



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA ROSA BRISSANT DE ANDRADE

**DESENVOLVER E AVALIAR LIPOSSOMAS CONTENDO LEVOBUPIVACAÍNA
(7S: 25R) EM TERMOGÉIS VISANDO OBTER EFEITO PROLONGADO DA
ANESTESIA LOCAL NO TRATAMENTO DE DOR PÓS-CIRÚRGICA**

Recife

2019

ANA ROSA BRISSANT DE ANDRADE

DESENVOLVER E AVALIAR LIPOSSOMAS CONTENDO LEVOBUPIVACAÍNA (75S: 25R) EM TERMOGÉIS VISANDO OBTER EFEITO PROLONGADO DA ANESTESIA LOCAL NO TRATAMENTO DE DOR PÓS-CIRÚRGICA

Dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: fármacos e medicamentos

Orientador: Prof^ª. Dr. Davi Pereira de Santana

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Leila Bastos Leal

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

A553d Andrade, Ana Rosa Brissant de.
Desenvolver e avaliar lipossomas contendo Levobupivacaína (75S: 25R) em termogéis visando obter efeito prolongado da anestesia local no tratamento de dor pós-cirúrgica / Ana Rosa Brissant de Andrade. – 2019.
56 f: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Davi Pereira de Santana.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Levobupivacaína. 2. Lipossoma. 3. Técnicas *in vitro*. 4. Termogel. I. Santana, Davi Pereira de (Orientador). II. Título.

615.1

CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2019-274)

ANA ROSA BRISSANT DE ANDRADE

DESENVOLVER E AVALIAR LIPOSSOMAS CONTENDO LEVOBUPIVACAÍNA (7S: 25R) EM TERMOGÉIS VISANDO OBTER EFEITO PROLONGADO DA ANESTESIA LOCAL NO TRATAMENTO DE DOR PÓS-CIRÚRGICA

Dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniele C. A. S. Santana (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Rafaela S. F. Carvalho (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, Tânia e Alexandre. Com todo amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus. Ele é a razão de tudo.

À minha mãe Tânia, pelo amor materno incondicional, por ser minha base, meu equilíbrio e a razão por tudo que faço.

Ao meu pai Alexandre, pelos conselhos, por ser meu espelho profissional e por me fazer acreditar que eu iria chegar onde sempre quis.

Ao meu irmão mais velho Hugo, por depositar toda sua confiança em mim, e extrair as minhas melhores risadas. Ao meu irmão Ricardinho, por todo companheirismo e carinho e minha irmã Alice.

Aos meus avós Rômulo (*in memoriam*) e Terezinha, Luiz (*in memoriam*) e Antonieta, por me ensinarem desde criança os valores da vida, de respeito ao próximo e aos mais velhos.

Agradeço em especial a Deo, meu namorado, que me acompanha desde o início da graduação, com quem divido meus medos, anseios, tristezas, mas também alegrias, amor, projetos, e sonhos.

As minhas primas, Nathália, Gabriela e Cecília, por toda amizade, irmãs de coração.

Aos meus tios, Júnior, Taciana, Telma, Ney e Flávia por tudo que sempre fizeram por mim.

Aos meus amigos de infância, quando nem imaginávamos onde estaríamos tantos anos depois, mas sabíamos o valor real de uma amizade. Taciani, Thaís, Iris, Krsna Surya, Amanda, Nattália, Nathalya e Dostoiewsky. Obrigada por todos os nossos momentos!

Aos amigos que fiz ao longo da graduação, Suzana, Gérsica, Liúbica, Alana e Alice. E especialmente Victor, e Alana, que mesmo morando fora do país sempre se fazem presentes. A graduação não teria a menor graça sem vocês.

À Minha segunda família, a que fiz em Belém do São Francisco. Em especial a minha cunhada Daniela e seus pais por terem me recebido de braços abertos, e a família do meu namorado. Muito obrigada pela acolhida!

À minha co-orientadora Leila, quem eu tanto admiro e respeito. Sempre presente e disponível. Agradeço pela oportunidade, por ter aberto as portas para mim com confiança. Obrigada por todos os ensinamentos, pelas conversas, por acreditar que eu seria capaz e por todos os bons momentos. Serei sempre grata. a tudo isso.

Em especial ao Professor Davi, pela orientação sempre disposto a ajudar. Toda minha gratidão, admiração e respeito.

Ao professor Danilo Bedor, por todas as considerações, ajuda e disponibilidade.

À toda família NUDFAC, todo meu carinho e gratidão por vocês. Só quem convive sabe a importância de cada um de vocês no dia a dia. Obrigada por toda a ajuda e amizade.

Aos amigos cientistas Thalita, Giovana, Carol Costa, Karol Belém, Carol Chagas, Maira, Juliana, Irla e Wellithom.

O apoio de vocês foi essencial nessa jornada. Seguiremos em frente!

As colaboradoras do SLC: Rafaela Ferraz, Nereide Magalhães, Mariane Cajubá Sarah Palácio e Maria Clara, pela disponibilidade, paciência, ensinamentos, espaço cedido e todas as contribuições neste trabalho. Vocês foram fundamentais.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPE, Nerilin e Rilvan.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Por tudo, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse sonho. Por cada palavra de incentivo que foi dita, por cada ajuda, por cada abraço. Cada um de vocês teve sua importância. Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A dor é um fenômeno que afeta a maioria da população, atingindo principalmente indivíduos pós-cirurgiados e por isso, no alívio da dor pós-operatória, a analgesia deve ser usada adequadamente. Neste contexto, a Bupivacaína é uma droga amplamente utilizada, promovendo efeitos duradouros. No entanto, a cardiotoxicidade e a neurotoxicidade são desvantagens relacionadas ao seu uso repetido e por isso, foi desenvolvida a Novabupi®, uma mistura contendo excesso enantiomérico da porção levógira que apresenta efeitos de toxicidade reduzidos. Buscando racionalizar o seu uso mediante prolongamento da duração de efeito, e diminuição de aplicações, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar lipossomas contendo o Cloridrato de Levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50%, seguido da incorporação em termogéis desenvolvidos anteriormente no nosso grupo de pesquisa. Os lipossomas foram preparados usando o método de hidratação lipídica fina e seca seguido de sonicação. Inicialmente, diferentes lotes de lipossomas carregados com LBPV, com diferentes concentrações lipídicas (de 42 a 240 mM) e variando a concentração de fármaco (2 a 5 mg / mL), para obter uma formulação estável contendo a maior quantidade de fármaco. As formulações desenvolvidas foram caracterizadas em termos de tamanho de partícula, índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta. A eficiência de encapsulação do fármaco em lipossomas foi determinada por ultracentrifugação/ultrafiltração. Todas as formulações permaneceram estáveis por 30 dias, exceto lipossomas preparados a 42 mM. O tamanho de partícula variou de $334,8 \pm 4,17$ a $414,33 \pm 5,9$ nm e o índice de polidispersão foi menor que 0,5, sugerindo que este sistema é homogêneo. Apresentaram carga de superfície neutra e a taxa de eficiência do fármaco próxima a 80%. O Lipossoma foi selecionado e incorporado no termogel, onde foram analisados outros parâmetros de formulação entre eles pH, temperatura de transição de fase, teor, biocompatibilidade, potencial irritante e perfil de permeação. Termogel contendo lipossomas carregados com LBPV foram desenvolvidos com sucesso, sendo uma formulação promissora para futuros testes de efetividade *in vivo*.

Palavras-chave: Levobupivacaína. Lipossoma. Técnicas *in vitro*. Termogel.

ABSTRACT

Pain is a phenomenon that affects most people, mainly affecting the people who are operated on. For the relief of postoperative pain, an analgesia is used readily. Bupivacaine is a widely used local drug that receives enduring warranties. However, cardiotoxicity and neurotoxicity are disadvantages of its repetitive use, because of this, studies were made and confirmed with a racemic mixture molecule justified under the effect of toxicity, then a Novabupi® was developed, which contains the enantiomeric excess. Therefore, the purpose of this work was to develop liposomes with Levobupivacaine hydrochloride in 50% enantiomeric excess, for subsequent incorporation into thermogel already developed. Liposomes were prepared using the fine and dry lipid hydration method followed by sonography. Initially, batches of liposomes were loaded with LBPV, with different lipid levels (from 42 to 240 mM) and varying the drug concentration (2 to 5 mg / mL), which are associated with greater amount of drug. The formulations were characterized in terms of particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential. The encapsulation efficiency of LBPV in liposomes was determined by ultracentrifugation / ultrafiltration. All standing formulations were stable for 30 days except liposomes prepared at 42 mM. The particle size varied from 334.8 ± 4.17 to 414.33 ± 5.9 nm and the polydispersity index was less than 0.5, suggesting that this system is homogeneous, induced neutral workload and efficiency rate of after the development of the liposome that was most adequate to the parameters, it was at the same time that thermogel, other parameters such as pH, phase transition temperature, content, biocompatibility, irritant potential were reached and permeation profile. We developed liposomes loaded with LBPV with subsequent incorporation in thermogel. The system proved to be promising in accordance with the results of the characterizations.

Keywords: Levobupivacaine. Liposome. *In vitro* techniques. Thermogel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Estrutura química da Bupivacaína	22
Figura 2	– Estrutura química da Dextrobupivacaína ou (R+)- Bupivacaína e da Levobupivacaína ou (S-)-Bupivacaína	24
Figura 3	– Estrutura química Cloridrato de Levobupivacaína (Novabupi®)	24
Figura 4	– Mecanismo de gelificação do Poloxamer 407®, copolímero de óxido de etileno e óxido de propileno	28
Figura 5	– Cromatograma da Novabupi®, pico referente ao ponto 5 da curva de calibração	31
Figura 6	– Excisão da córnea bovina	33
Figura 7	– Montagem da córnea bovina em holder (suporte do opacitômetro)	34
Figura 8	– Representação da célula de difusão de Franz	38
Figura 9	– Curva de regressão linear, obtida da média de três curvas de calibração autênticas.	41
Figura 10	– Tubos invertidos mediante a verificação da temperatura de transição sol-gel	44
Figura 11	– Hemorragia e coagulação dos vasos sanguíneos mediante a aplicação da solução de NaOH 0,1N usado como controle positivo no teste de HET-CAM	46
Figura 12	– Microplacas com meio de cultura DMEM	47
Figura 13	– Microplacas com DMSO, mostrando a cor violeta, produzida devido aos precipitados de cristais mediante a atividade mitocondrial	47
Gráfico 1	– Gráfico mostrando a viabilidade celular (%) do grupo controle apenas com DMEM	48
Gráfico 2	– Gráfico mostrando a viabilidade em relação as concentrações testadas de cada formulação	48
Gráfico 3	– Perfil de permeação <i>ex vivo</i> de F1 e F3 durante 72 horas	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio BCOP	34
Tabela 2-	Pontuação atribuída às alterações evidenciadas na membrana cório-alantóide	35
Tabela 3-	Classificação final do potencial irritante no HET-CAM	36
Tabela 4-	Formulações testadas no ensaio de biocompatibilidade	37
Tabela 5-	Lipossomas desenvolvidos	40
Tabela 6-	Composição das formulações desenvolvidas	42
Tabela 7-	Valores de pH	43
Tabela 8-	Valores de teor das formulações	43
Tabela 9-	Resultado do BCOP para as formulações.	45
Tabela 10-	Resultado do HET-CAM e CAM-TBS para as formulações placebo contendo fármaco	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Antiinflamatório Não Esteriois
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina
CAM	Membrana cório-alantóide
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
DCPO	Doença crônica pós-cirurgia
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsufóxido
DP	Desvio Padrão
ECVAM	Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos
EE	Eficiência de Encapsulação
EMEM	Minimum Essential Medium Eagle
EO	Óxido de Etileno
Fase Aq.	Fase Aquosa
Fase Org.	Fase Orgânica
FDA	Farmacopeia dos Estados Unidos
HCL	Ácido Clorídrico
HEC	Hidroxietilcelulose
HET-CAM	Membrana cório-alantóide do ovo de galinha
ICCVAM	Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
LBVP	Cloridrato de Levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50%
LUV	Vesículas grandes unilamelares
MTT	Microcultura de Tetrazólio
NB	Novabupi®
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
P407	Poloxamer 407®

