



Interação de anestésicos locais com lipossomos determinada por espectroscopia de infravermelho

Fraceto, L.F.^{1,2*}; de Paula, E.²

¹ Departamento de Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, Brasil

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Unicamp, Campinas, SP, Brasil

Recebido 21/03/06 / Aceito 01/08/06

RESUMO

Neste trabalho foram investigados os efeitos de dois anestésicos locais, lidocaína e benzocaína, sobre as propriedades estruturais e dinâmicas de vesículas unilamelares de fosfatidilcolina de ovo em pH 7,4 e 10,5 para determinar a localização preferencial destes anestésicos no interior da bicamada. Mudanças na organização de vesículas unilamelares pequenas foram determinadas através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Os experimentos de infravermelho mostraram que os anestésicos locais alteram as ligações de hidrogênio das moléculas de água monitoradas através das regiões da cadeia acila, grupamento fosfato e carbonilas da região do glicerol dos fosfolípidios. Os efeitos do aumento da concentração dos anestésicos locais nestas regiões mostraram que a lidocaína ionizada torna maior o acesso de moléculas de água nas regiões do grupamento de fosfato e carbonilas da região do glicerol. Para a lidocaína neutra (pH 10,5) o principal efeito observado foi na região do glicerol. Já para o anestésico local benzocaína foi observada uma diminuição do acesso de moléculas de água na região das carbonilas do glicerol. Um modelo proposto indica que a lidocaína ionizada e a neutra ligam-se aos lípidios próximos ao grupamento fosfato e região do glicerol. Para a benzocaína a localização preferencial proposta foi a região do glicerol e os primeiros carbonos da cadeia acila. A posição preferencial dos anestésicos nas membranas fosfolípidicas modelo pode modular o acesso destas moléculas em seus sítios de ligação na proteína canal de sódio voltagem-dependente.

Palavras-chave: Anestésicos locais; lipossomos; infravermelho.

INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais (AL) abrangem um grande número de moléculas de diferentes estruturas químicas como os amino-ésteres, os amino-amidas, os amino-cetonas, amidas, álcoois, tio-ésteres, tio-amidas, os derivados de uréia, poliéteres (Gupta, 1991), os derivados de monoterpenos do carano (Lochynski et al., 2002), capazes

de bloquear de forma reversível a condução do estímulo nervoso. Por constituírem moléculas anfífilas os AL têm grande afinidade pelas membranas celulares. Em membranas excitáveis eles inativam os canais de sódio voltagem-dependentes, impedindo assim o influxo de íons necessários à despolarização da membrana (Covino & Vassalo, 1985). As teorias propostas para explicar os mecanismos de ação dos AL podem ser classificadas em duas vertentes: a primeira atribui o efeito anestésico à ligação destes compostos à proteína canal de sódio; a outra considera a interação dos AL com os componentes lipídicos da membrana como determinante do fechamento dos canais de sódio (de Paula & Schreier, 1996).

Mais conhecida como “hipótese do lípidio”, a segunda explicação considera que as alterações causadas pela interação dos anestésicos locais nas propriedades estruturais e dinâmicas da matriz lipídica provocaria alterações conformacionais no canal de sódio, explicando desta forma a sua inativação (Lee, 1976). Estudos clássicos da literatura demonstram que os AL agem sobre sistemas membranares alterando-os de diversas maneiras. Analisando apenas a fase lipídica membrana observou-se efeitos de expansão da bicamada e de diminuição na temperatura principal de transição de fases, fatores esses que aumentariam a fluidez e a permeabilidade da membrana (de Paula & Schreier, 1996).

A incorporação de anestésico pela fase lipídica provoca uma expansão da área superficial de monocamadas (Skou, 1954) e de bicamadas (Seeman, 1966; Seelig, 1987). Esta expansão é favorecida pela diferença entre o comprimento da molécula do anestésico (mais curto) e o dos fosfolípidios. Assim, abaixo do seu ponto de inserção o anestésico criaria um “volume livre”, que seria compensado com uma mudança conformacional das cadeias lipídicas adjacentes, diminuindo o comprimento total da bicamada, bem como a sua expansão lateral (Trudell, 1977; Gallová & Balgavý, 1997). O efeito dos AL no empacotamento dos fosfolípidios em membranas modelo e biológicas foi bastante estudado por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e por outras técnicas espectroscópicas como a ressonância magnética nuclear (RMN), o infravermelho e a fluorescência (de Paula & Schreier, 1995; Pinto et al., 2000; Fraceto et al., 2002).

Através da técnica de absorção no infravermelho, Schöpflin et al. (1987), demonstraram a incorporação da dibucaína e da procaína em monocamadas de palmitoil-oleil

*Autor correspondente: Leonardo Fernandes Fraceto - Universidade de Sorocaba - Faculdade de Farmácia - Bloco C - Cidade Universitária - Rodovia Raposo Tavares km 92,5 - CEP: 18023-000 - Sorocaba - São Paulo, Brasil. Telefone: (15) 2101-7000 - Fax: (15) 2101-7000 - E-mail: leonardo.fraceto@uniso.br

fosfatidilcolina, estudando as bandas de absorção dos compostos entre 1400 e 1800 cm^{-1} . A combinação de estudos de infravermelho com a variação de pressão possibilitou a Auger et al. (1987, 1990) demonstrar que a tetracaína, incorporada em membranas sintéticas (fosfatidilcolina, fosfatidilserina) e biológicas é expulsa da bicamada por aumento da pressão. Este resultado explicou oportunamente observações anteriores, *in vivo*, sobre a reversão do efeito de anestésicos com o aumento de pressão (Lever et al., 1971), mostrando também porque os AL penetram menos em membranas biológicas com a diminuição da temperatura (Bradley & Richards, 1984). A compactação da membrana constitui, portanto, um fator limitante à partição dos AL em baixas temperaturas, conforme o descrito por Kaminoh et al. (1988; 1989).

