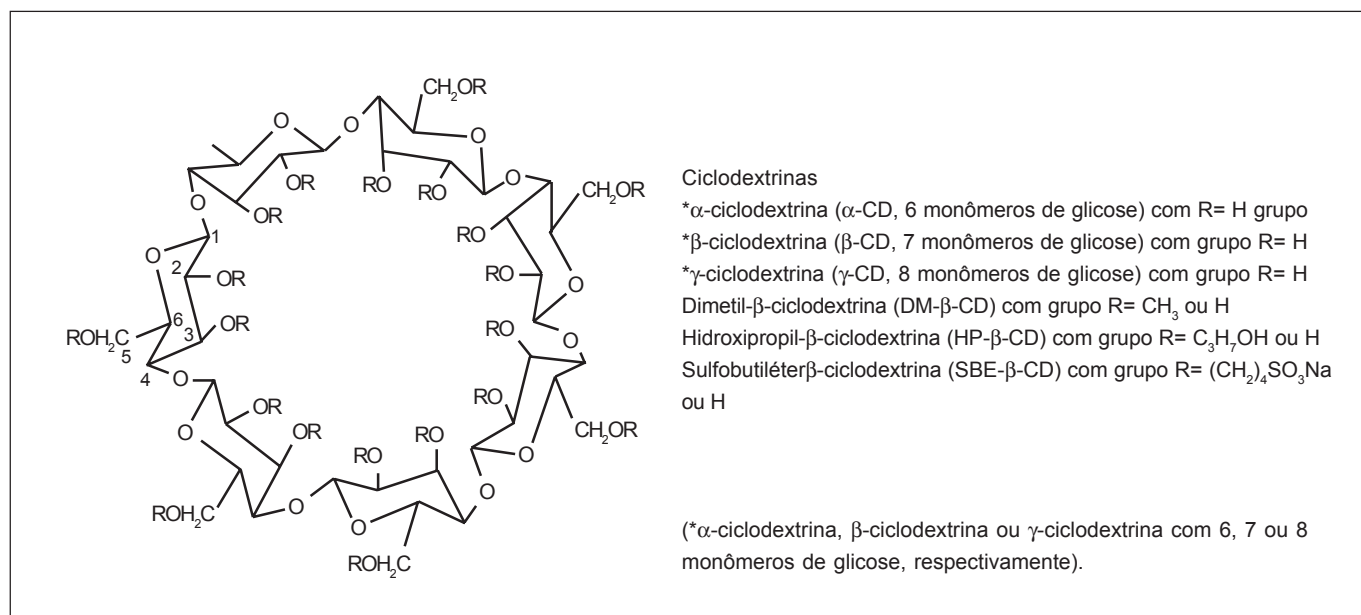


Figura 1 – Estrutura Geral das Ciclodextrinas Naturais* e Alguns dos Derivados da β -CD.

As soluções foram agitadas a 110 rpm sob diferentes temperaturas (10, 15, 20, 30 e 40° C) até o sistema atingir o equilíbrio (24 horas) e determinou-se a concentração de anestésico solubilizada por espectrofotometria (absortividade molar, $\epsilon = 470$)¹⁴. A partir desses dados, foram obtidas as isotermas de solubilidade e medindo-se a constante de afinidade (K) em diferentes temperaturas utilizando a equação 1, onde: S_0 é a concentração inicial do AL em solução.

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

A partir dos valores de constante de afinidade (K) em função de temperatura construiu-se um gráfico de van't Hoff medindo-se parâmetros termodinâmicos para o complexo formado: entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°), de acordo com a equação 2, onde T é a temperatura (em graus Kelvin) e R é constante ideal dos gases (8,31 kJ/mol)¹⁵⁻¹⁷.

$$\ln K = -\frac{(\Delta H^\circ)}{RT} + \frac{(\Delta S^\circ)}{R} \quad (2)$$

Este estudo experimental foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEA) – IB – UNICAMP que segue as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados grupos de cinco ratos albinos, machos, pertencentes à linhagem Wistar, com idade aproximada de 90 dias e peso corporal variando entre 200 e 250 g. Os animais, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação à vontade, alojados coletivamente (cinco animais por gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos sete dias.

Para a administração subaracnoídea os animais foram contidos firmemente enquanto uma agulha conectada a uma seringa de Hamilton foi inserida perpendicularmente no espaço entre as vértebras L_5 e L_6 (Figura 2). O local de injeção selecionado estava restrito à região onde o cordão espinhal termina e a cauda eqüina começa, de forma a reduzir a possibilidade de lesão espinal e facilitar a acessibilidade intervertebral. No momento em que a agulha foi inserida no espaço subaracnoídeo, observou-se um súbito movimento da cauda, reflexo este que foi utilizado como indicativo de punção correta. As formulações foram injetadas em volume máximo de 20 μ L¹⁸.

A avaliação dos bloqueios motor e sensitivo foi realizada simultaneamente e todas as medidas foram executadas pelo mesmo investigador. Os animais foram observados durante 24 horas após o tratamento para verificar a incidência de efeitos tóxicos sistêmicos (convulsões e óbitos) ou locais (falhas na recuperação dos movimentos normais). Os grupos experimentais foram assim determinados:

- Grupo-controle: HP- β -CD;
- Grupo S50-R50: bupivacaína racêmica;

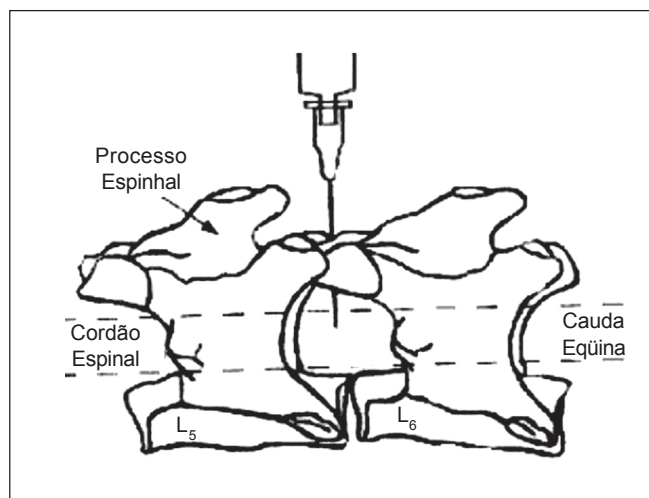


Figura 2 – Inserção da Agulha no Espaço Intervertebral (L_5 - L_6) para Injeção Subaracnoídea em Ratos

- Grupo S75-R25: mistura com 50% de excesso enantiomérico de bupivacaína;
- Grupo S50-R50_{HP- β -CD (1:1)}: bupivacaína racêmica hidroxipropil- β -ciclodextrina na proporção molar 1:1 (S50R50:HP- β -CD);
- Grupo S75-R25_{HP- β -CD (1:1)}: mistura com 50% de excesso enantiomérico de bupivacaína com hidroxipropil- β -ciclodextrina, na proporção molar 1:1 (S75-R25:HP- β -CD).

A presença de bloqueio motor foi evidenciada pelo “arrastamento” dos membros posteriores e/ou fechamento dos dedos¹⁹, sendo a intensidade do bloqueio motor avaliada de acordo com valores de escore: 0 (uso normal dos membros posteriores), 1 (incapacidade de flexionar completamente os membros posteriores) e 2 (impossibilidade do uso dos membros posteriores). A avaliação foi feita a cada minuto durante os cinco primeiros minutos após a injeção subaracnoídea e, posteriormente, em intervalos de 10 minutos até que fosse verificada a total recuperação dos movimentos do animal (pelo menos uma hora de observação). A latência (tempo entre a injeção e a obtenção de bloqueio motor grau 1 ou 2), o tempo para atingir o escore máximo (T_{max}), o tempo para recuperação da função motora e o efeito total do AL (estimado pela área sobre a curva efeito-tempo, AUC) foram os parâmetros analisados.

