

CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO ROPIVACAÍNA:β-CICLODEXTRINA

Leonardo Fernandes Fraceto*

Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Sorocaba, Av. Três de Março, 511, 18087-180 Sorocaba - São Paulo, Brasil

Marcos Moisés Gonçalves

Universidade de Sorocaba, Rodovia Raposo Tavares, km 92,5, 18023-000 Sorocaba - São Paulo, Brasil

Carolina Moraes Moraes, Daniele Ribeiro de Araújo, Luciana Zanella e Eneida de Paula

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, 13083-970

Campinas - SP, Brasil

Thelma de Aguiar Pertinhez

Departamento de Medicina Experimental, Universidade de Parma, Parma, Itália

Recebido em 17/7/06; aceito em 1/12/06; publicado na web em 24/7/07

CHARACTERIZATION OF THE INCLUSION COMPLEX ROPIVACAINE: β-CYCLODEXTRIN. Ropivacaine (RVC) is a widely used local anesthetic. The complexation of RVC with β-cyclodextrin (β-CD) is of great interest for the development of more efficient local anesthetic formulations. The present work focuses on the characterization of the RVC:β-CD complex by nuclear magnetic resonance (NMR). The stoichiometry of the complex is 1:2 RVC:β-CD. DOSY-NMR shows that the association constant is 55.5 M⁻¹. Longitudinal relaxation time results show that RVC changes its mobility in the presence of β-CD. This study is focused on the physicochemical characterization of inclusion complexes that are potentials options for pain treatment.

Keywords: ropivacaine; cyclodextrin; NMR.

INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais (AL) são compostos químicos cuja atividade farmacológica primária envolve o bloqueio reversível da condução nervosa. O primeiro composto a ser utilizado como anestésico local foi a cocaína, um alcalóide isolado das folhas de *Erythroxylon coca*, que teve sua ação demonstrada por Köller (1884) ao utilizá-la como anestésico oftálmico. Após ter sido empregada na clínica durante longo tempo, a cocaína foi substituída por outras substâncias, devido aos seus efeitos tóxicos, como dependência química e psíquica¹.

A ropivacaína (RVC) é um AL pertencente à classe das amino-amidas¹⁻³. A ropivacaína, juntamente com a lidocaína (LDC) e a bupivacaína (BVC), tem sido um dos compostos de escolha na terapia da dor aguda e crônica⁴.

A RVC é um AL semelhante à BVC, possuindo início de ação moderada, longa duração, bloqueio da condução e separação significativa entre o bloqueio sensorial e motor⁵. Porém a RVC induz menor toxicidade aos sistemas nervoso central e cardiovascular e promove maior grau de dissociação entre o bloqueio motor e sensorial, sendo útil na administração epidural, infiltração e alívio da dor pós-operatória⁶⁻¹¹.

Como as características desejáveis para uma molécula anestésica incluem, além de longa duração de ação e da seletividade para o bloqueio sensorial em relação ao bloqueio motor, a diminuição da toxicidade local e/ou sistêmica¹³, uma alternativa que, atualmente, tem se mostrado capaz de promover estes efeitos desejáveis é a liberação modificada desses fármacos, através de formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas^{12,13}.

As ciclodextrinas (Figura 1) são produtos cíclicos da hidrólise enzimática do amido por alguns microorganismos¹⁴. As três ciclodextrinas naturais são alfa (α-CD), beta (β-CD) e gama (γ-

CD), compostas de seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopirranose, respectivamente, unidas por ligações α-1,4. Estes compostos possuem em sua estrutura grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior. Assim, possuem exterior hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica. Tal cavidade permite às ciclodextrinas complexarem moléculas que apresentem dimensões compatíveis e alterarem suas propriedades físico-químicas, como solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade^{15,16}. As β-CDs são as ciclodextrinas mais amplamente utilizadas na complexação com várias classes de fármacos^{14,17}.

