VICTOR OLIVEIRA MURAKAMI

Desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema de liberação controlada da hialuronidase incluída em hidroxipropil- β -ciclodextrina

São Paulo

2012

VICTOR OLIVEIRA MURAKAMI

Desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema de liberação controlada da hialuronidase incluída em hidroxipropil- β -ciclodextrina

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti

São Paulo

2012

MURAKAMI V O. Desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema de liberação controlada da hialuronidase incluída em hidroxipropil- β -ciclodextrina. Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos **meus pais** que apostaram todas as suas fichas na educação de seus dois filhos, dedicaram cada gota de seu suor e esforço para que este trabalho, um dia, acontecesse. Serei sempre grato pelo que sou e pelo que significam para mim. Amo vocês.

A minha noiva e nosso herdeiro, que são o motivo de eu levantar toda manhã e encarar o mundo de frente, são a minha companhia em todos os momentos. Cuidarei de vocês com todo amor e carinho. Amo incondicionalmente.

Ao meu irmão, meu guardião. Que, juntamente com meus pais, sempre me incentivou nas minhas escolhas. Não tenho outra palavra para te descrever senão, irmão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Reservo este espaço para agradecer à Profa Dra Maria Aparecida Borsatti, por ser uma pessoa que luta pela sua integridade, por lutar pelo que acha correto, sempre de acordo com os bons valores que nos são passados!

Gostaria de agradecer por me ajudar nessa caminhada, por não somente ser orientadora, mas por ser mãe. Por brigar na hora que tem que brigar, por ouvir na hora que tem que ouvir, por ensinar na hora que tem que ensinar, por ser você!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Rodney Garcia Rocha e aos professores da Clínica Integrada da FOUSP e colegas pós-graduandos, em especial aos Prof. Mário Sérgio e Prof. Marcelo Romano pelos conhecimentos que me foram passados nas clínicas!

Aos Professores Maria Esperanza Cortes Segura (FO-UFMG), Rubén Dario Sinisterra Millán (IQ – UFMG), Marinilce Fagundes dos Santos (ICB-USP) e a todos dos laboratórios do ICB-USP e da ICEx-UFMG que, com todo seu profundo conhecimento, me auxiliaram na fase experimental.

À mestranda Carolina de Carvalho (FOUSP), pela suma importância neste projeto. Sua participação, dedicação e parceria foram vitais. Serei eternamente agradecido.

Às pós-graduandas Karina Imaculada Rosa Teixeira e Alinne Damásia Gomes (IQ-UFMG), e ao aluno de IC Fernando (DQ-ICEx-UFMG), por toda ajuda e conhecimento que me foram concedidos.

Às secretárias da Disciplina, Regina e Vilma!

Às bibliotecárias Sueli Cafazzi Prati, Glauci Elaine Damásia Fidélis e Maria Cláudia Pestana!

Às funcionárias do Setor de Pós-Graduação da FOUSP!

À FAPESP pelo auxílio à pesquisa!

Murakami VO. Desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema de liberação controlada da hialuronidase incluída em hidroxipropil – β - ciclodextrina. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão original.

RESUMO

A hialuronidase é uma enzima que vem sendo utilizada como adjuvante anestésico na oftalmologia há décadas para melhorar a eficácia anestésica, por aumentar a difusão do anestésico para o nervo. Na odontologia, quando foi injetada concomitantemente ao anestésico local em bloqueio pterigomandibular, reduziu a duração da anestesia e causou trismo, pois no momento inicial da anestesia ainda havia provavelmente muito anestésico no sítio da injeção, dispersando-o para tecidos adjacentes. Entretanto, em outro protocolo, a enzima foi injetada em outro momento, antes do término do efeito anestésico e, não induziu efeitos adversos e ainda aumentou a duração de ação, provavelmente, por difundir apenas o anestésico remanescente para o nervo. A fim de evitar uma nova punção para injetar a hialuronidase, a enzima poderia ser incorporada a um carreador, que modularia a sua liberação tardiamente, simulando o protocolo anterior. O desenvolvimento desse sistema de liberação controlada da enzima, a ser futuramente associada aos anestésicos locais visa ainda diminuir a dose necessária para o bloqueio completo, diminuindo assim o risco de toxicidade sistêmica. Este estudo laboratorial teve por objetivo desenvolver o complexo de inclusão utilizando a como carreador da hialuronidase, uma ciclodextrina, a hidroxipropil- β - α -ciclodextrina, formando o complexo de inclusão hialuronidase:hidroxipropil- β -ciclodextrina, em duas proporções molares, 1:1 e 2:1. Neste estudo ainda foram avaliadas as características físico-químicas dos componentes a fim de verificar se havia interação entre as moléculas. Após o preparo, a análise físico-química das substâncias foi realizada utilizando os seguintes métodos: espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier, análise térmica, ressonância magnética nuclear, além da análise morfológica (por MEV). Mudanças observadas na espectroscopia na região do infravermelho e na

calorimetria diferencial exploratória indicam interação molecular entre a hialuronidase e a hidroxipropil - β -ciclodextrina, em ambas razões molares, como sugerem o aspecto morfológico do complexo.

Palavras-chave: Anestésico Local, Hialuronogliconaminidase. Adjuvantes, Anestesia, Ciclodextrina.

Murakami VO. Development and physical-chemical characterization of a controlled delivery system of hyaluronidase included in hydroxypropyl- β - cyclodextrin [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão original.

ABSTRACT

Hyaluronidase is an enzyme that has been used as an adjuvant anesthetic in ophthalmology for decades to improve the effectiveness of anesthesia by increasing the diffusion of the anesthetic to the nerve. In dentistry, when it was injected concomitantly with local anesthetic in inferior alveolar nerve blockade, reduced the duration of anesthesia and caused trismus, because in the initial moment of anesthesia there was probably a lot of anesthetic in the injection site, spreading it to adjacent tissues. However, in another protocol, the enzyme was injected later, before the regression of the anesthetic effect and did not induce adverse effects, and also increased the duration of action, probably by spreading only the remaining anesthetic to the nerve. In order to avoid another puncture to inject hyaluronidase, the enzyme could be incorporated into a carrier, which modulates its release later, simulating the previous protocol, while maintaining its benefits. The development of such controlled release system of the enzyme, to be in the future associated to local anesthetics, also designed to decrease the dose required to obtain the complete block, thus reducing the risk of systemic toxicity. This laboratory study aimed to develop the inclusion complex using as carrier to hyaluronidase, a cyclodextrin, the hydroxypropyl- β -cyclodextrin – forming hyaluronidase : hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex, in both molar ratios 1:1 and 2:1. This study also evaluated the physico-chemical characteristics in order to ascertain whether there was interaction between the molecules. After being prepared, the physical-chemical analysis of the substances was performed using the following methods: Fourier transform infrared spectroscopy, thermal analysis, nuclear magnetic resonance (RMR), besides the morphological analysis by scanning electronic microscopy (SEM). Changes observed in infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry indicate molecular

interaction between hyaluronidase and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, in both molar ratios, as suggested by the morphological aspect of the complex.

Keywords: Local anesthetic, Hyaluronogluconaminidase, Adjuvants, Anesthesia, Cyclodextrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Classificação da hialuronidase.....	18
Figura 2.2 - Fórmula estrutural do Ácido Hialurônico.....	19
Figura 2.3 – Representação esquemática de perfil de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional.....	22
Figura 2.4 - Representação esquemática da estrutura das Ciclodextrinas naturais α , β e γ	24
Figura 5.1 - Análise por MEV dos cristais de hialuronidase e Hp- β -CD complexados, mistura física do complexo na razão molar 2:1, 1000 x.....	41
Figura 5.2 - Análise por MEV dos cristais de hialuronidase e Hp- β -CD complexados, mistura física do complexo na razão molar 2:1, 15.000x.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 – Espectro de absorção na região do infravermelho da hialuronidase.....	34
Gráfico 5.2 – Espectro de absorção na região do infravermelho para a Hidroxipropil- β -ciclodextrina	36
Gráfico 5.3 – Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo de inclusão hialuronidase:hidroxipropil- β -ciclodextrina.....	36
Gráfico 5.4 - Curvas TG, DTG e DTA da Hialuronidase pura.....	38
Gráfico 5.5 - Curva TG , DTG e DTA do composto de inclusão hialuronidase:HpBCD na razão molar 1:1	39
Gráfico 5.6 - Curva TG e DTG do composto de inclusão hialuronidase:HpBCD na razão molar 2:1.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	deformação
υ	estiramento
Å	Angstrom
AL	anestésico local
CD	ciclodextrina
DSC	calorimetria exploratória diferencial
DTA	derivada da análise térmica diferencial
DTG	derivada da termogravimetria
FT – IR	espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
Hp- β - CD	hidroxipropil- beta - ciclodextrina
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mm	milímetro
mV/s	Milivolts por segundo
®	marca registrada
RMN	ressonância magnética nuclear
rpm	rotações por minuto
TG	termogravimetria
TRU	turbity reducing unit
UTR	unidade de turbidade relativa
UV	ultra-violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
5 RESULTADOS.....	34
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

Foi na oftalmologia que a enzima hialuronidase ficou consagrada como adjuvante dos anestésicos locais (AL), pela melhora na eficácia do efeito anestésico, por sua ação difusora através do tecido conjuntivo periocular (Nathan et al., 1996; Soares et al., 2002), a fim de diminuir a pressão intraocular (Soares et al., 2002), reduzir o tempo de demora para o início (latência) do bloqueio nervoso (Sarvella; Nikki, 1992) e prolongar a duração de ação anestésica (Kallio et al., 2000).

Os primeiros estudos do uso da hialuronidase na odontologia avaliaram a eficácia do uso concomitante da enzima ao anestésico local (Kirby et al., 1949; Looby; Kirby, 1949) porém utilizavam elevadas concentrações e análise subjetiva da eficácia clínica. Em 2001, Ridenour et al. observaram que a injeção concomitante da hialuronidase à 150 UTR/ml ao anestésico local em bloqueio pterigomandibular, reduziu a duração da anestesia (dor) e causou trismo. Estes efeitos, provavelmente, foram devido à elevada concentração do anestésico no início da anestesia e cuja ação da enzima nesse momento facilitou a dispersão do anestésico, afastando-o do sítio da injeção, induzindo efeitos adversos e sem melhorar a eficácia clínica.

Ressalta-se que, tanto o bloqueio nervoso na odontologia quanto em oftalmologia são realizados em leitos periféricos, porém os resultados do uso concomitante da enzima com o anestésico local foram opostos. Isso se deve às características anatômicas diferentes entre os sítios. O globo ocular é um leito fechado dificultando a difusão do anestésico e da enzima para fora da órbita, diferentemente de outros leitos periféricos, como por exemplo, a região do bloqueio do nervo alveolar inferior que poderia facilitar a difusão do fármaco para os tecidos adjacentes, induzindo efeitos adversos (Sarvella, Nikki, 1992).

Mesmo assim, em texto de revisão, Malamed (2005) afirmou que a associação desta substância às soluções anestésicas induz a um rápido início do efeito anestésico como também o aumento do índice de sucesso, principalmente do bloqueio do nervo alveolar inferior.