O bloqueio sensitivo foi avaliado utilizando-se um estímulo mecânico²⁰. Para a execução do teste utilizou-se um equipamento apropriado, chamado analgesímetro, que gerou aumento gradual da força (em gramas) exercida por uma extremidade plástica sobre a superfície dorsal da pata do animal. Para evitar analgesia induzida por estresse, cada animal foi envolvido em uma toalha permitindo que a cabeça e os membros ficassem livres. O reflexo de retirada da pata foi considerado representativo do limiar de dor *Pain Withdrawal Threshold to Pressure* (PWTP). A linha basal do

PWTP foi medida antes dos experimentos e os animais que apresentaram valor do limiar de dor abaixo ou acima de 90 a 140 g foram excluídos do experimento e estabeleceu-se um valor máximo de pressão *cut-off* de 350 g, considerado representativo de bloqueio sensitivo. Após administração do veículo ou das formulações, as medidas foram realizadas durante cinco horas, com intervalos de 15 minutos durante a primeira hora, 30 minutos durante a segunda e terceira horas e, finalmente, 60 minutos nas últimas duas horas de teste. A analgesia foi definida como um aumento no limiar de pressão dos animais, pelo menos 50% maior que o observado no grupo tratado com o veículo. O ponto final da analgesia foi estabelecido quando da ausência de diferença estatística entre os grupos teste e controle ¹².

Para a análise estatística do bloqueio motor (latência, $T_{máx}$, tempo de recuperação e AUC) utilizou-se o teste Mann-Whitney e os dados foram expressos como medianas (limites mínimo e máximo). Os valores de PWTP durante o bloqueio sensitivo foram expressos em média \pm DP e avaliados, em tempos individuais, por Análise de Variância (One-way ANOVA) com teste posterior de Tukey-Kramer ²¹. Foi definida como estatística significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Por meio dos experimentos de solubilidade de fases, foi possível observar a complexação da S75-R25 com HP- β -CD em pH 7,4 sob diferentes temperaturas (Figura 3). O diagrama de solubilidade de fases dos sistemas indica a formação de complexos solúveis, havendo aumento linear na solubilidade de S75-R25 em função das concentrações de HP- β -CD testadas e em diferentes temperaturas.

Utilizando as regressões lineares obtidas das curvas da figura 3 e da equação 1, calculou-se a constante de afinidade (K) entre a S75-R25 e HP- β -CD para as várias temperaturas (Tabela I). Seus dados mostram que a elevação da temperatura leva a aumento no valor das constantes de afinidade (K), devido a aumento na solubilidade do fármaco, deslocando o equilíbrio no sentido da formação do complexo.

A partir dos valores de temperatura e constante de afinidade (K), utilizando-se a equação 2, foi possível construir a curva de van't Hoff (Figura 4) obtendo-se parâmetros termodinâ-

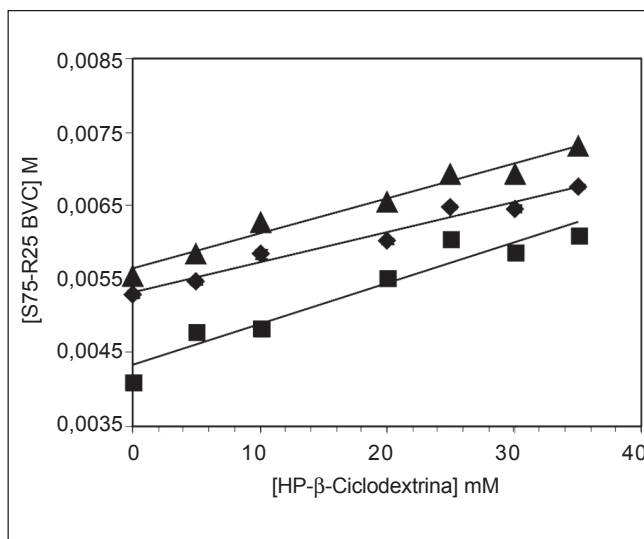


Figura 3 – Diagrama de Solubilidade de Fases para S75-R25 BVC em HP- β -CD pH 7,4 em Diferentes Temperaturas (n = 3)

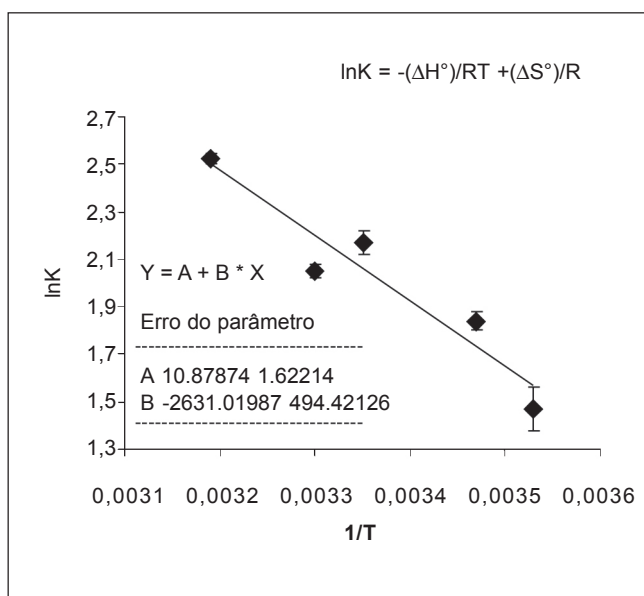


Figura 4 – Curva de van't Hoff (ln K versus 1/T) para S75-R25 BVC/HP- β -CD

Tabela I – Valores das Regressões Lineares (r) e das Constantes de Afinidade (K) para S75-R25 em HP- β -CD, em Função da Temperatura (pH 7,4)

T (°C)	Inclinação	Intercepto	r	K (M ⁻¹)
10	2,60778E-5	0,00597	0,98017	4,37 \pm 0,49
15	3,71542E-5	0,00589	0,99751	6,31 \pm 0,26
25	4,15617E-5	0,00534	0,97925	7,78 \pm 0,28
30	4,91371E-5	0,0056	0,99132	8,77 \pm 0,47
40	5,41445E-5	0,00433	0,97061	12,5 \pm 2,4

micos da complexação da molécula de S75-R25 com HP- β -CD.

Por meio dos dados de regressão linear, obtidos na figura 4, mediu-se os parâmetros termodinâmicos, sendo os valores obtidos para a complexação da S75-R25 com HP- β -CD de: 21,86 kJ/ mol de entalpia (ΔH°), 90,40 J/mol/K de entropia (ΔS°) e - 5,07 kJ/ mol de energia livre do sistema (ΔG°). A análise desses dados mostra que a complexação entre S75-R25 e a cavidade interna da CD é favorável, visto que a energia livre do sistema é negativa, sendo a entropia do sistema determinante para a complexação entre o fármaco e a CD.

Avaliação do Bloqueio Motor

As soluções anestésicas livres e complexadas, quando administradas por via subaracnóideia, afetaram de maneira similar a função motora dos animais. No entanto, a administração do veículo, HP- β -CD, não induziu qualquer sinal de bloqueio motor.

Comparando-se individualmente os grupos experimentais, observou-se que a latência do bloqueio motor foi reduzida, de forma significativa ($p < 0,001$) pelo tratamento com os complexos S50-R50_{HP- β -CD} e S75-R25_{HP- β -CD} com relação às soluções livres. Porém, outros parâmetros, como tempo de recuperação do bloqueio motor, tempo para o efeito máximo e efeito total do fármaco, não foram alterados pela complexação com HP- β -CD (Tabela II).

