

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento e avaliação farmacocinética de géis termossensíveis
para administração sustentada de molécula hidrofílica**

Alexandre Ferreira Bilhalva

Pelotas, 2017

Alexandre Ferreira Bilhalva

**Desenvolvimento e avaliação farmacocinética de géis termossensíveis
para administração sustentada de molécula hidrofílica**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia da Universidade Federal
de Pelotas, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.

Orientador: Francisco Augusto Burkert Del Pino

Coorientador: Marcio Nunes Corrêa

Coorientador: Rubens Alves Pereira

Pelotas, 2017

B595d Bilhalva, Alexandre Ferreira

Desenvolvimento e avaliação farmacocinética de géis termossensíveis para administração sustentada de molécula hidrofílica. / Alexandre Ferreira Bilhalva ; Francisco Augusto Burkert Del Pino, orientador ; Marcio Nunes Corrêa, Rubens Alves Pereira, coorientadores. — Pelotas, 2017.

65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Liberação controlada. 2. Hidrogéis. 3. Bovinos. 4. Fósforo. I. Pino, Francisco Augusto Burkert Del, orient. II. Corrêa, Marcio Nunes, coorient. III. Pereira, Rubens Alves, coorient. IV. Título.

CDD : 636.2

Alexandre Ferreira Bilhalva

**Desenvolvimento e avaliação farmacocinética de géis termossensíveis
para administração sustentada de molécula hidrofílica**

Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas

Data da Defesa: 20/02/2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa

.....

...

Dr. Rubens Alves Pereira

.....

...

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner

.....

...

Agradecimentos

Primeiramente a minha família e pessoas próximas a mim por todo o apoio durante o período do mestrado, Helena, Edson, Thiago, Rosi, Monique e Januza, muito obrigado!

Ao amigo Rubens Alves Pereira, por todo o aconselhamento, credibilidade, e ajuda em todos os períodos do experimento, facilitando bastante o desenvolvimento do projeto, e desenvolvimento pessoal.

Ao meu orientador e amigo professor Francisco Augusto Burkert Del Pino, pela orientação e ideias na qual facilitaram a elaboração da dissertação.

Ao amigo Marcio Nunes Corrêa pela credibilidade que foi depositada em mim, aconselhamentos, e oportunidades que me foram concedidas.

Agradeço também ao pessoal que participou e ajudou diretamente no desenvolvimento do projeto em diversos momentos, e mantiveram um ambiente de trabalho muito agradável, eles são: Rafael Prietsch, Patricia Mattei, Ilusca Finger, Alexandre Lima, Catiane Prestes e Josiane Feijó.

Agradeço a grande família do NUPEEC, pelo feliz convívio ao longo desses dois anos de muitas conquistas e felicidades.

Obrigado a todos!

Resumo

BILHALVA, Alexandre Ferreira. **Desenvolvimento e avaliação farmacocinética de géis termossensíveis para administração sustentada de molécula hidrofílica.** 2017. 65f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e avaliar *in vitro* e *in vivo* formulações de liberação sustentada de molécula hidrofílica, um suplemento energético bastante utilizado no meio veterinário, principalmente em bovinos leiteiros em períodos adversos como o periparto. O estudo *in vitro* ocorreu no Laboratório de Bioquímica Clínica do NUPEEC, na Universidade Federal de Pelotas, foram realizadas análises de geleificação, erosão, e liberação do fármaco. O estudo *in vivo* ocorreu no Centro de Pesquisa em Animais do Brasil, em São Paulo, utilizando 10 vacas lactantes da raça Holandês, com peso entre 494 kg – 657 kg. Os animais foram divididos em 2 grupos de 5 animais cada, variando, em cada um dos grupos as concentrações poliméricas utilizadas nas formulações. O grupo 1 continha 29% do polímero x e 10% do polímero y, e o grupo 2 continha 26% do polímero x e 15% do polímero y. Diferentes quantidades de formulação era administrado para cada animal dependendo do peso desse, a fim de alcançarem a concentração de 10 mg de molécula hidrofílica/kg. Após a administração das formulações, foram realizadas diversas coletas sanguíneas em períodos que iniciaram no momento da aplicação até 216 horas após a aplicação. O plasma coletado após a aplicação das formulações foi enviado para o laboratório LabFor, Campinas, onde foram realizadas as seguintes análises farmacocinéticas: área sob a curva, concentração máxima do composto, e tempo para concentração máxima do composto. Em relação as análises farmacocinéticas, em ambos os grupos as formulações foram capazes de manter uma liberação sustentada de molécula hidrofílica por um período entre 72 h e 96 h. Ambos os grupos alcançaram a concentração máxima 2 horas após a aplicação das formulações. Não houve diferença estatística em nenhum período analisado, referente as concentrações de molécula hidrofílica ($p=0,58$). O grupo 1 alcançou a concentração máxima de 14.140,00 $\mu\text{g/L}$ e o grupo 2 alcançou a concentração máxima de 13.600,00 $\mu\text{g/L}$, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p = 0,43$). Em relação a área sob a curva, o grupo 1 obteve uma média de 4.262.717 $\mu\text{g/L}$ até as 96 horas de avaliação, e o grupo 2 obteve uma média de 4.120.091 $\mu\text{g/L}$ até as 96 horas de avaliação, não havendo significância estatística entre esses ($p>0,05$). O estudo obteve êxito em desenvolver e avaliar formulações de liberação sustentada de molécula hidrofílica, ambas as formulações foram capazes de manter a liberação dos compostos ativos por um período de até 96 horas sendo, portanto, passíveis de utilização a campo.