Um outro protocolo foi apresentado mais recentemente, injetando a hialuronidase não concomitantemente ao anestésico local, mas antes da regressão do bloqueio nervoso ciático de ratos, por Borsatti et al. (2004) e em bloqueio do nervo alveolar inferior em humanos por Tempestini-Horliana et al. (2008), e em ambos a presença da enzima induziu aumento significativo da duração de ação. Esses autores discutem que a enzima injetada tardiamente pode ter difundido para o nervo apenas a quantidade de anestésico remanescente, que estaria reduzida naquele momento, prolongando a anestesia e evitando os efeitos adversos (Tempestini-Horliana et al., 2008).

Para se evitar o inconveniente de ter que realizar uma nova punção para injetar a enzima, surgiu a possibilidade de se utilizar a hialuronidase incorporada a um sistema de liberação controlada, como um carreador que atrasaria sua disponibilidade para o tecido, iniciando sua ação difusora mais tardiamente, simulando o efeito da injeção antes do término da anestesia.

Especula-se que o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada dessa enzima trará benefícios quando, em estudos futuros, for injetado concomitantemente ao anestésico local, e se comprovada sua eficácia clínica, poderá não somente prolongar a duração da anestesia, mas diminuir a necessidade de complementação anestésica e diminuir o risco de toxicidade sistêmica, principalmente em pacientes com comprometimento sistêmico e restrição de dose máxima de anestésico local por sessão clínica.

Entre as variadas formas de modular a liberação de fármacos tem-se os sistemas coloidais, que incluem as emulsões, micro e nanogéis, lipossomas, micro e nanopartículas, micro e nanocápsulas. São considerados métodos de veiculação, frequentemente descritos como “drug delivery systems”, que ao serem comparados aos métodos de dosagem convencionais oferecem inúmeras vantagens, tais como o direcionamento a alvos específicos, liberação progressiva do fármaco, toxicidade reduzida, menor número de doses (conveniência e maior adesão ao tratamento), diminuição dos picos plasmáticos, proteção e economia de fármaco e ainda podem suprimir moléculas indesejáveis (de Azevedo, 2003).

Neste estudo, foi proposta a inclusão da hialuronidase em um tipo de nanopartícula do grupo das ciclodextrinas, mas especificamente a hidroxipropil- β -ciclodextrina, desenvolvendo o complexo hialuronidase: hidroxipropil β -ciclodextrina, e sua caracterização para verificar a existência ou não de interação entre a enzima e a nanopartícula, fase laboratorial de comprovação essencial que tem que ser realizada antes de sua utilização em estudos laboratoriais em seres vivos. Para tal foram estudadas as características físico-químicas do complexo de inclusão utilizando variados métodos analíticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HIALURONIDASE

Segundo Fiszer-Szafarz (1984), a enzima hialuronidase foi descrita em 1928 por Reynals, mas foram Meyer et al. (1953) que descobriram a capacidade da hialuronidase de aumentar a difusão das moléculas na matriz extracelular. Mais tarde, esse “fator de difusão” recebeu o nome de hialuronidase (Gonçalves, 2007). Embora o termo hialuronidase seja o mais utilizado é ao mesmo tempo considerado impróprio. Também é conhecida pelo nome hialuronoglicosaminidase (Stern; Jedrzejewski, 2006).

A Hialuronidase é uma enzima endo- β -N-acetil-D- hexosaminidase que quebra o hialuronan (ácido hialurônico), o principal polímero glicosaminoglicano de tecidos conectivos. Age de modo reversível na ligação β -1,4 glicosídica, entre o ácido glucurônico e a N-acetilglucosamina, diminuindo a viscosidade da matriz extracelular. Devido a esta característica facilitadora na difusão de substâncias injetadas através dos tecidos, vem sendo utilizada principalmente em oftalmologia há mais de 40 anos para difusão de anestésico local (Khorlin et al., 1973; Watson, 1993; Farr et al., 1997; Rosenberg, 2004; Hynes; Walton, 2000).

A primeira classificação das hialuronidases foi estabelecida de acordo com seus mecanismos catalíticos em três famílias principais (Meyer, 1971), (figura 2.1), tipo testicular (encontrada em mamíferos), a encontrada em sanguessugas e a bacteriana. Esta classificação baseou-se na especificidade de substrato e na análise bioquímica da hialuronidase e de seus produtos de reação (Hynes; Walton, 2000).

O ácido hialurônico (Fig.2.2), é o maior componente da matriz extracelular especialmente em tecido conjuntivo frouxo, apresentando a capacidade de interagir com diferentes receptores incluindo proteínas da superfície celular e proteoglicanos (Salmen, 2003; Hynes, Walton, 2000 Alberts et al., 2004). Hoje se sabe que o ácido hialurônico é liberado diretamente da superfície celular por um complexo enzimático

embebido na membrana plasmática, enquanto que outras glicosaminoglicanas são sintetizadas dentro da célula e liberadas por exocitose (Alberts et al., 2004).

Figura 2.1. Classificação da hialuronidase (Meyer, 1971).

A hialuronidase apresenta simultaneamente atividade hidrolítica e de transglicosilação. Mesmo sobre condições ótimas para a hidrólise, a transglicosilação progride. As condições ótimas para hidrólise do hialuronan pela hialuronidase testicular bovina é sob pH 4,0 e presença de NaCl. Enquanto isso para a transglicosilação, é ideal o pH 7,0 e a ausência de NaCl (Kakizaki, I. et al., 2010).

Figura 2.2. Fórmula estrutural do Ácido Hialurônico (Meyer, 1971).

A degradação da hialuronidase efetua-se principalmente no fígado, rins e trato gastrointestinal. A meia vida da atividade enzimática sérica foi determinada como sendo de $3,1 \pm 0,6$ minutos. A eliminação da hialuronidase é realizada em três fases: na primeira é constatada uma rápida queda de atividade sérica, na segunda ocorre a passagem da enzima do ambiente intravascular para o extravascular, com duração entre uma e duas horas e, na terceira, a hialuronidase é inativada e eliminada em um processo que dura de uma a três horas (Farr et al., 1997).

Sob a ação da hialuronidase a alta viscosidade e habilidade lubrificante do ácido hialurônico ficam temporariamente diminuídas, o que aumenta a difusão das substâncias injetadas pelos planos teciduais. Vários estudos vêm utilizando-a como coadjuvante ao anestésico local para melhorar a eficácia dos bloqueios retrobulbares (Sarvela; Nikki, 1992; Kallio; Paloheimo; Maunuksela, 2000) e peribulbares (Nicoll et al., 1986; Soares et al., 2002; Barr et al., 1995; Gao; Budd, 1996; Hamada et al., 2005), além de reduzir a latência do bloqueio nervoso (Sarvela; Nikki, 1992; Nicoll et al., 1986) e diminuir a pressão intraocular (Soares et al., 2002).

Hialuronidase em Odontologia

Apesar de todos esses benefícios observados em oftalmologia, somente na década de 40 (Kirby et al., 1949; Looby, Kirky, 1949) surgiram as primeiras discussões sobre a possibilidade do uso de hialuronidase em odontologia e somente

em 2001, surge um estudo com adequada metodologia científica na literatura odontológica sobre o assunto, utilizando-a como adjuvante ao anestésico local em bloqueio pterigomandibular. Ridenour et al. (2001) avaliaram a eficácia anestésica da lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000 injetada concomitantemente a hialuronidase 150 UTR/ml ministradas numa mesma solução no bloqueio do nervo alveolar inferior em humanos. Como resultados, tal associação não aumentou a incidência do sucesso da anestesia local e aumentou a ocorrência de efeitos indesejáveis como dor e trismo, provavelmente, porque no momento inicial da anestesia deve haver maior quantidade de anestésico no sítio da injeção, e a ação da enzima nesse momento dispersa rapidamente o anestésico para os tecidos adjacentes.

Com base nos resultados de Poptiz-Bergez et al. (1995), de que seriam necessários apenas cerca de 1,6% do anestésico local injetado para ocorrer o bloqueio nervoso, Borsatti et al. (2004) levantaram a hipótese de que se a enzima hialuronidase fosse injetada tardiamente, antes do término do bloqueio nervoso, reaproveitaria parte da porcentagem restante perineural de anestésico, difundindo-o mais para o nervo e prolongar o bloqueio da condução nervosa.

Desse modo, o novo protocolo foi avaliado em ratos, injetando a enzima hialuronidase, na concentração de 800 UTR/ml (utilizada em oftalmologia, mas não concomitantemente), tardiamente, antes do término do bloqueio nervoso ciático, tendo prolongado a duração de ação anestésica (Borsatti et al., 2004).

Já, em humanos, Tempestini-Horliana et al. (2008), demonstraram que quando a hialuronidase à 75 UTR/ml (metade da concentração utilizada por Ridenour et al., 2001) foi injetada não concomitantemente ao AL, cerca de 30 minutos do início da anestesia, prolongou a duração da ação anestésica e sem induzir efeitos adversos. Discutiram que provavelmente a enzima tenha reduzido as barreiras anatômicas da matriz extracelular temporariamente, facilitando o aporte das moléculas remanescentes de anestésico local para o feixe nervoso, naquele momento.

Ainda que este protocolo tenha evitado efeitos adversos, apresenta um inconveniente de ter que receber a nova puntura da agulha para se injetar a solução

de hialuronidase antes do término do efeito anestésico. Surgiu a possibilidade de se realizar uma manobra terapêutica incorporando a enzima hialuronidase em um sistema de liberação controlada, com um nanopartícula carreadora de drogas que atrasaria sua disponibilidade ao tecido (simulando o protocolo da injeção da enzima antes do término da anestesia), formando um complexo hóspede: hospedeiro a ser injetado concomitantemente ao anestésico local.

Vislumbra-se que o desenvolvimento desse complexo de inclusão da enzima trará benefícios quando, em estudos futuros, for injetado concomitantemente ao anestésico local, e caso seja comprovada a eficácia clínica desse adjuvante anestésico, poderá, além de aumentar a duração do bloqueio nervoso, evitar a complementação anestésica e diminuir o risco de toxicidade sistêmica, principalmente em pacientes com comprometimento sistêmico e restrição de dose máxima de anestésico local por sessão clínica ou uso de vasoconstritor associado.

Sistema de Liberação Lenta de Drogas

Os sistemas de liberação controlada de fármacos desenvolvidos têm ampla aplicação, oferecendo a vantagem de liberar o fármaco de forma controlada, mais lentamente e em concentrações terapêuticas (Langer, 1990; Mirth, 1987). Quando um fármaco é aplicado neste tipo de sistema, os níveis sanguíneos se mantêm dentro da faixa terapêutica durante um intervalo de tempo maior, sendo mais eficaz do que as formas convencionais. Um exemplo dessa liberação acontece nos sistemas que empregam fármacos inclusos em ciclodextrinas (Borgman, 1986; Cortes, 1999).

Figura 2.3. Representação esquemática de perfil de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional. Fonte: <http://www.gerbras.com.br>.