Medidas de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foram realizadas com AL modificados, isto é, covalentemente ligados a radicais nitróxido (Gargiulo et al., 1973; Giotta et al., 1974) e também empregando radicais nitróxido ligados a ácidos graxos ou aos seus derivados (Schreier et al., 1984, 1986; Frezatti Jr. et al., 1986; de Paula & Schreier, 1995; Gallová & Balgavý, 1997; Pinto et al., 2000; Fraceto et al., 2002). Estes estudos mostraram que a incorporação dos AL na bicamada lipídica vem acompanhada de uma diminuição na ordem e de um aumento na dinâmica membranar. Em um estudo sistemático envolvendo AL das séries amino-amidas e amino-éster (de Paula & Schreier, 1995) observou-se que o efeito de diminuição da organização de membranas lipídicas não está relacionado diretamente à hidrofobicidade ou classe dos AL. Tais resultados foram reforçados por outros estudos de nosso grupo, que correlacionaram resultados de RMN e de RPE na análise da interação de AL de três famílias distintas com vesículas de lipossomas multilamelares (grandes) e unilamelares (pequenas) de fosfatidilcolina de ovo (Pinto et al., 2000; Fraceto et al., 2002). Desta forma, foram encontradas evidências de que os parâmetros estéricos dos AL determinariam a sua localização preferencial no interior da bicamada.

Medidas de ^1H -RMN foram favorecidas graças ao desenvolvimento de espectrômetros de RMN de alta resolução e de novas seqüências de pulsos, fatores estes que possibilitaram a obtenção de informações sobre a proximidade de AL e fosfolipídios. Diversos trabalhos já demonstraram que a localização dos anestésicos locais no interior de bicamadas lipídicas está diretamente relacionada ao estado de ionização do fármaco e de sua hidrofobicidade como, no caso, os relatados para diversos anestésicos locais: forma ionizada da tetracaína (Yokono et al., 1989) procaína, dibucaína e tetracaína (Kuroda & Fujiwara, 1987; Wakita et al., 1992), lidocaína (Fraceto et al., 2002; 2005), benzocaína (Fraceto & de Paula, 2004), etidocaína, mepivacaína e bupivacaína (Fraceto et al., 2005).

Neste trabalho foi estabelecida a interação de dois anestésicos locais — lidocaína e benzocaína (Figura 1) — com lipossomos unilamelares de fosfatidilcolina de ovo através de espectroscopia de infravermelho com

transformada de Fourier. A finalidade foi determinar a localização preferencial destes no interior dos lipossomos, de modo a fornecer informações adicionais para o entendimento da importância da interação dos anestésicos com a fase lipídica-membranar.

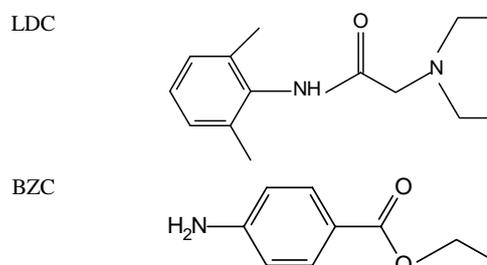


Figura 1: Estrutura química dos anestésicos locais, lidocaína (LDC) e benzocaína (BZC).

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A fosfatidilcolina de ovo (EPC) e os anestésicos locais, lidocaína e benzocaína, usados nos experimentos, foram obtidos da Sigma Chem. Co. Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau analítico.

Preparo dos lipossomos multilamelares

Alíquotas de fosfatidilcolina de ovo (EPC), retiradas de soluções estoque (mantidas a -80°C) e ressuspenso em clorofórmio, foram evaporadas sob fluxo de N_2 seguidas de vácuo por duas horas. Foram obtidos lipossomos multilamelares (LMV) por adição de tampão (tempo de hidratação de uma hora) e por agitação vigorosa (em vortex) por cinco minutos (Fraceto et al. 2002).

Nos experimentos foram utilizados tampão Hepes 100 mM pH 7,4 e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 10,5. A integridade química dos lipídios em função do tempo, nos diversos valores de pH, foi acompanhada por cromatografia em camada delgada.

Preparo dos lipossomos unilamelares

As vesículas unilamelares foram preparadas a partir de LMV e submetidas à sonicação por ultra-som (potência 50W, 20kHz de frequência nominal, sob fluxo de N_2) em tubos mergulhados em banho de gelo/ H_2O . O “tip” foi imerso a meia altura e sintonizado para máxima cavitação (marca Sonics & Materials Inc., Modelo VC50). A sonicação foi realizada em ciclos alternados de um minuto (agitação/repouso), para evitar o superaquecimento da amostra. O tempo de sonicação, até a translucidez da amostra, foi de 15-20 minutos para as amostras de EPC (65 mM). Adicionou-se uma pequena quantidade de resina Quelex (quelante de metais) nas amostras para a retirada

de resíduos de titânio provenientes do “tip” do sonicador. Em seguida, foram centrifugadas a $1000 \times g$ por 15 minutos (Sheetz & Chan, 1972; De Bony & Dennis, 1981).

Medidas de infravermelho

Devido a grande absorção de água das amostras as vesículas unilamelares foram preparadas conforme o descrito acima juntamente com o solvente água deuterada (D_2O) (Timothy et al., 1984; Blume et al., 1988). Os dados foram obtidos a partir da utilização de uma cela de infravermelho para líquidos de CaF_2 de 0,5 mm. As medidas foram realizadas no Instituto de Química/Unicamp em aparelho de espectrômetro Bomem-MB séries, utilizando tampão Hepes 100 mM, pH 7,4 e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 10,5. Foram analisadas as regiões da cadeia acila, carbonila e grupamento fosfato na ausência e presença de concentrações crescentes de AL (BZC e LDC).