PDI	Índice de Polidispersão
pH	Potential hidrogeniônico
PO	Óxido de Propileno
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos
Sol-Gel	Transição Solução-Gel
SUV	Vesículas pequenas unilamelares
T-GEL	Termogel

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micromêtro
mg	Miligrama
G	Gramma
Hr	Hora
J	Fluxo
min	Minutos
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
°	Grau
°C	Grau Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
p/v	Peso/Volume
v/v	Volume/Volume
S	Segundos
T	Tempo
V	Volume
pKa	Constante de dissolução
RPM	Rotação por Minuto
M	Molar
Mol/L	Mol por litro
Nmol	Nanomol
R ²	Coeficiente de Correlação
P/P	Peso/Peso
Cm ²	Centímetro quadrado
N	Normal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	Dor	18
3.1.1	<i>Métodos para o controle da dor</i>	20
3.1.2	<i>Anestésicos locais</i>	21
3.1.3	<i>Bupivacaína</i>	22
3.1.4	<i>Levobupivacaína</i>	23
3.2	Lipossomas	25
3.3	Termogel	26
4	METODOLOGIA	29
4.1	Insumo	29
4.2	Desenvolvimento e caracterização de lipossomas	29
4.2.1	<i>Tamanho e Índice de Polidispersão</i>	29
4.2.2	<i>Aplicação do Método de CLAE: Doseamento de Levobupivacaína (75S: 25R) em lipossomas e determinação da eficiência de encapsulação</i>	30
4.2.3	<i>Teor dos lipossomas</i>	31
4.2.4	<i>Incorporação dos lipossomas em termogel</i>	31
4.3	Caracterização das formulações	32
4.3.1	<i>Determinação do pH</i>	32
4.3.2	<i>Determinação do teor das formulações</i>	32
4.3.3	<i>Determinação da temperatura de transição</i>	32
4.4	Avaliação do potencial irritante	32
4.4.1	<i>Determinação da Permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP)</i>	33
4.4.2	<i>Teste em Membrana Córioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)</i>	35
4.4.3	<i>Teste em membrana Córioalantóide com coloração de Azul-Trypan (CAM-TBS)</i>	36
4.5	Teste de Biocompatibilidade Celular	37
4.6	Estudo de permeação <i>ex vivo</i>	38

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1	Desenvolvimento e caracterização das formulações	39
5.1.1	<i>Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo Levobupivacaína (75R: 25R)</i>	39
5.1.2	<i>Aplicação do Método de CLAE: Doseamento de Levobupivacaína (75S: 25R) em lipossomas e determinação da eficiência de encapsulação</i>	40
5.1.3	Incorporação do Lipossoma ao Termogel	41
5.2	Caracterização das formulações	42
5.2.1	<i>Determinação do pH</i>	43
5.2.2	<i>Determinação teor de Levobupivacaína (75S: 25R) nos formulações</i>	43
5.2.3	<i>Determinação da temperatura de transição</i>	43
5.3	Avaliação do potencial Irritante	45
5.3.1	<i>Avaliação da permeabilidade e opacidade em córnea bovina (BCOP)</i>	45
5.3.2	<i>Avaliação do teste da Membrana Cório Alantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM e CAM-TBS)</i>	45
5.4	Teste de Biocompatibilidade Celular	47
5.5	Estudo de permeação <i>ex vivo</i>	49
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A dor é um sintoma de causa e etiologia diversas, sendo indivíduos idosos, com sobrepeso e recém-operados aqueles mais acometidos, comprometendo sua qualidade de vida. Em se tratando especificamente da dor pós-operatória, para seu alívio, é necessário na maioria das vezes o uso abusivo de medicamentos entre eles analgésicos, antiinflamatórios ou ainda anestésicos e opiáceos (QUEIROZ, 2013). Este é o caso de pacientes que realizaram cirurgia de joelho ou algum procedimento de endodontia mais invasivo, por exemplo.

Dito isto, os anestésicos locais fazem parte de uma classe de escolha para tratar a dor pós-cirúrgica, cujo mecanismo farmacológico é o bloqueio reversível da condução nervosa de canais dos canais iônicos voltagem dependentes presentes nas membranas neurais (HARDMAN, 1996). No Brasil a lidocaína, prilocaína, mepivacaína, articaína, além de ropivacaína e bupivacaína são os mais utilizados (ALMEIDA, 2001).

A bupivacaína comercializada no Brasil na forma injetável unicamente, trata-se de uma mistura racêmica, que consiste em quantidades iguais de isômeros ópticos levobupivacaína S(-) e a dextrobupivacaína R(+). Este ativo provoca quadros de cardiotoxicidade e por isso foi desenvolvida a Levobupivacaína, que apresenta excesso do enantiômero S, se mostrando eficaz e menos neurotóxico e cardiotóxico. (SIMONETTI, 1997). A Levobupivacaína surgiu em 1999, com o registro da patente, sendo posteriormente produzida pelo Cristália Produtos químicos farmacêuticos LTDA, apenas como solução injetável, em concentrações de 0,25%, 0,5% e 0,75%, com ou sem vasoconstrictor, comercializada com a denominação de Novabupi®.

Considerando o uso deste ativo em diferentes formas farmacêuticas, visando uma ação local e aumento da duração de efeito quando da utilização em procedimentos pós cirúrgicos, nosso grupo de pesquisa desenvolveu formulações de termogel contendo a Novabupi® x%. Os resultados de permeação mostraram que, nesta forma farmacêutica fármaco permaneceu por mais tempo no local, podendo vir a ser um produto racional e eficaz (DE LIMA, 2018). Diante disto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar lipossomas contendo a Novabupi® incorporados em termogeis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar lipossomas contendo a Cloridrato de Levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% incorporados em termogéis visando obter o efeito prolongado da anestesia local no tratamento da dor pós-operatória

2.2 Objetivos Específicos

- Obter lipossomas contendo Cloridrato de em excesso enantiomérico Levobupivacaína a partir de fosfatidilcolina de soja (PC) e colesterol (CH);
- Caracterizar físico-quimicamente o sistema obtido;
- Incorporar os lipossomas ao termogel;
- Avaliar o potencial irritante das formulações através do método alternativo de opacidade e permeabilidade da córnea bovina (BCOP);
- Avaliar o potencial irritante das formulações através do método alternativo da membrana cório-alantoide do ovo embrionado de galinha (HET-CAM e CAM-TBS);
- Avaliar a biocompatibilidade celular das formulações através do ensaio de MTT;
- Avaliar a permeação *ex vivo* das formulações desenvolvidas e comparar com o termogel de levobupivacaína desenvolvido anteriormente;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Dor

É sabido que indivíduos idosos, de uma maneira geral e com sobrepeso, são um grupo que necessitam de cirurgias de, principalmente em joelhos, visando melhorar sua qualidade de vida (PACCA, 2018). Este público vem sofrendo cada vez mais de uma enfermidade conhecida como osteoartrite, que é definida como é um distúrbio degenerativo osteoarticular crônico, de origem multifatorial, com duas características patológicas localizadas: a destruição progressiva da cartilagem articular e a formação de osso nas margens das articulações (osteófitos), podendo gerar vários graus de limitação funcional, alterações psicológicas e redução na qualidade de vida devido a dor exacerbada, atingindo principalmente os joelhos, visto que são eles os responsáveis por sustentar o peso corporal. (NELSON, 2007; RILLO, 2016).

Outra modalidade que requer uma atenção especial em relação a procedimento pós-operatório relacionado à dor são os tratamentos odontológicos, uma vez que em sua maioria provocam estresse, medo e ansiedade nas pessoas, principalmente aqueles em que é necessária a injeção anestésica (DE SIQUEIRA, 2006). Além dos anestésicos locais, uma classe terapêutica muito utilizada são os antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) uma vez que eficazes para tratar dores leves a moderadas, especialmente em dores originadas no processo inflamatório ou lesão tecidual. (RANG et al., 2007; BORTOLUZZI, 2007). No entanto é comprovado que o uso excessivo de antiinflamatórios não-esteroidais podem causar uma serie de comprometimentos a saúde da pessoa acometida pela dor, principalmente relacionados ao trato gastrointestinal. (SANDOVAL, 2017).

Diante disso existe o interesse cada vez maior em minimizar o desconforto do paciente durante o tratamento odontológico e cirurgias intra-articulares, principalmente de joelho, uma vez que a presença constata da dor provoca diversos desconfortos e transtornos.

Justamente por ser umas das principais causas de sofrimento no homem, esta pode levar a diversos comprometimentos na qualidade de vida, além de vários problemas psicossociais e até econômico, podendo até se tornar em muitos casos problemas de saúde pública. (BOTEGA, F.H. & FONTANA, R. T).

A dor pós-operatória é classificada como dor aguda, sendo uma combinação de lesão tecidual, dor e ansiedade, relacionada principalmente ao problema pelo qual foi feita a cirurgia (PIMENTA, 2001). A ocorrência de dor pós-operatória depende de diversos fatores, sejam eles culturais, psicológicos como ansiedade, depressão, medo, do trauma cirúrgico, da habilidade técnica do cirurgião, das doenças prévias, do local e do tipo da incisão. Sabe-se que as diferenças individuais estão relacionadas aos processos de modulação da dor ao nível do sistema nervoso central, as quais podem explicar porque sua intensidade varia, de indivíduo para indivíduo, quando intervenções semelhantes são realizadas. (EISENACH, 1993).

As dores aguda e crônica envolvem substratos neurofisiológicos e farmacológicos distintos na transmissão do impulso desde a periferia até o sistema nervoso central. Na periferia estão localizados os receptores que emitem o sinal para a via de propagação do estímulo doloroso para a medula espinhal. Na medula estão localizados os corpos celulares dos neurônios que projetam os estímulos para o nível encefálico. A dor crônica persistente pós-operatória (DCPO), no entanto persiste por dois meses ou mais após o ato cirúrgico, quando se excluem quaisquer outras causas de dor, como, por exemplo, uma infecção (WU, 2011). Também é importante entender que a dor crônica pós-operatória tem um ponto de partida e é persistente após cirurgia, refletindo diretamente no retorno do indivíduo as atividades da vida diária e afeta, assim, sua capacidade e produtividade (JOSHI, 2005).

A dor pode ser gerada por estimulação direta de nociceptores que são terminações de vias aferentes de diferentes fibras, entre elas as mielinizadas e de alta velocidade de condução e as amielinizadas e de baixa velocidade de condução. Qualquer estímulo lesivo é captado por estes receptores transformando-o em sinal elétrico sendo propagado para as vias superiores através de potenciais de ação. A ativação destes receptores ocorre por liberação de substâncias ativadoras, como bradicininas e prostaglandinas, no local da lesão, sensibilizando os receptores responsáveis pela percepção da dor. No entanto, ocorre a liberação da histamina, que estimula diretamente o nociceptor e reduz o limiar para a ativação destes receptores. Desta forma, há o desencadeamento de um círculo vicioso através da retroalimentação promovendo a manutenção da resposta ao estímulo lesivo (DAVIES, 2001). Esta resposta leva as células do tecido danificado a liberar substâncias químicas que irão originar uma resposta imune capaz de influenciar a intensidade e a duração da dor (HADDAD, 2007).

3.1.1 Métodos para o controle da dor

Para controlar dor pós-cirúrgica relacionada a procedimentos intra-articulares, principalmente relacionadas ao joelho e também a procedimentos odontológicos invasivos, destaca-se a via farmacológica. O método concentra-se em bloquear a geração, transmissão e percepção dos estímulos nociceptivos, o que pode ser feito em diferentes níveis do sistema nervoso central e periférico. (CHAVES, 2003).

Dentre as várias formas de combate a dor, a analgesia multimodal com combinações de fármacos distintas classes terapêuticas, com mecanismos de ação distintos e com efeitos aditivos ou sinérgicos tendem a tratar de forma adequada a transmissão da dor. (JOSHI, 2005). Além do que, determinadas associações de drogas contemplam alvos inibitórios dos mecanismos de dor, sendo assim provocando sua diminuição, e ainda reduzindo riscos potenciais que estão relacionados aos medicamentos para dor, como por exemplo, quando os opióides estão em uso associado, onde é observada uma queda de até 40% dos efeitos adversos relacionados a náuseas, vômitos e sedação. (HAKEEM, 2011).