Tabela II – Valores de Temperatura em Kelvin, Valores de Constantes de Afinidade (K) para S75-R25 em HP- β -CD, pH 7,4 (deduzidos a partir da equação 2)

T (K)	1/T	K	lnK
283	0,00353	4,37	1,47 \pm 0,09
288	0,00347	6,31	1,84 \pm 0,04
298	0,00330	7,78	2,05 \pm 0,03
303	0,00335	8,77	2,17 \pm 0,05
313	0,00319	12,5	2,52 \pm 0,21

Avaliação do Bloqueio Sensitivo

A avaliação do bloqueio sensitivo, através do teste PWTP, mostrou as relações efeito-tempo para os AL livres e complexados. Os efeitos do veículo (HP- β -CD), dos fármacos livres (S50-R50 e S75-R25) e dos complexos de inclusão (S50-R50_{HP- β -CD} e S75-R25_{HP- β -CD}) administrados por via subaracnóideia foram avaliados ao longo do tempo (Figuras 5 e 6).

O tratamento com S50-R50_{HP- β -CD} aumentou o limiar de nocicepção dos animais com relação ao fármaco livre durante todo o período de experimentação. Na fase inicial do

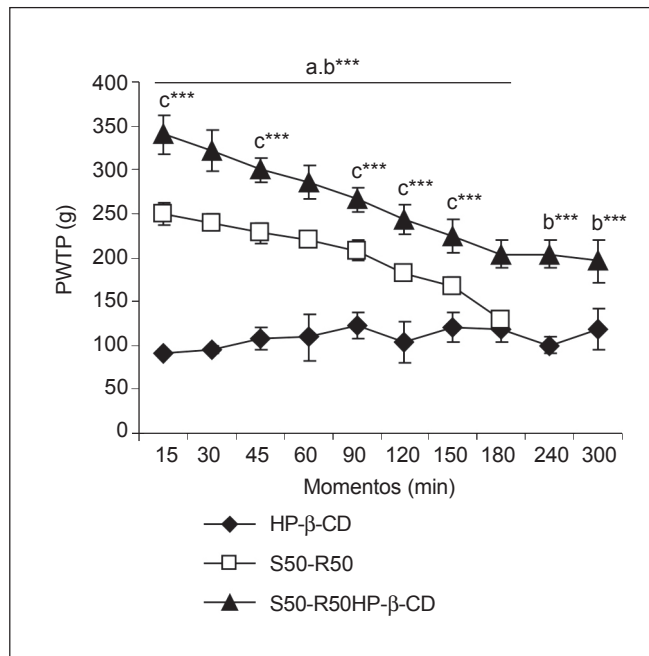


Figura 5 – Curva Efeito Versus Tempo no Teste PWTP para os Grupos Tratados com o Veículo (HP- β -CD), S50-R50, S50-R50_{HP- β -CD} (1:1) a 0,5% (100 μ g/20 μ L). Valores Expressos em Média \pm DP (n = 5). a = S50-R50 Versus HP- β -CD; b = S50-R50_{HP- β -CD} Versus HP- β -CD; c = S50-R50_{HP- β -CD} Versus S50-R50, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA)

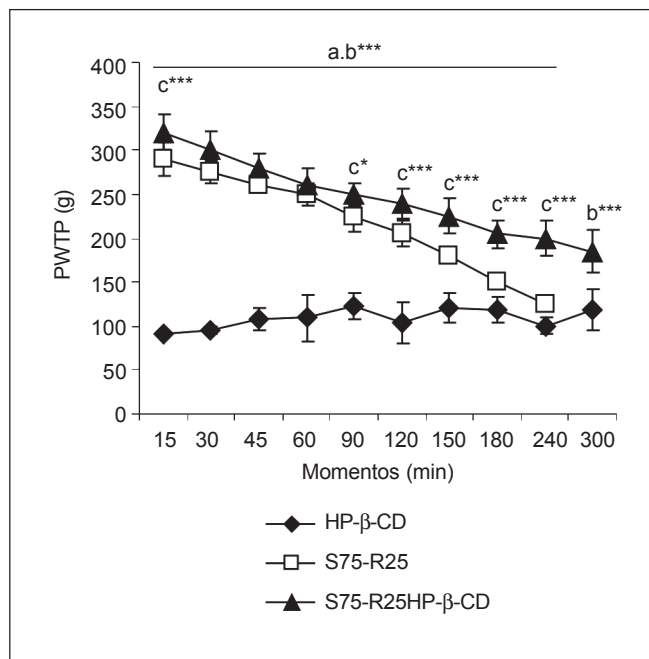


Figura 6 – Curva Efeito Versus Tempo no Teste PWTP para os Grupos Tratados com o Veículo (HP- β -CD), S75-R25, S75-R25_{HP- β -CD} (1:1) a 0,5% (100 μ g/ 20 μ L). Valores Expressos em Média \pm DP (n = 5). a = S75-R25 Versus HP- β -CD; b = S75-R25_{HP- β -CD} Versus HP- β -CD; c = S75-R25_{HP- β -CD} Versus S75-R25, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (One-Way ANOVA).

Tabela III – Latência, $T_{m\acute{a}x}$, Tempo de Recuperação e Efeito Total do Bloqueio Motor (AUC) Induzido por S50-R50 ou S75-R25 Livres ou Complexadas (0,5%) após Injeção Subaracnóidea em Ratos

Concentração	Grupos	Latência (s)	$T_{m\acute{a}x}$ (min)	Tempo de Recuperação (min)	AUC (escore/h)
0,5%	S50-R50	40,0 (30,0 – 45,0)	1 (-)	30,0 (30,0 – 40,0)	26,5 (15,5 – 35,5)
	S50-R50 _{HP-β-CD} (1:1)	20,0 (15,0 – 20,0) a***	1 (-)	30,0 (30,0 – 40,0)	27,5 (27,5 – 37,5)
	S75-R25	50,0 (40,0 – 55,0)	1 (-)	30,0 (20,0 – 30,0)	24,0 (14,0 – 24,0)
	S75-R25 _{HP-β-CD} (1:1)	30,0 (25,0 - 35,0) b***	1 (-)	30,0 (20,0 - 30,0)	24,0 (14,0 - 24,0)

Dados expressos em mediana (limite mínimo – limite máximo) (n = 5/grupo). a S50-R50_{HP-β-CD} versus S50-R50; b S75-R25_{HP-β-CD} versus S75-R25, *** p < 0,001

teste (até 180 min), ou seja, o ponto final da analgesia induzida por S50-R50 livre, ocorreu um aumento significativo (p < 0, 001) na intensidade da analgesia (cerca de 1,5 vez, com relação à S50-R50 livre) (Figura 5).

O complexo de inclusão S75-R25_{HP-β-CD} também modificou a resposta dos animais à nocicepção, aumentando o limiar da dor e a duração do efeito antinociceptivo em até cinco horas após a injeção (Figura 6). Observou-se um aumento (1,4 vez) na intensidade do efeito analgésico quando comparado com S75-R25 livre, após 180 minutos de tratamento (p < 0,001).

Ambos os sistemas de liberação controlada (S50-R50_{HP-β-CD} e S75-R25_{HP-β-CD}) aumentaram a intensidade e prolongaram a duração da analgesia, sendo o efeito dos complexos praticamente estável nas duas últimas horas do teste (Figuras 5 e 6), evidenciando sua maior eficiência com relação à S50-R50 e S75-R25 livres.