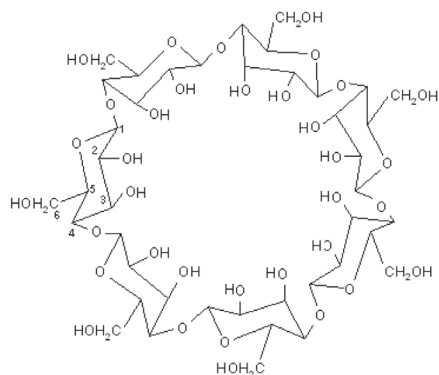


Figura 1. Representação esquemática da β-CD (R=H)

Alguns trabalhos na literatura relatam a caracterização físico-química da interação entre anestésicos locais com ciclodextrinas: para amino-amidas (lidocaína e bupivacaína) utilizando experimentos de calorimetria e modelagem molecular¹⁸; para a benzocaína foram realizados estudos de microscopia, calorimetria, fluorescência, dados de RMN e modelagem molecular¹⁹; para a bupivacaína foram

*e-mail: leonardo@sorocaba.unesp.br

realizados estudos de caracterização espectrofotométrica e ensaios *in vivo* da eficácia da complexação¹³, além da caracterização da complexação por potenciometria²⁰. No entanto, até o presente momento não se encontram na literatura estudos envolvendo a caracterização do complexo RVC:β-CD, principalmente dados referentes à estrutura do complexo.

Neste trabalho foi preparado o complexo de inclusão entre RVC e β-CD, realizando-se a caracterização por ressonância magnética nuclear através de experimentos para determinação da estequiometria do complexo ("job plot"), medidas de tempos de relaxação longitudinal e medidas de constante de associação por experimentos de difusão. A contribuição deste trabalho para a literatura está no desenvolvimento de um novo sistema carreador para o anestésico local RVC, a fim de possibilitar uma alternativa futura para o tratamento da dor.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e métodos

O cloridrato de ropivacaína foi doado pela empresa Cristália Indústria Química e Farmacêutica Ltda. A β-CD foi doada pela multinacional Roquette. A água deuterada foi obtida da Sigma Chem. Co. Todos os demais reagentes apresentavam grau espectroscópico ou analítico.

Preparo do complexo de inclusão RVC: β-CD

O complexo foi preparado de acordo com o procedimento descrito por Pinto e colaboradores¹⁹. O método consiste em misturar β-CD e RVC em água sob agitação por 24 h até atingir o equilíbrio, sendo estes posteriormente liofilizados e armazenados em dessecador para utilização futura.

Experimentos de RMN

Amostras de RVC, ciclodextrina e complexo foram preparadas em D₂O para aquisição de espectros uni e bidimensionais, para atribuição dos hidrogênios pertencentes a cada molécula. Aliquotas de 600 μL foram levadas ao espectrômetro de ressonância em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro. Os experimentos foram conduzidos a 25 °C usando-se como referência o pico da água residual (4,81 ppm). Os experimentos de RMN de hidrogênio (¹H-RMN) foram conduzidos no espectrômetro Varian INOVA 500 operando em um campo de 11,7 Tesla em frequência para hidrogênio de 499,73 MHz (resolução digital das medidas de 0,39 Hz/ponto), equipamento pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Em todos os experimentos a supressão da água residual foi feita pela técnica de pré-saturação. Os dados foram processados utilizando-se o programa nmrPIPE/nmrVIEW.

Método de variação contínua ("Job plot")

A técnica de variação contínua ("Job plot")^{21,22} baseia-se na variação de um parâmetro físico-químico observado na presença de ciclodextrina e que pode ser medido por técnicas espectroscópicas, como RMN ou fluorescência. Esta técnica foi utilizada na determinação da estequiometria de complexos de inclusão envolvendo a β-CD^{19,23,24}, fornecendo ótimos resultados.