No Brasil, a Relação Nacional de Medicamentos (RENAME) inclui alguns medicamentos para o tratamento de dor, no entanto de forma geral o consumo desses medicamentos para tratar a dor crônica e dor aguda é feito com base na Organização Mundial da Saúde, pois de acordo com o grau da dor, ela será tratada com analgésicos/AINES (antiinflamatórios não-esteroidais) para dores leves, com analgésicos/AINES associado à opióide fraco para dor moderada e com analgésicos/AINE associado a um opióide forte para dores intensas, sendo necessário em alguns casos o uso de drogas adjuvantes como os antidepressivos e antiepiléticos e em outros casos, os anestésicos locais (PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES), mesmo sabendo que dentro de uma mesma classe inexistem superioridade de um fármaco sobre o outro. (CHOU, 2007).

Uma vez que essas classes citadas inibem a gênese e a condução do estímulo doloroso, pode-se ser administrados por diferentes vias, seja por meio de bombas de infusão, pelo sistema de analgesia controlada pelo paciente, ingestão oral ou aplicação local. (CHAVES, 2003; BASSANEZI,2006).

3.1.2 Anestésicos locais

Os anestésicos locais vem sendo mais utilizados desde os anos 2000. São classificados como aminas terciárias com propriedades anfifílicas sintetizados na década de 40. (Vieira et al., 2000). Eles atuam bloqueando a transmissão do estímulo nociceptivo, pois atuam na membrana celular bloqueando os canais de sódio das terminações nervosas. Sua administração pode ser feita por diferentes vias e doses, desde a aplicação mais simples como a via tópica no tratamento de queimaduras, ou infiltração em uma ferida, até a via peridural, intra-articular, e cirurgias de grande porte (Golan et al., 2009). A administração deve ser feita de acordo com as propriedades químicas e farmacológicas de cada fármaco, pois os ativos deste grupo diferem em potência, toxicidade, duração de ação, estabilidade, solubilidade e capacidade de penetrar nas mucosas. (CARMONA, 2012).

Os anestésicos locais possuem em sua maioria um grupo aromático (lipossolúvel, hidrofóbico) associado a um grupo amina (polar e hidrofílico). Esses dois grupos são ligados por uma cadeia intermediária que determina a classificação do anestésico local como amida ou éster. Os exemplos de amidas são a lidocaína, bupivacaína e prilocaína. Figura 1 (EDGCOMBE, 2005).

Outro parâmetro importante é que a potência do anestésico local está ligada a sua lipossolubilidade. Portanto, quanto maior a afinidade do anestésico pela membrana, menor será a quantidade administrada para o fármaco produzir o bloqueio neural. (KLAUMANN, 2007). E quanto a duração, ela está relacionada diretamente com a ligação do agente as proteínas plasmáticas, pois quanto maior a quantidade de proteínas ligadas ao fármaco, maior o tempo de duração. No entanto, a proteína de maior afinidade é a α -1globulina, que normalmente apresenta baixos níveis séricos. Sobretudo, é bom deixar claro que tempo de ação, dose administrada e o uso de vasodilatadores, por exemplo, são fatores que interferem diretamente na maneira de resposta do medicamento. (MCLURE, 2005). Também é válido salientar que a velocidade de ação dessa classe é inversamente proporcional ao grau de ionização, ou seja, vai depender diretamente da constante de ionização do fármaco e do pH em que ele se encontra. (MCLURE, 2005).

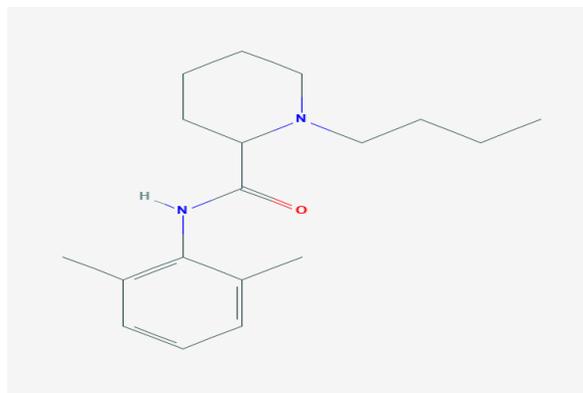
Quando se fala em anestésico local, inicialmente pensa-se em pequenos procedimentos associados ao uso da lidocaína, pois produzem um bloqueio motor e sensorial rápido e intenso em

baixas concentrações, por isso ela pode ser usada em forma de gel, pomada, cremes e aerossóis. Devido a sua rápida ação e também eliminação, além do seu baixo potencial tóxico. No entanto, ainda pode ser usada em para bloqueios raquidianos, porém em concentrações bem maiores, o que não seria indicado uma vez que podem levar a neurotoxicidade. (MCLURE, 2005; COVINO, 1996). Contudo, o anestésico local, deve ser usado preferencialmente em baixas concentrações, além de dar preferência a fármacos que tenham um limiar de concentração maior, a fim de diminuir a toxicidade cardiocirculatória, principalmnete em relação ao controle da dor pós-operatório. Uma vez quem o uso constante exige um aumento progressivo na dose utilizada, levando a efeitos indesejáveis como hipotensão arterial. (BASSANEZI, 2018)

3.1.3 Bupivacaína

A bupivacaína é um anestésico local com um grupo aromático associado a um grupo amina. (Figura 2). Esses dois grupos são ligados por uma cadeia intermediária que a classifica com uma amida. (EDGCOMBE, 2005).

Figura 1- Estrutura química da Bupivacaína.



Fonte: Pubchem.com

No Brasil, o medicamento é comercializado na forma de cloridrato de Bupivacaína e a apenas na forma de injetável (BRASIL, 2013). De acordo com o Draft publicado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2018, este fármaco se apresenta na forma de injeção lipossomal, cujo nome comercial é Exparel®, comercializado nos Estados Unidos.

A Bupivacaína trata-se de uma mistura racêmica, que consiste em quantidades iguais de isômeros ópticos, a levobupivacaína S(-) e a dextrobupivacaína R(+), e foi primeiramente utilizada para raquianestesia em 1966, nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1% com e sem epinefrina (LYON, 1998; EKBLUM, 1966). No entanto, foi observado que a bupivacaína leva a quadros de cardiotoxicidade, sendo esse efeito mais relacionado ao enantiômero (FOSTER, 2000).

Ela é administrada via intra-articular, por alguns cirurgiões ortopédicos, a fim de prevenir a dor aguda em cirurgias de joelho, além de via subcutânea, utilizada para anestesia, também pela via intra-operatória para analgesia pós-operatória e no tratamento da dor crônica, sendo utilizada em obstetrícia na anestesia peridural lombar. (IMANI, 2015; BABST, 1978).

3.1.4 Levobupivacaína

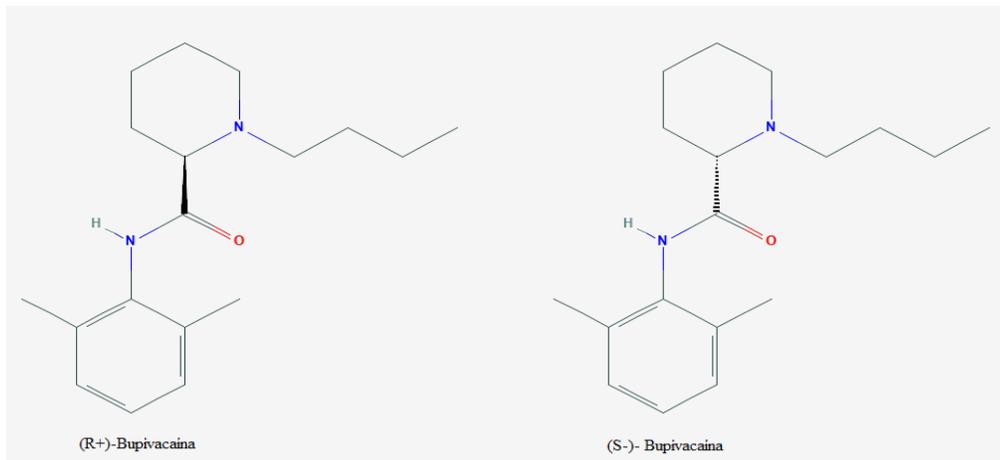
A Levobupivacaína é o enantiômero (S-) na Bupivacaína, (figura 3) que foi descrito na literatura em meados dos anos 80, por Federsel, obtida principalmente por diastereoméricos de bupivacaína ou seus intermediários sintéticos, a partir de então, houve o interesse de purificar a mistura racêmica para obtenção apenas da molécula levógira. Ela foi então introduzida na rotina clínica, pois estudos mostraram que ela é levobupivacaína é aproximadamente 40% menos tóxica que a bupivacaína, mas não difere da ropivacaína em letalidade, com menor cardiotoxicidade e também é menos tóxica em nível de sistema nervoso central. (MORRISON. 2000). Por meio de estudos clínicos, foi comprovado que a levobupivacaína provoca uma menor reação neurotóxica como convulsões, por exemplo, e também cardiótóxicas, como arritmias e taquicardias. (FOSTER, 2000).

Atualmente, no mercado brasileiro a Levobupivacaína está disponível na forma de cloridrato em solução injetável nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 0,75%, com ou sem vasodilatador (epinefrina). O laboratório farmacêutico responsável pela sua produção é o Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Limitada e comercialmente o medicamento é conhecido com Novabupi®. (NOVABUPI, 2013).

De maneira geral a Novabupi®, S-enantiômero da bupivacaína, em excesso enantiomérico de 50% (75% de levógira e 25% de dextrógira) é um pó cristalino, com fórmula

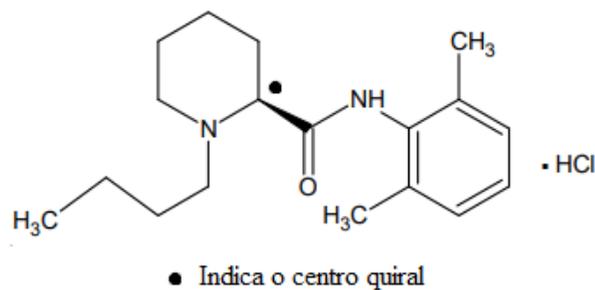
molecular $C_{18}H_{28}N_2O \cdot HCl$, cujo peso molecular é de 324,9, e com a seguinte fórmula estrutural (Figura 4).

Figura 2- Estrutura química da Dextrobupivacaína ou (R+)-Bupivacaína e da Levobupivacaína ou (S-)-Bupivacaína



Fonte: Pubchem

Figura 3- Estrutura química do cloridrato de Levobupivacaína (Novabupi®)



Fonte: NOVABUPI, 2013.

Sua solubilidade em água é cerca de 100 mg/mL a 20°C, o coeficiente de partição (álcool olefílico/água) é 1624 e o pKa é 8,09. Valores bem próximos do cloridrato de bupivacaína tendo como coeficiente de partição de 1565 e pKa igual ao cloridrato de levobupivacaína. A Novabupi® é incompatível com soluções alcalinas cujo pH seja superior a 8,5. Entretanto estudos demonstraram compatibilidade com cloreto de sódio 0,9% injetável. (NOVABUPI, 2013).

3.2 Lipossomas

Inicialmente, as estruturas lipossomais foram descritas em 1965 por Bangham como vesículas microscópicas esféricas, formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas, separadas por água, ou em outra solução aquosa, sendo capazes de incorporar compostos de natureza hidrofóbica e hidrofílica, distribuídas ao longo da estrutura por afinidade, ainda são biocompatíveis e não são reconhecidas pelo sistema imunológico como corpos estranhos. (PUISIEUX, 1995; BAEUMNER, 2006). Os lipídeos mais utilizados na preparação de lipossomas são os que apresentam uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline, pois tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio, elas são usadas em ao colesterol pois constituem a parte estrutural das membranas biológicas. (BATISTA, 2007).