RESULTADOS

Espectro de infravermelho dos lipossomos

Para a determinação da interação entre anestésicos locais e lipossomos foram observadas as frequências de estiramento do grupamento fosfato, das carbonilas e da região da cadeia acila da EPC (Figura 2). Os espectros das vesículas unilamelares preparadas com tampão HEPES, 100 mM, pH 7,4 em D_2O foram obtidos na região entre 400 cm^{-1} a 3800 cm^{-1} . Na Figura 2 é possível verificar a expansão do espectro das três regiões descritas acima para vesículas unilamelares de EPC. As atribuições das bandas foram feitas a partir de trabalhos semelhantes descritos pela literatura, usando-se membranas fosfolipídicas multilamelares (Timothy et al., 1984; Blume et al., 1988; Auger, et al. 1990; Chiou, et al., 1992; Ueda et al., 1994). Foi feita uma análise mais detalhada da região característica do estiramento de carbonila realizando a desconvolução espectral por meio software Microcal Origin®, como está mostrado na Figura 3.

Estudo da interação de lidocaína com lipossomos

A análise do efeito da lidocaína nos lipossomos por infravermelho foi realizada em dois valores de pH (7,4 e 10,5):

Efeito em pH 7,4

Para verificar o efeito da lidocaína (presença de forma neutra e ionizada), observou-se a influência do aumento da concentração do fármaco (0 a 50 mM) nas frequências de estiramentos dos lipossomos apresentadas na Figura 2. Os sinais correspondentes a molécula de LDC não apresentaram sobreposição com os das moléculas de EPC. O efeito do aumento da concentração de LDC pode ser observado na Figura 4.

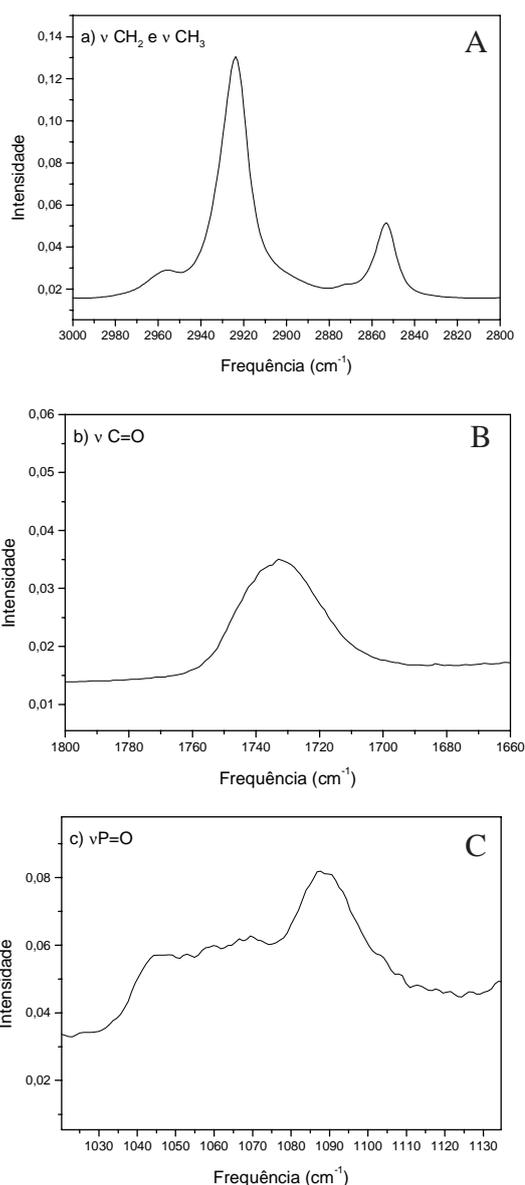


Figura 2: Espectro de Infravermelho de vesículas unilamelares de EPC (65mM). Regiões referentes às frequências de absorção de: a) νCH_2 e νCH_3 ; b) $\nu C=O$; c) $\nu P=O$ em cm^{-1} . Amostras coletadas em cela de CaF_2 , tampão HEPES 100 mM, pH 7,4 em D_2O a T.A..

Efeito em pH 10,5

O mesmo estudo apresentado na Figura 4 foi realizado em pH 10,5 (Figura 5), a fim de checar o efeito da LDC na sua forma 100 % neutra. A comparação entre os efeitos da LDC nos dois valores de pH está apresentada na Figura 6. Cabe ressaltar que a estabilidade físico-química dos lipídios nos diversos valores de pH em função do tempo foi verificada por cromatografia em camada delgada, não havendo também nenhuma hidrólise dos fosfolipídios e fármacos durante o período de realização do experimento (dados não mostrados).

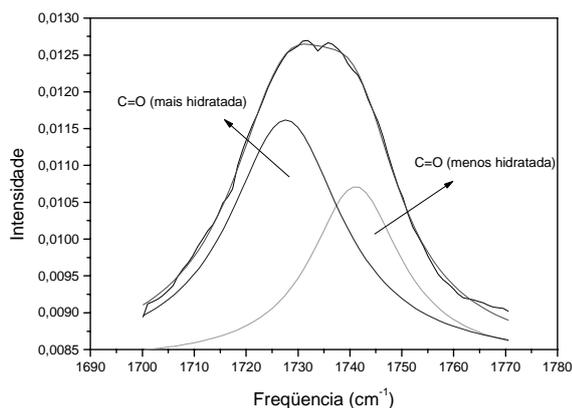


Figura 3: Desconvolução da banda de estiramento da carbonila ($\nu\text{C}=\text{O}$) dos fosfolípidios.

Estudo da interação da benzocaína com lipossomos

Na Figura 7 pode-se observar os efeitos causados pela BZC no interior das vesículas unilamelares de EPC. Porém, como a BZC é um anestésico neutro, a análise foi realizada somente em pH 7,4.