A estequiometria de complexação foi determinada a partir de soluções equimolares de RVC e β-CD preparadas e misturadas de forma que a concentração total (M) permaneça constante (M = [RVC]_{total} + [β-CD]_{total} = 5 mM), variando-se a fração molar das espécies entre 0 e 1 (0; 0,2; 0,33; 0,5; 0,66; 0,8; 1,0).

O parâmetro físico-químico analisado foi o deslocamento químico (δ) na ausência (δ₀) e na presença (δ) de RVC (ou β-CD). A análise dos dados foi realizada construindo-se um gráfico de Δδ.r (Δδ.r = (δ - δ₀)) em função de r (r = [RVC]_{total} / ([RVC]_{total} + [β-CD]_{total})), onde para um dado valor de r, a concentração do complexo fármaco:ciclodextrina atingirá um máximo correspondente ao ponto onde a derivada d[fármaco:ciclodextrina]/dr = 0. Isto poderá ser observado no gráfico de Δδ vs. r, quando sua derivada for igual a zero, uma vez que Δδ estará ligada diretamente à concentração do complexo²².

Medidas de tempo de relaxação longitudinal (T₁)

Os experimentos de tempo de relaxação longitudinal foram conduzidos no espectrômetro Varian INOVA 500 operando em um campo de 11,7 Tesla em frequência para hidrogênio de 499,73 MHz, equipamento pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. As amostras foram degaseificadas para evitar interferência de oxigênio dissolvido. O método utilizado nas medidas de T₁ foi o da inversão-recuperação. Foram utilizados nos experimentos os seguintes valores dos parâmetros: D₁ ("delay") de 6 s; pulso de 90° foi tipicamente entre 10-15 μs; número de scans de 16; janela de 12 ppm e utilização de 16 valores de tempo de recuperação (t₁). As medidas de T₁ foram conduzidas para RVC e RVC:β-CD.

Medidas de difusão

Os experimentos de difusão (DOSY) foram realizados para RVC (5 mM), β-CD e 1:2 RVC:β-CD a 25 °C. A seqüência utilizada foi a Dbppste. A duração total do gradiente de pulso foi de 2 ms, o tempo de espera de difusão foi de 0,05 s e o força de gradiente mínima foi de 0,3 Gauss/cm^{24,25}.

Para todos os experimentos foram coletados 30 espectros (64 transientes cada) com gradiente com amplitudes de pulsos variando de 0,68.10⁻³ até 3,4.10⁻³ T/cm, onde se observou aproximadamente o decaimento de 100% na intensidade da ressonância encontrada na maior amplitude de gradiente.

A fração do fármaco complexado foi determinada conforme descrito pela Equações 1 a 3²⁵

$$D_{OBSERVADA} = (1 - \gamma_{LIGADA}) \cdot D_{LIVRE} + \gamma_{LIGADA} \cdot D_{LIGADA} \quad (1)$$

$$\gamma_{LIVRE} + \gamma_{LIGADA} = 1 \quad (2)$$

$$\gamma_{LIGADA} = (D_{LIVRE} - D_{OBSERVADA}) \cdot (D_{LIVRE} - D_{LIGADA})^{-1} \quad (3)$$

onde, γ_{LIGADA} = fração de RVC complexada à β-CD; γ_{LIVRE} = fração de RVC sem complexar; D_{LIVRE} = coeficiente de difusão da RVC em solução; $D_{OBSERVADA}$ = coeficiente de difusão da RVC em presença de β-CD; D_{LIGADA} = coeficiente de difusão da RVC 100% ligada a β-CD.

