

PERFORMANCE *IN VITRO* DE UMA FORMULAÇÃO DE LIDOCAÍNA INCORPORADA EM SISTEMA LÍQUIDO CRISTALINO À BASE DE ÓLEO DE SEMENTE DE UVA E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÃO TÓPICA EM LESÕES DE MUCOSITE ORAL

Palavras-Chave: MUCOSITE ORAL, LIDOCAÍNA, SISTEMA LÍQUIDO CRISTALINO

Autores/as:

Julia Deraco Marangoni [FOP/UNICAMP]

Giovana Maria Fioramonti Calixto [FOP/UNICAMP]

Mônica Beatriz Portela Ferreira [FOP/UNICAMP]

Aylla Mesquita Pestana [FOP/UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Michelle Franz Montan Braga Leite (orientadora) [FOP/UNICAMP]

INTRODUÇÃO

A mucosite oral é uma condição inflamatória que varia de uma estomatite eritematosa geral a ulceração em toda a cavidade bucal [17]. O tratamento atual é demorado e oneroso, sendo necessárias novas alternativas [18]. Neste ensejo, destacam-se os produtos naturais, dentre esses, as uvas (*Vitis vinifera*), com ações anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, antialérgica e antimicrobiana, que podem ser eficazes para o tratamento de diversas condições [11].

SLC são sistemas nanoestruturados mucoadesivos de geleificação *in situ* com capacidade de incorporar água da saliva, se tornando um SLC mais viscoso *in situ*, permanecendo por mais tempo no sítio de aplicação [21; 1; 7; 5]. Assim, podem superar as limitações que a administração tópica que podem implicar sua remoção do sítio de aplicação. Em acréscimo, sua alta capacidade de mucoadesão pode aumentar a permeação dos ativos nele incorporados [21; 1; 7; 5; 6; 10; 12; 3; 19]. Para elevar ainda mais a mucoadesão dos SLC, um recurso é utilizar como fase aquosa uma dispersão de sal de ácido hialurônico, biopolímero que também possui capacidade mucoadesiva e propriedade umectante [15].

Os anestésicos locais (AL) são fármacos capazes de inibir reversivelmente a nocicepção. Dentre esses, a lidocaína é um dos mais utilizados devido à sua ação rápida e eficaz [12]. Desta forma, a hipótese do presente estudo é que uma formulação composta de lidocaína (LDC) incorporada em SLC (SLC/LDC) composto por óleo de semente de uva e ácido hialurônico possa superar as limitações que a administração tópica em mucosa oral oferece, além de garantir efeito sintomático e cicatrizante prolongado das lesões, oferecendo uma alternativa aos pacientes com lesões de mucosite oral.

2 METODOLOGIA

2.1 Preparo das formulações e quantificação da lidocaína por CLAE

Primeiramente, 40% (m/m) do tensoativo polioxipropileno (5) poloxietileno (20) cetil éter foi misturado com 40% (m/m) do óleo de semente de uva como fase oleosa. Separadamente, 5% (m/m) de cloridrato de lidocaína foi incorporado em 20% (m/m) de dispersão aquosa de ácido hialurônico 5% (m/m). Por fim, as duas fases foram misturadas sob agitação magnética por cinco minutos. A formulação comercial Lidocaína pomada 50 mg/g (SEM Pharma) foi utilizada como controle positivo.

A validação da metodologia analítica para quantificação da LDC foi realizada usando os parâmetros: linearidade, precisão intra-corrída e intermediária, exatidão, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação, seguindo as especificações da ANVISA (2017) e recomendações do ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005). A quantificação da LDC foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (realizada por HPLC acoplado a um coletor automático e controlado com o software Surveyoy ChromQuest 5.0 – Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), utilizando coluna de fase reversa - 150 x 4,60, 5µm, Phenomenex -, fase móvel foi uma mistura 60:40 de acetonitrila e 25 mM NH₄OH, ajustada para pH de 7,0 com solução de H₃PO₄, a uma taxa de fluxo de 1,2 mL/min e o comprimento de onda de 220nm.