Palavras-chave: liberação controlada; hidrogéis; bovinos; fósforo

Abstract

BILHALVA, Alexandre Ferreira. **Development and pharmacokinetic evaluation of thermosensitive gels for sustained administration of molécula hidrofílica** 2017. 65f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The objective of the present study was to develop and evaluate in vitro and in vivo sustained release formulations of molécula hidrofílica, an energy supplement widely used in the veterinary field, especially in dairy cattle in adverse periods such as the peripartum. The in vitro study was performed at the Laboratory of Clinical Biochemistry of NUPEEC, Federal University of Pelotas, analyzes of gelation, erosion, and drug release were performed. The in vivo study was carried out at the Brazilian Animal Research Center in São Paulo, using 10 lactating Holstein cows weighing between 494 kg and 657 kg. The animals were divided into 2 groups of 5 animals each, varying in each of the groups, the polymer concentrations used in the formulations. The Group 1 contained 29% of polymer x and 10% of polymer y, and group 2 contained 26% of polymer x and 15% of polymer y. Different amounts of formulation were administered to each animal depending on the weight thereof in order to achieve the concentration of 10 mg molécula hidrofílica/kg. After the administration of the formulations, several blood collections were performed in periods that started at the time of application until 216 hours after the application. The plasma collected after application of the formulations was sent to the laboratory LabFor, Campinas, where the following pharmacokinetic analyzes were performed: area under the curve, maximum compound concentration, and time to maximum compound concentration. Regarding pharmacokinetic analyzes, in both groups the formulations were able to maintain a sustained release of molécula hidrofílica for a period between 72 h and 96 h. Both groups reached the maximum concentration 2 hours after the application of the formulations. There was no statistical difference in any period analyzed, referring to molécula hidrofílica concentrations ($p = 0.58$). Group 1 reached a maximum concentration of 14,140.00 $\mu\text{g} / \text{L}$ and group 2 reached a maximum concentration of 13,600.00 $\mu\text{g} / \text{L}$, with no statistical difference between groups ($p = 0,43$). In relation to the area under the curve, group 1 obtained an average of 4,262,717 $\mu\text{g}/\text{L}$ up to 96 hours of evaluation, and group 2 obtained a mean of 4,120,091 $\mu\text{g}/\text{L}$ up to 96 hours of evaluation, there was no statistical significance among them ($p > 0,05$). The study was successful in developing and evaluating formulations of sustained release of hydrophilic molecule, both formulations were able to maintain the release of the active compounds for up to 96 hours and therefore could be used in field.

Key-words: controlled release; hydrogels; bovine; phosphorus

Lista de Figuras

Figura 1	Comparação entre o método de liberação convencional e a liberação controlada.....	20
Figura 2	Tipos de difusão de fármacos em dispositivos com métodos de liberação sustentada distintos	21
Figura 3	Processo de termogeleificação e modificação hidrofóbica-hidrofílica de hidrogéis	22
Figura 4	Estrutura química dos polímeros termossensíveis: poli(N-isopropilacrilamida) e poli(N,N-dietilacrilamida)	23
Figura 5	Estrutura química dos polaxâmeros Pluronic [®] , Pluronic [®] R, Tetronic [®] e Tetronic [®] R	25
Figura 6	Síntese da estrutura tribloco PEO-PPO-PEO do poloxâmero	26
Figura 7	Temperaturas de geleificação versus variação da concentração do polímero POLYMER X de 10% (w/w) - 30% (w/w)	27
Figura 8	Formulações poliméricas durante processo de preparação, após a hidratação das mesmas	40
Figura 9	Processo de <i>in vitro</i> de termogeleificação, as formulações após alcançaram uma determinada temperatura mudam de estado semissólido para estado sólido	41
Figura 10	Centro de Pesquisas em Animais do Brasil (CPABR), Amparo, São Paulo	43
Figura 11	Animais utilizados no experimento, vacas da raça Holandês, com peso variando de 459 kg – 657 kg e idade entre 2 e 6 anos	44
Figura 12	Infraestrutura do local de coletas sanguíneas e pesagem dos animais	45
Figura 13	Perfil de erosão dos géis ao longo de 96 horas de duração	48
Figura 14	Quantificação de molécula hidrofílica liberado até as 96 horas, após teste de quantificação <i>in vitro</i>	49
Figura 15	Avaliação do gel restante em 120 horas de erosão	51

Figura 16 Quantificação de molécula hidrofílica liberado ao longo de 120 horas de liberação ... 52

Figura 17 Resultados referentes as concentrações de molécula hidrofílica em todos os períodos analisados do estudo *in vivo* 55

.....