DISCUSSÃO

Análise do espectro de infravermelho dos lipossomos

A Figura 2 (a, b, c) mostra as expansões de três regiões do espectro. Na Figura 2a observa-se duas bandas, uma em 2920 cm^{-1} e outra em 2850 cm^{-1} referentes ao desdobramento assimétrico (ν_{as}) e simétrico (ν_{s}) dos $-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}$ das cadeias acila dos lípidios. Na Figura 2b observa-se uma banda em 1730 cm^{-1} referente à carbonila ($\nu\text{C}=\text{O}$) menos e mais hidratada dos fosfolípidios. Na Figura 2c observa-se uma banda em 1088 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico do grupamento fosfato ($\nu_{\text{as}}\text{P}=\text{O}$). A Figura 3 mostra as bandas de estiramento da carbonila ($\nu\text{C}=\text{O}$) após a desconvolução: uma delas em 1741 cm^{-1} , referente à frequência de estiramento da carbonila menos hidratada, e a outra em 1728 cm^{-1} , referente à carbonila mais hidratada. Todos os resultados estão de acordo com os encontrados na literatura (Timothy et al., 1984; Blume et al., 1988; Auger, et al. 1990; Chiou, et al., 1992; Ueda et al., 1994).

Efeito da lidocaína

Os efeitos do aumento da concentração de LDC nas bandas apresentadas na Figura 2, em pH 7,4, estão mostrados na Figura 4a e 4b. Estes resultados demonstram que as bandas de estiramento $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ e $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$ e $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ e $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ não sofreram alterações devido à presença de moléculas de LDC (Figura 4a). Já para a frequência de estiramento do grupamento fosfato ocorreu uma pequena variação em função do aumento da concentração de LDC. Possivelmente este efeito está relacionado a uma interação da LDC ionizada

com o grupamento fosfato, como o encontrado para este anestésico com membranas de eritrócitos (Fraceto & de Paula, 2004). Na Figura 4b observa-se que a LDC causou uma variação na frequência de estiramento da carbonila dos fosfolípidios, sendo esta uma alteração que ocorreu em uma faixa de 0 a 10 mM de LDC. Nas condições do experimento coeficiente de partição = 133 (de Paula & Schreier, 1995) 86% da quantidade total de LDC está inserida na membrana, resultando assim em uma razão molar de 1:7,5 LDC:EPC para a concentração máxima de LDC de 10 mM. Após esta concentração, observa-se ainda que tanto para a carbonila mais hidratada, quanto para a menos hidratada, ocorre uma estabilização. Isto decorre do fato da LDC cessar o acesso de moléculas de água à região da carbonila, provocando desta forma esta saturação no efeito (Fraceto et al., 2002).

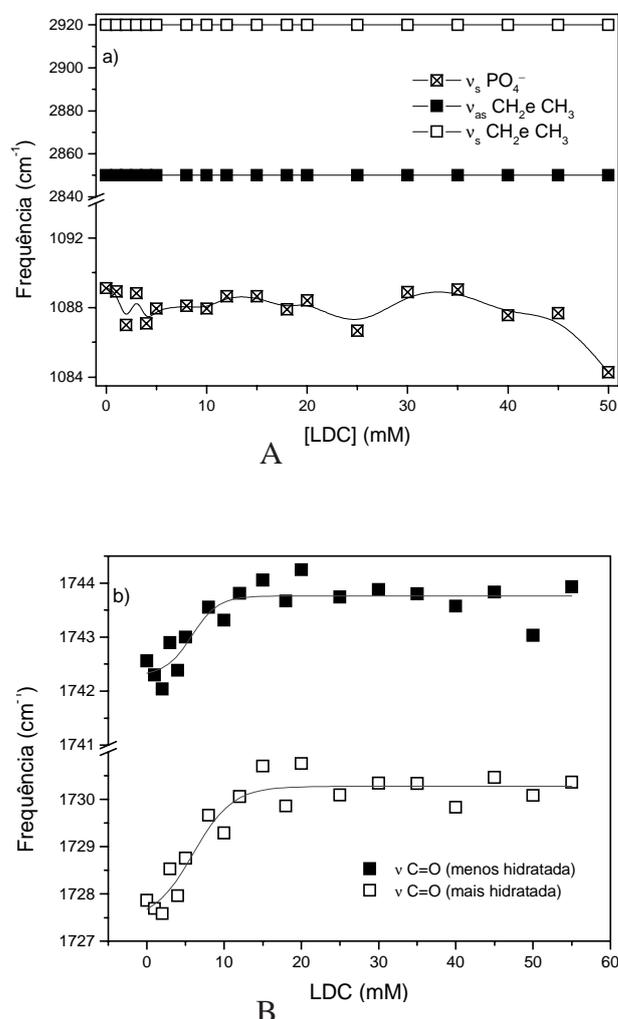


Figura 4: Alterações causadas nas frequências de estiramentos das bandas: a) νCH_2 e νCH_3 e $\nu\text{P}=\text{O}$; b) $\nu\text{C}=\text{O}$ em cm^{-1} . Amostras coletadas em cela de CaF_2 , tampão HEPES 100 mM, pH 7,4 em D_2O a T.A., $[\text{EPC}]=65\text{mM}$. Os resultados representam a média de três experimentos.

A Figura 5 (a, b) apresenta o resultado do estudo da interação de LDC 100 % neutra (pH 10,5) com lipossomos unilamelares. Da mesma forma, em pH 7,4 não foram observadas alterações nas frequências de estiramento ν_s CH₂ e CH₃ e ν_{as} CH₂ e CH₃ (Figura 5a). Já para a frequência de estiramento do grupamento fosfato observou-se uma variação menor do que aquela encontrada na mesma região em pH 7,4 (onde existe uma parcela das moléculas de lidocaína ionizadas) indicando que em pH 10,5 isto não ocorre.

