

Avaliação da associação de amitriptilina ou *acmella oleracea* em creme lipossomal de lidocaína e prilocaína na anestesia tópica: ensaio *in vitro*

Palavras-Chave: Amitriptilina, Combinação Lidocaína e Prilocaína, *Spilanthes oleracea*.

PIBIC-EM: *Jamilly Sousa Passos, Thauanny Cavalcante Silva, Alex Alexandre Vacchi Pinto, Ana Julia Lopes Silva da Costa, Stefany Belaz de Freitas* – FOP UNICAMP

Colaborador: *Michael Henrique Araujo Monteiro, Vitor Marinho da Costa* – Doutorando – FOP UNICAMP

Orientador: Prof. Dr. *Francisco Carlos Groppo* – Departamento de Biociências – FOP UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A dor é um dos principais fatores de ansiedade em procedimentos odontológicos, frequentemente associada a experiências negativas e ao atendimento apenas em situações de dor intensa (Boyce et al., 2016; Mundiya e Woodbine, 2022). O uso de anestésicos tópicos é essencial para reduzir o desconforto inicial durante punções, mas formulações convencionais de lidocaína e prilocaína apresentam limitações em profundidade e duração de efeito (Franz-Montan et al., 2017).

Novos compostos, como a amitriptilina, antidepressivo tricíclico com ação em canais de sódio, e também o espilantol, presente no extrato de *Acmella oleracea* (jambu), têm sido investigados como adjuvantes capazes de potencializar a ação anestésica tópica (Patel et al., 2023; Fosquiera et al., 2013; Santana de Freitas-Blanco et al., 2016). Paralelamente, veículos como o Pentravan®, de base lipossomal, demonstram aumentar a permeação e biodisponibilidade de diferentes agentes (Poloni et al., 2014; Carrer et al., 2020; Ossowicz-Rupniewska et al., 2021), configurando-se como alternativa promissora para uso em mucosa oral.

Neste contexto, o presente estudo avaliou a citotoxicidade de formulações contendo lidocaína e prilocaína associadas a amitriptilina ou *Acmella oleracea*, veiculadas ou não em Pentravan®, em culturas de queratinócitos humanos (HaCaT), visando analisar seu potencial para aplicação clínica (Adamiak-Giera et al., 2023; Franz-Montan et al., 2017).

METODOLOGIA:

Linhagem celular e condições de cultivo

Para o presente estudo foi utilizada a linhagem celular humana imortalizadas: queratinócitos (HaCaT), predominantes nos tecidos epiteliais de revestimento. A linhagem foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro – Associação Técnico-Científica Paulo Ehrlich.

As células foram cultivadas em meio Eagle de Dulbecco modificado (DMEM; GIBCO®, United Kingdom) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO®), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As culturas foram mantidas em placas de Petri para cultura de tecido de 61 cm² (TPP®), em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37 °C. As subculturas foram realizadas duas vezes por semana utilizando 0,5 mM EDTA (GIBCO®) seguida de tripsina (GIBCO®) para dissociação celular. Para os experimentos, as células foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de $2,4 \times 10^4$ células/poço (equivalente a 1×10^5 células/mL) até atingirem semi-confluência. O volume de meio utilizado por poço foi de 1 mL, garantindo cobertura adequada e condições homogêneas para as análises subsequentes.

As células foram expostas a seis formulações tópicas:

- (1) EMLA® (lidocaína 2,5% + prilocaína 2,5%);
- (2) lidocaína 2,5% + prilocaína 2,5% + amitriptilina 5% em pomada;
- (3) lidocaína 2,5% + prilocaína 2,5% + *Acmella oleracea* 20% (7,5% espilantol) em pomada;
- (4) lidocaína 2,5% + prilocaína 2,5% + amitriptilina 5% em Pentravan®;
- (5) lidocaína 2,5% + prilocaína 2,5% + *Acmella oleracea* 20% (7,5% espilantol) em Pentravan®;
- (6) base tópica sem ativos (placebo).

Os eluentes foram preparados conforme a ISO 10993-12, mantendo cada formulação em contato com DMEM por 24 h em condições estéreis, seguindo a ISO 10993-5:2009. A partir do extrato obtido, prepararam-se diluições de 50% ou 1/2 (C2), 25% ou 1/4 (C4) e 12,5% ou 1/8 (C8), além da concentração integral (100% - C1). O grupo controle consistiu em células expostas apenas ao DMEM.