A inclusão molecular é um método farmacotécnico para melhorar as propriedades de um medicamento já existente, com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais, aumentar ou diminuir a solubilidade dependendo da solubilidade do fármaco em utilização, diminuir a concentração do medicamento, e diminuir o número de aplicações de um determinado arsenal terapêutico. Dessa forma obtêm-se maior adesão do paciente ao tratamento (Rajewski; Stella, 1996). Com complexação ocorrem modificações na farmacocinética e farmacodinâmica de fármacos (Moraes *et al.*, 2007; Lyra *et al.*, 2010).

A formação de compostos de inclusão oferece uma nova conformação espacial que pode conferir diferentes propriedades ao fármaco encapsulado (hóspede) (Gould, Scott, 2005. 2005; Lyra *et al.*, 2010). Dos compostos supramoleculares, o grupo das ciclodextrinas (CDs) oferece vantagens ao ser utilizado em composto de inclusão. Entre os diversos tipos de CDs, a hidroxipropil β -ciclodextrina (HP β -CD) é a utilizada pela via parenteral devido à sua maior hidrossolubilidade (Gould, Scott, . 2005).

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos compostos de unidades de glicose. Estruturalmente são produzidos pela ciclização enzimática do amido,

catalizada pela ação da enzima ciclodextrina-glicosil-transferase, formando uma espiral helicoidal de unidades de glicose unidas por ligações β -1,4 entre si (Biwer *et al.*, 1988; Szejtli, 1988).

Essas cadeias de glicose formam uma cavidade dentro da qual, compostos podem entrar e formar um complexo solúvel em água e assim alterar propriedades de físico-químicas da droga (Szejtli, 1998). Isso não significa que a interação com a substância hospede seja sempre no interior da cavidade, podendo ser na borda ou exterior a cavidade. O número de unidades de glicose é que determina o tamanho da cavidade tronco- cônica e seu nome correspondente (Szejtli, 1998; Uekama *et al.*, 1998).

Deste modo, as ciclodextrinas naturais mais comumente utilizadas como veículos das formulações são α -, β e γ -ciclodextrina, com o correspondente número de unidades de glicose (α -1,4 de glicopirranose ligadas) (α = 6, β = 7, γ = 8). Também são chamadas de ciclomalto-hexanose, ciclomalto-heptanose e ciclomalto-octanose, respectivamente. Nos dias atuais, é difícil imaginar um mundo sem ciclodextrinas (CDs), porque, inconscientemente, todo mundo usa esse carreador em sua vida diária como constituintes invisível dos alimentos comuns, assim como em numerosos produtos cosméticos e de higiene, têxteis, e excipientes como facilitadoras em vários medicamentos (Kurkov, Loftsson, 2012).

O tamanho da cavidade tronco-cônica na parte mais larga, para entrada da molécula hóspede varia de 4,7 a 5,3 Å para α - CD, de 6,0 a 6,5 Å para a β -CD e de 7,5 a 8,3 Å para a γ -CD (Cabral-Marques, Morais, 1991; Szejtli, 1990; Thompson, 1997). (Figura 2.4).

Os complexos formados pela ciclodextrina são mais estáveis em relação à decomposição por luz, calor e liberação de oxigênio. Fármacos que são capazes de formar estes complexos de inclusão estão mais protegidos da desestabilidade química e da degradação por hidrólise (Masson *et al.*, 1998; Loftsson, Masson, 2001).

Essas moléculas de ciclodextrina, embora semelhantes em sua estrutura de unidade, possuem taxas de absorção ligeiramente diferentes, possivelmente devido à diferenças nos processos de degradação (Kurkov, Loftsson, 2012).

A ciclodextrina natural tem vinte e um grupos hidroxila e todos esses grupos podem ser considerados pontos iniciais para modificações estruturais, e vários grupos funcionais têm sido introduzidos em seu anel macrocíclico. O encapsulamento de uma substância nestas moléculas pode levar a mudança em propriedades da substância em questão: solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade e bioavaliabilidade (Hirayama et al,2002).

Figura 2.4. Representação esquemática da estrutura das Ciclodextrinas naturais α , β e γ (Szejtli, 1990).

Devido à conformação em cadeia das unidades de glicopiranosose, todos os grupos de hidroxila estão orientados para o exterior da molécula, com os grupos hidroxila primários localizados no lado mais estreito e os secundários no lado mais largo da estrutura, conferindo caráter hidrófilo (Loftsson, Brewster, 1996; Saltão, Veiga, 2001).

A cavidade apresenta características hidrófobas devido ao caráter apolar determinado pelos dois anéis dos grupos C-H e pelo anel de átomos de oxigênio incluídos nas ligações glicosídicas. Esta estrutura molecular incomum confere às CDs propriedades únicas (Gould, Scott, 2005).

Assim, os complexos de inclusão de CD são complexos moleculares caracterizados por aprisionamento de uma molécula da droga lipofílica ou, mais freqüentemente, apenas de um radical lipofílico dessa molécula de fármaco pouco solúvel em água (hidrofóbica) na cavidade da CD pouco hidrofóbica. Quase sem exceção, a formação do complexo fármaco:CD é um processo reversível, e a velocidade de reversão depende principalmente da força de interação entre os componentes, do tipo de ligação entre fármaco: CD (ligação eletrostática, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, liberação de tensão conformacional, transferência de cargas) e da razão molar entre os compostos (Denadai et al., 2007; Kurkov; Loftsson, 2012).

Entre os três derivados, a β -ciclodextrina (β -CD) parece ser a mais vantajosa para utilização farmacêutica como agente complexante, devido, entre outras propriedades, ao tamanho da sua cavidade, disponibilidade e baixo custo. Tomando por base o diâmetro de sua cavidade, parece que a α -ciclodextrina tem um diâmetro pequeno para que possa incluir a maior parte dos princípios ativos, ao passo que a β -ciclodextrina e melhor ainda a γ -ciclodextrina sirvam a este propósito, uma vez que possuem cavidade de maior diâmetro quando comparadas a α -ciclodextrina. Em relação à solubilidade em água, a menos solúvel é a β -ciclodextrina.

A γ -ciclodextrina também seria interessante para o uso farmacêutico, mas seu alto custo torna difícil seu uso em escala industrial.

A 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) é uma derivação das outras ciclodextrinas, e tem sido considerada como uma alternativa para a α -, β - e γ -ciclodextrina, com melhor hidrossolubilidade, podendo ser utilizada por via parenteral, além de ser ligeiramente menos tóxica (Gould, Scott, 2005).

Em soluções aquosas de CD, a biodisponibilidade de uma droga depende da capacidade das moléculas da droga para interagir com as moléculas de CD e da

razão molar fármaco: CD, ou seja: (1) a biodisponibilidade das drogas que não interagem com CDs não será afetada significativamente pela presença de CDs; (2) ainda, que a biodisponibilidade de drogas que apresentam uma forte interação com a CD poderá ser aumentada ou diminuída dependendo da razão molar fármaco: concentração de CD (Kurkov; Loftsson, 2012).

Toxicidade da HP- β -CD

Numerosos estudos sobre a toxicidade aguda e subcrônica da HP- β -CD têm demonstrados resultados insignificantes após a sua administração intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intracraniana ou tópica e, mesmo quando administrada por via intravenosa na dose de 10 g/kg, e não se observa o acúmulo renal observado com outras ciclodextrinas (Brewster et al., 1990, 1992; Carpenter et al., Gerloczy, Pitha, 1995; Gould, Scott, 2005; Pitha et al., 1995; Loftsson, Brewster, 1997; Pitha, Pitha, 1985; Pitha et al., 1986, 1994; Stella, Rajewski, 1997; Strattan, 1992; Yoshida et al., 1988).

Numa pesquisa efetuada em ratos, utilizando 400 mg de HP- β -CD por administração intravenosa durante 90 dias, resultou em toxicidade moderada, evidenciada pela diminuição do aumento de peso corporal, alterações dos parâmetros séricos, aumento da atividade das células fagocitárias mononucleares dos pulmões e fígado e, ainda, alterações do pâncreas (Mosher, Thompson, 2002).

Evidências de estudos clínicos mostram que a HP- β -CD é considerada não tóxica numa dose diária inferior a 16 g/kg. Segundo, Irie e Uekama (1997), não apresenta potencial mutagênico, não tem efeitos adversos na fertilidade nem no desenvolvimento pré e pós-natal e não é teratogênica.

Vários são os estudos que foram realizados em ratos com a finalidade de avaliar a segurança da administração oral da HP- β -CD. Algumas das investigações revelaram que a toxicidade em longo prazo não induziu mortalidade, nem sinais visíveis de doença, apesar do grupo experimental ter apresentado ligeiro aumento de peso comparativamente com o grupo controle. O aumento do tamanho do fígado após administração crônica durante 112 dias, sem alterações morfológicas, nem diferença significativa do colesterol sérico, pode ser atribuído à formação de complexos de inclusão com os ácidos biliares no intestino (como ocorre com β -CD).

A inibição da captação destes poderá levar ao aumento da sua síntese e possivelmente ao aumento do tamanho do fígado (Gerloczy *et al.*, 1994; Pitha, Pitha, 1985).

A possibilidade de se nanoagregar os anestésicos locais em sistemas de liberação controlada tanto para uso tópico como injetável, têm demonstrado muitas vantagens ao reduzir a concentração de anestésico local utilizado, aumentar a sua permeabilidade e absorção, manter o anestésico no local alvo por períodos mais longos, por prolongam o efeito anestésico ou analgésico e, finalmente, para diminuir a depuração, toxicidade local e sistêmica (de Paula *et al.*, 2010), mesmo de anestésicos conhecidamente mais tóxicos ou instáveis (Franco de Lima *et al.*, 2012).

Neste estudo, o hóspede do complexo é a enzima, e não um anestésico, desse modo, o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada da enzima, a ser associado ao anestésico local, permitira sua ação imediata deste que não está complexado (está livre), embora estudos onde o anestésico local está nanoagregado não tenham demonstrado aumento significativo da latência de ação (Franco de Lima *et al.*, 2012).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do estudo é preparar um sistema de liberação controlada formado pela associação de hialuronidase e Hidroxipropil- β -Ciclodextrina nas razões molares de 1:1 e 2:1, bem como caracterizar fisico-quimicamente a fim de observar a existência de interação entre as moléculas em estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO DE INCLUSÃO HIALURONIDASE : HIDROXIPROPIL β -CICLODEXTRINA

A Hidroxipropil β -cyclodextrina (HP- β -CD) foi obtida da Cerestar[®] (EUA) e a hialuronidase (Hyalozima[®] - Apsen Farmacêutica, Brasil).

4.1.1 Equipamentos

- No processo de homogeneização foi utilizado um homogeneizador tipo Dispergierstation T8-10 IKA Labortechnik conectado a um estabilizador T801 Netzgerat de 12V. A velocidade de agitação foi de 4000rpm.
- O processo de liofilização foi realizado empregando-se o equipamento Savant Modulo D-Freeze Dryer da Thermo-Electron Corporation[®].
- A Calorimetria Exploratória Diferencial foi feita num equipamento Shimadzu dta-50[®], do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (DQ-ICEx) da UFMG.
- As análises termogravimétricas foram realizadas em equipamento Mettler TA 4000 thermogravimetric analyzer (TG50)[®].
- As análises térmicas foram realizadas no equipamento Q600 Simultaneous TGA/DSC (SDT), do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (DQ-ICEX) da UFMG.
- Os espectros de infravermelho dos complexos foram obtidos pelo Espectrofotômetro Perkin Elmer modelo GX[®] (Boston, MA, USA).