DISCUSSÃO

A habilidade das CD de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e da polaridade entre a CD e a molécula complexada. Além disso, as forças que dirigem a complexação têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água da cavidade das CD, às interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas^{22,23}. As moléculas complexadas permanecem normalmente orientadas em uma posição onde há máximo contato entre sua porção hidrofóbica e a cavidade apolar da CD, estando sua porção hidrofílica em contato com os grupos hidroxil da CD ou expostas ao meio aquoso^{3,23}. De fato, os resultados dos testes de caracterização físico-química indicam que a S75-R25 interage com a cavidade das moléculas de HP-β-CD e esta interação aumenta a solubilidade aquosa do AL, sendo energeticamente favorável e indicando um possível aumento na biodisponibilidade do fármaco.

Para efeitos comparativos, incluíram-se os grupos tratados com S50-R50 e S50-R50_{HP-β-CD} nos testes de avaliação da eficácia anestésica. Embora as formulações complexadas não tenham modificado a duração ou a intensidade do bloqueio

motor, observou-se redução no tempo de latência e, além disso, promoveram um efeito potencializador do bloqueio nervoso diferencial induzido pelos AL. Esses resultados são condizentes com aqueles obtidos previamente em camundongos, através do teste do bloqueio do nervo isquiático, indicando que a complexação com HP-β-CD reduz a instalação do bloqueio motor, promovendo um início de ação mais rápido, sem prolongar ou intensificar sua duração¹².

Um AL ideal deve ter longa duração de ação, baixa toxicidade sistêmica e maior seletividade para fibras sensitivas que motoras, onde essa característica de manter a analgesia sem afetar excessivamente a função motora, tem grande relevância clínica²⁴.

A avaliação do bloqueio sensitivo induzido pela injeção subaracnóidea dos complexos de inclusão S50-R50_{HP-β-CD} e S75-R25_{HP-β-CD} mostrou aumento na intensidade e na duração da analgesia com relação aos fármacos livres. A potencialização do efeito analgésico promovido pela complexação com a CD pode estar relacionada com o aumento da concentração de AL total, disponibilizado pelas formulações e também pela formação de uma barreira que impede a ligação com as proteínas do líquor e a captação pela circulação, já que o fármaco livre apresenta grande capacidade de ligação às proteínas do líquor, o que reduz sua fração disponível no local de ação.

Os fármacos lipofílicos (como S50-R50 e S75-R25), quando injetados por via subaracnóidea, apresentam rápida distribuição no fluido cerebrospinal. Em consequência disso, há início de ação mais rápido, mas com redução na duração de ação²⁵. Dessa forma, se a complexação com CD disponibiliza uma maior fração de AL, mantendo também o anestésico mais tempo em contato com o nervo, as formulações complexadas seriam de grande utilidade na clínica por potencializar seus efeitos analgésicos.

Apesar de ambos os complexos, S50-R50_{HP-β-CD} e S75-R25_{HP-β-CD}, terem potencializado o bloqueio nervoso diferencial, a formulação com a mistura com excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) de bupivacaína beneficia-se pelo fato de apresentar menor potencial tóxico do que a bupivacaína (S50-R50), favorecendo o desenvolvimento de formulações mais seguras e úteis na clínica para o tratamento da dor

aguda no período pós-operatório, com a vantagem de serem administradas em menores concentrações.

Os resultados do estudo mostraram que é possível, através de formulações nano-estruturadas, desenhadas especialmente para cada AL, aumentar o bloqueio nervoso diferencial e a duração total da anestesia após administração de bupivacaína (S50-R50) e da mistura com excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) de bupivacaína. Dessa forma, as formulações não-emulsão de AL propostas podem ser utilizadas para diminuir a frequência de administrações ou diminuir a dose do AL necessária para indução de um mesmo efeito, o que é interessante para fármacos com duração de ação prolongada, mas com toxicidade sistêmica elevada, como a bupivacaína.

Complexation of 50% Enantiomeric Excess (S75-R25) Bupivacaine with Cyclodextrins and Spinal Block Anesthesia in Rats

Daniele Ribeiro de Araujo, M.D.; Angélica de Fátima de Assunção Braga TSA, M.D.; Carolina Moraes Moraes, M.D.; Leonardo Fernandes Fraceto, M.D.; Eneida de Paula, M.D.

INTRODUCTION

The advances in basic and clinical research have expanded the pharmacological options for pain treatment and local anesthetics (LA), which have the ability to block the excitation-conduction process in peripheral nerves, are among the

several classes of drugs used to alleviate or eliminate pain. Even though bupivacaine has a great clinical applicability, ropivacaine, levobupivacaine, and, more recently, the 50% enantiomeric excess (S75-R25) bupivacaine have become new options for prolonged regional anesthesia. However, the LAs currently used present limitations due to their relatively short action and their toxicity for the central nervous and cardiovascular systems ^{1,2}.

Aiming at prolonging the duration of action and reducing systemic toxicity of these drugs, several formulations of LA complexed with cyclodextrins (CD), cyclic oligosaccharides resulting from the enzymatic hydrolysis of starch ^{3,4}, have been developed. Besides the physical-chemical stabilization, the main effects of complexation with CD are observed especially in the change in aqueous solubility, the liberation ratio, and pharmacokinetics and pharmacodynamic properties, modifying the duration and intensity of the pharmacological effects of these drugs ^{5,6}.

Animal studies indicate that complexation with beta-cyclodextrins (β -CD) and some of its derivatives, such as hydroxypropil-beta-cyclodextrin (HP- β -CD) (Figure 1), increases aqueous solubility and the duration of the nervous block induced by racemic bupivacaine ⁷⁻¹¹. Furthermore, a recent study demonstrated that complexation of racemic bupivacaine (S50-R50) and the 50% enantiomeric excess (S75-R25) with HP- β -CD potentiated the intensity and duration of analgesia after sciatic nerve block in mice, being potentially advantageous for the relief of postoperative pain ¹².

Since bupivacaine (S75-R25) is less toxic than racemic bupivacaine (S50-R50), the objective of this study was to determine the physical-chemical characteristics and the effects of the spinal block administration in rats of the inclusion