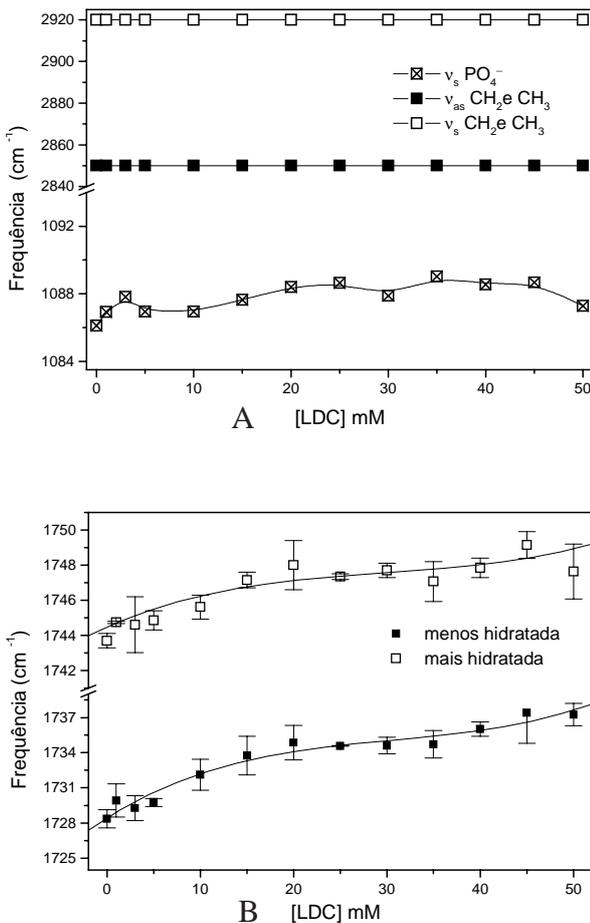


Figura 5: Alterações causadas nas frequências de estiramentos das bandas: a) ν CH₂ e ν CH₃ e ν P=O; b) ν C=O em cm⁻¹. Amostras coletadas em cela de CaF₂, tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 10,5 em D₂O a T.A., [EPC]=65mM. Os resultados representam a média de três experimentos.

Na Figura 5b observamos que a presença de LDC causa uma variação na frequência de estiramento da carbonila dos fosfolípidios em uma faixa de 0 a 20 mM de LDC. Nas condições do experimento (coeficiente de partição=144) 87 % da quantidade total de LDC está na membrana, o que dá uma razão molar de 1:3,7 (LDC:EPC). Acima da concentração de 20 mM de LDC, tanto para a

carbonila mais hidratada quanto para a menos hidratada, ocorre uma estabilização no efeito provocado pelo anestésico local — provavelmente devido a uma saturação da membrana.

Comparando os resultados obtidos nos dois valores de pH observa-se que quando em pH 7,4 uma fração de moléculas de LDC apresenta interação com a região do grupamento fosfato; já em pH 10,5, como as moléculas de LDC não apresentaram carga, não causaram alterações no grupamento fosfato. Entretanto, em pH 10,5 o efeito na região da carbonila (Figura 6) é mais pronunciado do que o em pH 7,4. Desta maneira, é possível perceber que a LDC provoca um maior acesso de moléculas de água devido a sua inserção na região próxima aos -CH₂- vizinhos ao grupamento fosfato e cabeça polar, como o proposto na literatura (Fraceto et al., 2002) mas, sem contudo causar uma alteração específica na região do grupamento fosfato.

Os dados descritos acima indicam assim que a LDC pode apresentar dois tipos de interações no interior das vesículas fosfolipídicas, conforme já foi relatado para o anestésico local tetracaína (Boulanger et al., 1980, 1981).

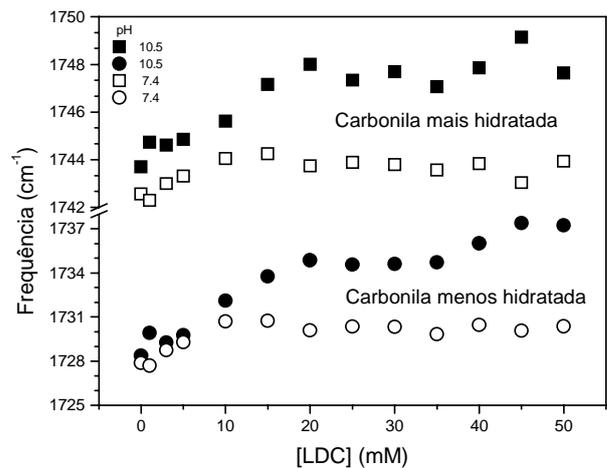


Figura 6: Efeito causado pela LDC na região da carbonila de vesículas de EPC em diferentes valores de pH (7,4 e 10,5).

Benzocaína

A análise dos dados do efeito do aumento da concentração de BZC nas vesículas fosfolipídicas mostra que as frequências das bandas de estiramentos ν_s CH₂ e CH₃ e ν_{as} CH₂ e CH₃ não sofreram alterações devido à presença de moléculas de BZC (Figura 7a). Para a frequência de estiramento do grupamento fosfato ao contrário da LDC, não se observou nenhuma variação com o aumento da concentração de BZC, confirmando os resultados propostos para a localização da BZC em vesículas multilamelares (Pinto, 1998) e de eritrócito (Fraceto & Paula, 2004).