A constante de afinidade foi calculada a partir da Equação 4, deduzida da constante de equilíbrio para a estequiometria de 1:2 RVC:β-CD.

$$K = \frac{\gamma_{LIGADA}}{(1 - \gamma_{LIGADA}) \cdot ([\beta - CD]_0 - 2 \cdot \gamma_{LIGADA} \cdot [RVC]_0)^2} \quad (4)$$

onde, γ_{LIGADA} é a fração de RVC complexada, [RVC]₀ = concentração inicial de RVC (M); [β-CD]₀ = concentração inicial de β-CD (M).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais informativas para o estudo de complexos de ciclodextrinas com vários

substratos orgânicos, pois fornece evidências diretas da formação dos complexos. A razão para isso é que a presença da molécula hóspede, quando inserida na cavidade interna das ciclodextrinas, causa mudanças no ambiente químico dos hidrogênios internos (H_3 e H_5), mas não nos hidrogênios externos (H_1 , H_2 e H_4)¹⁹. Em adição, a interação da molécula hospedeira com a cavidade da ciclodextrina pode causar variação no deslocamento químico dos hidrogênios da molécula incorporada na cavidade^{26,27}.

A Figura 2 apresenta os espectros de 1H -RMN da molécula de RVC e β -CD. O deslocamento químico dos hidrogênios de ambas moléculas, bem como a atribuição dos hidrogênios estão apresentadas na Tabela 1. A atribuição dos espectros de RMN, tanto da RVC quanto da β -CD, foi realizada utilizando dados da literatura^{19,26,27} e espectros bidimensionais (dados não mostrados)

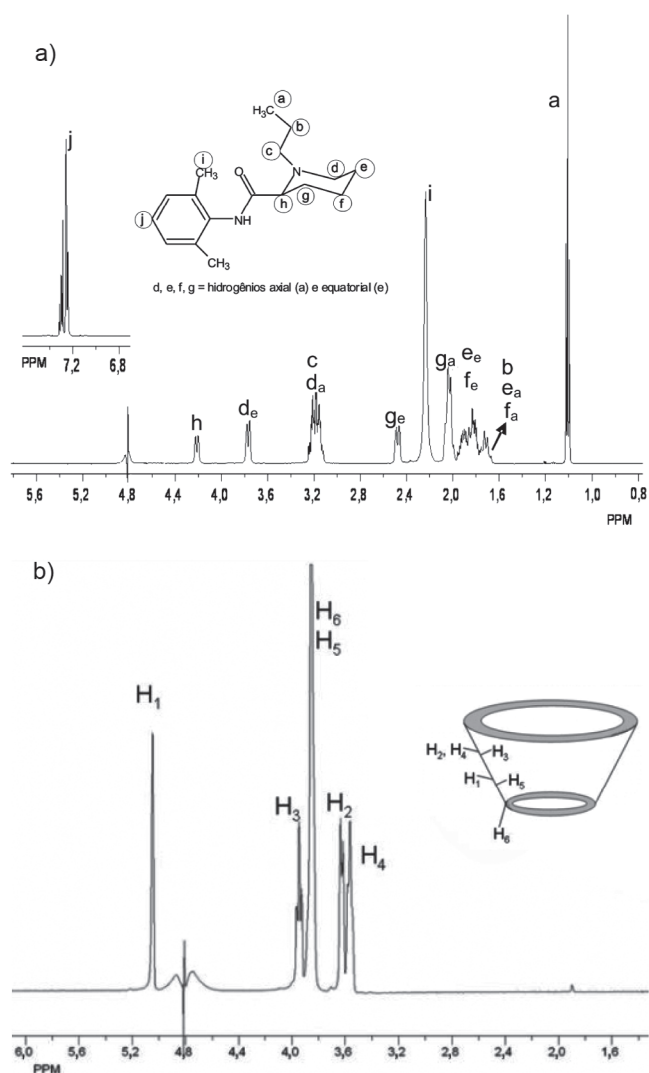


Figura 2. Espectro monodimensional de 1H -RMN de a) RVC, 10 mM e b) β -CD, 10 mM em D_2O , pH 5,5, 25 °C

A partir da atribuição dos espectros de ambas as moléculas foi realizada a determinação da estequiometria do complexo utilizando-se o método de variação contínua (“Job plot”)^{19,28}, o qual representa a dependência da variação de deslocamento químico na razão fármaco/ciclodextrina (Tabela 2). Os valores encontrados para a variação no deslocamento químico dos hidrogênios da molécula de β -CD são compatíveis com trabalhos encontrados na literatura^{24,29}.