2.2 Avaliação da cinética de liberação *in vitro* de lidocaína (LDC)

O estudo de liberação da lidocaína (LDC) em solução, LDC incorporada no SLC (LDC-SLC) e formulação comercial (LIDO) foi realizado no equipamento Transdérmico Manual Phoenix (Hanson®) constituído por células de difusão de Franz com volume de 7 mL. Foi utilizada membrana sintética de acetato de celulose com massa molar de 12–14 kDa (Sigma-Aldrich®) e solução receptora composta por tampão fosfato salino (PBS) com pH 7,4 a 37 °C e sob agitação de 300 rpm. As formulações foram acondicionadas no anel disposto no compartimento doador, que comporta aproximadamente 300 mg de formulação. As amostras (400 µL) foram coletadas do compartimento receptor em tempos pré-determinados (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 720 e 1440 min). A LDC liberada foi quantificada por CLAE a partir do método analítico validado. Foram aplicados diferentes modelos matemáticos a fim de selecionar a cinética de liberação da LDC (definido pelo maior valor de R²). O software empregado para o tratamento dos dados foi o KinetDS 3.0 Jagiellonian University Medical College, Cracóvia, Polônia).

2.2 Ensaio de permeação *in vitro* da lidocaína através de epitélio de mucosa jugal de suínos

O ensaio de permeação *in vitro* da LDC das formulações descritas (LDC; LDC-SLC; LIDO) foi realizado no mesmo equipamento descrito para o ensaio de liberação, utilizando as mesmas condições.

Foram adquiridas mucosa jugal de suínos da raça *Sus scrofa domestica*, Landrace, abatidos, para o consumo alimentício no abatedouro Angelelli Ltda - devidamente certificado (SIF 2259), sendo excluídas as fora das especificações. Após, o epitélio da mucosa jugal foi gentilmente alocado na parte superior da célula de Franz, com o epitélio voltado para o compartimento doador. As formulações foram acondicionadas no anel dosador disposto no compartimento doador da célula de difusão de Franz. As amostras foram coletadas do compartimento receptor em tempos pré-determinados (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 e 300 min). A LDC permeada foi quantificada por CLAE a partir do método analítico validado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação do método de quantificação da LDC por CLAE

A curva analítica provou ser linear ao longo do intervalo proposto (5,0 - 200,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), como mostrado pelo coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,9998, demonstrando um ajuste aceitável de dados para a linha de regressão ($y = 1301,2 x - 1478,5$). Conforme dados da Tabela 1, o método apresentou precisão e exatidão. A sensibilidade do método para quantificação de lidocaína foi expressa pela inclinação da curva analítica, e pelos valores LQ e LD de 3,13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,94 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Parâmetro Concentração Nominal ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Lidocaína		
	5	50	200
Intra-dia (n=3)			
Concentração média analisada	5,27	49,3	197,4
Precisão (DPR%)	2,32	0,46	0,54
Exatidão (%)	105,6	96,9	98,7
Inter-dia (n=9; n=3 em 3 dias diferentes)			
Concentração média analisada	5,32	48,4	201,24
Precisão (DPR%)	0,13	0,72	3,72
Exatidão (%)	106,5	96,9	100,6

Tabela 1 – Parâmetros de precisão e exatidão para determinação de lidocaína.