Protocolo experimental

O fluxograma do protocolo experimental é apresentado na Figura 1, ilustrando as etapas de preparo das amostras, diluição, exposição celular e leitura do ensaio MTT. As células foram incubadas com as diferentes formulações e concentrações por 6, 12 e 24 h a 37 °C.

Ao término de cada período de exposição, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (TOX-2, Sigma-Aldrich®), conduzido em quintuplicata para cada combinação de formulação e diluição testada. Após o tempo experimental, o meio foi removido e substituído por solução de MTT preparada de acordo com as instruções do fabricante. As placas de 24 poços foram então incubadas por 4 h em condições controladas para formação dos cristais de formazan. Posteriormente, o formazan formado foi solubilizado com dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich®), e o conteúdo de cada poço foi cuidadosamente transferido para placas de 96 poços, possibilitando a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm, com correção para 650 nm. Os valores de absorbância obtidos para cada poço foram convertidos em percentual de viabilidade celular em relação ao controle negativo permitindo a normalização dos dados e a comparação entre grupos experimentais.

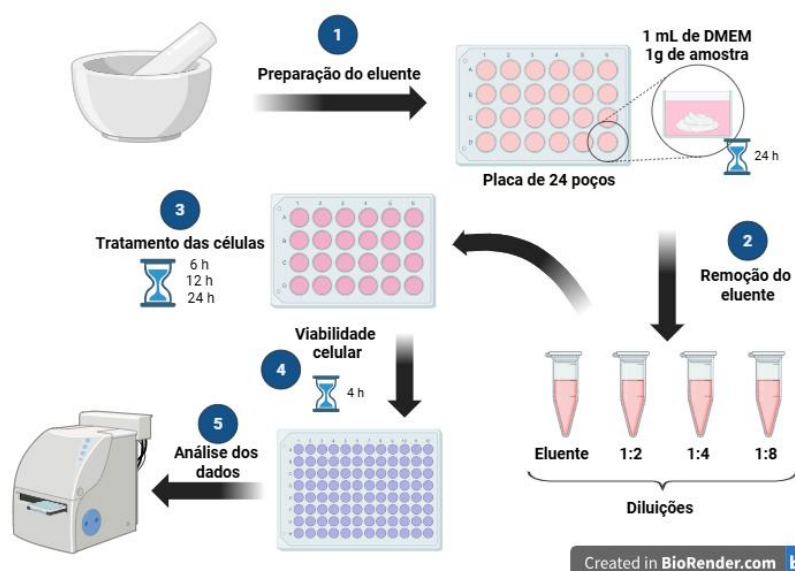


Figura 1. Fluxograma do protocolo experimental para avaliação da viabilidade celular (ensaio MTT). As amostras foram preparadas em DMEM (1 g/1 mL) e incubadas por 24 h. O eluente obtido foi diluído (1, 1:2, 1:4, 1:8) e aplicado às células por 6, 12 e 24 h. Em seguida, realizou-se o ensaio de viabilidade celular e a leitura dos resultados no leitor de microplacas. Created in <https://BioRender.com>.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, que indicou distribuição não normal para as variáveis. Diante disso, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e Benjamini-Krieger-Yekutieli (BKY) como *post-hoc*. As análises foram aplicadas para comparar: (1) os períodos de exposição (6, 12 e 24 h) dentro de cada formulação e concentração; (2) as formulações entre si, em cada período e concentração; e (3) as concentrações dentro de cada formulação e período. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A viabilidade celular das formulações testadas está apresentada na Figura 2 e Tabela 1. De acordo com o critério da ISO 10993-5:2009, valores abaixo de 50% indicam citotoxicidade acentuada.

Após 6 horas (Figura 1A), de uma forma geral, a exposição às formulações 1 e 4, causou decréscimo significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular em relação às demais formulações, independentemente da concentração utilizada. Enquanto as concentrações das formulações 3 e 5 influenciaram de forma inversa a viabilidade celular, as diferentes concentrações não afetaram ($p > 0,05$) a viabilidade proporcionada pelas formulações 2 e 5. Apenas a formulação 3, em relação às demais mostrou menor efeito ($p < 0,05$) na viabilidade da HaCaT, particularmente nas menores concentrações utilizadas. Decorridas 12 horas de exposição, os efeitos deletérios das formulações foram mais evidentes. As formulações 1, 4 e 5 produziram redução da viabilidade ($p < 0,05$) entre 80 e 90%, à exceção da menor concentração da formulação 1. Mesmo as formulações 3 e 6 causaram diminuição ($p < 0,05$) significativa (abaixo de 50%) para C1 e C2, indicando que a toxicidade é dependente do tempo

de exposição e da concentração do composto. Após 24 h da exposição, o efeito deletério das formulações foi confirmado. As formulações 1, 4 e 5 causaram reduções significativas da viabilidade ($p<0,05$) em relação às concentrações C4 e C8 das formulações 2, 3 e 6. Nas concentrações maiores (C1 e C2), todas as formulações causaram extensa perda de viabilidade, à exceção da formulação 6. Esta formulação apresentou diminuição da viabilidade em relação a C4 e C8, mas valores superiores às demais em C1 e C2.