Como os constituintes básicos usados para preparar os lipossomas não semelhantes a estruturas biológicas, eles são considerados vesículas biocompatíveis e biodegradável. Eles são classificados como unilamelares quando formados apenas uma bicamada lipídica ou multilamelares caso haja mais uma bicamada presente. Quanto ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas ou grandes, sendo caracterizadas como lipossomas unilamelares pequenos - SUV (small unilamellar vesicles) e lipossomas unilamelares grandes - LUV (large unilamellar vesicles). (CHANG, 2012)

A tecnologia de preparo vai depender que qual tipo de lipossoma deseja-se obter. No caso para lipossomas multilamelares o pelo método de hidratação lipídica, descrito por Bangham, 1971, que consiste em solubilizar os lipídios em solvente orgânico, remover os solventes orgânicos através de rota-evaporação, seguida da dispersão dos lipídios em meio aquoso e uniformização do tamanho das partículas.

Sabe-se que terapeuticamente, os lipossomas apresentam uma variedade de aplicações, seja veiculando antibióticos, antivirais, anestésicos e outros. Atualmente no Brasil são comercializadas, por exemplo, fórmulas lipossomais de Anfotericina B, conhecida como Ambisome®, cuja indústria farmacêutica responsável é a UNITED MEDICAL LTDA e Caelyx®

cujo ativo é o cloridrato de doxorubicina lipossomal peguilado, registrado por JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA LTDA. (BATISTA, 2007).

O uso de lipossomas se torna interessante frente as formas farmacêuticas convencionais, sejam elas parenterais de ação sistêmica ou de aplicação local, uma vez que aumentam o tempo de liberação do principio ativo, sem aumentar a dosagem, diminuindo assim a toxicidade, além de diminuir a frequência de aplicação (CHAHAR, 2012).

3.3 Termogel

O processo de geificação descrito por Kistler em 1932 descreveu que existe a formação de uma estrutura organizada que garante a forma de gel, que consiste em um sistema semissólido, onde há pequenas ou grandes moléculas dispersas, os agentes gelificantes, em um veículo líquido, adquirindo consistência semelhante a geléias, como por exemplo, os derivados de celulose como a hidroxipropilmetilcelulose ou derivados do ácido acrílico. (ALLEN JR, 2013). A formação da estrutura se dá pela neutralização química ou reticulação física (JEONG, 2002). A transição de uma solução para um gel é um fenômeno onde uma suspensão ou uma solução coloidal se transforma em gel devido às ligações e interações entre as partículas, formando uma rede sólida polimérica tridimensional, resultando em um sistema viscoso e estruturado. (HIRATSUKA, 1995).

Com a evolução da indústria farmacêutica, foi necessário o avanço tecnológico para lidar com problemas médicos, o que se tornou mais responsivos aos estímulos externos, resultando em uma nova classe de biomateriais "inteligentes", que respondem estímulos ambientais como mudança de pH, luz e temperatura, que vai desde a modificação de sua forma, solubilidade, características da superfície e até transição de fase sol-gel. Para tanto surgiram novos polímeros, com base na sua aplicação, os biomateriais foram definidos como tipos de material usado em dispositivos médicos, e a base acadêmica do campo estava na ciência dos materiais e na engenharia clássica. Inicialmente os materiais foram projetados para executar funções mecânicas, no entanto houve uma ampliação para seu uso. (HUEBSCH, 2009).

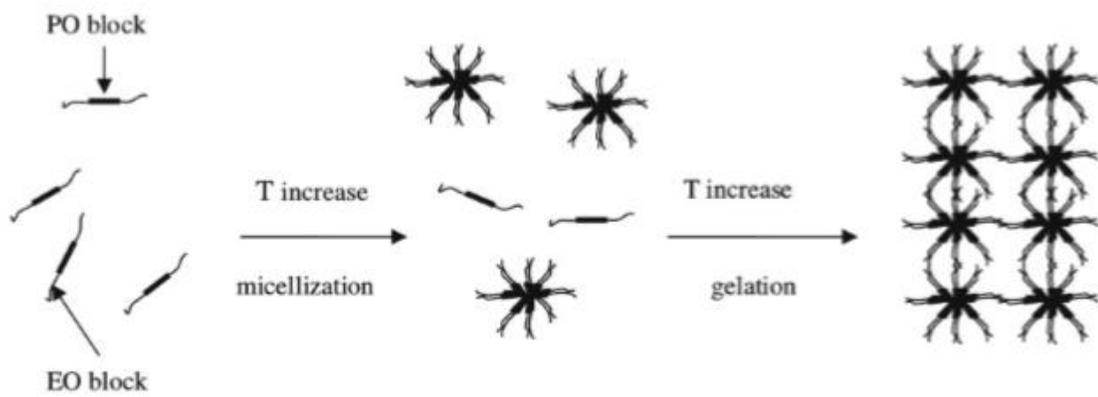
O termogel é uma forma farmacêutica, constituído em parte por um polímero, que permite a ele ter uma característica, que é ser termorreversível, ou seja, que responde a uma mudança na

temperatura, geralmente a temperatura do corpo. Essa propriedade é única do termogel, onde as formulações são preparadas em uma concentração tal que a 25 °C, um termogel possa ser um líquido (sol) e a 36 °C (gel), ou seja, capaz de sofrer uma transição sol-gel reversível para formar um gel sólido.

O polímero mais estudado e usado é conhecido como Pluronic, pois ele é usado desde nos anos 70, e foi introduzido no cenário comercial nos anos 50, inicialmente como agentes surfactantes em diferentes tipos de preparações, soluções orais, oftálmicas e produtos tópicos por exemplo. (SCHMOLKA, 1991; PARK, 2012.). Também conhecido como Poloxamer 407®, esse polímero se inclui na categoria de copolímero, com arranjos em três blocos não-iônicos, tendo um bloco central hidrofóbico de óxido de propileno e dois blocos hidrofílicos de óxido de etileno, com o aumento da temperatura, os triblocos se organizam na forma de micelas, esta forma caracteriza a gelificação, (figura 5), além dessa propriedade, o Poloxamer 407® é biocompatível e biodegradável, o que permitiu então seu uso em várias categorias médicas (DUMORTIER, 2006).

Para diferentes tipos de preparações, soluções orais, oftálmicas, produtos tópicos, por exemplo (PARK; et al., 2012; MOON; et al., 2012). O Poloxamer, quando em alta concentração (10% - 25%), apresenta o comportamento termossensível (RICCI; et al., 2004), sendo bastante estudado em sistemas de formação *in situ* (VINTILOIU; et al., 2008). Como a temperatura aumenta, as moléculas de copolímero de Poloxamer 407 agregam-se em micelas, esta micelização é seguida da geleificação (imagem 3) (DUMORTIER; et al., 2006).

Figura 4- Mecanismo de gelificação do Poloxamer 407®, copolímero de óxido de etileno e óxido de propileno.



Fonte: DUMORTIER, 2006.

4 METODOLOGIA

4.1 Insumo

O insumo farmacêutico ativo (IFA) o Cloridrato de Levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50%) foi cedido pelo Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Limitada. Todos os solventes e reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico e as vidrarias previamente calibradas.

4.2 Desenvolvimento e caracterização de lipossomas

Inicialmente os lipossomas foram preparados usando lipídeos a 42 mM (Fosfatidilcolina de ovo e Colesterol) e LBPV 2mg/mL, pelo método de hidratação do filme lipídico (BANGHAM, 1971), seguida de homogeneização por ultrassom. Os constituintes foram calculados e pesados mediante concentrações pré-definidas, onde os lipídeos foram dissolvidos juntamente com metade da LBPV numa mistura de clorofórmio e metanol (3: 1 v/v) sob agitação magnética, depois de dissolvidos, foram vertidos em balão de fundo redondo, sob rotação constante de 80 rpm e banho aquecido a 37°C, acoplado a um condensador, onde permaneceu até completa evaporação dos solventes, o tempo estimado foi de 40 minutos. O filme lipídico formado foi hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato de potássio (pH 5,0). A dispersão lipossomal foi então sonicada (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz durante 20 segundos de modo a obter vesículas multilamelares.

4.2.1 Tamanho e Índice de Polidispersão

O tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão dos lipossomas foram medidos por espectroscopia de autocorrelação de fótons utilizando um analisador de partículas a laser Zetasizer™ Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido).

4.2.2 Aplicação do Método de CLAE: Doseamento de Levobupivacaína (75S: 25R) em lipossomas e determinação da eficiência de encapsulação

O método CLAE-UV para determinar a quantidade de fármaco nas amostras foi previamente desenvolvido e validado seguindo a RDC nº 166, de 2017 (ANVISA), no NUDFAC. As análises foram realizadas em um sistema constituído por um Cromatógrafo Shimadzu modelo Nexera 2. A separação foi realizada pela coluna de fase reversa Shimadzu® 150 × 4,60 mm C18 (5 µm) sob um fluxo de 1,2 mL/min, calibrado com uma curva de 5-200 µg/mL. A fase móvel foi composta de metanol: solução de bicarbonato de amônio, 20 mM (70:30, v /v) (DE LIMA, 2018).

Para a determinação quantitativa presendo no lipossoma de LBPV transferiu-se uma alíquota da forma lipossomal equivalente a 50µg do fármaco (125µL) para balão volumétrico de 5mL, onde em seguida, completou-se o volume de metanol. A solução foi submetida à sonicação (procedimento que utiliza a energia de ondas sonoras a fim de promover a agitação das partículas contidas em um recipiente) por 5 minutos para romper a estrutura dos lipossomas e liberar o conteúdo encapsulado. A solução foi filtrada (Filtros Milex® 0,22 mm, Millipore, EUA) e a concentração de LBPV foi determinada mediante ao método de doseamento estabelecido. Os ensaios foram realizados em triplicata.

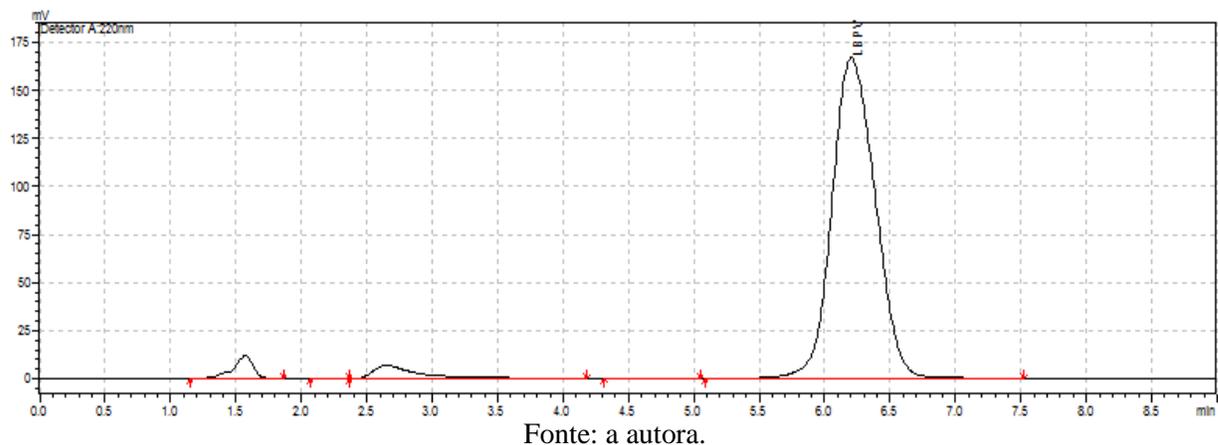
A eficiência de encapsulação foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação utilizando unidades filtrantes Microcon® (Millipore, EUA), na qual as amostras de lipossomas (500µL) foram centrifugadas (Ultracentrífuga, modelo Eppendorf 5417R) a 14.000 rpm por 40 min a 4°C (LIRA, et al, 2009). A concentração de Novabupi® no ultrafiltrado (fármaco livre) foi determinada. Por fim, a eficiência de encapsulação (%) foi calculada pela diferença entre as concentrações do fármaco total na suspensão e não encapsulada (livre), de acordo com a equação abaixo.

$$EE\% = \frac{(teor - taxa\ de\ encapsulação) \times 100}{teor}$$

4.2.3 Teor dos lipossomas

A técnica usada para verificar o teor dos lipossomas de LBPV foi a Cromatografia líquida de alta eficiência, já citada anteriormente. Para a análise, foram retirados um volume de 125 μL do Lipossoma e diluídos em um balão volumétrico de 5 mL, seguido da agitação em Vortex (Fisatom 230V 60Hz 30W Modelo 771) por um minuto, a diluição foi feita para atingir a concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$ e assim ficar entre os pontos médios da curva de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, e analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta. Todas as avaliações foram feitas em triplicada.