Tabela 1. Atribuição e deslocamento químico dos 1H da RVC (10 mM) e da β -CD (10 mM), D_2O , pH 5,5 a 25 °C

RVC		β -CD	
Identificação dos 1H	δ 1H (ppm)	Identificação dos 1H	δ 1H (ppm)
a	1,01	H_1	5,02
b	1,81	H_2	3,60
c	3,15	H_3	3,92
d_a	3,19	H_4	3,54
d_c	3,77	H_5	3,81
e_a	1,85	H_6	3,84
e_c	2,05		
f_c	2,03		
f_a	1,73		
g_a	2,03		
g_c	2,48		
h	4,21		
i	2,31		
j	7,26		

^ahidrogênio axial; ^chidrogênio equatorial

Tabela 2. Variação nos valores de deslocamento químico dos hidrogênios da molécula de β -CD em diferentes razões molares

Identificação dos 1H	δ 1H (ppm)	$\Delta\delta$ 1H (ppm)					
		β -CD:RVC (razão molar)					
		1:0	1:4	1:2	1:1	2:1	4:1
H_1	5,02		0,010	0,014	0,033	0,063	0,008
H_2	3,60		0,008	0,014	0,030	0,059	0,004
H_3	3,92		0,009	0,017	0,033	0,063	0,008
H_4	3,54		0,010	0,017	0,035	0,063	0,008
H_5	3,81		0,018	0,027	0,045	0,073	0,016
H_6	3,84		0,010	0,017	0,032	0,053	0,014

A Figura 3 apresenta o resultado obtido pelo método de variação contínua (“Job plot”) para o H_3 da β -CD (resultados semelhantes foram obtidos para outros hidrogênios). A posição de máximo no “Job plot” é a de 0,66 para a β -CD, o que indica que a complexação possui estequiometria de 2:1, ou seja, 2 moléculas de β -CD para cada molécula de RVC.

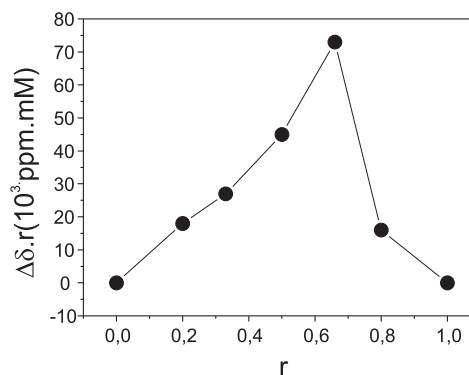


Figura 3. Variação do deslocamento químico dos hidrogênios H_3 da β -CD em diferentes frações molares do complexo (“Job Plot”), 25 °C, pH 5,5

A estequiometria de duas moléculas de ciclodextrina para uma de RVC pode ser devida ao fato de uma ciclodextrina interagir com o anel aromático da molécula de anestésico e a outra, com o anel piperidínico, juntamente com o grupamento propila. Na literatura

podem ser encontrados outros compostos com estequiometria 2:1 ciclodextrina:composto hóspede^{28,30-33}.

Uma vez realizada a caracterização supramolecular da complexação (via análise de estequiometria de complexação e provável estrutura do complexo fármaco:ciclodextrina) foram realizados os experimentos de difusão, a fim de se medir via RMN a fração de anestésico local complexada, bem como a constante de associação (K) entre RVC e β -CD.