Lista de Tabelas

Tabela 1 Concentrações utilizadas dos polímeros e fármaco nas formulações, e temperatura de geleificação das triplicatas 47

Tabela 2 Concentrações dos polímeros e molécula hidrofílica utilizadas nas formulações, e temperaturas de geleificação das triplicatas 50

Tabela 3 Resultados referentes as análises de hematócrito (Ht), hemácias (He), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) 53

Tabela 4 Valores referentes às análises do número de leucócitos (LEUC), neutrófilos segmentados (SEG), eosinófilos (EOS), basófilos (BAS), linfócitos (LINF), monócitos (MONO), bastonetes (BAST) e plaquetas (PQT) 54

Tabela 5 Média das concentrações plasmáticas ($\mu\text{g/L}$), dos grupos 1 e 2, após diferentes períodos 56

Tabela 6 Média dos parâmetros farmacocinéticos dos grupos 56

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGNES	Ácidos graxos não esterificados
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
CC	Corpos cetônicos
BHBA	β -hidroxibutirato
AGLs	Ácidos graxos livres
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
TAGs	Triacilgliceróis
CIDR [®]	Controlled internal drug release
PEO	Óxido de polietileno
PPO	Óxido de polipropileno
PO	Óxido de propileno
EO	Óxido de etileno
ECC	Escore de condição corporal
HT	Hematócrito
HE	Hemácias
HB	Hemoglobina
VCM	Volume corpuscular médio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
LEUC	Valores individuais do número de leucócitos
SEG	Neutrófilo Segmentados
EOS	Eosinófilos
BAS	Basófilos
LINF	Linfócitos
MONO	Monócitos
BAST	Bastonetes
PQT	Plaquetas
Cmax	Concentração plasmática máxima

Tmax

Tempo para concentração plasmática máxima

AUC

Área sob a curva

Sumário

1	Introdução	12
1.1	Objetivos	14
2	Revisão de literatura	14
2.1	Bovinocultura	14
2.2	Balanço energético negativo e cetose	15
2.2.1	Perdas econômicas	17
2.2.2	Estratégias terapêuticas e preventivas	17
2.3	Molécula hidrofílica	18
2.4	Liberação controlada	19
2.4.1	Hidrogéis	22
2.4.1.1	Polaxâmeros	24
3	Projeto de Pesquisa	28
4	Metodologia	40
4.1	Preparação das formulações de liberação controlada	40
4.2	Análise in vitro das formulações	41
4.3	Manejo de animais e instalações	42
4.4	Coletas de sangue	44
4.5	Análises sanguíneas	45
4.6	Análises farmacocinéticas	46
4.7	Análises estatísticas	46
5	Aspectos éticos	46
6	Resultados e discussão	46
6.1	Análises in vitro	46
6.1.1	Formulações com 29% do polímero x	46
6.1.2	Formulações com 26% do polímero x	50
6.2	Resultados in vivo	53
6.2.1	Análises hematobioquímicas	53
6.2.2	Avaliações farmacocinéticas	55
7	Conclusão	59
8	Referências	60

1 Introdução

Nas últimas décadas cada vez mais se tem investido em pesquisa e alternativas para melhora na nutrição e manutenção energética de animais de produção. Especificamente quando falamos em vacas leiteiras, esses ruminantes passam por períodos extremos de demanda nutricional, principalmente durante o período de transição gestação/lactação (CAMPOS et al, 2005). Nessa fase, comumente compreendida por 21 dias antes e 21 dias após o parto, o animal passa de uma situação em que está gestante e não lactante, para uma situação de não gestante e lactante (NETO et al, 2011).

Durante esse período de transição a vaca diminui sua ingestão de alimento, além de aumentar suas necessidades nutricionais para o desenvolvimento do feto, e posteriormente para síntese do leite. Em função desse desequilíbrio entre a demanda e disponibilidade de energia, o animal entra em balanço energético negativo (BEN), ou seja, a vaca entra em um status de déficit energético (SOUZA et al, 2015). Durante essa fase, o organismo inicia o processo de mobilização de suas reservas lipídicas, aumentando os níveis séricos de ácidos graxos não esterificados (AGNEs), para tentar suprir a demanda energética. Porém, durante esse processo, muitas vezes o fígado não consegue metabolizar a grande quantidade de derivados da oxidação dos AGNEs, o acetil-CoA, e com isso ocorre o acúmulo dessa molécula no fígado. A oxidação parcial do acetil-CoA formará os corpos cetônicos (cc), que são majoritariamente o acetoacetato, acetona e β -hidroxibutirato (BHBA), conseqüentemente acarretando o quadro denominado cetose (DRACKLEY, 1999).