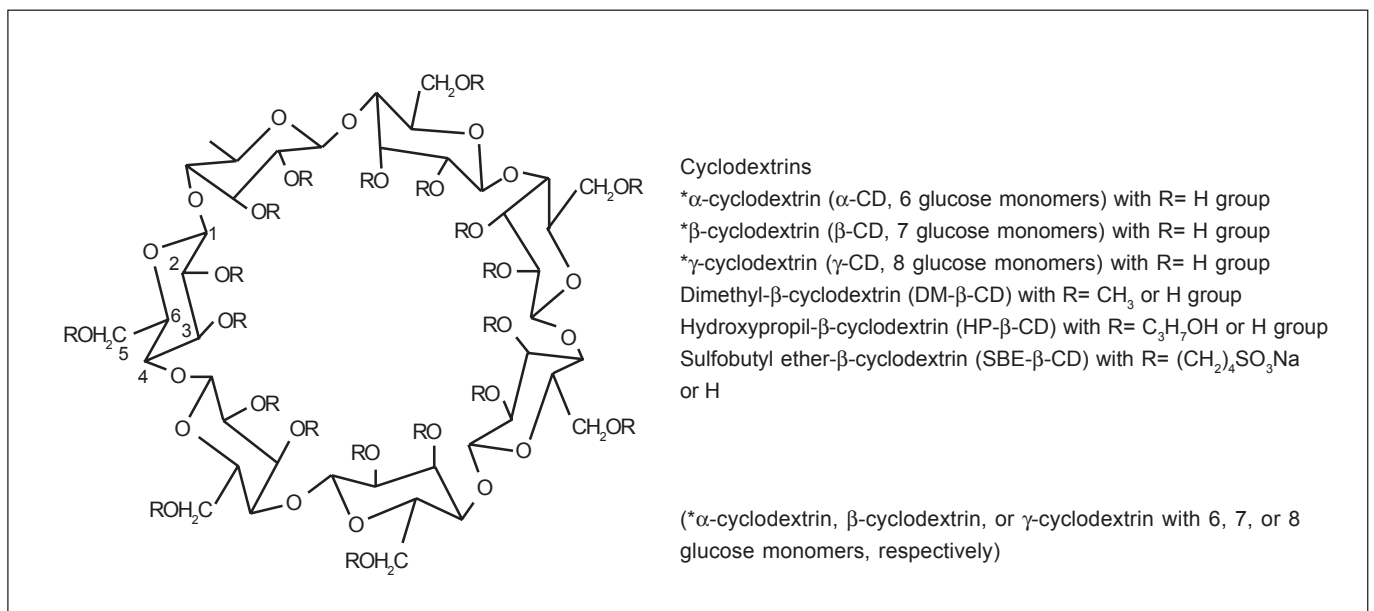


Figure 1 – General Structure of Natural Cyclodextrins* and Some of the β -CD Derivatives

complexation of racemic bupivacaine (S50-R50) and enantiomeric mixture (S75-R25) with HP-β-CD, and comparing them with the free solutions currently used.

METHODS

The solid complexes were prepared mixing proper doses of HP-β-CD and S75-R25 in water in a molar ratio of 1:1. Samples were agitated for 24 hours at room temperature. Afterwards, the solution was lyophilized and stored at -20° C for later use. Enough doses of the solid complexes were weighed to obtain the proper concentrations and dissolved, afterwards, in a buffer (20 mM of HEPES with pH of 7.4 with 154 mM of NaCl). The physical-chemical complex was characterized through solubility studies according to the method described in the literature ¹³. Excess local anesthetic (15 mM) was added to the buffer solution, 50 mM with pH of 7.4, in the presence of increasing doses of HP-β-CD (0, 5, 10, 20, 25, 30, 35 nM). Solutions were agitated at 110 rpm at different temperatures (10°, 15°, 20°, 30°, and 40° C) until the system reached an equilibrium (24 h), and the concentration of the anesthetic dissolved was determined by spectrophotometry (molar absorbance, ε = 470) ¹⁴. With these data, we obtained the solubility isotherms, and the affinity constants (K) were measured at different temperatures using equation 1, where: So is the initial concentration of the LA in solution.

$$K = \frac{\text{inclination}}{So (1 - \text{inclination})} \quad (1)$$

A van't Hoff chart was built using the affinity constant (K) against the temperature and measuring the thermodynamic parameters for the complex in question: enthalpy (ΔH°) and entropy (ΔS°), according to equation 2, where T is the temperature (in degrees Kelvin) and R is the ideal gas constant (8.31 kJ/mol) ¹⁵⁻¹⁷.

$$\ln K = -\frac{(\Delta H^\circ)}{RT} + \frac{(\Delta S^\circ)}{R} \quad (2)$$

This experimental study was conducted after approval by the Ethics Committee on Animal Experiments of the Instituto de Biologia of the Universidade Estadual de Campinas (CEEA) – IB – UNICAMP, which follows the rules of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Groups of five male, albino rats, of the Wistar lineage, approximately 90 days old, weight varying from 200 to 250 g, were used. The animals came from the Centro de Bioterismo of UNICAMP (CEMIB) and were exposed to light/dark, 12-hour cycles, with free access to food and water, housed in groups (5 animals per cage), and acclimated to the local of the experiment for at least 7 days. The animals were firmly contained while a needle connected to a Hamilton syringe was introduced perpendicularly in the L₅-L₆ space (Figure 2) to perform the subarachnoid injection. The injection site was restricted to the region where the spinal cord ends and the cauda equina begins, to reduce the pos-

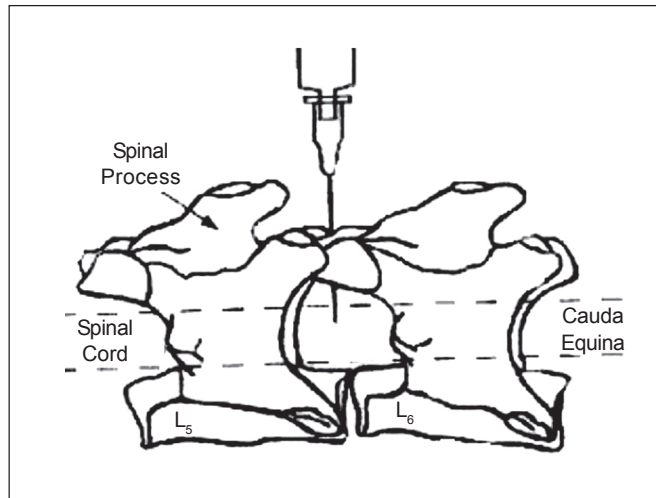


Figure 2 – Introduction of the Needle in the Intervertebral Space (L₅-L₆) for Spinal Block Injection in Rats

sibility of spinal lesion and to facilitate intervertebral access. When the needle was inserted in the subarachnoid space, there was a sudden movement of the tail. This reflex was considered an indication that the puncture was successful. A maximum of 20 μL of the formulations was injected ¹⁸. Motor and sensitive blocks were evaluated simultaneously and every measurement was done by the same investigator. Animals were observed for 24 h after the treatment to determine the incidence of systemic (seizures and deaths) or local (failure to recover normal movements) toxic effects. Experimental groups were characterized as follows:

- Control Group: HP-β-CD;
- S50-R50 Group: racemic bupivacaine;
- S75-R25 Group: 50% enantiomeric excess bupivacaine;
- S50-R50_{HP-β-CD (1:1)}} Group: racemic bupivacaine with hydroxipropil-β-cyclodextrine at a 1:1 molar ratio (S50-R50:HP-β-CD);
- S75-R25_{HP-β-CD (1:1)}} Group: 50% enantiomeric excess bupivacaine with hydroxipropil-β-cyclodextrine at a 1:1 molar ratio (S75-R25:HP-β-CD).

The presence of motor block was determined by “dragging” the hind legs and/or “closing” of the fingers ¹⁹, and its intensity was evaluated according to the following scores: 0 (normal use of the hind legs), 1 (unable to flexion completely the hind legs), and 2 (cannot use the hind legs). Animals were evaluated every minute for the first 5 minutes after the subarachnoid administration, followed by evaluation at 10-minute intervals until complete recovery of the movements (observation for at least 1 hour). Parameters evaluated were latency (interval between the injection and development of motor block grade 1 or 2), length of time to reach maximum score (T_{max}), length of time to recover motor function, and total effect of the LA (estimated by the area under the effect-time curve, AUC). Sensitive block was evaluated by a mechanical stimulus ²⁰. A device called analgesimeter, which generates a gradual increase in the strength (in grams) used by a plastic extre-

mity over the dorsal surface of the animal's paw, was used. To avoid the analgesia produced by stress, each animal was wrapped in a towel, except for its head and legs. Paw withdrawal reflex was considered an indication of the pain threshold – Pain Withdrawal Threshold to Pressure (PWTP). Basal PWTP was measured before the experiment and animals with a pain threshold below or above 90 to 140 g were excluded, and a maximal pressure (cut-off) of 350 g, considered as representative of a sensitive block, was established. After the administration of the excipient or formulations, measurements were done for five hours; at 15-minute intervals for the 1st hour, 30-minute intervals for the 2nd and 3rd hours, and 60-minute intervals in the last two hours. Analgesia was defined as an increase in the pressure threshold of the animals at least 50% greater than in the group treated with the excipient. The end-point of analgesia was established when there were no statistical differences among the test and control groups ¹².