- As análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidas através de Bruker DRX 400-AVANCE espectrômetro[®] equipado com uma sonda inversa. usando-se D₂O como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.
- Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JFM 840AR 15 Kv (UFMG).

4.1.2 Preparo dos compostos de inclusão de hialuronidase:hidroxipropil-β-ciclodextrina em diversas razões molares;

O preparo dos compostos de inclusão hialuronidase: hidroxipropil β-ciclodextrina foi feito pelo método de liofilização da suspensão aquosa de hidroxipropil beta-ciclodextrina (HP β-cd) e hialuronidase em diferentes razões molares (1:1; 2:1), tomando como base os métodos previamente descritos na literatura para inclusão de outras substâncias em ciclodextrinas (Cortes et al., 2001).

Foram preparadas inicialmente soluções aquosas de hialuronidase (Massa molar: 578 g/mol) deixadas sob agitação constante a 40° C durante 24 horas. Foram acrescentadas a estas, soluções aquosas de hidroxipropil beta-ciclodextrina (Mm: 1375g/mol) na concentração indicada para se obter as duas razões molares de hialuronidase: hidroxipropil beta-ciclodextrina.

Em seguida, as soluções resultantes foram distribuídas em tubo de Falcon, congeladas em N₂ e levadas a sublimação. Esse método de liofilização tem o propósito de preservar a integridade, estrutura e atividades biológicas ou químicas dos fármacos.

As misturas mecânicas foram preparadas utilizando-se as mesmas razões molares dos grupos comparados. Foram feitas por agregação física, com a massa molar da hialuronidase e hidroxipropil beta-ciclodextrina satisfazendo-se a equivalência molar para compostos de hialuronidase: hidroxipropil-β-ciclodextrina 1:1; 2:1. Os compostos assim preparados servem como grupos teste para todos os experimentos tendo como controles os grupos: hialuronidase e Hp-β-CD.

4.1.3 Caracterização físico-química

A. ANÁLISE TÉRMICA

A Calorimetria exploratória diferencial foi utilizada com o objetivo de medir a mudança de fases dos compostos. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) registra a quantidade de calor absorvida ou liberada pelo sistema, em relação a um material termicamente inerte, quando os dois são aquecidos simultaneamente a uma razão constante. A DSC é um importante instrumento analítico na caracterização de interações das drogas e CDs no estado sólido (Araújo et al., 2009).

Dessa forma detectam-se mudanças entálpicas do sistema, tais como fusão, vaporização, transição de fase cristalográfica ou reações químicas, através de bandas e picos endotérmicos ou exotérmicos que aparecem nas respectivas curvas.

A curva da DSC foi feita a uma velocidade de aquecimento de 10° C/min., em atmosfera dinâmica de N₂ e cadinho de alumínio (Cortes, 1999).

As análises de Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG) foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 10° C/min. de 25 a 750° C em atmosfera dinâmica de N₂ usando cadinho de platina. A massa das amostras foi, em média, de 7 mg cada.

B. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO FT-IR (ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER)

A espectroscopia na região do infravermelho, no estado sólido foi realizada a fim de detectar a ocorrência de novos picos ou qualquer deslocamento do pico que poderia ser atribuída as interações entre a hialuronidase e a hidroxipropil- β -ciclodextrina (Hp- β -CD).

Os espectros da hialuronidase, a hidroxipropil- β -ciclodextrina e os compostos preparados entre a hialuronidase: hidroxipropil- β -ciclodextrina (Hp- β -CD) foram detectados em numero de ondas que vão de 4000-700 cm⁻¹, obtidos a partir de

pastilhas de KBr e registrado em espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Spectrum GX (Cunha Filho; Sá-Barreto, 2007).

C. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica através da qual é possível conhecer a disposição espacial de átomos ou grupos funcionais de moléculas ou ainda complexos, assim como dados relacionados à dinâmica molecular destes, avaliar interações moleculares que ocorrem, por exemplo, em sistemas do tipo hóspede - hospedeiro envolvendo ciclodextrinas.

Neste caso, a RMN poderia fornecer evidências da formação dos complexos de inclusão através do estabelecimento das constantes de formação e correlações espaciais.

Desta forma, os experimentos de hidrogênio são de grande importância na caracterização dos complexos supramoleculares através da análise da variação de deslocamentos químicos em função da variação das espécies envolvidas. As variações mais significativas se referem aos núcleos que estão interagindo de forma mais efetiva e é resultado da complexação das espécies.

As análises dos espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidas em espectrofotômetro equipado com uma sonda inversa de 5 mm e bobina de gradiente z operado à 27° C com corrente de 400 MHz. O experimento de ressonância magnética nuclear foi realizado pela Técnica de Watergate com supressão do sinal residual.

Todos os experimentos de RMV foram usados para confirmar o perfil do sinal de prótons das moléculas dos compostos de inclusão de hialuronidase.

D. MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada para estudar, principalmente, os aspectos de superfície das substâncias. Por fornecer informações minuciosas do estado de cristalização de produtos obtidos por diferentes técnicas de complexação ou dispersão com polímeros, vem sendo mais frequentemente utilizada (Duarte et al., 2003; Ribeiro et al., 2008).

Com a MEV, visualizam-se alterações na cristalinidade das partículas, ocasionadas pelos métodos utilizados na formação dos complexos de inclusão no estado sólido. Da mesma forma, permite a análise e diferenciação das partículas de ciclodextrina e dos cristais dos fármacos (Pralhad, Rajendrakuma, 2004).

Nas imagens obtidas com a MEV, é possível distinguir as partículas do material a ser complexado (hospede) e da CD (hospedeiro). Contudo, quando ocorre a formação de um complexo, o estado cristalino resultante é diferente do obtido pela simples mistura da molécula hóspede com as CDs.

As amostras de Microscopia Eletrônica de Varredura foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JFM 840AR 15 Kv, com até 15.000x de aumento.

5 RESULTADOS

5.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO FT-IR (ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER)

O espectro de absorção na região do infravermelho para a hialuronidase (Gráfico 5.1) apresenta as principais bandas, que podem ser destacadas: (Na região de $3400\text{-}3230\text{cm}^{-1}$ observa-se uma banda larga, de intensidade forte, relativa a vibrações de estiramento de ligações $\nu(\text{OH})$ poliméricos, presentes nas unidades glicosídicas da hialuronidase.

Gráfico 5.1: Espectro de absorção na região do infravermelho para a hialuronidase.

Na região de $3360\text{-}3220\text{ cm}^{-1}$ podemos observar uma banda larga, de intensidade variável, referente a vibrações de estiramento de ligações $\nu(\text{NH})$ de amidas primárias. Em $1750\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$, há uma banda forte, intensa, correspondente a vibrações de estiramento das ligações $\text{C}=\text{O}$ dos grupamentos amida presentes nos monômeros da hialuronidase. Na região de $1650\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ observa-se uma banda no espectro de intensidade forte referente as vibrações de estiramento de grupos $\nu(\text{CN})$ e também vibrações de deformação de grupos $\delta(\text{NH})$ de amidas. Na região de $1485\text{-}1445\text{ cm}^{-1}$ há uma banda fraca referente a vibrações de deformação $\delta(\text{CH})$ de alcanos, presentes em grupos CH_2 . Em $1350\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ tem-se uma banda forte referente a vibrações de deformação de $\delta(\text{OH})$ de alcoóis. Na região de $1260\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ há a presença de uma banda forte, estreita, referente a vibrações de estiramento de ligações $\nu(\text{R-O-Ar})$, presentes em éteres aromáticos.

Analisando o espectro de infravermelho da HP-B-CD (Gráfico 5.2), e os espectros dos compostos preparados com a ciclodextrina (HP-B-CD) e a hialuronidase (Gráfico 5.3), podemos considerar as principais modificações nos modos

Os espectros compostos, preparados entre a hialuronidase e a hidroxipropil- β -ciclodextrina, apresentam bandas distintas entre si e também distintas dos materiais de partida, a hialuronidase e a hidroxipropil- β -ciclodextrina. A região $3400\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ apresenta uma diminuição significativa da banda correspondente aos estiramentos de ligações $\nu(\text{OH})$ poliméricos, presente no espectro da hialuronidase pura, o que indica interação entre as duas matrizes na formação de uma única espécie. Ainda também na região de 2900 cm^{-1} observa-se uma banda nos dois grupos teste referente ao estiramento de grupos $\nu(\text{CH})$ de alcanos, presentes nos radicais hidroxipropil da HP-B-CD.

Gráfico 5.2: Espectro de absorção na região do infravermelho para a Hp-β-CD.

Gráfico 5.3: Espectro de absorção na região do infravermelho para o complexo hialuronidase: Hp-β-CD (1:1).

As bandas referentes as regiões de 1750 e 1650 cm^{-1} também modificaram o padrão de aparecimento nos espectros das amostras teste, havendo afilamento ou diminuição na sua intensidade, isso acontece devido a interação presente entre a ciclodextrina e a enzima quando há a formação do composto.

Na região de 1500-1250 cm^{-1} apareceram varias pequenas bandas não encontradas no espectro original da hialuronidase e encontradas no espectro da hidroxipropil- β -ciclodextrina e isso e mais um indicio da interação entre as duas matrizes.

Na região de 1200-1000 cm^{-1} encontramos nos grupos teste uma banda característica das ciclodextrinas, que e referente aos estiramentos $\nu(\text{C-O-C})$ presentes nas subunidades de glicopirranose. É novamente uma forma de identificar que houve interação entre as duas espécies na formação de um composto único.

5.2 TERMOGRAVIMETRIA (TG) / TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (DTG) e ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) / CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

No gráfico 5.4 estão representadas as curvas de termodecomposição da Hialuronidase pura. Analisando a curva TG da hialuronidase, observou-se uma constância na massa inicial até 275°C, onde iniciou-se o processo de decomposição. A curva DTA aponta uma reação endotérmica por volta dos 135°C, podendo ser interpretada como ponto de fusão da substância.

Gráfico 5.4 Curvas TG (verde), DTG (azul) e DTA (vermelho) da Hialuronidase pura

Analisando o gráfico 5.5 onde encontra-se a análise térmica do composto de inclusão Hialuronidase:Hp β CD na proporção de 1:1. Na curva TG observou-se uma perda de massa na ordem de 5% até o ponto de fusão (125°C).

No intervalo entre 125°C até 150°C houve uma perda de massa de 5%, a qual se manteve em um mesmo patamar até o início da decomposição em torno dos 275°C. O ponto de fusão, segundo a curva da análise térmica diferencial, encontrou-se em 120°C para a hialuronidase:Hp β CD (1:1).

Gráfico 5.5 Curva TG (verde), DTG (azul) e DTA (vermelho) do composto de inclusão hialuronidase:HpBCD na razão molar 1:1

No Gráfico 5.6 estão representadas as curvas de termodecomposição do composto de inclusão Hialuronidase:HpBCD na razão molar de 2:1.

Analisando a curva TG da amostra, observou-se uma constância na massa inicial até 275°C, onde iniciou-se o processo de decomposição. A curva DTA não apontou variações de entalpia.