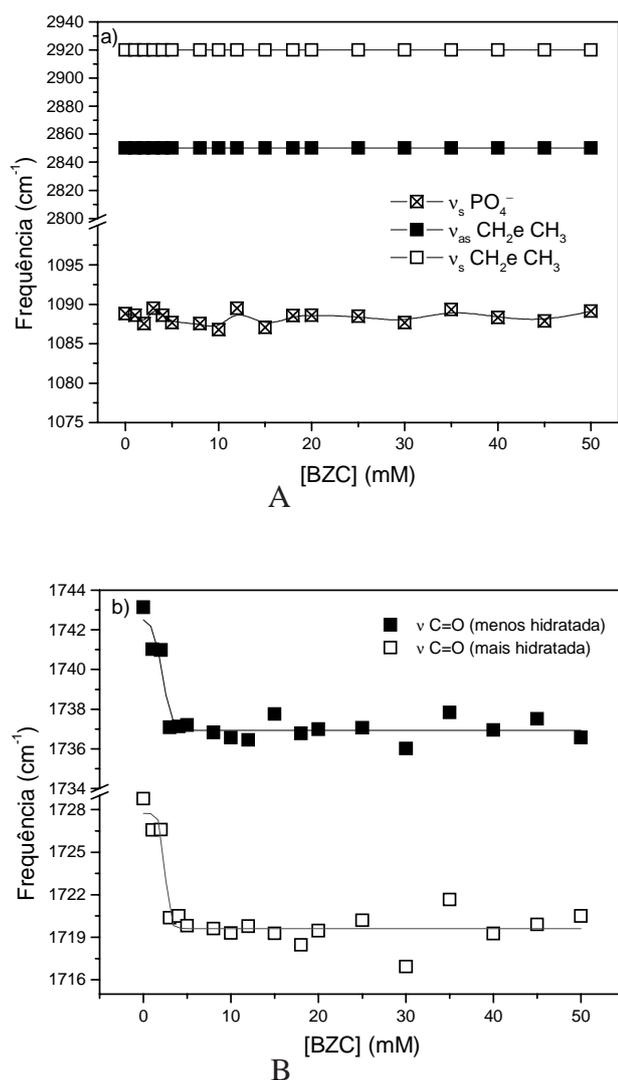


Figura 7: Alterações causadas nas frequências de estiramentos das bandas: a) ν_{CH_2} e ν_{CH_3} e $\nu_{P=O}$; b) $\nu_{C=O}$ em cm^{-1} . Amostras coletadas em cela de CaF_2 , tampão HEPES 100 mM, pH 7,4 em D_2O a T.A., $[EPC]=65mM$. Os resultados representam a média de três experimentos.

Em relação à Figura 7b observa-se que a presença de BZC causou uma variação na frequência de estiramento da carbonila dos fosfolípidios numa faixa de concentração de 0 a 5 mM de BZC. Nas condições do experimento 93 % da quantidade total de BZC está na membrana o que dá uma razão molar de na 1:14 (BZC:EPC) na concentração de BZC de 5 mM. Após esta concentração ocorre uma estabilização do efeito tanto para a carbonila mais hidratada como para a menos hidratada

O efeito observado na carbonila advém do fato da molécula de BZC inserir-se mais profundamente no interior das vesículas fosfolipídicas fazendo com que ocorra, diferentemente da LDC, um menor acesso das moléculas de água nesta região competindo com as moléculas de água

pelo sítio na região do glicerol dos fosfolípidios. Em consequência da diminuição de acesso de moléculas de água (desidratação), observa-se uma mudança na frequência de estiramento de ambas carbonilas (mais e menos hidratadas) para a região do azul (Ueda et al., 1994). É importante notar que este efeito foi pronunciado de forma mais efetiva na frequência da carbonila mais hidratada (Ueda et al, 1994). A competição entre as moléculas de BZC e água fez com que a frequência de estiramento das carbonilas aumentasse sua energia e, por consequência, diminuísse sua frequência. Tais apontamentos estão de acordo com a literatura, já que um maior acesso de moléculas à região do glicerol faz com que a energia das vibrações destas carbonilas diminua. (Wong et al., 1988).

Comparação entre os dois anestésicos

A comparação entre os resultados obtidos para os dois anestésicos aqui estudados mostrou que os efeitos provocados pela LDC foram antagônicos aos da BZC. A LDC causou efeito na região do grupamento fosfato (provocado pelas moléculas ionizadas) e na região da carbonila (provocado pelas moléculas neutras), provocando um maior acesso de moléculas de água nesta região e fazendo com que as bandas fossem deslocadas para regiões de maiores frequências (com menor energia). A BZC apresentou efeito apenas na região da carbonila, mas por outro lado causou uma diminuição no acesso das moléculas de água, fazendo com que ocorresse um deslocamento das frequências para uma região de maior energia. Tais resultados acordam com dados da literatura sobre a interação destes anestésicos com membranas de eritrócito (Fraceto & de Paula, 2004), segundo os quais a LDC se localiza mais superficialmente (grupamento fosfato e cabeça polar) que a BZC (região próxima ao glicerol).

Um estudo sobre a orientação e a localização da benzocaína e butambem em membranas fosfolipídicas por ²H-RMN (Kuroda et al, 2000) mostrou que a BZC (deuterada seletivamente) altera a ordem das cadeias acila na região próxima às carbonilas do glicerol. Porém, o mesmo sistema quando em presença de colesterol apresenta uma localização um pouco mais superficial. Os resultados aqui apresentados corroboram com este modelo, visto que o efeito causado pela BZC é específico nesta região.

Baseado nos dados fornecidos, juntamente com as informações da literatura (Kuroda et al., 2000; Fraceto & de Paula, 2004) sobre a inserção dos dois anestésicos LDC e BZC em vesículas fosfolipídicas de EPC, foi proposto um modelo (Figura 8) que traz uma representação estática da posição dos anestésicos locais no interior de vesículas fosfolipídicas.

Desta forma, a partir dos experimentos de infravermelho, foi possível propor um modelo de inserção para os dois anestésicos em vesículas fosfolipídicas, onde a localização de LDC, no interior das vesículas, depende

Anestésicos locais e lipossomos.