A cetose não apenas acomete vacas leiteiras, mas também vacas de corte e ovelhas, pois acontece no final da gestação, comumente a gestações gemelares. Todas as complicações metabólicas da cetose afetam diretamente a produtividade dos animais, sendo um fator preocupante para lucratividade dos sistemas pecuários. O diagnóstico da patologia pode ser realizado através de

dosagens sanguíneas de glicose e ácidos graxos livres (AGLs), além da detecção de CC no leite e sangue (GEISHAUSER et al, 2000).

Portanto, buscam-se estratégias para minimizar o déficit energético durante o período de transição, dentre elas estão a utilização de dietas específicas visando um maior aporte nutricional, bem como a utilização de suplementação energética a base de fósforo para esses animais. Um exemplo de fósforo é o composto Molécula hidrofílica, uma fonte orgânica derivada do ácido fosfórico, com papel importante no ciclo ADP/ATP, favorecendo a fosforilação nucleotídica no ciclo de Krebs (PEREIRA, 2010). O Molécula hidrofílica auxilia na redução do estresse, através da diminuição dos níveis de cortisol e elevando os de insulina (VAN DER STAAY et al, 2007), hormônio que melhora a entrada de glicose na célula, sendo também responsável pelo armazenamento de energia nas formas de glicogênio, triglicerídeos e proteínas (CUTERI et al, 2007)

Entretanto, para manutenção dos níveis terapêuticos da molécula, se faz necessário diversas administrações ao longo de vários dias, prática extremamente difícil de ser realizada, principalmente quando estamos lidando com um grande número de animais. Nesse contexto, é necessário o desenvolvimento de novas formulações que possuam uma liberação sustentada, que visem a manutenção do fármaco em um nível terapêutico, por vários dias. Para que isso seja alcançado, existem diversos métodos na tecnologia farmacêutica (UHRICH et al, 1999) capazes de fornecer uma liberação lenta e contínua de fármacos, muitos desses sistemas são desenvolvidos com uma matriz formada por polímeros ou membranas capazes de conter essa liberação (DE LYRA et al, o qual pode ser ativado por estímulos como temperatura, pH e pressão osmótica (BAJPAI et al, 2008).

Dentre os variados sistemas de liberação de fármacos, podemos citar os hidrogéis como uma categoria de polímeros passíveis de utilização na liberação controlada. Eles são formados por polímeros solúveis em água, formando redes tridimensionais reticuladas (HOARE; KOHANE, 2008). A principal característica desses polímeros é sua capacidade de termogeleificação, ou seja, dependendo da temperatura a formulação está em estado líquido, e com o aumento desta, o

líquido passa para o estado de gel aumentando a sua viscosidade e resistência (DETERMAN et al, 2007).

1.1 Objetivos

- a) Desenvolver e avaliar uma nova estratégia para amenizar o balanço energético negativo em vacas leiteiras;
- b) Desenvolver e avaliar *in vitro* formulações de liberação sustentada de molécula hidrofílica, utilizando polímeros biodegradáveis;
- c) Realizar ensaios *in vivo* com vacas leiteiras em lactação;

2 Revisão de Literatura

2.1 Bovinocultura

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. Segundo o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o Brasil é dono do segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. O país, desde 2004, é líder nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (MAPA, 2016).

O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois principais segmentos lucrativos: as cadeias produtivas da carne e leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos é estimado em R\$ 67 bilhões, esse fator aliado à presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidencia a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país (MAPA, 2016).

O clima tropical e a extensão territorial do Brasil contribuem para esse resultado, uma vez que permitem a criação da maioria do gado em pastagens. Além disso, o investimento em tecnologia e capacitação profissional, o desenvolvimento de políticas públicas, que permitem que o animal seja rastreado do seu nascimento até o abate, o controle da sanidade animal e segurança

alimentar, contribuíram para que o País atendesse às exigências dos mercados rigorosos e conquistasse espaço no cenário mundial (MAPA, 2016).

Em relação à pecuária leiteira, dados do IBGE mostram que em 2014 a produção brasileira de leite chegou em 35,17 bilhões de litros, demonstrando um aumento de 2,7% em relação aos dados de 2013. No panorama mundial, o Brasil em 2014, se encontrava em 5º lugar no ranking de produção mundial, atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China (Milkpoint, 2016). O preço médio nacional do litro do leite foi de R\$ 0,96, gerando um valor de produção de R\$ 33,78 bilhões em 2014 (Milkpoint, 2016).

A produtividade média da produção de leite no Brasil foi de 1.525 litros/vaca/ ano, em 2014, correspondendo a um crescimento de 2,2% em relação à observada em 2013 (1.492 litros/vaca/ano). A Região Sul apresentou a maior produtividade nacional, 2 789 litros/vaca/ano, um aumento de 4,3% em 2014, comparado ao ano anterior. No Sul do País ocorreram as maiores produtividades, destacando-se o estado do Rio Grande do Sul com a maior produtividade nacional (3.034 litros/vaca/ano), seguido por Santa Catarina (2.694 litros/vaca/ano) e Paraná (2.629 litros/vaca/ ano) (IBGE, 2016).