Comparando as amostras das análises térmicas realizadas, pela alteração no ponto de fusão quando comparadas as curvas do composto de inclusão com a hialuronidase pura, sugere-se que houve algum tipo de interação entre a hialuronidase e a Hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Gráfico 5.6. Curva TG (verde), DTG (azul) e DTA (vermelho) do composto de inclusão hialuronidase:Hp β CD na razão molar 2:1

Sugere-se também que o composto de inclusão na proporção de 2:1 seja mais estável termicamente, devido a constância na massa até sua decomposição, o que não ocorreu na razão de 1:1 (indicando saída de moléculas de água de hidratação do composto de inclusão).

É notório que o aspecto do composto de inclusão em 1:1 é um gel mesmo quando liofilizado, já na razão 2:1, encontra-se em pó.

5.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A espectroscopia por RMN não nos permitiu observar interações a curta distância entre a hialuronidase e a Hidroxipropil- β -ciclodextrina. Isto se deu pelo fato

das duas substâncias terem composições químicas muito semelhantes (dois açúcares), o que gera uma sobreposição nos espectros de RMN, não nos permitindo identificar se há ou não interação entre as substâncias.

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As figuras 5.1 e 5.2 apresentam resultado da MEV em aumento de 1.000 X e 15.000 X, respectivamente, evidenciando que houve interação hóspede e hospedeiro do complexo de inclusão, sendo a interação interna a cavidade.

Figura 5.1 Análise por MEV dos cristais de hialuronidase e HpBCD complexados, mistura física do complexo na razão molar 2:1, aumento 1000 x.

Figura 5.2. Análise por MEV dos cristais de hialuronidase e HpBCD complexados, mistura física do complexo na razão molar 2:1, aumento 15.000x.

6 DISCUSSÃO

Os complexos de inclusão veem sendo amplamente estudados, devido às inúmeras formas de utilização industrial. O composto em estudo, a ciclodextrina, tem como característica, além das citadas em 1998 por Masson et al., e em 2001 por Loftsson; Masson, ser uma substância farmacologicamente inativa e não toxica, servindo como carreadora de outra substância ativa. Tais características podem ser utilizadas a favor de diversas áreas do conhecimento (Kurkov; Loftsson, 2012).

As CDs têm como características formarem complexos de inclusão em tanto em solução quanto no estado sólido. Porém, as interações existentes nos compostos formados são fracas. Esta propriedade inerente a este tipo de sistema molecular, impossibilita a utilização de algumas técnicas analíticas aplicadas à solução. No entanto, a caracterização de CIs no estado sólido é de grande interesse, devido ao fato de poder ser explorada comercialmente (Britto et al., 2004).

No presente trabalho, a ciclodextrina foi associada à hialuronidase, enzima muito utilizada na oftalmologia devido ao seu poder difusor visando liberá-la gradativamente a fim de manter seu efeito dissipador de substâncias no tecido conjuntivo, de forma prolongada e modulada. Foram desenvolvidas duas razões molar do CI hialuronidase: hidroxipropil β - ciclodextrina (pedido de depósito de patente, Anexo A). Dois motivos levaram a utilizar diferentes proporções no preparo, a discrepância de tamanho entre as duas moléculas e também para uma futura avaliação da biodisponibilidade do fármaco, uma vez que a liberação da droga no CI depende da capacidade das moléculas de interagir com o hospedeiro e depende também da razão molar droga:CD (Kurkov; Loftsson, 2012).

Foram realizados diversos experimentos para investigar a existência de associação entre as duas moléculas. Complexos em estado de cristalização são comumente analisados através das técnicas de espectroscopia de FTIR, estudos de dissolução, difração de Raio-X e estudos térmicos (Cannavà et al, 2008; Lu et al,

2009). Segundo Venturines et al. (2008), atualmente estão sendo utilizadas técnicas para caracterização, como a espectroscopia de Raman, eletroforese capilar, potenciometria, ITC, dicroísmo circular, entre outros. Para o sistema de liberação controlada em estudo, foram utilizados alguns destes testes descritos a seguir. Estes demonstraram em seus resultados a formação efetiva do CI (gráfico 5.1 a 5.6).

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada em várias áreas do conhecimento, e vem sendo amplamente utilizada para estudar os aspectos de superfície dos materiais. Segundo Lyra et al. (2010), a MEV é um método inadequado para verificarmos a interação molecular e formação de CI, devido a especificidade deste método em analisar morfologia e superfície das substâncias.

Contudo, conhecer detalhadamente a microestrutura dos materiais, permite prever propriedades e respostas químicas (Pralhad & Rajendrakuma, 2004). Já, alterações drásticas na forma das partículas, bem como no seu aspecto e tamanho, apontam para a existência de novas fases sólidas. Segundo Duarte et al., (2003) e Ribeiro et al., (2008), a utilização da MEV pode detalhar o estado físico, mais precisamente a cristalização das substâncias obtidas nos diferentes processos de complexação.

Segundo Ribeiro et al. (2003), as moléculas de CDs tem formato globular, medem de 1 a 180 μm , ao passo que os fármacos possuem formatos irregulares e apresentam-se em formas cristalinas menores, porém com uma distribuição de tamanho de partícula mais homogênea. É possível obter a visualização dos cristais de fármacos e das partículas de CDs nas misturas físicas (figura 5.1 e 5.2), entretanto, o estado cristalino dos componentes isolados pode ficar diferente quando ocorre a formação de um complexo, devido à interação da molécula hóspede com hospedeiro (Lyra et al., 2010), embora essa característica não tenha ficado evidente em nosso estudo (figura 5.2).

Utilizando este método, é possível avaliar a redução da fase cristalina das partículas que constituem o CI no estado sólido, à medida que possibilita sua visualização e diferencia as partículas de ciclodextrina e dos cristais dos fármacos (Pralhad; Rajendrakuma, 2004), como na figura 5.2 obtida através da MEV. Nota-se

que a hidroxipropil- β -ciclodextrina apresenta tamanho micrométrico, apesar de pertencer ao no grupo das nanomoléculas.

É possível observar ainda a ocorrência de diversos tamanhos de Hp- β -CD, entre moléculas do mesmo grupo, preparadas na mesma mistura. Fica a imagem sugestiva da relação hóspede-hospedeiro, porém essa não é a técnica mais indicada para avaliar se há interação entre os compostos. Caso haja interação, esse parâmetro (aspecto físico) não indica a intensidade de interação, não revela se a formação do complexo é forte o suficiente para alterar significativamente a biodisponibilidade da hialuronidase.

A formação do complexo de inclusão, sem exceção, é um processo reversível. Desta forma, é provável que a formação de novos CIs ou a liberação da droga estejam diretamente relacionados à força de interação entre o hóspede e o hospedeiro, no caso, hialuronidase:Hp- β -CD e da razão molar das substâncias (Kurcov, Loftsson, 2012).

Nas análises térmicas, a curva TG da hialuronidase pura, demonstrou uma constância na massa inicial até 275°C (Gráfico 5.4). Tal estabilidade se deve a ausência de água e de qualquer tipo de contaminação no processo de preparo da substância, comprovando a pureza da amostra. Em seguida iniciou-se a ebulição até a redução da hialuronidase a partículas de carbono, explicando a razão da massa não reduzir a zero. A curva DTA aponta uma reação endotérmica por volta dos 135°C, podendo ser interpretada como ponto de fusão da substância. Na análise térmica da curva TG do composto de inclusão hialuronidase:Hp- β -CD (Gráfico 5.5) na proporção de 1:1 observa-se uma perda de massa na ordem de 5% até o ponto de fusão. Esta variação de massa sugere a perda de água presente na cavidade das ciclodextrinas não complexadas. Essas alterações indicam interação molecular. O mesmo não ocorre para a hialuronidase: Hp- β -CD 2:1 (Gráfico 5.6). Isso se deve provavelmente ao número reduzido de ciclodextrinas livres, pois a oferta da enzima encontra-se duas vezes maior que a oferta do carreador. Entretanto, devido a considerável diferença de tamanho entre as substâncias, e de acordo com a imagem obtida na figura 5.2, nota-se a complexação de uma ou mais enzimas por ciclodextrina.

No gráfico 5.6, a constância presente na massa até o ponto de fusão no composto de inclusão hialuronidase:Hp- β -CD 2:1, e a curva DTA crescente, sem picos positivos nem negativos, demonstraram estabilidade térmica e estrutural, diferentemente da outra razão molar e da hialuronidase pura. Comparando os resultados das análises térmicas realizadas, as diferentes curvas obtidas nos compostos de inclusão 1:1 e 2:1, e da hialuronidase pura, sugerem que houve interação entre a hialuronidase e a hidroxipropil- β -ciclodextrina. É notório que o aspecto do composto de inclusão em 1:1 durante seu preparo é um gel mesmo quando liofilizado, já na razão 2:1, encontra-se em pó. De acordo com o estudo de Burgos et al. (2012), a água encontrada na cavidade das ciclodextrinas (águas de inclusão) e entre as moléculas de ciclodextrinas (águas intersticiais, externa), mantêm a estrutura cristalina do composto.

A espectroscopia de absorção na região de infravermelho FTIR estuda a interação da radiação eletromagnética emitida pelo equipamento com os compostos a serem avaliados, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas (Cunha Filho, Sá-Barreto, 2007). Comparando os resultados a uma tabela detalhada (de faixa de absorção e intensidade) de tipos de ligações químicas possíveis, que determina através da faixa de absorção e intensidade, e dos tipos de vibrações observadas (deformação: δ ; estiramento: ν), as ligações existentes no composto. Desta forma, obtêm-se um perfil de espectro para cada tipo de composto, possibilitando sua identificação.

Quando comparados os resultados das amostras de hialuronidase, Hp- β -CD e hialuronidase: Hp- β -CD, verificou-se alterações de intensidade e surgimento de novas bandas, fatores estes que diferiam dos resultados obtidos em cada substância isolada. Na análise da mistura, em determinadas regiões, apareceram bandas encontradas somente em hialuronidase, assim como surgiram bandas somente encontradas na ciclodextrina. Este fato identifica a existência de interação entre as duas espécies na formação de um composto único. Conforme observado na literatura, não foram encontrados estudos utilizando a complexação destes mesmos componentes, impossibilitando a comparação de resultados.

Não obstante, este estudo laboratorial representa uma fase necessária de

análise por contribui para a área de conhecimento, confirmando a interação entre os componentes do CI hialuronidase: Hp- β -CD, e que estes não estão apenas presentes (associados) em uma solução. Ainda, com estes resultados, entrevê a possibilidade de, em estudos futuros, o complexo associado ao anestésico local poder modular a liberação da enzima, e possivelmente atrasar a sua biodisponibilidade, influenciando na farmacocinética e farmacodinâmica dos anestésicos locais, podendo alterar sua eficácia e segurança clínica.

7 CONCLUSÕES

Através dos métodos analíticos das características físico-químicas é possível afirmar que há interação entre os componentes do complexo de inclusão hialuronidase: hidroxipropil - β -ciclodextrina, desenvolvidas neste estudo:

- Alterações observadas na espectroscopia na região do infravermelho e na calorimetria diferencial exploratória indicam interação molecular entre a hialuronidase e a hidroxipropil - β -ciclodextrina, em ambas razões molares (1:1 e 2:1), como sugerem o aspecto morfológico do complexo.