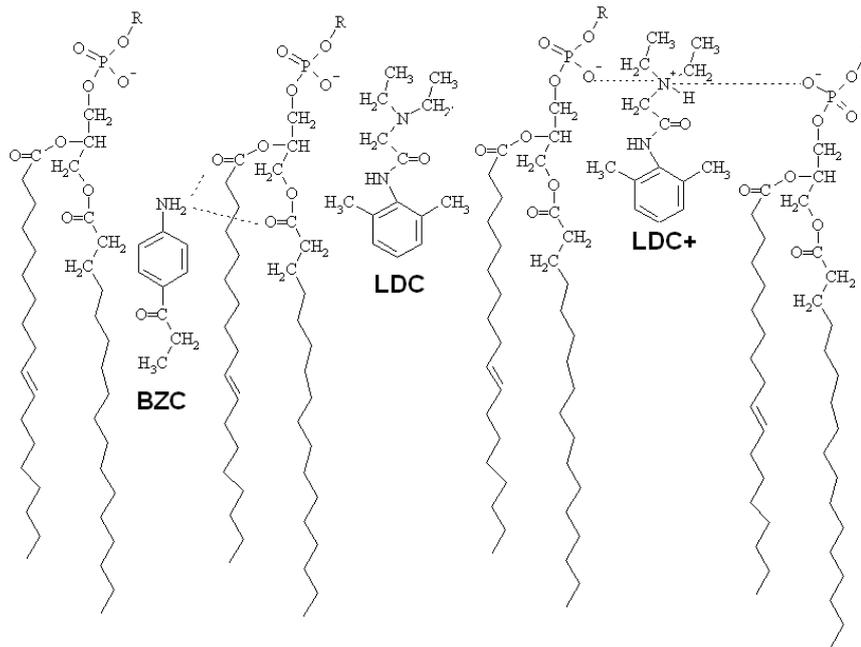


Figura 8: Modelo de inserção da BZC, LDC e LDC+ (pH 7,4 e 10,5) em vesículas de EPC.

do estado de ionização deste anestésico. Neste caso, enquanto a forma neutra se insere em uma região próxima ao glicerol e grupamento fosfato, na forma ionizada a interação é mais próxima ao grupamento fosfato e cabeça polar. O anestésico local BZC apresenta uma inserção mais profunda na bicamada lipídica localizando-se entre o glicerol e os primeiros carbonos da cadeia acila.

Esta localização preferencial dos anestésicos locais aqui estudados pode indicar uma “via de acesso” alternativa destes fármacos a sítios hidrofóbicos na proteína canal de Na⁺. Desta forma, interpretação do mecanismo de anestesia deixa de ter uma abordagem restrita à importância da interação com o lipídio, ou direta, com a proteína canal de Na⁺, e torna-se mais abrangente, fornecendo uma visão mais global de seu mecanismo de ação. Neste caso, os lipídios funcionariam, portanto como um entreposto, facilitando o acesso (concentrando e direcionando a molécula) do anestésico ao sítio específico da proteína canal de sódio, causando dessa maneira a sua inativação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio financeiro (Proc. 00/0362-0) e ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (EP, Proc. 300197/95-0).

ABSTRACT

Interaction between local anesthetics and liposomes determined by infrared spectroscopy

We examined the effect of two local anesthetics (lidocaine and benzocaine) on the structure and

dynamics of egg phosphatidylcholine (EPC) membranes at pH 7.4 and 10.5 in order to assess the preferred environment of these local anesthetics within the bilayer. Changes in the organization of small unilamellar vesicles were monitored by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), which revealed that the local anesthetics (LA) changed the water-molecule hydrogen-bonding pattern, monitored by effects on the acyl chain, phosphate group and glycerol carbonyl regions of the phospholipids. The effect of increasing the concentration of local anesthetic on these regions of egg phosphatidylcholine revealed that charged lidocaine increases the access of water to the phosphate groups and to carbonyls in the glycerol region of the bilayer, while uncharged lidocaine (pH 10.5) affected mainly the glycerol carbonyls. Benzocaine, on the other hand diminished the access of water molecules to the glycerol carbonyl region. A model is proposed in which charged and uncharged lidocaine binds to the lipids near the phosphate and glycerol regions of the bilayer. For benzocaine, the main locations proposed are in the glycerol region and at the first carbons of the acyl chain. We propose that this preferential positioning, demonstrated here in model phospholipid membranes, also takes place in the nerve axons, where it could modulate the access of the LA molecules to their protein-binding sites in the voltage-gated sodium channel.

Keywords: local anesthetic; liposomes; infrared.

REFERÊNCIAS

Auger M, Smith ICP, Mantsch H, Wong PTT. High-pressure infrared study of phosphatidylserine bilayers and their