Os cálculos da fração complexada, bem como da constante de associação foram realizados utilizando-se o formalismo descrito por Johnson Jr. e colaboradores^{25,34,35}, a partir das Equações 1 a 4. Os valores de coeficiente de difusão medidos através dos experimentos de difusão estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de coeficiente de difusão ($10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) determinados a partir dos experimentos de difusão para RVC, β -CD e complexo 1:2 (RVC: β -CD). [RVC] = 5 mM, 25 °C, pH 5,5

D_{livre}	$D_{\text{observada}}$	D_{ligada}
$3,23 \pm 0,03$	$2,55 \pm 0,07$	$1,98 \pm 0,03$

D_{LIVRE} = coeficiente de difusão da RVC em solução; $D_{\text{OBSERVADA}}$ = coeficiente de difusão da RVC em presença de β -CD; D_{LIGADA} = coeficiente de difusão da RVC 100% ligada à β -CD.

O valor determinado para D_{livre} é igual ao coeficiente de difusão da RVC em solução, $D_{\text{observada}}$ é igual ao coeficiente de difusão da RVC em presença de ciclodextrina e D_{ligada} é igual ao coeficiente de difusão da molécula de β -CD em solução, que seria correspondente ao coeficiente de difusão de 100% da molécula de RVC ligada à ciclodextrina.

A partir dos valores apresentados na Tabela 3, observa-se que a difusão da molécula de anestésico local em solução (D_{livre}) é maior que a encontrada para a molécula de ciclodextrina (D_{ligada}), devido à diferença de massa molar dos dois compostos, o que indica que a mobilidade destas moléculas em solução é diferente.

Utilizando os dados obtidos e as Equações 1 a 4 foram calculados os valores de fração complexada e da constante de afinidade para a interação entre RVC e β -CD sendo estes de 54% e $55,5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. O valor da constante de afinidade entre a molécula de RVC e β -CD está próximo a valores encontrados na literatura para outros anestésicos locais do tipo amino-amida e β -CD, determinados por isotermas de solubilidade (Bupivacaína, $K=112 \text{ M}^{-1}$; Etidocaína, $K=38,4 \text{ M}^{-1}$; Lidocaína, $K=25,8 \text{ M}^{-1}$; Mepivacaína, $K=50,9 \text{ M}^{-1}$; Prilocaína, $K=96,0 \text{ M}^{-1}$)³⁶.

A fim de se obter maiores informações sobre o complexo entre RVC e β -CD foram realizadas medidas das propriedades dinâmicas da molécula de RVC em presença e ausência de β -CD, utilizando-se medidas de tempo de relaxação longitudinal (T_1).

A variação nos valores de T_1 (Tabela 4) ao longo de alguns hidrogênios da molécula de RVC estão apresentados na Figura 4. A análise desta figura mostra que as regiões da molécula que sofreram maiores variações foram as do anel aromático e parte do anel piperidínico e grupamento propila. Estas variações estão de acordo a estequiometria determinada para o complexo.

Neste modelo as regiões da molécula de RVC que estariam inseridas na cavidade interna da ciclodextrina seriam o anel aromático e o anel piperidínico. As medidas de T_1 mostraram diminuições nas propriedades dinâmicas dos hidrogênios da molécula de RVC em presença de ciclodextrina, indicando que a inserção destas partes da molécula na cavidade causa uma restrição na mobilidade destes núcleos. Na literatura existem relatos da utilização de variações nos valores de tempos de relaxação longitudinal de anestésicos locais,

Tabela 4. Valores de T_1 (s) medidos para a molécula de RVC em ausência (T_{RVC}) e presença ($T_{\text{RVC}:\beta\text{-CD}}$) de β -CD

Hidrogênio	T_{RVC} (s)	$T_{\text{RVC}:\beta\text{-CD}}$ (s)	ΔT_1 (s)
j	2,187	2,012	0,175
i	1,146	1,095	0,051
H	0,404	0,356	0,047
g_a	0,419	0,335	0,084
e_c	0,359	0,334	0,025
e_a	0,419	0,351	0,069
d_a	0,414	0,346	0,067
c	0,569	0,407	0,162
b	0,589	0,353	0,235
a	1,155	1,049	0,106