REFERÊNCIAS

1. Alberts B, Johson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4aed. New York: Garland Publishing; 2004.
2. Araújo MVG, Macedo FLO, Nascimento CC, Conegero LS, Barreto LS, Almeida LE, Costa NB JR, Gimenez LF. Characterization, phase solubility and molecular modeling of β -cyclodextrin/pyrimethamine inclusion complex. *Spectrochim Acta* 2009;72:165–70.
3. Barr J, Kirkpatrick N, Dick A, Leonard L, Hawksworth G, Noble DW. Effects of adrenaline and hyaluronidase on plasma concentrations of lignocaine and bupivacaine after peribulbar anaesthesia. *Br J Anaesth* 1995 Dec;75(6):692-7.
4. Biwer A; Antranikian G; Heinzle E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59:609-17.
5. Borgman R.J. Biodisponibilidade, dosagens e novas formas de apresentação. In: Craig RC, Stitzel RE. *Farmacologia Moderna* 4ª Ed. São Paulo: Roca Livraria Ltda; 1986. Cap.6.
6. Borsatti MA, Simonetti MPB, Rocha RG, Penha SS, Hyaluronidase induce long-term analgesia of the EMB s75:r25: a study in the sciatic nerve of the rat in vivo. *Braz Oral Res.* 2004;18:18.

7. Brewster ME, Estes KS, Bodor N. An intravenous toxicity study of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, a useful drug solubilizer, in rats and monkeys. *Int J Pharm*. 1990;59:231-43.
8. Brewster ME, Anderson WR, Meinsma D, Moreno D, Webb AI, Pablo L, Estes KS, Derendorf H, Bodor N, Sawchuk R, Cheung B, Pop E. Intravenous and oral pharmacokinetic evaluation of a 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-based formulation of carbamazepine in the dog: comparison with commercially available tablets and suspensions. *J Pharm Sci*. 1997 Mar;86(3):335-9.
9. Britto MAFO, Nascimento-JR CS, Santos HF. Análise Estrutural de Ciclodextrinas: Um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. *Quim Nova*. 2004;27(6):882-8.
10. Cabral-Marques H, Morais JA. Ciclodextrinas e seus complexos de inclusão. *Rev Port Farm*. 1991;41(2):5-8
11. Cannavà C, Crupi V, Ficarra P, Guardo M, Majolino D, Stancanelli R, Venuti V. Physicochemical characterization of coumestrol/ β -cyclodextrins inclusion complexes by UV-vis and FTIR-ATR spectroscopies. *Vib Spectrosc*. 2008; 48:172–8.
12. Carpenter TO, Gerloczy A, Pitha J. Safety of parenteral hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J Pharm Sc*. 1995;84(2):222-5.

13. Cortes ME, Sinisterra RD, Avila-Campos MJ, Tortamano N, Rocha RG. The chlorhexidine:beta-ciclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. *J Inclusion Phen Macrocyclic Chem* 2001;40:297-302.
14. Cortes ME. Estudo dos compostos de inclusão tipo hospedeiro convidado entre a clorexidina e a β -ciclodextrina: Avaliação in vitro [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.
15. Cunha Filho MSS, Sá Barreto LCL. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007;28(1):1-9.
16. de Azevedo MMM. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Monografia LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP Material disponível: <http://lqes.igq.unicamp.br, 2003>.
17. de Paula E, Cereda CM, Tofoli GR, Franz-Montan M, Fraceto LF, de Araújo DR. Drug delivery systems for local anesthetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2010; 4(1):23-34.
18. Denadai AM, Teixeira KI, Santoro MM, Pimenta AM, Cortés ME, Sinisterra RD. Supramolecular self-assembly of beta-cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydr Res.* 2007;342(15):2286-96

19. Duarte LC, Juchem PL, Pulz G M, Brum TMM, Chodur N, Liccardo A, Fischer AC, Acauan RB. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. *Pesqui Geociênc.* 2003;30(2):3-15.
20. Duran-Reynals F. Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organs. *CR Soc Biol.* 1928;99:6–7.
21. Farr C, Menzel J, Seeberger J, Schweigle B. Clinical pharmacology and possible applications of hyaluronidase with reference to Hylase "Dessau". *Wien Med Wochenschr* 1997;147(15):347-55.
22. Fiszer-Szafarz B. Hyaluronidase polymorphism detected by polycrylamide gel electrophoresis application to hyaluronidases from bacteria, slim e molds, bee and snake venom s, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum. *Analytical Biochem.* 1984;143:76-81.
23. Franco CF, Pataro AL, Ribeiro e Souza LC, Santos VR, Cortes ME, Sinisterra RD. In vitro effects of a chlorhexidine controlled delivery system. *Artificial Organs* 2003; 27(5):474-9.
24. Franco-de-Lima RA, de Jesus MB, Saia Cereda CM, Tofoli GR, Cabeça LF, Mazzaro I, Fraceto LF, de Paula E. Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrins. *J Drug Target.* 2012 Jan;20(1):85-96

25. Freudenberg, K., Cramer, F., Plieninger, H., 1953. Verfahren zur Herstellung von Einschlussverbindungen physiologisch wirksamer organischer Verbindungen. Knoll A.-G. Chemische Fabriken, Germany, Patent No. 895,769, 5 November 1953.

26. Gao F, Budd AJ. Venous levels of lignocaine and bupivacaine after peribulbar block. *Anaesthesia*. 1996 Dec;51(12):1109-12.

27. Gerloczy A, Hoshino T, Pitha J. Safety of oral cyclodextrins: effects of hydroxypropyl cyclodextrins, cyclodextrin sulfates and cationic cyclodextrins on steroid balance in rats. *J Pharm Sci*. 1994;83(2):193-6.

28. Gonçalves SB. Extração, purificação e estudo sobre a formação de filmes mononucleares da hialuronidase bovina [tese]. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia Química; 2007.

29. Gould S, Scott R. 2-Hydroxypropyl – β - cyclodextrin (HP- β -CD): a toxicology review. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(10): 1451- 9.

30. Hirayama F, Uekama K, Kamda M, Udo K, Yano H, Arima H. γ -cyclodextrin conjugate based controlled release system: repeated and prolonged releases of ketoprofen after oral administration in rats. *J Control Release*. 2002;82:407-16.

31. Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000, Feb 15; 183(2):201-7

32. Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins III: toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sc.* 1997;86(2):147-62.
33. Kakizaki I, Ibori N, Kojima K, Yamaguchi M, Endo M. Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase. *FEBS J.* 2010;277:1776-86.
34. Kallio H, Paloheimo M, Maunuksela EL. Hyaluronidase as an adjuvant in bupivacaine-lidocaine mixture for retrobulbar/peribulbar block. *Anesth Analg.* 2000; 91(4):934-7.
35. Khorlin AY, Vikha IV, Milishnikov AN. Subunit structure of testicular hyaluronidase. *FEBS Lett.* 1973 Apr 1;31(1).
36. Kirby C, Eckenhoff J, Looby J. The use of hyaluronidase with local anesthetic agents in nerve block and infiltration anesthesia. *Surgery.* 1949;25:101.
37. Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharmac.* 2012; jul [Epub ahead of print].
38. Langer R. New methods of drugs delivery. *Science* 1990; 249:1527-33

39. Loftsson T, Masson MM. Cyclodextrins in topical drug formulations: Theory and practice. *Int J Pharmaceutics* 2001; 225:15-30.
40. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci* 1996 Oct, 85(10): 1017-25.
41. Looby J, Kirby C. Use of hyaluronidase with local anesthetic agents in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1949;38:1-4.
42. Lyra MAM, Alves LDS, Fontes DAF, Soares-Sobrinho JL, Rolim-Neto PJ. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2010;31(2):117-24.
43. Malamed SF. Manual de anestesia local. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. 350p.
44. Masson M, Loftsson T, Jonsdottir RS, Fridriksdottir H, Petersen DS. Stabilization of ionic drugs through complexation with non ionic and ionic cyclodextrins. *Int J Pharmaceutics* 1998; 164(1-2):45-55.
45. Meyer K. Hyaluronidases. In *The Enzymes* (Boyer PD & Krebs EG), New York: Academic Press. 1971. p. 307- 20.

46. Meyer K, Linker A, Davidson EA, Weissmann B. The mucopolysaccharides of bovine cornea J Biol Chem. 1953 Dec;205(2):611- 6
47. Mirth DB. Controlled-release therapeutic systems:technology applicable to the treatment of oral disease. Adv Dent Res. 1987;1(1):109-18.
48. Moraes CM, Abrami P, Gonçalves MM, Andréo Filho N, Fernandes AS, de Paula E, Fraceto LF. Preparação e caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- β -ciclodextrina. Quim Nova 2007;30(4):777-84.
49. Mosher GL, Thompson DO. Complexation and cyclodextrins. In Swarbrick J, Boylan JC (Eds.). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York: Marcel Dekker. 2002. p. 531-58.
50. Nathan N, Benrhaïem M, Lotfi H, Debord J, Rigaud G, Lachatre G, Adenis JP, Feiss P. The role of hyaluronidase on lidocaine and bupivacaine pharmacokinetics after peribulbar blockade. Anesth Analg. 1996;82(5):1060-4.
51. Nicoll JM, Treuren B, Acharya PA, Ahlen K, James M. Retrobulbar anesthesia the role of hyaluronidase. Anesth Analg 1986 Dec;65(12):1324-8.

52. Pitha J, Pitha J. Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients. *J Pharm Sci.* 1985. Sep;74(9): 987-90.
53. Pitha J, Harman SM, Michel ME. Hydrophilic cyclodextrin derivatives enable effective oral administration of steroidal hormones. *J Pharm Sci.* 1986;75(2):165-7.
54. Poptiz-Bergez FA, Leeson S, Strichartz G R, Thalhammer JG. Relation between functional deficit and intraneural local anesthetic during peripheral nerve block. *Anesthesiology.* 1995;83:583-92.
55. Pralhad T, Rajendrakuma K. Study of freeze-dried quercetin-cycloextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffractions and SEM analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;34:333-9.
56. Rajewski RA, Stella VJ. Pharmacological applications of ciclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J Pharm Sc.* 1996;85(11): 1142-69
57. Ribeiro A, Figueiras A, Santos D, Veiga F. Preparation and solid-state characterization of Inclusion complexes formed between miconazole and methyl- β -cyclodextrin. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2008;9(4):1102-9.
58. Ribeiro L, Loftsson T, Ferreira D, Veiga F. Investigation and physicochemical characterization of vinpocetine-sulfobutyl ether β -

cyclodextrin binary and ternary complexes. Chem Pharm Bull. 2003;51:914-22.

59. Ridenour S, Reader A, Beck M, Weaver J. Anesthetic efficacy of a combination of hyaluronidase and lidocaine with epinephrine in alveolar nerve blocks. Anesth Prog. 2001; 48(9):9-15.

60. Rosenberg Additives to increase tissue spread of local anesthetics. Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management. 2004 Jul 8(3):114-8.