Figura 5- Cromatograma da Novabupi®, pico referente ao ponto 5 da curva de calibração.



4.2.4 Incorporação do Lipossoma em termogel

A incorporação do lipossoma no termogel foi calculada de acordo com a concentração de cada componente, sendo assim foram desenvolvidas duas formulações finais com lipossomas e outra que foi anteriormente desenvolvida por De Lima, 2018, que também foi adicionada ao grupo para comparação.

4.3 Caracterização das formulações

4.3.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado através de pHmetro modelo PG 1800 (GEHAKA®), previamente calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0, à temperatura ambiente.

4.3.2 Determinação do teor das formulações

Para a análise do teor das formulações finais desenvolvidas, foi usada a mesma metodologia feita para o teor dos lipossomas, onde foram retirados um volume de 125µL da formulação e diluídos em um balão volumétrico de 5 mL, seguido da agitação em Vortex (Fisatom 230V 60Hz 30W Modelo 771) por um minuto, a diluição foi feita para atingir a concentração de 125µg/mL e assim ficar entre os pontos de 100 µg/mL e 150 µg/mL da curva, esta diluição serve para a formulação 1 e 2, já para a formulação 3, cujo concentração é de 1mg/mL, a diluição foi feita para atingir a concentração de 25µg/mL e assim ficar entre os pontos de 20 µg/mL e 50 µg/mL da curva. As amostras foram analisadas posteriormente pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta. Todas as avaliações foram feitas em triplicada.

4.3.3 Determinação da temperatura de transição

O comportamento de transição sol-gel sensível à temperatura do copolímero solução ou suspensão foi investigada pelo método de inversão em tubo de ensaio.

4.4 Avaliação de Potencial Irritante

A avaliação de medicamentos e cosméticos potencialmente irritantes a pele através da utilização de métodos alternativos tem sido bastante estimulada sobre seu uso, uma vez que tende a

reduzir o sofrimento e o número de animais utilizados em estudos *in vivo*, sendo então implementados testes sequenciais a partir de testes mais simples e sofisticados (Cazarini, 2004).

4.4.1 Determinação da permeabilidade e opacidade em córnea bovina (BCOP)

O teste foi realizado de acordo com o protocolo nº 437 da OECD. Para a realização do BCOP as córneas bovinas foram divididas em 2 grupos: teste e controle (utilizando 4 córneas por formulação). Os olhos de boi foram adquiridos no matadouro do município de Paulista e avaliados quanto à integridade, com objetivo de descartar as córneas com algum tipo de imperfeições como cortes, arranhões e áreas opacas. Foi utilizado solução salina (NaCl 0,9% p/v) e solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N como controle negativo e positivo, respectivamente.

As córneas foram excisadas e montadas nos suportes do opacitômetro (modelo OP-KIT 3.0) como mostrado nas Figuras 6 e 7. Os suportes foram previamente preenchidos com EMEM permitindo que as córneas mantenham suas características originais. As córneas já montadas ficaram incubadas por 1 hora a 32 °C, após esse período, foi realizado a primeira leitura da opacidade no opacitômetro modelo OP-KIT 3.0, obtendo o valor inicial da opacidade (pré-teste). Na sequência, o EMEM foi removido da câmara anterior dos suportes, para aplicação de 750 µL de cada formulação sobre a superfície epitelial das córneas durante 10 minutos.

Em seguida, as córneas foram lavadas para remoção das formulações e incubadas novamente por 2 horas a 32°C. Por fim, a opacidade foi novamente verificada, sendo esse valor correspondente a opacidade pós-teste.

Figura 6- Excisão da córnea bovina.



Fonte: (IIVIS - BCOP, 2015).

Figura 7- Montagem da córnea bovina em holder (suporte do opacitômetro).



Fonte: Fonte: (IIVIS -BCOP, 2015).

Para determinação da permeabilidade, as córneas foram tratadas com 1 mL de solução de fluoresceína sódica a 0,4%. Após um período de 90 minutos, todo o meio contido na câmara posterior dos suportes foi removido e foi verificada a densidade óptica em 490nm (OD490).

O cálculo do índice de irritação *in vitro* (IVIS) é feito pela seguinte equação:

$$IVIS = \text{valor médio de opacidade} + (15 \times \text{média permeabilidade OD 490 valor})$$

Os valores obtidos foram enquadrados na classificação contida na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio BCOP.

Índice de irritação <i>in vitro</i> (IVIS)	Classificação
≤ 3	Sem categoria
$>3 \leq 55$	Não determinado
> 55	Categoria 1

Fonte: OECD (2013).

4.4.2 Teste de Membrana Corioalantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)

Para avaliação do potencial irritante das formulações, foram utilizadas três métodos alternativos, o primeiro descrito na *The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) referenciado no guia nº 07-4517, onde será verificado o potencial irritante das formulações mediante a reação da membrana corioalantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha em relação à presença de congestão, hemorragia coagulação/opacidade após o contato com a formulação teste.

Para cada formulação testada, foram utilizados seis ovos fertilizados de galinhas da raça Leghorn. Os ovos foram incubados a $37 \pm 0,5$ °C com umidade relativa de $65 \pm 2\%$ durante um período 10 dias (ICCVAM, 2010). Para os três métodos alternativos foram utilizados solução salina 0,9% NaCl como um controle negativo e solução de hidróxido de sódio 0,1N (NaOH). As formulações foram avaliadas sem diluição. (Figura 8).

No décimo dia de incubação, a casca do ovo foi removida ao redor da câmara de ar, evidenciando a membrana da casca, que também foi retirada (Figura 9), para expor o local alvo do teste, a membrana corioalantóide.

Na sequência, 300 µL de formulação foi adicionado sobre a superfície da membrana cório-alantóide edeixado em contato por 20 segundos, seguido de lavagem com solução salina, para a remoção da formulação, a membrana (CAM) observada por 5 minutos para determinar o aparecimento dos possíveis efeitos irritantes: hiperemia, hemorragia e coagulação. Pontuações foram atribuídas para cada efeito evidenciado (Tabela 2) e o potencial irritante definido (Tabela 3).

Tabela 2 - Pontuações atribuídas às alterações evidenciadas na membrana cório-alantoide.

Efeito	Tempo	Tempo		
		≤ 30 segundos	30 segundos < t ≤ 2 minutos	2 minutos < t ≤ 5 minutos
Hiperemia		5	3	1
Hemorragia		7	5	3
Coagulação		9	7	5

Tabela 3- Classificação final do potencial irritante no HET - CAM.

Faixa	Classificação final
0,00 a 0,99	Não irritante
1,00 a 4,99	Irritante leve
5,00 a 8,99	Irritante moderado
9,00 a 21,00	Irritante severo

Fonte: a autora

4.4.3 Teste em Membrana Corioalantóide com coloração Azul Trypan (CAM-TBS)

A fase inicial do teste é semelhante ao HET-CAM, onde são utilizados ovos no décimo dia de incubação e a membrana corioalantóide também é exposta, tendo contato com a formulação por 30 segundos, seguida remoção da formulação 0,5 mL de tampão fosfato contendo 0,1% de azul de trypan, que serve como indicador de lesão foram adicionados à membrana corioalantóide em uma zona delimitada por um anel de silicone. O excesso do corante foi removido com água destilada e a área da CAM que foi delimitada pelo anel de silicone foi recortada, colocada em tubo contendo 5 mL de formamida e, em seguida, agitada em vórtex e centrifugada (1500g por 10 min).

A absorbância do sobrenadante foi medida através de espectrofotometria a 595 nm. A quantidade de azul de trypan absorvido pela membrana corioalantóica foi calculada usando a equação abaixo (LAGARTO et al., 2006). (Equação 2)

$$\text{Corante absorvido} = \text{Absorbância} \times 5 \text{ nmol} / 1000 \times 109 \text{ [2]}$$

A curva de calibração do corante foi feita com soluções de azul de trypan em formamida nas concentrações 10^{-6} , 10^{-5} e 5×10^{-5} mol/L, lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. As formulações foram classificadas de acordo com os parâmetros:

- 0-6,99 corresponde a não irritante/ligeiramente irritante (NI / SLI);
- 7,00- 14,50 correspondente a moderadamente irritante (MI);
- $\geq 14,50$ correspondente a irritante severo (SI).

4.5 Teste de Biocompatibilidade Celular

O teste de biocompatibilidade celular é realizado para verificar a compatibilidade de um determinado tipo celular com as formulações e seus constituintes a serem testados, através do complexo piruvato- desidrogenase complexo enzimático presente na mitocôndria (teste MTT). Para o estudo, foi usada uma linhagem celular do tipo Fibroblasto (NIH 3T3), onde as mesmas foram cultivadas, colocadas nos 96 poços da microplaca, com meio de cultura DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media), e novamente incubadas, a 37°C/24h, a fim de se obter uma densidade celular equivalente a 10⁴ Células por poço (SEOL, 2013). No total foram testadas sete formulações, que estão descritas na Tabela 4 abaixo. Inicialmente, a concentração de LBPV era de 1mg/mL, sendo então necessária uma diluição em meio de cultura DMEM, sem modificar qualquer parâmetro a diante. Após a incubação das microplacas, já com as células crescidas, foram adicionadas as formulações diluídas em meio de cultura DMEM nas seguintes concentrações: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25µg/mL e em seguida incubadas novamente por 24h/37°C. Após a incubação, foram retirados 200µL do meio de cultura DMEM e adicionados 25 µL de MTT (4mg/mL), sendo novamente incubados por duas horas e observando a cada meia hora se houve a formação dos cristais de Formazan.

Tabela 4- Formulações testadas no ensaio de biocompatibilidade.

Formulação	Constituintes
1	Fármaco(1mg/mL)
2	Lipossoma Branco (240mM)
3	Lipossoma Fármaco(240mM-3mg/mL)
4	Termogel (P407-10%) (0,02%-HEC)
5	Termogel-Fármaco (5mg/mL)
6	Termogel Lipossomas-Fármaco (1mg/mL)
7	Termogel-Fármaco Lipossomas-Fármaco 5mg/mL)

Fonte: a autora.

4.6 Estudo de permeação *ex vivo*

Os experimentos em ratos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (Registro nº 23076.007923 / 2017-61) e realizados em células de difusão vertical de Franz (sistema de teste de difusão automatizado Vision® Microette, Chatsworth, EUA). A pele de rato Wistar foi obtida por excisão após a eutanásia com dose letal de isoflurano, por excisão e mantida em leito com temperatura controlada (37 °C) durante a aplicação subcutânea de 0,5 mL da formulação. No final, a pele foi montada entre a câmara doadora e receptora das células de difusão. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato + azida de sódio 0,01 M, pH = 7,4, sob aquecimento com circulação de água (37 °C) e agitação magnética (300 rpm). Alíquotas de um mililitro foram recolhidas (a percentagem de LBPV foi analisada por CLAE-UV) em intervalos de tempo predeterminados (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h) e substituídas automaticamente, com um volume igual do meio receptor (DE LIMA, 2018).

Figura 8 - Representação da célula de difusão de Franz.



Fonte: Adaptado de Silva (2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Desenvolvimento da formulação

5.1.1 Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo Levobupivacaína (75S: 25R)

Como descrito na metodologia, os lipossomas foram formulados através do método de hidratação do filme lipídico (BANGHAM, 1971), seguida de homogeneização por ultrassom onde foram testadas diferentes concentrações de colesterol e fosfatidilcolina. No mercado internacional existe uma suspensão injetável de lipossomas de bupivacaína para uso local e pós-cirúrgico, (EXPAREL®). Estima-se que a concentração de lipídeos deste produto varia entre 30 e 60mM. Diante disto, no nosso desenvolvimento, partimos de uma concentração total dos lipídeos de 42mM e 2mg/mL de LBPV (L1). No entanto não houve estabilidade da formulação obtida, não sendo possível verificar o tamanho de gotícula nem o índice de polidispersão. Nesta formulação o teor do ativo foi de 108% e a eficiência de encapsulação 18,9%. Este resultado demonstra que praticamente não houve encapsulação do fármaco, e por isto optou-se por aumentar a concentração de lipídeos para 120mM e manter a mesma concentração do fármaco em 2mg/mL (L2). Esta nova formulação apresentou teor de 96,1% e eficiência de encapsulação de 70,6%. Ou seja, a concentração de lipídeos interfere diretamente no aprisionamento do fármaco dentro das vesículas. Da mesma forma da formulação anterior, não foi possível verificar o tamanho de gotícula nem o índice de polidispersão.