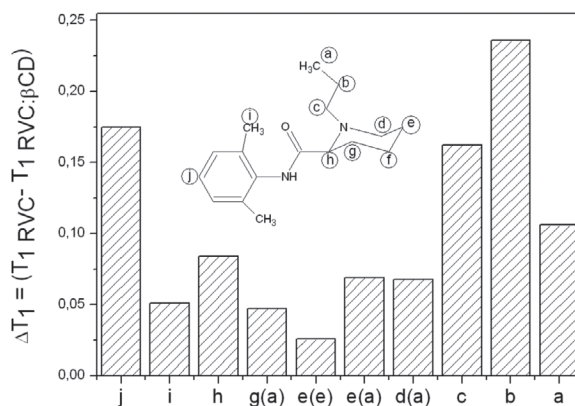


Figura 4. Variação nos valores de T_1 (em segundos) para os hidrogênios da RVC e RVC: β -CD 1:2. [RVC]=5 mM, 25 °C, pH 5,5. (a) = hidrogênio axial e (e) = hidrogênio equatorial da molécula de RVC

quando inseridos em lipossomos unilamelares de fosfatidilcolina de ovo, como metodologia para determinação das propriedades dinâmicas e a localização dos anestésicos locais no interior dos lipossomos^{37,38}. Desta forma, estes resultados corroboram as demais medidas de RMN, fornecendo informações sobre a localização de partes da molécula de RVC no interior da cavidade das ciclodextrinas. Infelizmente, por problemas de sobreposição espectral alguns hidrogênios não tiveram os valores de T_1 determinados.

CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta dados de caracterização físico-química da complexação da molécula anestésica local ropivacaína com β -CD, apresentando uma estequiometria de complexação de 1:2 RVC: β -CD. Nos experimentos de difusão 54% das moléculas RVC estão complexadas, apresentando uma constante de afinidade de $55,5 \text{ M}^{-1}$. As medidas de tempo de relaxação longitudinal indicam que os hidrogênios do anel aromático e do anel piperidínico sofreram maiores alterações na presença de β -CD. Tais resultados são importantes para um melhor entendimento das propriedades físico-químicas deste complexo de inclusão, podendo futuramente ser uma potencial alternativa para o tratamento da dor.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo auxílio financeiro e ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (E. Paula, Proc. 300197/95-0).