61. Salmen S. Inhibitors of bacterial and mammalian hyaluronidase: synthesis and structure-activity relationships. Regensburg: University of Regensburg; 2003.[thesis]. 338p. Acesso em dezembro de 2009: http://epub.uni-regensburg.de/10693/1/Spickenreither_diss.pdf

62. Saltão R; Veiga F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. Rev Bras Cien Farm. 2001;37(1):1-17.

63. Sarvella J, Nikki P. Hyaluronidase improves regional ophthalmic anaesthesia with etidocaine. Can J Anaesth. 1992;39(9):920-4.

64. Soares LF, Helayel PE, Conceição DB, Oliveira Filho GR. Bloqueio peribulbar com ME de bupivacaína S75:R25 0,5 % e lidocaína 2%: efeitos de adição de hyaluronidase. Rev Bras Anesthesiol 2002;52(4):420-5.

65. Stabhoz A, Soskolne A, Friedman M, Sela MM. The use of sustained release delivery of Chlorhexidine for the maintenance of periodontal pockets: 2 years clinical trial. *J Periodontol* 1991; 62:429-33.

66. Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev* 2006;106:818–39.

67. Schardinger F. Über Thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.*, 6 (1903), pp. 865–880.

68. Stella VJ, Rajewski RA. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res.* 1997;14:556-67.

69. Strattan CE. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, part II: safety and manufacturing issues. *Pharm. Tech.* 1992;2:52-8.

70. Szejtli J. *Cyclodextrin Technology*. Netherland: Kluwer, 1988. p.1-170

71. Szejtli J. Cyclodextrins: properties and applications. *Drug Invest.* 1990;2(suppl 4):11-21.

72. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 1998;98(5):1743-53.
73. Tempestini – Horliana ACR, Brito MAD, Perez FEG, Simonetti MPB, Rocha RG, Borsatti MA. Hyaluronidase increases the duration of mepivacaine in inferior alveolar nerve blocks. *J Oral Maxillofacial Surg.* 2008;66:286-90.
74. Thompson DO. Cyclodextrins--enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997;14(1):1-104.
75. Toyoda K, Shoda T, Uneyama C, Takada K. Carcinogenicity study of β -cyclodextrina in F344 rats. *Food and Chem. Toxic.* 1997. 35:331-6.
76. Venturine CG, Nicoline J, Machado C, Machado VG. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim Nova* 2008;31(2):360-8.
77. Watson D. Hyaluronidase. *Br J Anaesth* 1993;71:422-425.
78. Yoshida A, Arima H, Uekama K, Pitha J. Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of beta-cyclodextrins. *Int J Pharm.* 1988;46:217-22.

ANEXO A: Publicação do aceite na RPI.

PATENTES, DESENHOS INDUSTRIAIS, CONTRATOS, PROGRAMAS DE COMPUTADOR, INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS, TOPOGRAFIA DE CIRCUITO INTEGRADO

REVISTA DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Nº 2146

22 de Fevereiro de 2012

SEÇÃO I

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente
Dilma Rousseff

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR
Ministro do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
Fernando Pimentel

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

PRESIDENTE
Jorge de Paula Costa Ayala

VICE-PRESIDENTE
Adriano Tardelli

CHEFE DE GABINETE
Joelma Sales de Oliveira

DIRETORIA DE COOPERAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO
Denise Moqueira Gregory

PROCURADORIA FEDERAL no INPI
Mauro Sodré Maia

DIRETORIA DE PATENTES
Julio César Castello Branco Reis Moreira

DIRETORIA DE MARCAS
Viviane Bogale Câmara

DIRETORIA DE CONTRATOS, INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS E REGISTROS
Sílvia Sarto de Almeida Neves

DIRETORIA DE ADMINISTRAÇÃO
Leonardo de Paula Lutz

REVISTA DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Órgão Oficial do INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Lei nº 5648, de 11.12.70 art. 9º e decreto nº 68.104, de 22.01.71, art. 24

SEDE DO INPI
MV - Mayrink Velho nº 9, Centro - CEP: 20090-910
PM - Praça Mauá nº 7, Centro - CEP: 20061-240
Tel.: PBX (21) 3037-3000

PROCURADORIA
MV - 22º andar
Tel.: (21) 3037-3731, 3037-3732
Fax: (21) 3037-6841

DIRMA - Diretoria de Marcas
MV - 25º andar
Tel.: (21) 3037-3628
Fax: (21) 3037-3247

DIRPA - Diretoria de Patentes
MV - 20º andar
Tel.: (21) 3037-3592, 3037-3715, 3037-3049
Fax: (21) 3037-3194

DICIG - Diretoria de Contratos, Indicações Geográficas e Registros
PM - 12º andar
Tel.: (21) 3037-3646, 3037-3608, 3037-3648
Fax: (21) 3037-3175

DIRAD - Diretoria de Administração
MV - 3º andar
Tel.: (21) 3037-3114

DICOD - Diretoria de Cooperação para o Desenvolvimento
MV - 27º andar
Tel.: (21) 3037-3044

DIVISÕES REGIONAIS

BRASILIA
Chefe: Antônio Carlos Pereira Coelho
e-mail: dirgo@inpi.gov.br
SAS - Quadra 2, Lote 11A
Brasília - DF - CEP: 70070-020
Tel.: (61) 3224-1114
Horário de Atendimento: 10h às 16h30

CEARÁ
Chefe: Alberto Moreira da Rocha
e-mail: dirgoce@inpi.gov.br
Rua Doutor Mário Martins Coelho, nº 38
Aldeota - Fortaleza - CE - CEP: 60170-290
Tel.: (85) 3261-1372, 3261-1695
Fax: (85) 3268-1495
Horário de Atendimento: 10h às 16h30

MINAS GERAIS
Chefe: José Renato Carvalho Gomes
e-mail: jrc@inpi.gov.br
Avenida Amazonas nº 1.909
Santa Agatânia - Belo Horizonte - MG - CEP: 30180-002
Tel.: (31) 3291-6614, 3291-6623

Fax: (31) 3291-5449
Horário de Atendimento: 10h às 16h30

PARANÁ

Chefe: Renée Fernandes Senger
e-mail: dirgop@inpi.gov.br
Rua Marechal Deodoro, 344, 10º andar
Edifício Alabala, Centro, Curitiba - PR
CEP: 80010-909
Telefone: (41) 3322-4411
Horário de Atendimento: 10h às 16h30

RIO GRANDE DO SUL

Chefe: Maria Isabel de Toledo Andrade Cunha
e-mail: dirgrs@inpi.gov.br
e-mail: ibel@inpi.gov.br
Av. José de Alencar, 521 - Cobertura 902 - Bairro Menino Jesus, Porto Alegre - RS - CEP: 90090-401
Telefone: (51) 3226-6909, 3226-6422, 3227-5686
Horário de Atendimento: 10h às 16h30

SÃO PAULO

Chefe: Maria dos Anjos Marques Basso
e-mail: dirgosp@inpi.gov.br
Rua Tabapuã, 41 - 4º andar - Itaim Bibi
São Paulo - SP - CEP: 04533-010
Telefone: (11) 3071-3434, 3071-3433
Horário de Atendimento: 10h às 16h30

REPRESENTAÇÕES E POSTOS AVANÇADOS

Acree
Responsável: Arnaldo Severiano Freitas
Secretaria de Desenvolvimento Ciência e Tecnologia
BR-364, Km 5, Zona A - Setor 3 Lote "1-A" - Distrito Industrial - Rio Branco/AC - CEP: 69.917-100
Tel./Fax: (68) 3229-6349, 3229-4259, 3229-5556
Horário de Atendimento: 8h às 12h
14h às 17h30

Alagoas

Responsável: Jarbas Aguiar dos Santos
Secretaria do Desenvolvimento Econômico
Av. Da Paz, N.º 1108 - Centro
Maceió/AL - CEP: 57022-050
Tel.: (32) 3315-1721, 3315-1719, 3315-1720
Horário de Atendimento: 8h às 16h30

Amapá

Responsável: Rosângela Cruz Silva de Souza
Junta Comercial
Av. FAS, 1610 - Centro
Macapá/AP - CEP: 68006-030
Tel.: (96) 3225-8600
Fax: (96) 3225-8654
Horário de Atendimento: 7h30 às 13h30

Amazonas

Responsável: Aletei Velloso da Silva
SEPLAN - Secretaria do Estado de Planejamento e Desenvolvimento Econômico
Rua Major Gabriel, 1870 - Praça 14 de Janeiro
Manaus/AM - CEP: 69090-060
Tel.: (67) 2126-1235, 2126-1200

Bahia

Responsável: Flávio José Moreno
Rua Pedro R. Bandeira, 143 - 5º andar
Cidade Salta - Salvador - BA
CEP: 40015-080
Tel.: (71) 3326-8597, 3242-5223
Horário de Atendimento: 10h às 16h30

Responsável: Isis Patrícia Motta

Av. Cláudio Marcolino, 6629 - Multi Shop Boca do Rio
CEP: 41715-000
Tel.: (71) 3281-4148
Horário de Atendimento: 10h às 16h30

Espírito Santo

Responsável: Edmar Gonzaga
Rua Abigail do Amaral Carneiro, 191
Edifício Arábica - 3º andar - salas 312, 314 e 316
Ensaiada do Sul - Vitória - ES - CEP: 29065-907

Tel.: (27) 3235-7788
Fax: (27) 3315-8623
Horário de Atendimento: 10h às 16h30

Goiás

Responsável: Rosemar Rodrigues de Oliveira Mariani
JUNTA COMERCIAL DO ESTADO DE GOIÁS
Rua 206 - Esquina 256 - Setor Universitário, Quadra 84, Lt. 5 e 6 Goiânia - GO CEP: 74640-310
Tel.: (62) 3202-2246, 3202-2262, 3261-4833 Ramal: 279
Horário de Atendimento: 8h às 18h

Maranhão

Responsável: Déia Lourdes Furtado de Oliveira
Secretaria de Estado da Indústria e Comércio
Av. Carlos Cunha s/nº - sala 210
Edifício Nágib Haddad - Calhau/MA - CEP: 65065-180
Telefone: (98) 3235-8546, ramais 28 e 29
Horário de Atendimento: após às 13h

Mato Grosso

Responsável: Kenner Langner da Silva
Junta Comercial do Estado do Mato Grosso - JUSSEMAT
Av. Heliador Rubens de Mendonça, s/nº - CPA
Cuiabá/MT - CEP: 78055-500
Tel.: (65) 3613-9526, 3613-9528
Horário de Atendimento: 8h às 12h
14h às 17h00

Mato Grosso do Sul

Responsável: Cássia Brandão de Souza
Secretaria de Estado de Desenvolvimento Agrário, da Produção, da Indústria, do Comércio e do Turismo/SEPROTUR
Av. Desembargador José Nunes da Cunha-Parguei dos Poderes, Bloco 12 - CEP: 79031-310 - Campo Grande/MS
Telefone: (67) 3318-5013
Horário de Atendimento: 7h30 às 13h30

Pará

Responsável: Paulo Fernando Campos Maciel
SEDECT - Secretaria Estado de Desenvolvimento Ciência e Tecnologia
Av. Presidente Vargas, 1020 - Campina Belém/PA - CEP: 66017-005
Telefone: (91) 4009-2534, 4009-2531
Horário de Atendimento: 8h às 13h
14h às 18h