A próxima formulação (L3) foi desenvolvida com a concentração de lipídeos de 240mM e a concentração da LBPV de 3mg/mL. Os resultados demonstraram lipossomas estáveis, com um tamanho de gotícula de $334,8\text{nm} \pm 4,17$ e índice de polidispersão de 0,45.

Vale salientar que o valor ideal para o IP é menor que 0,3. O teor obtido foi de 79,57% e a eficiência de encapsulação foi de 83,29%, não sendo suficiente, para o objetivo pretendido. Na tentativa de aumentar a concentração do fármaco, formulou-se outros dois lipossomas (L4 e L5) com concentrações de LBPV de 3,4mg/mL e 4mg/mL. As eficiências de encapsulação foram de 54,07% e 30,6%, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, a formulação escolhida

foi a L3, uma vez que se melhor se enquadrou nos objetivos traçados para o desenvolvimento. Todos os dados podem ser visualizados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5- Resumo dos lipossomas desenvolvidos.

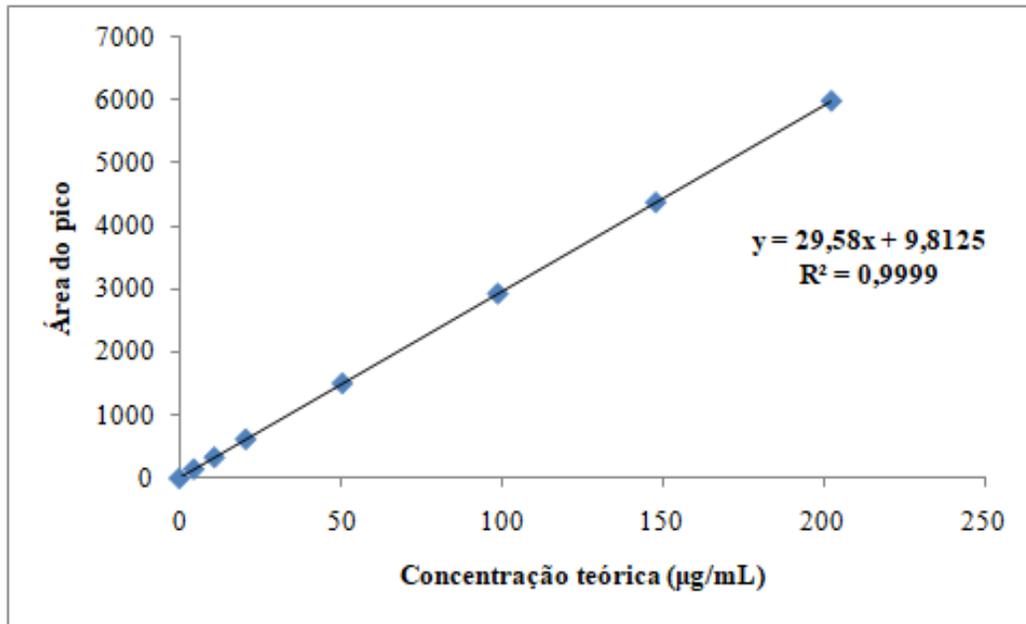
Formulação	Lipossoma	LBPV Fase org. (mg)	LBPV Fase aq. (mg)	Tamanho de Partícula ± DP (nm)	PDI	Teor (%)	EE (%)	Estabilidade
L1	42 Mm (2mg/mL)	10	-	-	-	108	18,9	Instável
L2	120 mM (2 mg/mL)	10	-	-	-	96,1	70,6	Instável
L3	240 mM (3 mg/mL)	10	5	334,8 ±4,17	0,451	79,57	83,29	Estável
L4	240 mM (3,4mg/mL)	10	7	398,75 ±0,13	0,38 ±22,2	79,06 ±0,23	54,07	Estável
L5	240 mM (4 mg/mL)	10	10	247, 43 ±3,52	0,40	67,23	30,6	Estável

Fonte: a autora.

5.1.2 Aplicação do Método de CLAE: Doseamento de Levobupivacaína (75S: 25R) em lipossomas e determinação da eficiência de encapsulação

O método de doseamento da LBPV foi descrito anteriormente por De Lima, 2018 e já validado no NUDFAC. A curva de calibração do ativo demonstrou que o método é linear no intervalo de 5 - 200µg/mL. A equação da reta obtida foi $y = 29,58x - 9,8125$, com um coeficiente de correlação de $r^2 = 0,9999$. Segundo a ANVISA (BRASIL, 2017), o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de r^2 obtido na análise do fármaco pelo método CLAE-UV reproduzido obedece aos limites estabelecidos (Figura 9).

Figura 9- Curva de regressão linear, obtida da média de três curvas de calibração autênticas.



Fonte: a autora.

5.1.3 Incorporação do Lipossoma ao Termogel

No desenvolvimento do termogel, diferentes concentrações de Poloxamer foram testadas. A formulação final (termogel base) foi composta por Poloxamer 407 (Pluronic F-12 ®) 15 % (p/p), hidroxietilcelulose 0,2% (p/p) e solução salina (NaCl 0,9%) q.s.p a 5°C, através do “Cold Method” (SCHMOLKA, 1972) adaptado. (DE LIMA, 2018). Como o intuito era a obtenção de um termogel contendo LBPV na concentração de 5mg/mL, foram incorporados 3,34 mL do Lipossoma L3 (0,3% LBPV) e 4mg de LBPV qsp termogel base. Ao final foram obtidas as formulações descritas na Tabela 6.

Tabela 6- Composição das formulações desenvolvidas.

Formulação	F1	F2	F3
Composição	P407 15%	P407 15%	P407 15%
	HEC 0,2%	HEC 0,2%	HEC 0,2%
	LBPV 0,5%	Lipossoma (0,3%) (3,34mL)*	Lipossoma (0,3%)(3,34mL)*
	Sol. Salina 0,9% q.s.p 10 mL	LBPV@ 0,4%	Sol. Salina 0,9% q.s.p 10 mL
		Sol. Salina 0,9% q.s.p 10mL	

Fonte: autoria própria.

*3,34mL correspondem 0,1% de LBPV no Lipossoma

5.2 Caracterização das formulações

5.2.1 Determinação do pH

Fluidos e medicamentos são infundidos em diversos tecidos, incluindo a hipoderme quando se utiliza a via subcutânea. A espessura da hipoderme varia nas pessoas conforme o local do corpo e tende a ser maior em mulheres (Richter et al, 2012). A absorção de medicamentos por via subcutânea depende dos capilares sanguíneos e linfáticos presentes nos septos da hipoderme, onde os medicamentos hidrossolúveis cujo pH esteja mais próximo neutralidade (7,38-7,45) são compatíveis com a via subcutânea. De acordo com a literatura, alguns medicamentos com pH ácido podem ser administrados pela via subcutânea, desde que isso seja feito de forma mais lenta, como por exemplo haloperidol (pH: 3,0–3,8), metoclopramida (pH: 3,0–5,0), ondansetrona (pH: 3,5), brometo de N-butilescopolamina (pH: 3,7–5,5) e levomepromazina (pH: 3,2–4,7). (AZEVEDO, 2016). No caso das formulações estudadas, os pHs encontraram-se na faixa de 5,2 a 7,15 (Tabela 7). (CRISTALIA; 2016).

Tabela 7- Valores de pH.

Formulação	pH a 8°C	pH a 25°C	pH a 37°C
Tgel (branco)	6,93 ± 0,06	6,97 ± 0,12	6,99 ± 0,09
F1-Termogel LBPV 0,5%)	6,81 ± 0,10	7,15 ± 0,07	7,04 ± 0,1
F2-Termogel (LBPV 0,4%) +L3 (lipossomas 0,1%)	5,61±0,14	5,40 ± 0,19	5,57 ± 0,23
F3-Termogel L3 (lipossomas 0,1%)	5,65 ± 0,06	5,52 ± 0,08	5,60 ± 0,05
F4- L3 (lipossomas 0,3%)	5,28 ± 0,16	5,36 ± 0,08	5,4 ± 0,15

Fonte: a autora.

5.2.2 Determinação teor de Levobupivacaína (75S: 25R) nos formulações

Quanto ao teor do ativo (LBPV), como demonstrado na Tabela 8, as amostras apresentaram teores dentro dos limites recomendados pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), que devem ser entre 90 e 110%.

Tabela 8- Valores do teor das formulações.

Formulação	F1	F2	F3
Teor	106%	98,9%	99,19%

Fonte: a autora.

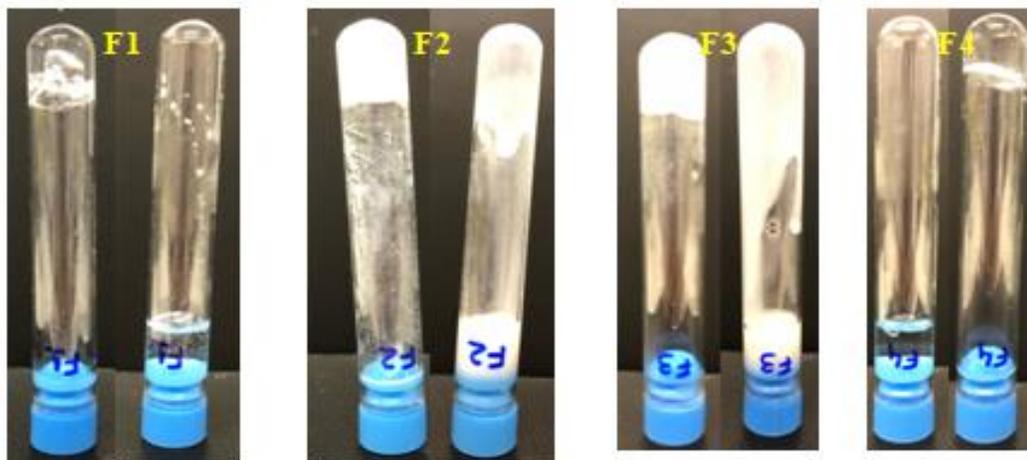
5.2.3 Determinação da temperatura de transição

Foram colocados 2mL do termogel em tubo, que foi imerso em água gelada (4°C) por 10 min para recuperar o estado de solução. Este processo foi repetido várias vezes. Para determinar a transição sol-gel temperatura ambiente, Tgel, o frasco de amostra foi imerso banho-maria à

temperatura desejado por 15 min, retirado do banho-maria e depois invertido repetidamente. A temperatura foi aumentada gradativamente. (YOSHIDA, 2014).

Os frascos contendo as formulações foram transferidos para um banho de água e a temperatura gradativamente. A transição da gelificação foi verificada invertendo o balão horizontalmente por 2 minutos na mesma temperatura para permitir o equilíbrio. A gelificação foi considerada completa quando a amostra já não deslizou no balão, como pode ser observada na figura 10 abaixo.

Figura 10- Tubos invertidos mediante a verificação de temperatura de transição sol-gel



Fonte: a autora.

5.3 Avaliação de Potencial Irritante

5.3.1 Avaliação da permeabilidade e opacidade em córna bovina (BCOP)

Em relação à avaliação do BCOP, as formulações não foram classificadas quando ao potencial irritante, uma vez que os resultados obtidos foram classificados como indeterminados, como pode ser observados na Tabela 9.

Tabela 9- Resultado do BCOP para as formulações.

Formulação	Pontuação (Média ± DP)	Classificação Final
F1	53,30 ± 29,48	Não Determinado
F2	43,43 ± 43,47	Não Determinado
F3	42,93 ± 37,44	Não Determinado
NaCl 0,9% Controle Negativo)	0	Sem Categoria
NaOH 0,1N (Controle Positivo	392,85 ± 73,00	Categoria 1

Fonte: a autora.