REFERÊNCIAS

1. Covino, B. G.; Vassalo, H. G.; *Anestésicos locais: mecanismos de ação e uso clínico*, Colina: Rio de Janeiro, 1985.
2. Courtney, K. R.; Strichartz, G. R.; *Local Anesthetics, Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag: Berlin, 1987.
3. Gupta, S. P.; *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1109.
4. Kuzma, P. J.; Kline, M. D.; Calkins, M. D.; Staats, P. S.; *Reg. Anesth.* **1997**, *22*, 543.
5. McClure, J. H.; *Brit. J. Anaesth.* **1996**, *76*, 300.
6. Cederholm, I.; *Drug Saf.* **1997**, *16*, 391.
7. Knudsen, K.; Suurkula, M. B.; Blomberg, S.; Sjøvall, J.; Edvardsson, N.; *Br. J. Anesth.* **1997**, *78*, 507.
8. Emanuelsson, B. M.; Person, J.; Sadin, S.; Alm, C.; Gustafsson, L. L.; *Ther. Drug Monit.* **1997**, *19*, 126.
9. O'Keefe, N. J.; Healy, T. E. J.; *Pharmacol. Ther.* **1999**, *84*, 233.
10. Bennett, G.; Deer, T.; Stuart, D. P.; Rauck, R.; Yaksh, T.; Hassenbusch, S. J.; *J. Pain Symp. Manag.* **2000**, *20*, 44.
11. Whiteside, J. B.; Wildsmith, J. A. W.; *Br. J. Anesth.* **2001**, *87*, 27.
12. de Araújo, D. R.; Pinto, L. M. A.; Braga, A. F. A.; de Paula, E.; *Rev. Bras. Anesthesiol.* **2003**, *53*, 663.
13. de Araújo, D. R.; Fraceto, L. F.; Braga, A. F. A.; de Paula, E.; *Rev. Bras. Anesthesiol.* **2005**, *55*, 316.
14. Loftsson, T.; Masson, M.; *Int. J. Pharm.* **2001**, *225*, 15.
15. McCormack, B.; Gregoriadis, G.; *Int. J. Pharm.* **1998**, *162*, 59.
16. Matioli, G.; *Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais*, Ed. Eduem: Maringá, 2000.
17. Irie, T.; Uekama, K.; *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 147.
18. Pinto, L. M. A.; de Jesus, M. B.; de Paula, E.; Lino, A. C. S.; Alderete, J. B.; Duarte, H. A.; Takahata, Y.; *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2004**, *678*, 63.
19. Pinto, L. M. A.; Fraceto, L. F.; Santana, M. H.; Pertinhez, T. A.; Oyama-Junior, S.; de Paula, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 956.
20. Kopecký, F.; Vojteková, M.; Kaclík, P.; Demko, M.; Bieliková, Z.; *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 581.
21. Etos, S.; Noda, H.; Noda, A.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1994**, *19*, 385.
22. Loukas, Y. L.; Vraka, V.; Gregoriadis, G.; *Int. J. Pharm.* **1998**, *162*, 137.
23. Ivanov, P. M.; Salvatierra, D.; Jaime, C.; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7012.
24. Laverde Jr., A.; da Conceição, G. J. A.; Queiroz, S. C. N.; Fujiwara, F. Y.; Marsaioli, A. J.; *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, 433.
25. Johnson, C. S. Jr.; *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 203.
26. Xiliang, G.; Yu, Y.; Guoyan, Z.; Guomei, Z.; Jianbin, C.; Shaomin, S.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2003**, *59*, 3379.
27. Bratu, I.; Gavira-Vallejo, J. M.; Hernanz, A.; *Biopolymers* **2005**, *77*, 361.
28. Ikeda, Y.; Hirayama, F.; Arima, H.; Uekama, K.; Yoshitake, Y.; Harano, K.; *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1659.
29. Zouvelekis, D.; Yannakopoulou, K.; Mavridis, I. M.; Antoniadou-Vyza, A.; *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1387.
30. Munoz-Botella, S.; Martin, M. A.; Del Castillo, B.; Menendez, J. C.; Vazquez, L.; Lerner, D. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 909.
31. Garcia-Rio, L.; Hervés, P.; Leis, J. R.; Mejuto, J. C.; Pérez-Juste, J.; Rodríguez-Dafonte, P.; *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1038.
32. Abou-Zeid, O. K.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2005**, *62*, 245.
33. Pascal, B.; Maud, G.; Georges, D.; Adelin, A.; Valery, B.; Bruno, P.; Didier, C.; Géraldine, P.; Luc, D.; Brigitte, E.; *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, *8*, 164.
34. Morris, K. F.; Johnson, C. S. Jr.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3139.
35. Morris, K. F.; Johnson, C. S. Jr.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4291.
36. Dollo, G.; Le Corre, P.; Chevanne, F.; Le Verge, R.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *136*, 165.
37. Fraceto, L. F.; Spisni, A.; Schreier, S.; de Paula, E.; *Biophys. Chem.* **2005**, *115*, 11.
38. Fraceto, L. F.; Pinto, L. M. A.; Franzoni, L.; Braga, A. A. C.; Spisni, A.; Schreier, S.; de Paula, E.; *Biophys. Chem.* **2002**, *99*, 229.