2.2 Balanço energético negativo e cetose

Dentre períodos adversos para animais de produção como bovinos e ovinos, o periparto, período que é designado como 21 dias antes até 21 dias após o parto, é uma das fases mais críticas na manutenção da saúde e da produção desses animais. Nesse período, o animal passa de um estado onde se encontra prenhe e não lactante, para um estado lactante não prenhe. No período final de gestação e no início da lactação, as necessidades nutricionais desses animais para o crescimento do feto e síntese do leite aumentam consideravelmente, com isso a vaca não consegue atender suas demandas nutricionais (WATHES et al, 2007).

Há um grande aumento na demanda de glicose, aminoácidos, e ácidos graxos para o estabelecimento da lactação (BAUMAN; CURRIE et al, 1980). Há

intensa mobilização de ácidos graxos não-esterificados (AGNEs) pelo fígado, local onde essas moléculas de AGNEs podem ser oxidadas a dióxido de carbono para fornecimento de energia, ou parcialmente oxidadas, produzindo os corpos cetônicos ou acetato o qual são transportados para diversas regiões no organismo (WATHES et al, 2007). Em outra via, os AGNEs podem ser esterificados em triacilgliceróis (TAGs) o qual se acumulam no fígado, tendo sua máxima concentração de 7 a 13 dias após o parto e então diminui gradualmente (GRUMMER, 1995; BAUMAN; CURRIE, 1980).

O β -hidroxibutirato (BHBA) é a forma de corpo cetônico mais predominante no sangue, analisando a sua concentração, pode-se identificar um aumento da oxidação de ácidos graxos. O aumento dos corpos cetônicos circulantes no organismo do animal caracteriza um dos sintomas da patologia denominada cetose (HERDT, 2000). A cetose pode ser classificada em clínica e subclínica, sendo que a primeira pode ser subclassificada em primária, secundária, alimentar e espontânea. A primária ocorre quando o animal não recebe alimentação suficiente para suas demandas energéticas; a cetose secundária ocorre quando a ingestão de alimentos está reduzida, como por exemplo no período de transição, ou devido a ocorrência de outras enfermidades que levam a uma menor quantidade de ingestão de alimento, é a ocorrência mais frequente; a cetose alimentar ocorre quando o animal ingere muitos alimentos precursores cetogênicos, como a silagem de milho, por exemplo; e a cetose espontânea acontece quando há um aumento sem causa identificada de corpos cetônicos no sangue (DUFFIELD, 2000). Os principais sintomas da cetose clínica são: a perda do escore de condição corporal, diminuição da produção, fezes secas, anorexia, e ocasionalmente podem ocorrer sintomas neurológicos (SOUZA et al, 2015).

A cetose subclínica se caracteriza com um estágio inicial da cetose clínica, porém sem alterações clínicas, mas com a elevação dos corpos cetônicos no sangue. As alterações fisiológicas mais recorrentes são a hipoglicemia (até 90% da glicose pode ser desviada para síntese de lactose) e cetonemia, principalmente o BHBA (DUFFIELD, 2000).

2.2.1 Perdas econômicas

A cetose pode acarretar muitas perdas na produção leiteira, custo com medicamentos, serviço de veterinários, diminuição da taxa de concepção, assim como, em casos mais extremos, o próprio descarte do animal acometido. Além disso, até mesmo a cetose subclínica aumenta o risco de doenças como mastite, metrite, laminite e deslocamento de abomaso ocorrerem (MCART et al, 2012).

McArt e colaboradores (2014) identificaram perdas no valor de U\$ 127.00 e U\$106.00, respectivamente para nulíparas e múltiparas com quadro de cetose. Desse total, 32% foram devido a perdas na eficiência reprodutiva futura, 28 % com outras doenças concomitantes, 22% referente à produção de leite, 13% por descarte, 3% com tratamento, 2% mão-de-obra e 1% com diagnóstico. As perdas totais por cada caso de cetose no sistema de produção foram de U\$ 361.00 e de U\$ 279.00, respectivamente para nulíparas e múltiparas. Deste total, 40% foi devido aos gastos direto com os quadros de cetose, 32% relacionado a ocorrência de metrite e 28% a deslocamento de abomaso.

2.2.2 Estratégias terapêuticas e preventivas

Para prevenção da cetose usualmente se utilizam estratégias nutricionais no seu período seco e período de transição. Os objetivos da dieta de transição são especificamente prevenir a cetose subclínica através da maximização da ingestão de matéria seca e fornecendo uma quantidade de energia satisfatória (OETZEL; GOFF, 1998). Alguns com vacas no periparto já utilizaram algumas estratégias baseadas em ácido nicotínico (FÜRL, 1989), carnitina (LACOUNT et al, 1995) glicerol (DEFRAIN et al, 2004), propilenoglicol e propionato (KRISTENSEN; RAUN, 2007), monensina (ARIELI et al, 2008), metionina (PREYNAT et al, 2009) e colina (CHUNG et al, 2009).