The Mann-Whitney test was used for the statistical analysis of the motor block (latency, T_{max} , recovery time, and AUC) and the data expressed as median (minimal and maximal limits). PWTP values during sensitive blocks were expressed as mean \pm SD and the individual times were evaluated by the Variance Analysis (One-way ANOVA) and posteriorly by the Tukey-Kramer test ²¹. A value was considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

It was possible to observe, through the solubility phase tests, the complexation of S75-R25 with HP- β -CD at a pH of 7.4 in different temperature (Figure 3). The solubility diagram of the phase systems indicates formation of soluble complexes with a linear increase in solubility of S75-R25 against the concentrations of HP- β -CD tested in different temperatures. Using linear regressions obtained with the curves in figure 3 and equation 1, the affinity constant (K) between S75-R25 and HP- β -CD in different temperatures was calculated (Table I). The data obtained demonstrated that elevating the temperature increases the values of the affinity constant (K) due to an increase in the solubility of the drug, dislocating the equilibrium to form the complex.

A van't Hoff curve (Figure 4) was obtained from the temperature and affinity constant (K) values using equation 2, obtai-

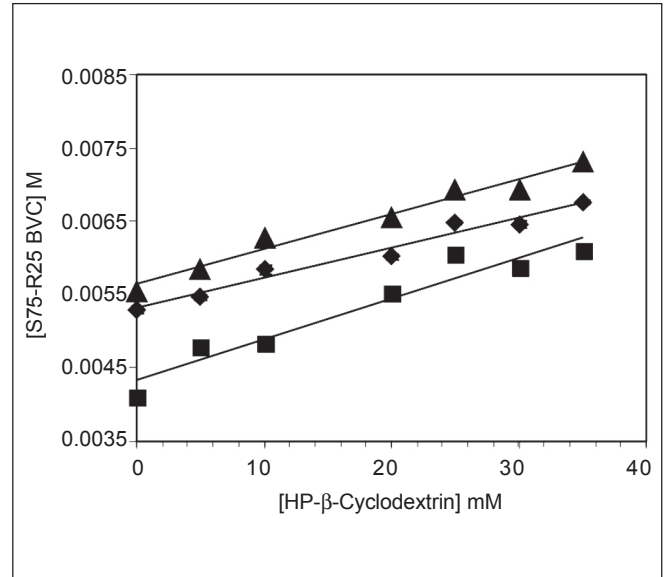


Figure 3 – Chart of Phase Solubility for S75-R25 Bupivacaine with HP- β -CD pH 7.4 in Different Temperatures (n = 3)

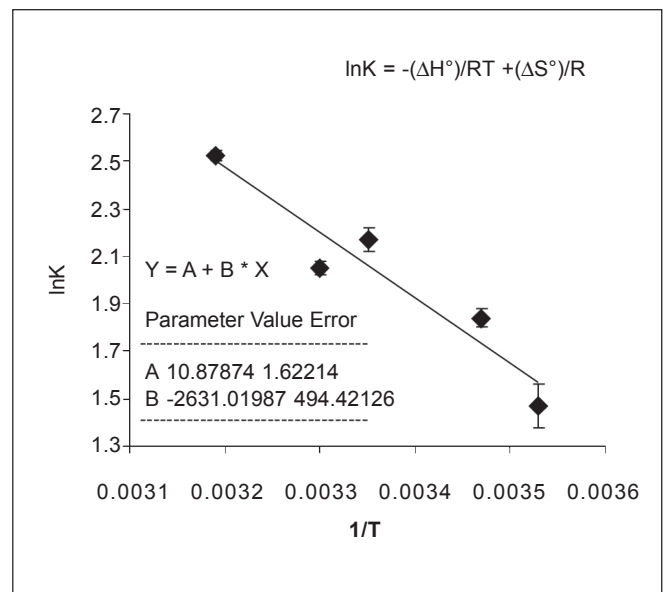


Figure 4 – Van't Hoff Curve (ln K versus 1/T) for S75-R25 Bupivacaine/HP- β -CD

Table I – Linear Regressions (r) and Affinity Constants (K) for S75-R25 with HP- β -CD According to the Temperature (pH 7.4)

T (°C)	Inclination	Intercepted	r	K (M ⁻¹)
10	2.60778E-5	0.00597	0.98017	4.37 \pm 0.49
15	3.71542E-5	0.00589	0.99751	6.31 \pm 0.26
25	4.15617E-5	0.00534	0.97925	7.78 \pm 0.28
30	4.91371E-5	0.0056	0.99132	8.77 \pm 0.47
40	5.41445E-5	0.00433	0.97061	12.5 \pm 2.4

ning, therefore, the thermodynamic parameters of the complexation of S75-R25 with HP-β-CD.

Thermodynamic parameters were obtained from figure 4, through linear regression of the data. Values obtained for the complexation of S75-R25 with HP-β-CD were: 21.86 kJ/mol of enthalpy (ΔH°), 90.40 J/mol/K of entropy (ΔS°), and -5.07 kJ/mol of free energy in the system (ΔS°). The analysis of this data demonstrates that complexation between S75-R25 and the internal cavity of CD is favorable, since the free energy of the system is negative, and the entropy of the system is decisive for complexation of the drug with the CD.

Evaluation of the Motor Block

When the anesthetic solutions, free and in complexation, are administered by the subarachnoid route, they had the same effect on the animal's motor function. However, the administration of the excipient, HP-β-CD, did not produce any signs of motor block.

Comparing the experimental groups individually, we observed that the latency of the motor block was significantly reduced ($p < 0.001$) by the treatment with S50-R50_{HP-β-CD} and S75-R25_{HP-β-CD} when compared with the free solution. However, other parameters, such as length of recovery from the motor block, length of time for maximum effect, and total effect of the drug did not change with complexation with HP-β-CD (Table II).

Evaluation of the Sensitive Block

The evaluation of the sensitive block, through the PWTP, showed the effect-time relationships for the free and complexed LA. The effects of the excipient (HP-β-CD), free drugs (S50-R50 and S75-R25), and inclusion complexation (S50-R50_{HP-β-CD} and S75-R25_{HP-β-CD}) administered by the subarachnoid route, were evaluated (Figure 5 and 6).

The treatment with S50-R50_{HP-β-CD} increased the nociceptive threshold when compared to the free drug, at all times of the experiment. In the initial phase (up to 180 minutes), i.e., the end point of the analgesia induced by free S50-R50, there was a significant increase ($p < 0.001$) in the intensity of the

Table II – Temperature in Degrees Kelvin and Affinity Constant (K) for S75-R25 with HP-β-CD, pH 7.4 (values obtained from equation 2)

T (K)	1/T	K	lnK
283	0.00353	4.37	1.47 ± 0.09
288	0.00347	6.31	1.84 ± 0.04
298	0.00330	7.78	2.05 ± 0.03
303	0.00335	8.77	2.17 ± 0.05
313	0.00319	12.5	2.52 ± 0.21