Apesar do potencial dos métodos alternativos apresentados neste estudo, eles não são amplamente utilizados e poucos estudos na literatura empregaram esses métodos. No entanto, estes testes devem ser merecidos porque oferecer objetividade e padronização de resultados. Em contraste com os métodos que envolvem animais que produzem resultados subjetivos. (CAZEDEY, 2009).

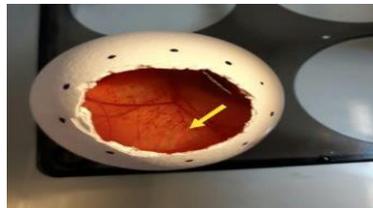
5.3.2 Avaliação do teste da Membrana Cório Alantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM e CAM-TBS)

Os testes avaliaram o potencial irritante de preparações sobre a membrana cório-alantóide (CAM) do ovo embrionado da galinha. Atualmente no Brasil, o HET-CAM e o CAM-TBS estão passando pelo processo de validação. Entretanto, este primeiro método já é considerado válido

pelo ECVAM (SOUSA, 2016). O teste CAM-TBS complementa o teste HET-CAM clássico, uma vez que obtemos dados quantitativos pela medição do corante de azul de *trypan* absorvida pelas células da CAM expostas pelas formulações testadas (LAGARTO et al., 2006).

Ambos os ensaios foram realizados em sextuplicatas, dados em média com desvio padrão, e as formulações testadas foram a F1, F2 e F3. Pelos resultados obtidos, foi possível classificar cada formulação em relação ao seu potencial irritante, como é mostrado na Tabela 10. Diante dos resultados, pode-se concluir que a membrana córneo-alantóide não apresentou nenhuma reação irritativa mediante ao contato com a solução salina de NaCl 0,9% (controle negativo) bem como com as formulações testadas (F1, F2 e F3), no entanto o mesmo não ocorre com a solução de NaOH 0,1 N (controle positivo), como já era esperado, uma vez que esta solução é testada para confirmar uma irritação de moderada a grave (Figura 11).

Figura 11- Hemorragia e coagulação dos vasos sanguíneos mediante a aplicação da solução de NaOH 0,1N usado como controle positivo no teste de HET-CAM.



Fonte: a autora.

Tabela 10- Resultado do HET-CAM e CAM-TBS para as formulações placebo contendo fármaco.

Formulação	HET - CAM (Média ± DP)	Classificação Final	CAM-TBS (Média ± DP)	Classificação Final
F1	0,166 ± 0,40	Não Irritante	2,32 ± 2,04	NI / SLI
F2	0,83 ± 0,40	Não Irritante	1,05 ± 1,26	NI / SLI
F3	0,83 ± 0,40	Não Irritante	0,90 ± 1,22	NI / SLI
NaCl 0,9% Controle Negativo)	0 ± 0	Não Irritante	4,83 ± 3,02	NI / SLI
NaOH 0,1N (Controle Positivo)	6,0 ± 1,09	Irritante Moderado	12,26 ± 6,01	MI

Fonte: a autora.

5.4 Teste de Biocompatibilidade Celular

Inicialmente, as formulações foram diluídas em meio de cultura DMEM, de tal forma que a IC50 da LBPV, de 168 μ M (SHIN, 2014). Após a incubação das microplacas, já com as células crescidas às formulações diluídas foram colocadas nos poções e incubadas novamente por 24h/37°C. Após a incubação, foi retirado 200 μ L do meio de cultura DMEM e adicionado 25 μ L de MTT (4mg/mL), e incubadas novamente por duas horas, sendo observadas a cada meia hora, para caso houvesse a formação dos cristais de Formazan. (SEOL,2013).

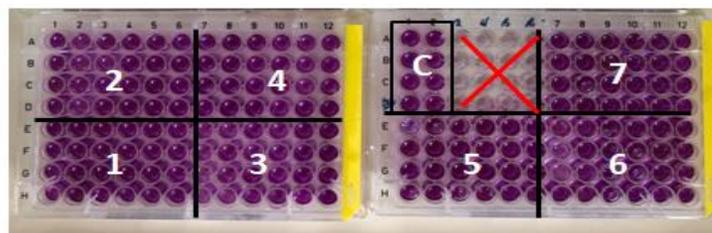
Passadas às duas horas foram feitas as leituras das microplacas através da técnica ELISA, onde foi possível verificar que na concentração de 200 μ g/mL, as formulações F2, F3 e F6, tiveram uma morte celular de respectivamente 28,22%, 41,24% e 19,39% no entanto, a partir das outras diluições a tendência foi o crescimento celular em para todos as formulações e pontos, ficando acima inclusive dos pontos de controle. Como pode ser observado nos Figuras 16 e 17, respectivamente.

Figura 12- Microplacas com meio de cultura DMEM.



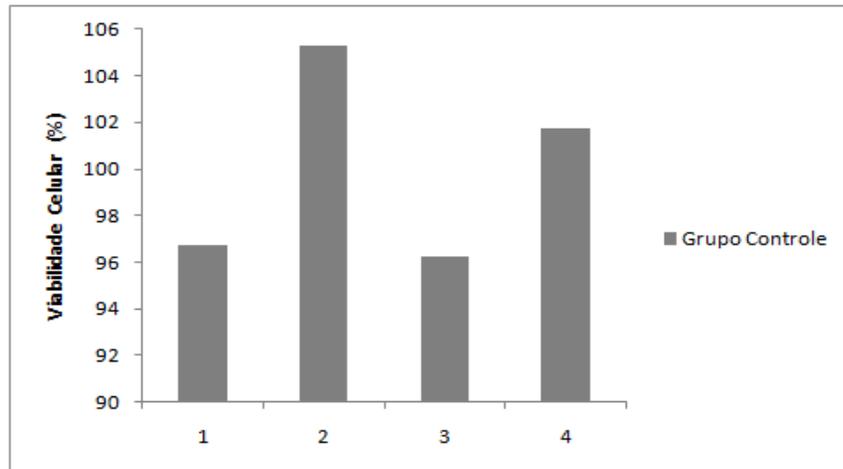
Fonte: a autora.

Figura 13- Microplacas com DMSO, mostrando a cor violeta, produzida devido aos precipitados de cristais mediante a atividade mitocondrial.



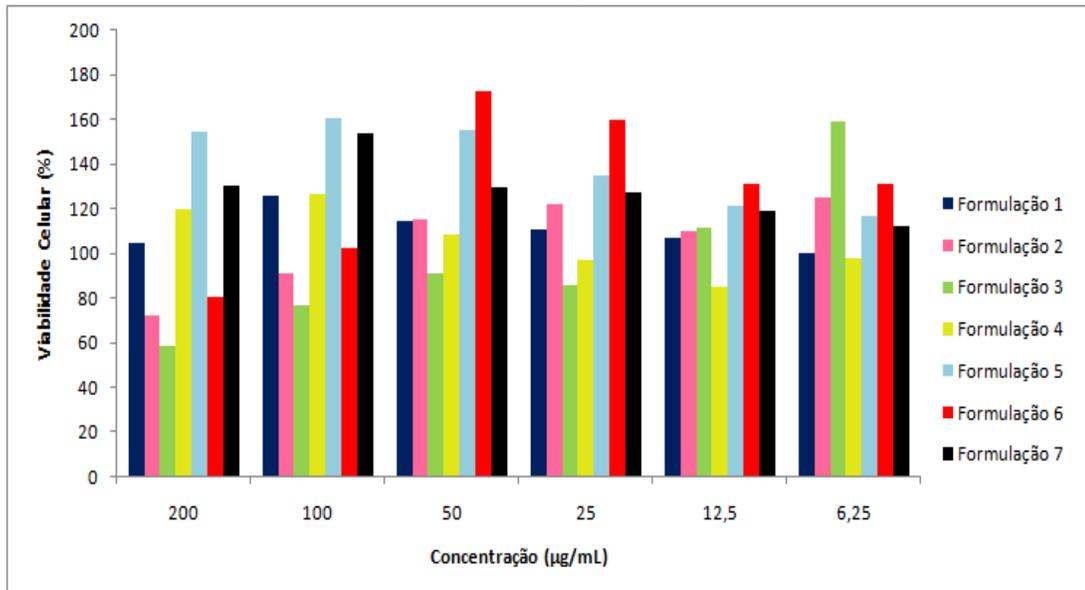
Fonte: a autora.

Gráfico 1- Gráfico mostrando a viabilidade Celular (%) do grupo controle, apenas com meio de cultura e DMSO.



Fonte: a autora.

Gráfico 2- Gráfico mostrando a viabilidade em relação as concentrações testadas de cada formulação.



Fonte: a autora.

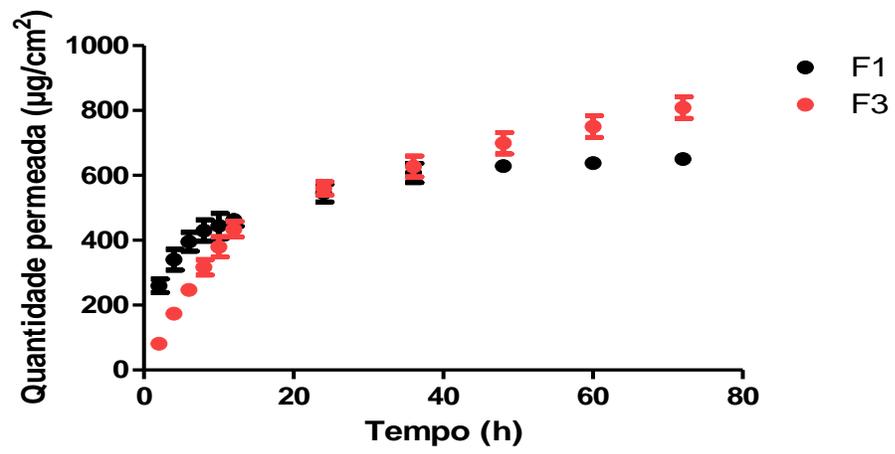
5.5 Estudo de permeação *ex vivo*

Inicialmente, para a utilização de ratos nesses estudos, foi necessária a aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (Registro nº 23076.007923 / 2017-61). A avaliação cutânea *ex vitro* foi realizada em células de difusão de Franz (sistema de teste de difusão automatizada Vision® Microette, Chatsworth, EUA). A pele escolhida foi a de ratos da raça Wistar, uma vez que recém retirada promove uma melhor aplicação via subcutânea da formulação, ela foi obtida por excisão, logo após eutanásia com dose letal de isoflurano e tricotomia dos pelos, e mantida em leito com temperatura controlada de 30°C, durante a aplicação de 0,5mL da formulação.

Para a montagem das células, o compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato de sódio + azida de sódio 0,01 M, pH = 7,4, sob aquecimento com circulação de água (37 °C) e agitação magnética (300 rpm), finalizada com a pele junto a formulação. Alíquotas de um mililitro foram recolhidas em intervalos de tempo predeterminados (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h) e imediatamente substituídas automaticamente, com um volume igual do meio receptor fresco. Ao final do experimento, todas as amostras foram filtradas (Filtro Millex-HV 0,45µM 13mm) e submetidas a análise cromatográfica.

Após o processamento dos dados, foi verificado que para a formulação F1, o fluxo foi de 28,24 µg/cm² até as primeiras oito horas, e após 24 horas até o último ponto de coleta de 72h o fluxo permanece em 1,14 µg/cm². Já para a formulação F3 até as primeiras 12 horas é de 35 µg/cm², e posteriormente se mantém em 5,16 µg/cm² até 72 horas. Observa-se então que apesar da diminuição do fluxo mediante ao tempo, ele ainda se mantém 4,5 vezes maior em relação a Formulação F1, fato justificável devido a presença do lipossoma de LBPV 0,5%. Ainda que sutil, existe uma diferença estatisticamente significativa entre as formulações com e sem o Lipossoma de LBPV 0,5%, após 48 horas, demonstrando a importância do lipossoma na manutenção da duração e quantidade, o que, possivelmente, será refletido em termos de efeito terapêutico.

Gráfico 3- Perfil de permeação *ex vivo* de F1 e F3 durante 72 horas



Fonte: a autora.