Uma alternativa recente tem sido a utilização de suplementos energéticos a base de fósforo orgânico como fornecimento de energia. As moléculas de fósforo possuem uma grande importância no organismo, está diretamente envolvido na síntese e composição dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), hormônios, é integrante de moléculas intermediárias do metabolismo energético

(ATP e ADP), além da participação da composição óssea do animal (GONZÁLES; SILVA, 2002).

O fósforo age sobre o equilíbrio ácido-básico dos fluidos através do sistema tampão-fosfato (UNDERWOOD, 1999) e também atua como constituinte de fosfolípídeos estruturais nas membranas celulares necessários para a absorção, movimentação, deposição e utilização das gorduras no organismo (UNDERWOOD, 1999) Além disso, o fósforo possui uma grande importância no metabolismo de carboidratos no fígado, onde ocorre a fosforilação de todos os intermediários da gliconeogênese (KREIPE et al, 2011). Portanto, as taxas de gliconeogênese e glicólise são reguladas a partir da biodisponibilidade de fósforo (BERG et al, 2006).

2.3 Molécula hidrofílica

Dentre as estratégias de utilização de fósforo para tratamento e prevenção das desordens energéticas em ruminantes, o molécula hidrofílica (ácido 1-(n-butilamino)-1-metiletil-fosfônico), um tipo de fósforo orgânico, é uma alternativa bastante utilizada em ruminantes. Em uma aplicação de 100 miligramas de molécula hidrofílica contem aproximadamente 17,3 mg de fósforo em sua composição (ROLLIN et al, 2010).

O molécula hidrofílica já é utilizado em um composto bastante difundido no meio veterinário, o suplemento energético Catosal B12 (Bayer Saúde Animal), sua aplicação é recomendada diariamente em casos extremos de déficit energético, em doenças crônicas a recomendação é a aplicação diversas vezes em intervalos de 3 a 5 dias (Website Bayer Saúde Animal – 24/10/16). De acordo com a bula do suplemento, para bovinos e equinos adultos, a dose recomendada varia de 5,0 ml – 25,0 ml, podendo ser administrado pela via subcutânea, intramuscular ou intravenosa.

Em um estudo de Pereira e colaboradores (2013) foi utilizado o molécula hidrofílica combinado com cianocobalamina (vitamina B12) em ovelhas na primeira semana pós-parto, essa combinação resultou em menores concentrações de AGNEs e acetona no soro, e aumento das concentrações de

fósforo, glicose, e maior ingestão de matéria seca pelos animais. Em outro estudo de Pereira e colaboradores (2013) foi utilizada a molécula hidrofílica em combinação com a cianocobalamina em vacas em período pós-parto, nesse trabalho foi verificado uma diminuição de AGNEs e colesterol nos animais tratados, também foi identificada uma diminuição dos níveis de BHBA. Houve um aumento na produção leiteira e proteína do leite linearmente com o aumento das doses do tratamento, indicando diversos benefícios na utilização da molécula hidrofílica como suplemento energético.

2.4 Liberação controlada de fármacos

A liberação controlada é definida como a capacidade de liberação de um fármaco em uma taxa pré-determinada, em um período pré-definido, e essa técnica vem sendo utilizada e estudada para eliminar limitações de sistemas farmacêuticos convencionais de entrega de fármacos (QIU; PARK, 2001). Dentre as inúmeras vantagens da utilização de dispositivos de liberação controlada estão a eficácia intensificada, toxicidade reduzida e maior conveniência na aplicação (UHRICH et al, 1999). Na liberação controlada pode-se trabalhar com cada molécula de forma diferente, dependendo da forma de liberação e período que temos interesse que cada fármaco seja liberado. Por exemplo, se possuímos uma molécula que é rapidamente metabolizada no organismo, podemos desenvolver um sistema de liberação sustentada por um tempo bem mais longo (RATHBONE; GURNY, 2000).

Na figura 1, temos um exemplo de comparação do método convencional de liberação e aplicação de fármacos com a liberação controlada. Podemos perceber a necessidade de diversas doses no método convencional, ao passo que a liberação controlada necessita de apenas uma aplicação para uma duração de 24 horas. Também percebe-se que apenas níveis terapêuticos são atingidos na liberação controlada, entretanto no sistema convencional, quando ocorre a administração das doses, o fármaco pode atingir níveis tóxicos ao organismo do indivíduo, além de que quando há a proximidade de nova aplicação de uma dose, o mesmo fármaco se encontra em uma faixa subterapêutica.