- interactions with the local anesthetic tetracaine. *Biochemistry* 1990;29:2008-15.
- Auger M, Jarrel HC, Smith ICP, Wong PTT, Siminovitch DJ, Mantsch HH. Pressure-induced exclusion of a local anesthetic from model and nerve membranes. *Biochemistry* 1987;26:8513-6.
- Blume A, Hubner W., Messner G. Fourier transform infrared spectroscopy of $^{13}\text{C}=\text{O}$ -labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups *Biochemistry* 1988;27:8239-49.
- Boulanger Y, Schreier S, Leitch LC, Smith ICP. Multiple binding sites for local anesthetics in membranes: characterization of the sites and their equilibria by deuterium NMR of specifically deuterated procaine and tetracaine. *Can J Biochem* 1980;58:986-95.
- Boulanger Y, Schreier S, Smith ICP. Molecular details of anesthetic-lipid interaction as seen by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 1981;20:6824-30.
- Bradley DJ, Richards CD. Temperature-dependence of the action of nerve blocking agents and its relationship to membrane-buffer partition coefficients: thermodynamic implications for the site of action of local anaesthetics. *Br J Pharmacol* 1984;81:161-7.
- Chiou JS, Krishna PR, Kamaya H, Ueda I. Alcohols dehydrate lipid membranes: an infrared study on hydrogen bonding. *Biochim Biophys Acta* 1992;1110:225-33.
- Covino BG, Vassalo HG. *Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico*. Rio de Janeiro: Colina Editora; 1985.
- De Bony J, Dennis EA. Alcohols dehydrate lipid membranes: an infrared study on hydrogen bonding. *Biochemistry* 1981;20:5256-60.
- 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.
- de Paula E, Schreier S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:877-94.
- Fraceto LF, de Paula E. Anestésicos locais: interação com membranas de eritrócito de sangue humano, estudada por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{31}P . *Quim Nova* 2004;27:66-71.
- Fraceto LF, Pinto LMA, Franzoni L, Spisni A, Schreier S, de Paula E. Specific location of lidocaine in phospholipid bilayers: A ^1H -NMR and RPE study. *Biophys Chem* 2002;99:229-43.
- Fraceto LF, Spisni A, Schreier S, de Paula E. Differential effects of uncharged aminoamide local anesthetics on phospholipid bilayers, as monitored by ^1H -NMR measurements. *Biophys Chem* 2005;115:11-8.
- Frezzatti Jr WA, Toselli WR, Schreier S. Spin label study of local anesthetic-lipid membrane interactions. Phase separation of the uncharged form and bilayer micellization by the charged form of tetracaine. *Biochim Biophys Acta* 1986;860:531-8.
- Gallová J, Balgavý P. Interaction of local anesthetic heptacaine homologs with phosphatidylcholine bilayers: spin label ESR study. *Biochim Biophys Acta* 1997;1325:189-96.
- Gargiulo RJ, Giotta GJ, Wang HH. Spin-labeled analogs of local anesthetics. *J Med Chem* 1973;16:707-8.
- Giotta GJ, Chan DS, Wang HH. Binding of spin-labeled local anesthetics to phosphatidylcholine and phosphatidylserine liposomes. *Arch Biochim Biophys* 1974;163:453-8.
- Gupta SP. Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. *Chem Rev* 1991;91:1109-19.
- Kaminoh Y, Kamaya H, Ueda I. Differential affinity of charged local anesthetics to solid-gel and liquid-crystalline states of dimyristoylphosphatidic acid vesicle membranes. *Biochim Biophys Acta* 1989;987:63-8.
- Kaminoh Y, Tashiro C, Kamaya H, Ueda I. Membrane-buffer partition coefficients of tetracaine for liquid-crystal and solid-gel membranes estimated by direct ultraviolet spectrophotometry. *Biochim Biophys Acta* 1988;946:215-20.
- Kuroda Y, Fujiwara Y. Locations and dynamical perturbations for lipids of cationic forms of procaine, tetracaine, and dibucaine in small unilamellar phosphatidylcholine vesicles as studied by nuclear Overhauser effects in ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1987;903:395-410.
- Kuroda Y, Nasu H, Fujiwara Y, Nakagawa T. Orientations and locations of local anesthetics benzocaine and butamben in phospholipid membranes as studied by ^2H NMR spectroscopy. *J Memb Biol* 2000;177:117-28.
- Lee AG. Model for action of local anaesthetics. *Nature* 1976;262:545-8.
- Lever MJ, Miller KW, Paton WDM, Smith EB. Pressure reversal of anaesthesia. *Nature* 1971;231:368-71.
- Lochynski S, Frackwiak B, Librowski T, Czarnecki R, Grochowski J, Serda P, Pasenkiewicz-Gierula M. Stereochemistry of terpene derivatives. Part 3: Hydrolytic kinetic resolution as a convenient approach to chiral aminohydroxyiminocaranes with local anaesthetic activity. *Tetrahedron* 2002;13:873-8.
- Pinto LMA. *Interação dos anestésicos locais benzocaína, lidocaína e tetracaína com membranas modelos*. [Dissertação] Campinas: Departamento de Bioquímica, UNICAMP; 1998.
- Pinto LMA, Yokaichiya DK, Fraceto LF, de Paula E. Interaction of benzocaine with model membranes. *Biophys Chem* 2000;87:213-23.

Anestésicos locais e lipossomos.

- Schreier S, Amaral AT, Stachissini AS, Bianconi ML. Electron spin resonance study of benzoic acid esters, analogs of local anesthetics. Interaction with membranes, aggregation and hydrolysis. *Bull Magn Res* 1986;8:166-71.
- Schreier S, Frezzatti Jr WA, Araujo PS, Chaimovich H, Cuccovia IM. Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine. Spin label and titration studies. *Biochim Biophys Acta* 1984;769:231-7.
- Schoepflin M, Fingeli UP, Perlia X. A study on the interaction of local anesthetics with phospholipid model membranes by infrared ATR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 1987;109:2375-80.
- Seelig A. Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1987;899:196-204.
- Seeman P. Erythrocyte membrane stabilization by steroids and alcohols; a possible model for anesthesia. *Biochem Pharmacol* 1966;15:1753-66.
- Sheetz MP, Chan S. Effect of sonication on the structure of lecithin bilayers. *Biochemistry* 1972;11:4573-81.
- Skou JC. Local anaesthetics. V. The action of local anaesthetics on monomolecular layers of stearic acid. *Acta Pharmacol Toxicol* 1954;10:317-24.
- Timothy JL, Ross PD, Levin IW. Effects of anesthetic and nonanesthetic steroids on dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: a calorimetric and Raman spectroscopic investigation. *Biochemistry* 1984;23:4636-41.
- Trudell JR. A unitary theory of anesthesia based on lateral phase separations in nerve membranes. *Anesthesiology* 1977;46:5-10.
- Ueda I, Chiou JS, Krishma PR, Kamaya H. Local anesthetics destabilize lipid membranes by breaking hydration shell: infrared and calorimetry studies. *Biochim Biophys Acta* 1994;1190:421-9.
- Wakita M, Kuroda Y, Fujiwara Y, Nakagawa T. Conformations of dibucaine and tetracaine in small unilamellar phosphatidylcholine vesicles as studied by nuclear Overhauser effects in ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Phys Lipids* 1992;62:45-54.
- Wong PT, Siminovitch DJ, Mantsch HH. Structure and properties of model membranes: new knowledge from high-pressure vibrational spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1988;947:139-71.
- Yokono S, Ogi K, Miura S, Ueda I. 400 MHz two-dimensional nuclear Overhauser spectroscopy on anesthetic interaction with lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* 1989;982:300-2.