Responsável: Francisco Montandon Gutierrez
SEFA - Secretaria Estadual da Fazenda
Av. Mendonça Furtado, 2797 - Fátima
Santarém/PA - CEP: 68005-020
Telefone: (93) 3063-5634
Horário de Atendimento: 8h30 às 13h

Paraná

Responsável: Aline Nascimento Duarte
Secretaria de Turismo e Desenvolvimento Econômico
Rua Feliciano Cierre nº 50 - Jaguaribe
João Pessoa/PB - CEP: 58015-570
Telefone: (83) 3308-3022, 3308-3023, 3242-3545/2729
Horário de Atendimento: 12h às 16h30

Pernambuco

Responsável: Eduardo Andrade Benfica
e-mail: benfica@inpi.gov.br
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Campus Universitário
Recife/PE - CEP: 50670-920
Telefone: (81) 3453-6145, 3271-1223
Horário de Atendimento: 10h às 16h30

Piauí

Responsável: Eliane Fátima Assunção Lima Souza
Secretaria de Desenvolvimento Econômico e Tecnológico
Rua Rui Barbosa, nº 805 - Centro - Central/FACIS/SEBRAE
Telefone: (86) 3216-3000 ramal 1403
Horário de Atendimento: 7h30 às 13h30

(74) PRINCESA MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110044406 em 17/11/2011 11.57(SP).	Número de Protocolo 18110042307 em 31/10/2011 03.50(SP).	(71) MOLDLEV COMÉRCIO DE MOLDURAS LTDA (BR/SP) (74) PEZZUOL & ASSOCIADOS MARCAS E PATENTES S/C LTDA Número de Protocolo 18110046412 em 30/11/2011 12.34(SP).
(21) PI 1104785-2 A2 2.10 (22) 17/11/2011 (71) ADIBO ADMINISTRAÇÃO E PARTICIPAÇÕES (BR/SP) (74) ICAMP MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110044435 em 17/11/2011 01.56(SP).	(21) PI 1104817-4 A2 2.10 (22) 27/10/2011 (71) Universidade Estadual de Campinas - Unicamp (BR/SP) (74) LUCIANA ALBOCCINO BARBOSA CATALANO Número de Aviso de Recebimento SZ411167807BR	(21) PI 1105037-3 A2 2.10 (22) 03/11/2011 (71) JOSE SEJTMAN (BR/SP) Número de Protocolo 18110042667 em 03/11/2011 02.21(SP).
(21) PI 1104786-0 A2 2.10 (22) 03/11/2011 (71) MM COMPONENTES PARA IMPLEMENTOS RODOVIÁRIOS LTDA (BR/SP) (74) DANILLO FERREIRA MACHADO Número de Protocolo 18110042681 em 03/11/2011 02.46(SP).	(21) PI 1104818-2 A2 2.10 (22) 28/10/2011 (71) AIRSHIP DO BRASIL LOGÍSTICA LTDA. (BR/SP) (74) EDNEA CASAGRANDE PINHEIRO Número de Aviso de Recebimento SX072719349BR2	(21) PI 1105038-1 A2 2.10 (22) 30/11/2011 (71) RODRIGO LASALVIA BESADA (BR/SP) (74) PEZZUOL & ASSOCIADOS MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110046413 em 30/11/2011 12.36(SP).
(21) PI 1104787-9 A2 2.10 (22) 09/11/2011 (71) LOCALSOFTWARE SISTEMA COMERCIAL LTDA ME (BR/SP) (74) PEZZUOL & ASSOCIADOS MARCAS E PATENTES Número de Protocolo 18110043419 em 09/11/2011 10.22(SP).	(21) PI 1104819-0 A2 2.10 (22) 28/10/2011 (71) RICO BREU (BR/SP), PATRICK BREU (BR/SP) (74) INTERAÇÃO MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110041968 em 28/10/2011 11.40(SP).	(21) PI 1105039-0 A2 2.10 (22) 30/11/2011 (71) CELIO POPPI (BR/SP) (74) MARCO ANTONIO DE OLIVEIRA Número de Protocolo 18110046462 em 30/11/2011 02.27(SP).
(21) PI 1104788-7 A2 2.10 (22) 03/11/2011 (71) NETPOINTS FIDELIDADE S.A. (BR/SP) (74) PEZZUOL & ASSOCIADOS MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110042626 em 03/11/2011 12.36(SP).	(21) PI 1104820-4 A2 2.10 (22) 28/10/2011 (71) SULPHUR SOLUTIONS INC. (CA) (74) LUCAS MARTINS GAIARSA Número de Protocolo 18110041980 em 28/10/2011 11.58(SP).	(21) PI 1105040-3 A2 2.10 (22) 30/11/2011 (71) JOSILEIDE LISBOA BARROS DOS REIS - ME (BR/SP) (74) ICAMP MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110046447 em 30/11/2011 01.26(SP).
(21) PI 1104809-3 A2 2.10 (22) 28/10/2011 (71) FERNANDO GONÇALVES DE SOUZA (BR/SP) (74) ICAMP MARCAS E PATENTES S/C LTDA Número de Protocolo 18110041999 em 28/10/2011 01.48(SP).	(21) PI 1104821-2 A2 2.10 (22) 04/11/2011 (71) GUMERCINDO LUCIO NAIM (BR/MG), WESLEY FROTA MORAES (BR/MG) (74) SÃO PAULO MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110042916 em 04/11/2011 03.45(SP).	(21) PI 1105041-1 A2 2.10 (22) 30/11/2011 (71) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP (BR/SP) (74) MARIA APARECIDA DE SOUZA Número de Protocolo 18110046446 em 30/11/2011 01.26(SP).
(21) PI 1104810-7 A2 2.10 (22) 25/10/2011 (71) ROGERIO FELIPE ALVES DE ALBUQUERQUE (BR/SP) Número de Protocolo 18110041357 em 25/10/2011 12.57(SP).	(21) PI 1104822-0 A2 2.10 (22) 27/10/2011 (71) PIZZATO ELETTRICA S. R. L. (IT) (74) CRUZEIRO NEWMARC PATENTES E MARCAS LTDA Número de Protocolo 18110041867 em 27/10/2011 04.26(SP).	(21) PI 1105042-0 A2 2.10 (22) 30/11/2011 (71) FUNDAÇÃO CPQD - CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM TELECOMUNICAÇÕES (BR/SP), COMPANHIA ENERGÉTICA DE PERNAMBUCO (BR/PE) (74) ANA LUCIA FORNI POPPI Número de Protocolo 18110046444 em 30/11/2011 01.16(SP).
(21) PI 1104811-5 A2 2.10 (22) 04/11/2011 (71) GENERAL ELECTRIC COMPANY (US) (74) CAROLINA NAKATA Número de Protocolo 18110042940 em 04/11/2011 03.58(SP).	(21) PI 1104823-9 A2 2.10 (22) 28/10/2011 (71) BIO & GREEN INDÚSTRIA DE PRODUTOS BIODEGRADÁVEIS LTDA (BR/SP) (74) RICARDO DE ANDRADE BERGAMO DA SILVA Número de Protocolo 18110042001 em 28/10/2011 01.49(SP).	(21) PI 1105043-8 A2 2.10 (22) 30/11/2011 (71) SIMULOGICA - SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL E SISTEMAS LTDA - ME (BR/SC) (74) SÍMBOLO MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110046551 em 30/11/2011 04.12(SP).
(21) PI 1104812-3 A2 2.10 (22) 08/11/2011 (71) ENTERPLAK PRODUTOS ELETRÔNICOS LTDA (BR/MG) (74) CRUZEIRO NEWMARC PATENTES E MARCAS LTDA Número de Protocolo 18110043384 em 08/11/2011 04.22(SP).	(21) PI 1104824-7 A2 2.10 (22) 25/10/2011 (71) ROSEMOUNT AEROSPACE INC. (US) (74) DAVID DO NASCIMENTO ADV. ASSOC. Número de Protocolo 18110041453 em 25/10/2011 04.07(SP).	(21) PI 1105044-6 A2 2.10 (22) 30/11/2011 (71) WHIRLPOOL S.A. (BR/SP) (74) EDUARDO DA SILVA RODRIGUES Número de Protocolo 18110046648 em 30/11/2011 04.28(SP).
(21) PI 1104813-1 A2 2.10 (22) 11/11/2011 (71) JAIR AFONSO FREITAS PIRES (BR/RS) (74) MARGARETE RODRIGUES Número de Protocolo 18110043931 em 11/11/2011 12.35(SP).	(21) PI 1104825-5 A2 2.10 (22) 25/10/2011 (71) GONÇALO VLADEMIR MARTINS (BR/SP) (74) TINOCO SOARES & FILHO LTDA Número de Protocolo 18110041407 em 25/10/2011 03.31(SP).	(21) PI 1105045-4 A2 2.10 (22) 10/11/2011 (71) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP (BR/SP) (74) MARIA APARECIDA BORSATTI Número de Protocolo 18110043694 em 10/11/2011 12.13(SP).
(21) PI 1104814-0 A2 2.10 (22) 11/11/2011 (71) FLEXOMARINE S.A. (BR/SP) (74) SIGILO'S MARCAS E PATENTES S/C LTDA Número de Protocolo 18110043922 em 11/11/2011 11.17(SP).	(21) PI 1104826-3 A2 2.10 (22) 25/10/2011 (71) VETCO GRAY CONTROLS LIMITED (UK) (74) PAOLA CALABRIA MATTIOLI Número de Protocolo 18110041397 em 25/10/2011 02.25(SP).	(21) PI 1105046-2 A2 2.10 (22) 10/11/2011 (71) HENRIQUE APARECIDO DE AGUIAR FILHO (BR/SP) (74) FOCUS MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110043638 em 10/11/2011 10.17(SP).
(21) PI 1104815-8 A2 2.10 (22) 31/10/2011 (71) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP (BR/SP) (74) MARIA APARECIDA DE SOUZA Número de Protocolo 18110042197 em 31/10/2011 11.10(SP).	(21) PI 1104827-1 A2 2.10 (22) 03/11/2011 (71) PEDRO PADILHA DE MENEZES (BR/SP) (74) MODAL MARCAS E PATENTES LTDA Número de Protocolo 18110042643 em 03/11/2011 01.09(SP).	(21) PI 1105047-0 A2 2.10 (22) 28/11/2011 (71) DURATEX S.A. (BR/SP) (74) ANTONIO MAURICIO ARNAUD Número de Protocolo 18110046123 em 28/11/2011 04.09(SP).
(21) PI 1104816-6 A2 2.10 (22) 31/10/2011 (71) GE AVIATION SYSTEMS LLC (US) (74) ARTUR FRANCISCO SCHALL	(21) PI 1104828-0 A2 2.10 (22) 16/11/2011 (71) TAI-HER YANG (TW) (74) PINHEIRO NETO ADVOGADOS Número de Protocolo 18110044380 em 16/11/2011 04.24(SP).	(21) PI 1105048-9 A2 2.10 (22) 30/11/2011
	(21) PI 1105036-5 A2 2.10 (22) 30/11/2011	