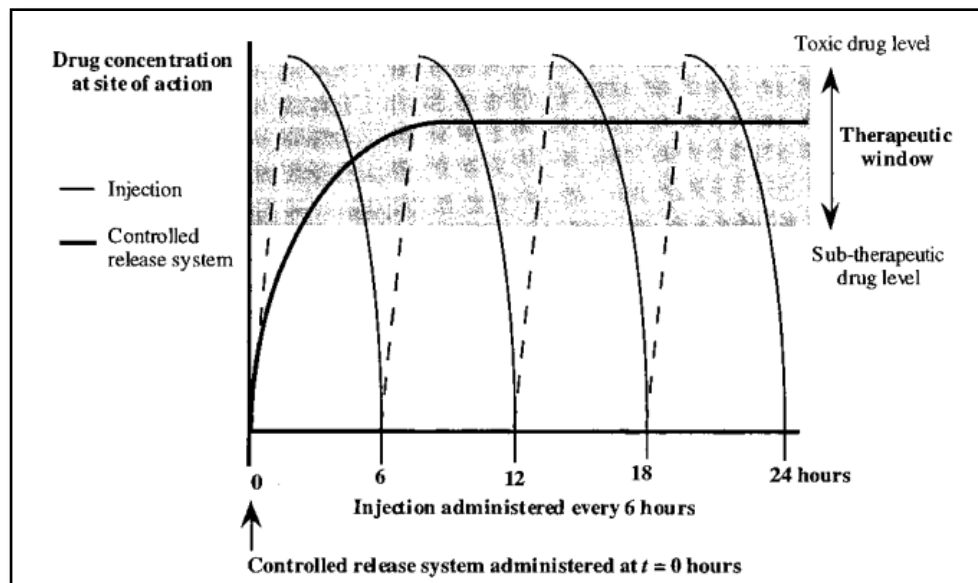


Figura 1 – Comparação entre o método de liberação convencional e a liberação controlada.
 Fonte: Uhrich et al, 1999, p.3183.

Em métodos de liberação controlada por distribuição, o dispositivo é liberado em um local específico do corpo do indivíduo, essa liberação pode ser ativada por pH, temperatura, ou osmolaridade (HOARE; KOHANNE, 2008). Os dispositivos poliméricos que promovem uma forma de liberação sustentada “protegem” a molécula ativa do meio orgânico no qual estão inseridos. Esse mecanismo pode envolver o atraso da dissolução das moléculas do fármaco, portanto inibindo a difusão da droga fora do dispositivo, controlando a difusão da mesma (BAKER; RHODES, 1995). Na figura 2 temos uma comparação de métodos de controle do dispositivo na forma de como o fármaco é liberado para o meio. Na primeira parte da figura, a dissolução controlada, o polímero dissolve gradativamente, com isso o fármaco vai difundindo pelo meio no qual está o dispositivo. Na segunda parte, em virtude da insolubilidade da matriz dos polímeros, o fármaco difunde através de poros na estrutura desse, e após isso consegue entrar em contato com o meio, fora do dispositivo. Na parte final da figura o dispositivo é desenvolvido com uma membrana semipermeável a água, com isso, a droga é dissolvida por essa água e difunde através do polímero para o meio.

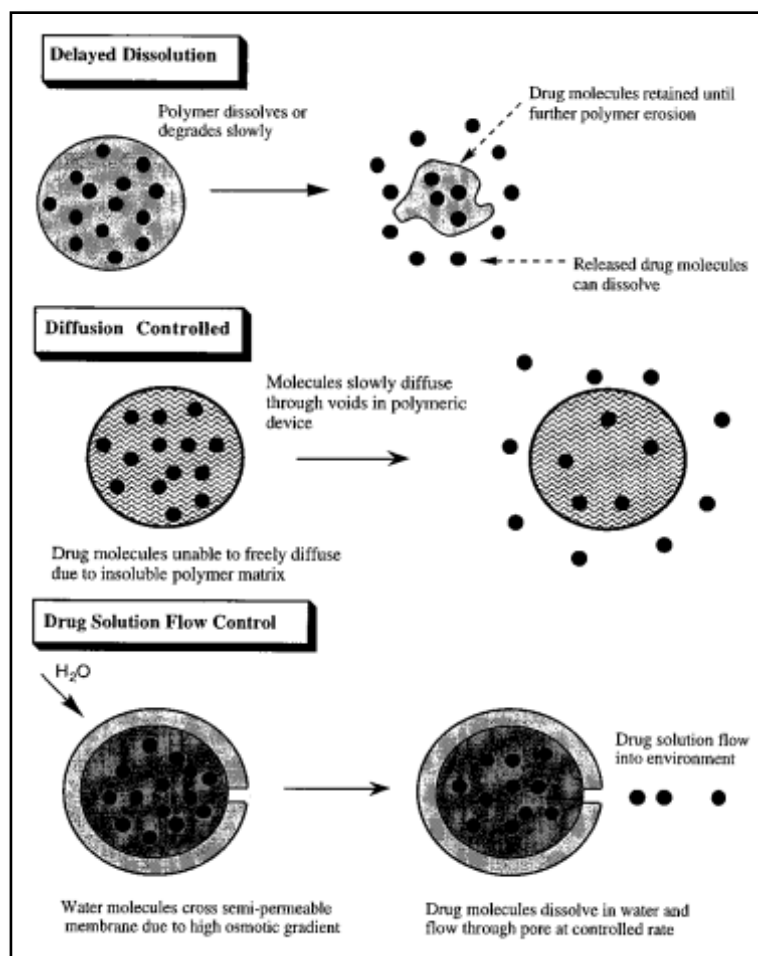


Figura 2 – Tipos de difusão de fármacos em dispositivos com métodos de liberação sustentada distintos.