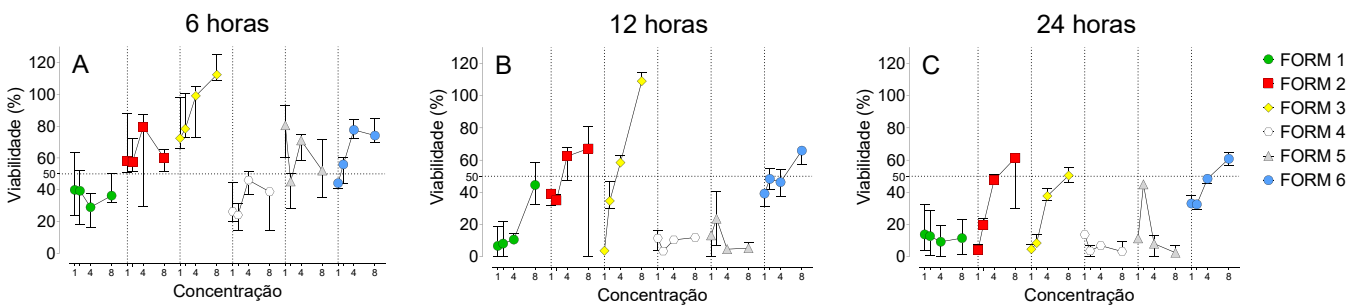


Figura 2. Viabilidade celular (%) das formulações F1–F6 em queratinócitos humanos (HaCaT) após exposição por 6, 12 e 24 horas, nas concentrações C1 (100%), C1:2 (50%), C1:4 (25%) e C1:8 (12,5%). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão.

Os resultados da viabilidade celular (em %) estão apresentados na Tabela 1 abaixo.

		Formulações					
[]	Expos.	F1	F2	F3	F4	F5	F6
C1		39,9	58,1	72,4	26,3	80,5	44,2
	6 horas	(33,2-53,9)	(53-73,4)	(67,6-95,4)	(22,2-36,8)	(70-87,9)	(41,9-46)
		6,8	39,2	3,8	11,6	13,3	39,2
	12 horas	(3-13,6)	(34-40,1)	(2,2-5,7)	(7,6-14,4)	(5,6-14,3)	(35,1-39,8)
C2		13,9	4,2	4,8	13,8	11,5	33,1
	24 horas	(4,2-27,8)	(3,4-6,1)	(3,8-6,4)	(11,4-15,6)	(10,4-13,2)	(30,9-37,4)
		39,3	57,7	78,4	24,1	45,2	56
	6 horas	(31,2-48,5)	(51,9-66,5)	(73,2-92,6)	(16,6-28)	(35,3-48,2)	(48,8-58,8)
C4		8,2	35	34,7	3,6	23,7	48,3
	12 horas	(2,5-16,8)	(33,2-38)	(30,2-46,6)	(2,1-5,5)	(14,8-33,2)	(43,1-51,9)
		12,9	19,7	8,6	3,7	45	32,6
	24 horas	(1,7-24,6)	(18,6-22,4)	(7,2-11,8)	(1-6)	(43,5-46,3)	(29,8-34)
C8		29	79,7	99,1	46,1	71,1	77,7
	6 horas	(27,1-35,6)	(47,2-84,6)	(75,2-102,9)	(41,3-50,8)	(61,4-73,6)	(73,1-81,6)
		10,7	62,4	58,5	10,5	4,8	46,4
	12 horas	(9,1-12,9)	(54,4-66,2)	(57,5-62,3)	(9,5-11,7)	(3,7-6,6)	(39-50,3)
C8		9,4	47,5	37,8	7	8,2	48,5
	24 horas	(2,5-15,9)	(46,9-49,7)	(35,1-40,3)	(6,4-8,4)	(4,2-12,8)	(46-48,6)
C8		36,4	59,9	112,4	38,8	52,1	74,1
	6 horas	(32,9-45,7)	(53,4-64,4)	(109,4-119,1)	(22,6-40,5)	(42,9-63,3)	(70,7-83,2)
		44,6	67,2	109	12	5,4	65,9
	12 horas	(36-50,9)	(33-77,1)	(107,6-112,2)	(9,9-12,8)	(4,5-7,6)	(59,7-66,8)
C8		11,6	61,5	50,5	3,3	2,6	60,8
	24 horas	(2-21,5)	(35,8-62,3)	(48-53,6)	(3,1-7,1)	(0-5,4)	(57,5-63,8)

Tabela 1. Mediana (1º e 3º quartis) da viabilidade celular (%) em função dos períodos de exposição (6, 12 e 24 horas), formulações (F1–F6) e concentração (C1=100%, C2=50%, C3=25% e C4 = 12,5%).

CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos neste ensaio *in vitro*, verificou-se que:

- (1) Todas as formulações causaram diminuição da viabilidade celular de maneira dependente da concentração e do tempo de exposição;
- (2) A base tópica sem ativos (formulação 6 - placebo), usada como pomada base para as formulações 2 e 3, também foi citotóxica;
- (3) A associação da lidocaína/prilocaína/amitriptilina à pomada base não aumentou a citotoxicidade;
- (4) A associação à lidocaína/prilocaína/*Acmella oleracea* não aumentou a citotoxicidade da pomada base e melhorou a viabilidade celular em baixas concentrações;
- (5) O Pentravan foi responsável pela pronunciada citotoxicidade das formulações 4 e 5;
- (6) O EMLA® mostrou pronunciada citotoxicidade independentemente do tempo de exposição e concentração;
- (7) A relevância clínica da citotoxicidade *in vitro* observada deve ser comprovada *in vivo* em estudos clínicos, visando ajustes na concentração e tempo de contato das formulações.

BIBLIOGRAFIA

- Adamiak-Giera U, Nowak A, Duchnik W, Ossowicz-Rupniewska P, Czerkawska A, Machoy-Mokrzyńska et al. Evaluation of the *in vitro* permeation parameters of topical ketoprofen and lidocaine hydrochloride from transdermal Pentravan® products through human skin. *Front Pharmacol*. 2023 May 31;14:1157977.
- Boyce RA, Kirpalani T, Mohan N. Updates of Topical and Local Anesthesia Agents. *Dent Clin North Am*. 2016 Apr;60(2):445-71.
- Carrer V, Alonso C, Pont M, Zanuy M, Córdoba M, Espinosa S et al. Effect of propylene glycol on the skin penetration of drugs. *Arch Dermatol Res*. 2020 Jul;312(5):337-352.
- Fosquiera E, Andrade L, Rotta I, Chaves S, Uchida D, Gazim Z, et al. Eficácia da *Acmella oleracea* para anestesia tópica na mucosa bucal. *Rev Odonto Cienc* 2013;28(3):61-65.
- Franz-Montan M, Ribeiro LNM, Volpato MC, Cereda CMS, Groppo FC, Tofoli GR et al. Recent advances and perspectives in oral anesthesia. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2017; 14(5), 673-684.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 10993-12: Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials*. 4th ed. Geneva: ISO, 2012.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity*. 3rd ed. Geneva: ISO, 2009.
- Mundiya J, Woodbine E. Updates on Topical and Local Anesthesia Agents. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2022 Feb;34(1):147-155.
- Ossowicz-Rupniewska P, Nowak A, Klebeko J, Janus E, Duchnik W, Adamiak-Giera U et al. Assessment of the Effect of Structural Modification of Ibuprofen on the Penetration of Ibuprofen from Pentravan® (Semisolid) Formulation Using Human Skin and a Transdermal Diffusion Test Model. *Materials (Basel)*. 2021 Nov 11;14(22):6808.
- Patel N, Urolagin S, Haq MA, Patel C, Bhatt R, Girdhar G et al. Anesthetic Effect of 2% Amitriptyline Versus 2% Lidocaine: A Comparative Evaluation. *Cureus*. 2023 Aug 13;15(8):e43405.
- Polonini HC, Soldati PP, Oliveira MALd, Brandão MAF, Chaves MdGM, Raposo NRB. Transdermal formulations containing human sexual steroids: development and validation of methods and *in vitro* drug release. *Quim. Nova*. 2014;37:720–727. doi: 10.5935/0100-4042.20140116.
- Santana de Freitas-Blanco V, Franz-Montan M, Groppo FC, de Carvalho JE, Figueira GM, Serpe L et al. Development and Evaluation of a Novel Mucoadhesive Film Containing *Acmella oleracea* Extract for Oral Mucosa Topical Anesthesia. *PLoS One*. 2016 Sep 14;11(9):e0162850.