3.2 Ensaio de liberação *in vitro* de lidocaína (LDC)

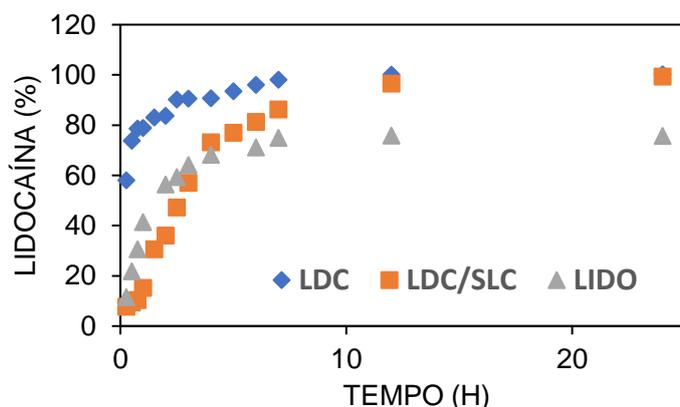


Figura 1 – Perfil de liberação da lidocaína em solução (LDC), LDC incorporada no SLC (LDC-SLC) e formulação comercial (LIDO)

primeira ordem, Korsmeyer-Peppas, Higuchi e Weibull), conforme descritos na Tabela 2.

Modelos Matemáticos	Formulações	
	FC	FL
Korsmeyer-Peppas		
R^2	0,8209	0,8936
n	0,2765	0,2872
Higuchi		
R^2	0,3968	0,9031
K	1,5917	26,7834

A célula de difusão tipo Franz permite a análise *in vitro* do movimento do fármaco através de uma membrana. Os perfis de liberação, ilustrados na Figura 1, foram determinados pela relação percentual das concentrações de LDC liberadas em função do tempo.

A modelagem matemática foi empregada para ajustar a cinética das formulações, (LDC/SLC e LIDO) por meio de diferentes modelos (ordem zero,

1ª ordem		
R ²	0,000	0,9915
K	0,0009	0,2653
Weibull		
R ²	0,9979	0,9968
b	0,7457	3,5006

Tabela 2 – Os parâmetros ajustados dos modelos cinéticos utilizados na liberação de lidocaína.

O modelo Weibull foi o que mais se ajustou. R² mais alto. O critério utilizado para a escolha de um modelo é a determinação do R² *ajustado* que melhor se ajuste ao perfil de liberação obtido [5]. O modelo que mais se adequou à liberação das formulações foi o de Weibull. Neste modelo, o valor do expoente b é o indicador do mecanismo de transporte do fármaco através da matriz. Estimativas para valores de b menores que 0,75 indicam difusão segundo Fick.

Para valores de b entre 0,75 e 1 estão associados dois mecanismos, a difusão Fickiana e o transporte caso II (através do intumescimento), e finalmente, para valores maiores que 1, o transporte do fármaco se deve a um complexo mecanismo de liberação, em que vários processos, como difusão, intumescimento e erosão (degradação), podem ocorrer simultaneamente [18]. Tem-se que, desta forma, b é o parâmetro de forma que caracteriza a curva como sendo exponencial (b=1; Caso 1), sigmóide (b>1; Caso 2) ou parabólica (b<1; Caso 3). Neste mérito, a formulação teste é caso 2 e a comercial é caso 3. Os dados mostram que o valor de b para a formulação comercial fora menor que 0,75, e, portanto, o mecanismo de liberação está associado com a difusão de Fick. Uma vez que a formulação em estudo obteve resultado maior que 1, o transporte do fármaco ocorre por um mecanismo com vários processos, nesse caso pode ser devido o intumescimento característico da formulação.

Associando as características mucoadesivas da formulação em estudo com a capacidade de liberar o fármaco, pode ser um potencial sistema de liberação do LDC. Os testes *in vitro* são importantes para o entendimento do comportamento físico-químico dos sistemas. Destarte, o ensaio mostrou que são adequadas para administração oral.

3.3 Ensaio de permeação *in vitro* da lidocaína através de epitélio de mucosa jugal de suínos

Realizados os testes de permeação, obtivemos os seguintes resultados:

	Formulações	
	LIDO	LDC/SLC
Fluxo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	700,0 \pm 19,1	33,528 \pm 1,4
Lag time (h)	0,311 \pm 0,014	-

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos calculados a partir dos perfis de permeação de lidocaína.