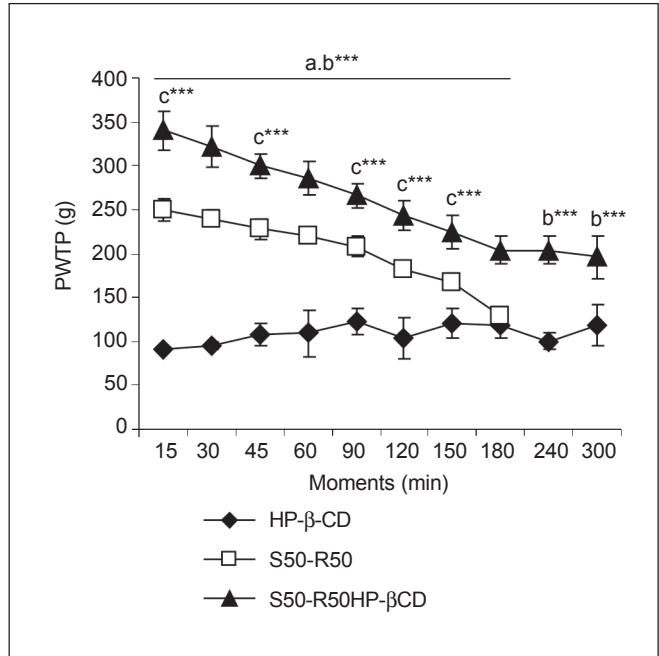


Figure 5 – Effect Versus Time Curve for the PWTP Test for Groups Treated with Excipient (HP-β-CD), 0.5% S50-R50, S50-R50_{HP-β-CD} (1:1) (100 µg/20 µL). Values Expressed as Mean ± SD (n=5); a = S50-R50 Versus HP-β-CD; b = S50-R50_{HP-β-CD} Versus HP-β-CD; c = S50-R50_{HP-β-CD} Versus S50-R50. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (One-way ANOVA)

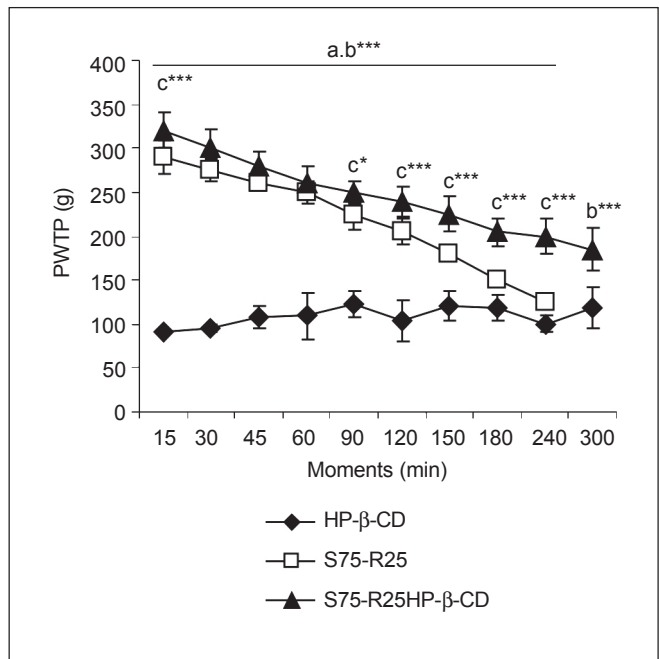


Figure 6 – Effect Versus Time Curve for Groups Treated with Excipient (HP-β-CD), S75-R25, 0.5% S75-R50_{HP-β-CD} (1:1) (100 µg/20 µL). Values Expressed as Mean ± SD (n=5); a = S75-R25 Versus HP-β-CD; b = S75-R25_{HP-β-CD} Versus HP-β-CD; c = S75-R25_{HP-β-CD} Versus S75-R25. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (One-Way ANOVA)

Table III – Latency, T_{max} , Recuperation Time, and Total Effect of the Motor Block (AUC) Induced by Free or Complexed (0.5%) S50-R50 or S75-R25 after Subarachnoid Administration in Rats

Concentration	Groups	Latency (s)	T_{max} (min)	Recuperation Time (min)	AUC (score/h)
0.5%	S50-R50	40.0 (30.0 – 45.0)	1 (-)	30.0 (30.0 – 40.0)	26.5 (15.5 – 35.5)
	S50-R50 _{HP-β-CD} (1:1)	20.0 (15.0 – 20.0) ^{a ***}	1 (-)	30.0 (30.0 – 40.0)	27.5 (27.5 – 37.5)
	S75-R25	50.0 (40.0 – 55.0)	1 (-)	30.0 (20.0 – 30.0)	24.0 (14.0 – 24.0)
	S75-R25 _{HP-β-CD} (1:1)	30.0 (25.0 – 35.0) ^{b ***}	1 (-)	30.0 (20.0 – 30.0)	24.0 (14.0 – 24.0)

Data expressed as median (minimum limit – maximum limit) (n = 5/group). a= S50-R50_{HP-β-CD} versus S50-R50; b= S75-R25_{HP-β-CD} versus S75-R25, ***p < 0.001

analgesia (approximately 1.5 times more than the free S50-R50) (Figure 5).

The inclusion complex, S75-R25_{HP-β-CD}, also changed the answer of the animals to nociceptive stimuli, increased pain threshold and the duration of the antinociceptive action up to 5 hours after its administration (Figure 6). The intensity of the analgesia increased (1.4 times) when compared with the free S75-R25 after 180 minutes of treatment (p < 0.001).

Both systems of controlled release (S50-R50_{HP-β-CD} and S75-R25_{HP-β-CD}) increased the intensity and prolonged the duration of the analgesia, and the effects of the complexes was practically stable during the last two hours (Figures 5 and 6), demonstrating they are more efficient than the free S50-R50 and S75-R25.

DISCUSSION

The ability of the CDs to form inclusion complexes depends, essentially, on the compatibility of the esters and the polarity between the CD and complexed molecule. Moreover, the forces that drive the complexation have been attributed to the high energy of the repulsion forces of the water present in the cavity of the CDs, the van der Waals interactions, hydrogen bonds, and hydrophobic interactions^{22,23}. Complexed molecules remain oriented in the direction of the greatest contact between its hydrophobic portion and the nonpolar cavity of the CD, while its hydrophilic portion is in contact with the hydroxyl groups of the CD or exposed to the aqueous environment^{3,23}. In fact, the results of the physical-chemical characterization tests indicate that S75-R25 interacts with the cavity in the molecule of HP-β-CD, and that this interaction increases the aqueous solubility of the LA, being energetically favorable, and indicating a possible increase in the bioavailability of the drug. For comparison, the groups treated with S50-R50 and S50-R50_{HP-β-CD} were included in the tests that evaluated the anesthetic efficacy. Although complexed formulations did not change the duration or the intensity of the motor block, there was a reduction in the latency time, and a potentiating effect on the differential nervous block induced by the LA. These results agree with those obtained previously with the sciatic nervous block in mice, indicating that complexation with HP-β-CD reduces the length of time to establish motor anes-

thesia, promoting a faster beginning of action without prolonging or intensifying its duration¹².

The ideal LA should be long acting, have low toxicity, and greater selectivity for sensitive than motor fibers, since this characteristic of maintaining analgesia without affecting excessively motor function has great clinical relevance²⁴.

Evaluation of the sensitive block induced by the subarachnoid injection of inclusion complexes, S50-R50_{HP-β-CD} and S75-R25_{HP-β-CD}, demonstrates an increase in the intensity and duration of the analgesia when compared to the free drugs. The potentiation of the analgesic effect promoted by the complexation with CD may be connected to the increase in the total concentration of the LA available with these formulations, as well as by the formation of a barrier that hinders their binding to liquor proteins and being captured by the blood, since the free drug has a large capacity of binding to liquor proteins, therefore reducing the amount of the drug that is available.

When lipophilic drugs (such as S50-R50 and S75-R25) are administered by the subarachnoid route, they are quickly distributed in the cerebrospinal fluid. Consequently, their onset of action is faster, but the duration of their effect is shorter²⁵. Thus, if complexation with CD makes a greater fraction of the LA available while, at the same time, increasing the length of time it is in contact with the nerve, complexed drugs would be of great clinical utility for potentiating its analgesic action.