6 CONCLUSÃO

- Através da técnica de hidratação do filme lipídico seguida de sonicação, foi possível obter lipossoma com LBPV (formulação F3).
- O lipossoma foi caracterizado quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, teor e taxa de encapsulação. Todas as análises ficaram dentro do proposto, sendo viável sua incorporação em termogel.
- Foi possível realizar a incorporação dos lipossomas em termogel, sem a perda de sua propriedade termorreversível. Esta formulação apresentou pH, temperatura de gelificação e teor, de acordo com as especificações da literatura, permitindo a realização dos demais ensaios.
- As formulações F1, F2 e F3 apresentaram classificação “não determinada” através do método do BCOP, “não irritante” através do HET-CAM e “não irritante” ou “levemente irritante” através do CAM-TBS, demonstrando que as mesmas são seguras para aplicação proposta.
- O estudo de Biocompatibilidade também foi positivo, uma vez que não houve uma morte celular, constatando assim que todos os insumos e ativos usados para preparar as formulações são biocompatíveis e não levam a indícios de toxicidade.
- Nos estudos de permeação *ex vivo*, utilizando a pele fresca de rato, a formulação (F3) analisadas a formulação (F3) demonstrou a importância do lipossoma contendo o fármaco na manutenção da duração e quantidade permeada, o que, possivelmente, será refletido em termos de efeito terapêutico.
- Como perspectiva, será realizada a avaliação de estabilidade do produto final, e estudo pré-clínico em ratos, buscando comparar as formulações contendo ou não o lipossoma do ponto de vista da efetividade terapêutica. Uma vez selecionada a formulação final, esta será comparada clinicamente com o Exparel® (formulação para a mesma finalidade encontrada no mercado internacional contendo a bupivacaina).

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, D. L. O uso da via subcutânea em geriatria e cuidados paliativos. **Rio de Janeiro: SBGG, ANCP**, 2016.
- BABST, C. R.; GILLING, B. N. Bupivacaine: a review. **Anesthesia progress**, v. 25, n. 3, p. 87, 1978.
- BANGHAM, A. D. Development of the liposome concept. **Liposomes in biological systems**, p. 1-24, 1980.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of molecular biology**, v. 13, n. 1, p. 238-IN27, 1965.
- BASSANEZI, B. S. B.; OLIVEIRA FILHO, A. G. Postoperative analgesia. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 2, p. 116-122, 2006.
- BASSANEZI, B. S. B.; OLIVEIRA FILHO, A. G.. Analgesia pós-operatória. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 2, p. 116-122, 2018.)
- BORTOLUZZI, M. C., MANFRO, R., GRANDI, C.F & RESTELATO J.M.F. Ensaio clínico randomizado comparativo do nível de dor pós-operatória da cirurgia dentária tratados com naproxeno ou celecoxibe: estudo piloto. **RGO (Porto Alegre)**, v. 55, n. 4, p. 343-7, 2007.
- Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, 24 de Julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, de 25 de Julho de 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica nº 264 de Agosto de 2013**. Bupivacaína. Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/12/bupivaca--na.pdf>>. Acesso em: 24 dez, 2018.
- CARMONA, M. et al. Prontuário Terapêutico–10. **INFARMED-Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saude, IP/Ministerio da Saude**, 2012.
- CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.
- CAZEDEY, E. C. L., CARVALHO, F. C. FIORENTINO, F.A.M, GREMIAO, M.P.D. & SALGADO, H, R, N. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 759-766, 2009.

CHAHAR, P.; CUMMINGS III, KENNET. C. Liposomal bupivacaine: a review of a new bupivacaine formulation. **Journal of pain research**, v. 5, p. 257, 2012.

CHANG, H. I.; YEH, M. K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 49, 2012.

CHAVES, L. D. ; DE MATTOS PIMENTA, C. A. Controle da dor pós-operatória: comparação entre métodos analgésicos. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 11, n. 2, p. 215-219, 2003.

CHOU, R.; HUFFMAN, L. H.. Nonpharmacologic therapies for acute and chronic low back pain: a review of the evidence for an American Pain Society/American College of Physicians clinical practice guideline. **Annals of internal medicine**, v. 147, n. 7, p. 492-504, 2007.

COVINO, BG ; ROGERS, MC; TINKER, JH; LONGNECKER, D. Farmacologia dos anestésicos locais. **Princípios e práticas de anesthesiologia**, v. 2, p. 913-929, 1996.

DAVIES, A.; BLAKELEY, A. G. H; KIDD, C. **Human physiology**. Churchill Livingstone, 2001.

DE LIMA, E. N.; DE ANDRADE, A. R. B., LEAL, L. B., & DE SANTANA, D. P. Levobupivacaine Thermogel for Long-acting Analgesia. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 6, p. 2533-2542, 2018.

DE MATTOS PIMENTA, C. A., SANTOS, E. M. M., CHAVES, L. D., MARTINS, L. M., & GUTIERREZ, B. A. O. Controle da dor no pós-operatório. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 35, n. 2, p. 180–183, 2001.

DE SIQUEIRA, A. M. P., OLIVEIRA, P. C., SHCAIRA, V. R. L., AMBROSANO, G. M. B., RANALI, J., & VOLPATO, M. C. Relação entre ansiedade e dor em anestesia local e procedimentos periodontais. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 171-74, 2006.

DRAFT FDA BUPIVACAÍNA. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM586176.pdf>. Acesso em: 24 dez. 2018.

DUMORTIER, G. GROSSIORD, J. L., AGNELY, F., & CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.

DUMORTIER, G. GROSSIORD, J. L., ZUBER, M., COUARRAZE, G., & CHAUMEIL, J. C. Rheological study of a thermoreversible morphine gel. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 17, n. 9, p. 1255–1265, 1991.

EDGCOMBE, H.; HOCKING, G. Local Anaesthetic Pharmacology. **World Anaesthetic Tutorial of the Week**, p. 1-7, 2005.

EISENACH, J. C.; BONNET, F. Incidência da dor pós-operatória e fatores predisponentes. **A dor no meio cirúrgico**, Porto Alegre: Artes médicas, p. 48–56, 1993.

EKBLOM, L.; WIDMAN, B. Lac-43 and Tetracaine in Spinal Anaesthesia: A Controlled Clinical Study. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 10, p. 419-425, 1966.

Farmacopeia Brasileira. Parte I. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

FEDERSEL, H.J.; JAKSCH, P.; SANDBERG, R. An efficient synthesis of a new, chiral 2', 6'-pipercoloxylidide local anaesthetic agent. **Acta Chem. Scand. Ser. B**, v. 41, p. 757-761, 1987.

FOSTER, R. H.; MARKHAM, A., Levobupivacaine. *Drugs*, v. 59, n. 3, p. 551-579, 2000.

GOLAN, D., JUNIOR, T., ARMEN, H., ARMSTRONG, E. J., & ARMSTRONG, A. W. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. In: **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2009

HADDAD, J. J. On the enigma of pain and hyperalgesia: a molecular perspective. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 353, n. 2, p. 217-224, 2007.

HAKEEM, A.; SHANMUGAM, V.. Inguinodynia following Lichtenstein tension-free hernia repair: a review. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 14, p. 1791, 2011.

HARDMAN, J. G. *et al.* **Goodman and Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. [S.l: s.n.], 1996.

HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H.. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química nova**, p. 171-180, 1995.

HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. **Nature**, v. 462, n. 7272, p. 426, 2009.

IMANI, F. E. S., RAZI, M., JAFARIAN, A. A., YOUSEFSAHI, F., ETEMADI, H., & SAFARI, S.. The effect of intra-articular meperidine and bupivacaine 0.5% on postoperative pain of arthroscopic knee surgery; a randomized double blind clinical trial. **Anesthesiology and pain medicine**, v. 5, n. 1, 2015.

JEONG, B.; KIM, S. W.; BAE, Y. H. Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 1, p. 37–51, 2002.

JEONG, B.; KIM, S. W.; BAE, Y. H. Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 154-162, 2012.

KISTLER, S. S. Coherent expanded-aerogels. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 52-64, 1932.

KLAUMANN, P. R. **Bloqueio peribulbar com ropivacaína 1% em cães. 2007. 60f.** Tese de Doutorado. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias)–Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2007.

LIRA, M. C., SIQUEIRA-MOURA, M. P., ROLIM-SANTOS, H. M., GALETTI, F. C., SIMIONI, A. R., SANTOS, N. P., ... & SANTOS-MAGALHÃES, N. S. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **J Liposome Res.** 2009; 19: 49-58.

MCLURE, H. A.; RUBIN, A. P. Review of local anaesthetic agents. **Minerva anesthesiol**, v. 71, n. 3, p. 59–74, 2005.

MORRISON, S. G., DOMINGUEZ, J. J., FRASCAROLO, P., & REIZ, S. A comparison of the electrocardiographic cardiotoxic effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized swine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 90, n. 6, p. 1308-1314, 2000.

NELSON, M. E., REJESKI, W. J., BLAIR, S. N., DUNCAN, P. W., JUDGE, J. O., KING, A. C., MACERA, A. C & CASTANEDA-SCEPPA, C. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Circulation**, v. 116, n. 9, p. 1094, 2007.

NOVABUPI: cloridrato de levobupivacaína. São Paulo: CRISTÁLIA. 2013. Bula de remédio.

OECD. **Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.** OECD Publishing, 2009.

OECD. **Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, v. 4, 2013.

PACCA, D. M., DE-CAMPOS, G. C., ZORZI, A. R., CHAIM, E. A., & DE-MIRANDA, J. B. Prevalence of joint pain and osteoarthritis in obese Brazilian population. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 31, n. 1, 2018.

PARK, M. H., JOO, M. K., CHOI, B. G. Biodegradable thermogels. **Accounts of chemical research**, v. 45, n. 3, p. 424-433, 2011.

PIMENTA, C. A. M.; CRUZ, D. DE A. L. M.; SANTOS, J. L. F. DOS. Instrumentos para avaliação da dor: o que há de novo em nosso meio. *Arq. bras. neurocir*, v. 17, n. 1, p. 15–24, 1998.

PUISIEUX, F. (Ed.). **Liposomes: new systems and new trends in their applications**. Ed. de Santé, 1995.

RANG, H. P. et al. *Farmacologia*. 6ª edição. **Rio de Janeiro: Guabanara, Koogan AS**, 2007.

RILLO, O.; RIERA, H.; ACOSTA, C. et al. Consensus recommendations for the management in osteoarthritis of hand, hip, and knee. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 7, p. 345-354, 2016.

SANDOVAL, A. C., FERNANDES, D. R., SILVA, E. A. D., JÚNIOR, T., & TOMAZ, A.. O uso indiscriminado dos Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINES), 2017.

SCHMOLKA, I. R. Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. **Journal of biomedical materials research**, v. 6, n. 6, p. 571-582, 1972.

SCHMOLKA, I. R. **Poloxamers in the pharmaceutical industry**. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1991.

SEOL, D., MAGNETTA, M. J., RAMAKRISHNAN, P. S. et al. Biocompatibility and preclinical feasibility tests of a temperature-sensitive hydrogel for the purpose of surgical wound pain control and cartilage repair. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 101, n. 8, p. 1508-1515, 2013.

SHIN, H. W., SOH, J. S., KIM, H. Z., HONG, J., WOO, D. H., HEO, J. Y, HWANG, E. M; PARK, J. Y. & LEE, C. JThe inhibitory effects of bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine on K 2P (two-pore domain potassium) channel TREK-1. **Journal of anaesthesia**, v. 28, n. 1, p. 81-86, 2014.

SILVA, J. A. **Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados**. [Tese] Recife: Departamento Ciências Farmacêuticas, UFPE; 2008.

SIMONETTI, M. P.B. ; VALINETTI, E. A.; FERREIRA, F. M. C.. Avaliação da atividade anestésica local da S (-) Bupivacaína: estudo experimental in vivo no nervo ciático de rato. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 47, n. 5, p. 425-34, 1997.

YOSHIDA, Y.; TAKAHASHI, A.; KUZUYA, A. Instant preparation of a biodegradable injectable polymer formulation exhibiting a temperature-responsive sol–gel transition. **Polymer Journal**, v. 46, n. 9, p. 632, 2014.