A formulação comercial de lidocaína apresentou maior fluxo do que a formulação desenvolvida. Isto pode ser explicado pelo sistema líquido cristalino ter uma estrutura mais bem organizada do que a formulação comercial e dessa forma aprisiona mais o fármaco, o liberando de forma mais lenta. No

entanto, apesar dessa característica, o lag time da formulação desenvolvida foi menor, indicando que o início da permeação desta é mais rápido. Isto pode ser atribuído pela composição da formulação ter ácido oleico que atua como um promotor de permeação, desorganizando a barreira epitelial e assim facilitando a permeação do fármaco [3,5]. Ademais, este resultado é esperado e desejável, uma vez que se trata de uma liberação sustentada. Destarte, é possível manter o efeito anestésico por maior tempo, com possibilidade de intervalo de aplicação maiores.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que o modelo matemático que mais se ajustou ao perfil de liberação das formulações foi o modelo de Weibull, o qual sugere que os sistemas liberaram a LDC com o intumescimento. Ademais, associando a capacidade das formulações em liberarem o fármaco com as suas características mucoadesivas, verificou-se que os sistemas desenvolvidos podem potencialmente promover a liberação sustentada da LDC, bem como permeação, podendo estes se apresentar como ferramentas para o tratamento de mucosite oral.

REFERÊNCIAS

1. BENERGOSSI, J. *et al.* **Highlights in peptide nanoparticle carriers intended to oral diseases.** Current Topics In Medicinal Chemistry, v. 15, n. 4, p. 345-355, 2015.
2. CALIXTO, G. *et al.* **Polyethyleneimine and Chitosan Polymer-Based Mucoadhesive Liquid Crystalline Systems Intended for Buccal Drug Delivery.** AAPS PharmSciTech, v. 19, n. 2, p. 820-836, 2018.
3. CALIXTO, G. *et al.* **Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization.** Pharmaceutical development and technology, v. 20, n. 4, p. 490-496, 2015.
4. CALIXTO, G. *et al.* **Design and characterization of a novel p1025 peptide-loaded liquid crystalline system for the treatment of dental caries.** Molecules, v. 21, n. 2, p. 158, 2016a
5. CINTRA, G. *et al.* **Bioadhesive surfactant systems for methotrexate skin delivery.** Molecules, v. 21, n. 2, p. 231, 2016.
6. CHORILLI, M. *et al.* **Rheological characterization and safety evaluation of non-ionic lamellar liquid crystalline systems containing retinyl palmitate.** Journal of biomedical nanotechnology, v. 12, n. 2, p. 394- 403, 2016.
7. CUBAYACHI, C. **Desenvolvimento de sistemas semi-sólidos mucoadesivos para liberação de anestésico e aplicação de iontoforese na cavidade bucal.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2014, 90.
8. DAGLIA, M. **Polyphenols as antimicrobial agents.** Curr. Opin. Biotechnol. 2012, 23, 174–181.
9. FRANZ-MONTAN, M. *et al.* **Nanostructured systems for transbuccal drug delivery.** In: Nanostructures for Oral Medicine. Elsevier, 2017a. p. 87-121.
10. FRANZ-MONTAN, M. *et al.* **Recent advances and perspectives in topical oral anesthesia.** Expert opinion on drug delivery, v. 14, n. 5, p. 673-684, 2017b
11. MIRANDA, S.S.; QUEIROZ, L.S; FREITAS, V.S. **Prevenção e tratamento das mucosites orais: uma revisão sistemática.** Revista de Saúde Coletiva da UEFS, 6(2), 66-73, 2016
12. PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. **On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms.** Int. J. Pharm., v. 309, p. 44–50, 2016.
13. RODERO, C. F. *et al.* **Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis.** Molecular Pharmaceutics, v. 15, n. 10, p. 4491-4504, 2018.
14. SALMAZI, R. *et al.* **A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis.** International Journal of Nanomedicine, v. 10, p. 4815, 2015.