Even though both complexes, S50-R50_{HP-β-CD} and S75-R25_{HP-β-CD}, enhanced the differential nervous block, the formulation with 50% enantiomeric excess (S75-R25) bupivacaine is better than racemic bupivacaine (S50-R50) due to its lower toxic potential, favoring the development of safer formulations that are more clinically useful for the treatment of postoperative acute pain, while being administered in smaller doses. The results of this study demonstrated that it is possible, through nano-structure formulations especially designed for each LA, to increase the differential nervous block and the total duration of the anesthesia after the administration of racemic bupivacaine (S50-R50) and 50% enantiomeric excess (S75-R25) bupivacaine. Thus, the proposed non-emulsion formulations of LAs can be used to decrease the frequency of the administration or the dose necessary to induce the same effect, which is interesting for long acting drugs with high systemic toxicity, such as bupivacaine.

REFERÊNCIAS – REFERENCES

01. Covino BG – Pharmacology of local anaesthetic agents. Br J Anaesth, 1986;58:701-716.
02. Simonetti MPB, Valinetti EA, Ferreira FM – Avaliação da atividade anestésica local da S(-) bupivacaína: estudo experimental *in vivo* em nervo isquiático de rato. Rev Bras Anesthesiol, 1997; 47:425-434.
03. Fromming KH, Szejtli J – Topics in Inclusion Science – Cyclodextrins in Pharmacy, Hungria, Kluwer Academic Publishers, 1994;33-34.
04. Gould S, Scott RC – 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): a toxicology review. Food Chem Toxicol, 2005; 1451-1459.
05. Szejtli J – Medicinal applications of cyclodextrins. Med Res Rev, 1994;14:353-386.
06. Araujo DR, Pinto LMA, Braga AFA et al – Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. Rev Bras Anesthesiol, 2003;53:663-671.
07. Dollo G, Le Corre P, Chevanne F et al – Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. I. Physicochemical characterization. Int J Pharm, 1996;131:219-228.
08. Dollo G, Le Corre P, Chevanne F et al – Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. II. Evaluation of affinity constants and in vitro transfer rate constants. Int J Pharm, 1996;136:65-74.
09. Dollo G, Thompson DO, Le Corre P et al – Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- β -CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. Int J Pharm, 1998;164:11-19.
10. Dollo G, Le Corre P, Freville JC et al – Biopharmaceutics of local anesthetic-cyclodextrin complexes following loco-regional administration. Ann Pharm Fr, 2000;58:425-432.
11. Estebe JP, Ecoffey C, Dollo G et al – Bupivacaine pharmacokinetics and motor blockade following epidural administration of the bupivacaine-sulphobutylether 7- β -cyclodextrin complex in sheep. Eur J Anaesthesiol, 2002;19:308-310.
12. Araujo DR, Pinto LMA, Braga AFA et al – Sistemas de liberação controlada com bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25): efeitos da complexação com ciclodextrinas no bloqueio do nervo isquiático em camundongos. Rev Bras Anesthesiol, 2005;55:316-328.
13. Higuchi T, Connors KA – Phase-solubility techniques. Adv Anal Chem Instr, 1965;4:117-212.
14. de Paula E, Schreier S – Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. Biochim Biophys Acta, 1995;1240:25-33.
15. Ravelet C, Ravel A, Grosset C et al – Stoichiometry and formation constants of six PAHs with γ -Ciclodextrin, determined by HPLC using a cyano stationary phase. J Liq Chrom Relat Technol, 2002;25:421-432.
16. Ismaili L, Andre C, Nicod L et al – Chromatographic determination of the association constants between Psorasolen derivatives and modified β -cyclodextrin: effect of sucrose as a co-enhancer association agent. J Liq Chrom Relat Technol, 2003;26:871-882.
17. Gazpio C, Sanchez M, Garcia-Zubiri et al – HPLC and Solubility study of the interaction between pindolol and cyclodextrins. J Pharm Biomed Anal, 2005;9:487-492.
18. Mestre C, Pelissier T, Fialip J et al – A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. J Pharm Toxic Meth, 1994;32:197-200.
19. Feldman HS, Covino BG – Comparative motor-blocking effects of bupivacaine and ropivacaine, a new amino amide local anesthetic, in the rat and dog. Anesth Analg, 1988;67:1047-1052.
20. Randall LO, Selitto JJ – A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn, 1957;409-419.
21. Zar JH – Biostatistical Analysis, 3rd Ed, New Jersey, Prentice-Hall, 1996;180-216.
22. Bibby D, Davies NM, Tucker IG – Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. Int J Pharmac, 2000;197:1-11.
23. Davis ME, Brewster ME – Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. Nature Reviews, 2004;3:1023-1035.
24. Kuzma PJ, Kline MD, Calkins MD et al – Progress in the development of ultra-long-acting local anesthetics. Reg Anesth, 1997; 22:543-551.
25. Boersma FP, Meert TF, Vercauteren M – Spinal sufentanil in rats: part I: epidural *versus* intrathecal sufentanil and morphine. Acta Anaesthesiol Scand, 1992;36:187-192.

RESUMEN

Araujo DR, Braga AFA, Moraes CM, Fraceto LF, Paula E – Mezcla con Exceso Enantiomérico de 50% (S75-R25) de Bupivacaina con Complejo de Ciclodextrinas y Anestesia por Vía Subaracnoidea en Ratones.

JUSTIFICATIVA Y OBJETIVOS: Con la finalidad de prolongar la duración de la acción y reducir la toxicidad sistémica, se han desarrollado formulaciones de AL con complejo de ciclodextrinas (CD). Ese estudio realizó la caracterización físico-química y evaluó en ratones, los efectos de los complejos de inclusión de bupivacaína racémica (S50-R50) y de la mezcla con exceso enantiomérico de 50% (S75-R25) de bupivacaína con hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD), comparándolos con las soluciones actualmente utilizadas en la clínica.

MÉTODO: Los complejos de inclusión de S75-R25 en HP- β -CD (razón molar 1:1) fueron caracterizados por estudios de solubilidad de fases variando las concentraciones de HP- β -CD y la temperatura. Fueron determinadas las constantes de afinidad (K) por la HP- β -CD y los parámetros termodinámicos para los complejos. Los bloqueos motor y sensitivo fueron evaluados en ratones, a través de la administración subaracnoidea de las formulaciones en la concentración clínica de 0,5%.

RESULTADOS: La formación de complejos de inclusión se observó a través del aumento de la solubilidad acuosa del AL bajo diferentes temperaturas y concentraciones de HP- β -CD. Las pruebas *in vivo* mostraron que S50-R50_{HP- β -CD} y S75-R25_{HP- β -CD} redujeron la latencia ($p < 0,001$) sin alterar el tiempo de recuperación del bloqueo motor, tiempo para efecto máximo y efecto total de los fármacos. Además, ambas formulaciones aumentaron la intensidad (1,5 veces, $p < 0,001$) y prolongaron la duración de la analgesia, con relación a los fármacos libres.

CONCLUSIONES: Los complejos, S50-R50_{HP- β -CD} y S75-R25_{HP- β -CD} potenciaron el bloqueo nervioso diferencial, pudiendo ser utilizados para reducir la frecuencia de administraciones o la dosis de AL para inducción de un mismo efecto. La formulación conteniendo la mezcla con exceso enantiomérico de 50% (S75-R25) de bupivacaina fue interesante en el desarrollo de formulaciones seguras y útiles para el tratamiento del dolor agudo en el período postoperatorio.