Fonte: Uhrich et al, 1999, p.3183.

Na medicina veterinária a liberação controlada já é bastante utilizada em vários produtos como, dispositivos intrauterinos para controle de estro, como por exemplo os dispositivos CIDR[®] (controlled internal drug release) (COLAZO et al, 2004; MARTINEZ et al, 2005), formulações subcutâneas para controle infecções por carrapatos (ZEIDNER et al, 2008), bolus intraruminais anti-parasitários (ALVINERIE et al, 1999), tabletes vaginais antimicrobianos (GAVINI et al, 2002), cápsula de liberação controlada de monensina (DUFFIELD et al, 1999).

Dentre os polímeros capazes de serem utilizados para liberação controlada, podemos citar os poliésteres, os poliortoésteres, polianidridos e poliamidas como classes de polímeros bastante utilizados no desenvolvimento

de dispositivos biodegradáveis (VILLANOVA et al, Uma classe com um grande potencial de utilização são os hidrogéis, polímeros que passam por um processo de geleificação ao receber algum estímulo ambiental como, por exemplo, variações na temperatura ou pH e formam um gel. Assim que esses estímulos não estão mais presentes, as formulações voltam para seu estado inicial líquido (QIU; PARK, 2001).

2.4.1 Hidrogéis

Os hidrogéis são estruturas tridimensionais na forma de redes interligadas de polímeros solúveis em água. Os hidrogéis podem ser desenvolvidos com formas físicas variadas, incluindo nanopartículas, revestimentos e filmes (HOARE; KOHANE, 2008). Dentre as possibilidades de utilização desses polímeros estão a medicina regenerativa, engenharia de tecidos (KHADEMHOSEINI; LANGER, 2007), liberação controlada, entre outras aplicações. Como mencionado anteriormente, esses polímeros sofrem modificações quando entram em contato com estímulos ambientais como temperatura, pH ou osmolaridade (figura 3).

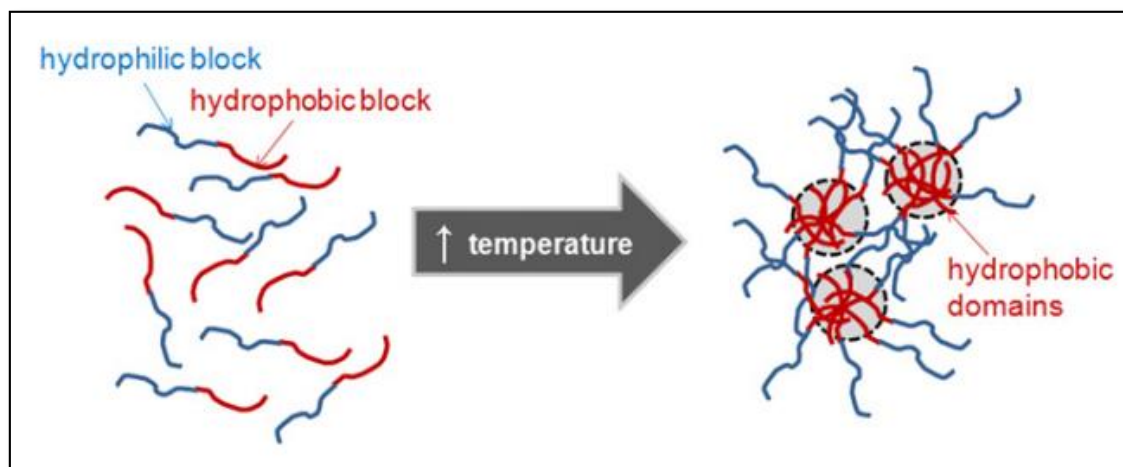


Figura 3 – Processo de termogeificação e modificação hidrofóbica-hidrofílica de hidrogéis.

Fonte: Hoare; Kohane, 2008, p.1994

Os hidrogéis podem ser classificados em dois grupos distintos: os géis pré-formados e os géis formados *in situ* (MINKE; BLACKWELL, 1978). Nos géis pré-formados são estruturas simples, altamente viscosas, que não sofrem modificações pós-aplicação, já os géis formados *in situ*, são formulações menos viscosas, e após a aplicação no indivíduo, sofrem alterações estruturais devido a estímulos fisiológicos (RATHBONE; GURNY, 2000).

Hidrogéis sensíveis à temperatura são provavelmente os mais utilizados em pesquisas, a maioria desses polímeros aumentam sua solubilidade em água com o aumento da temperatura. Normalmente as formulações, assim que são administradas no organismo, iniciam o processo de formação do gel (RUELGARIEPY; LEROUX, 2004).

Há um grande número de polímeros utilizados para formação de hidrogéis, entre eles podemos citar o poli(N-isopropilacrilamida), poli(N,N-dietilacrilamida) (figura 4), metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxipropilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, carbopol, xantana, e os pluronics (polaxâmeros) (RATHBONE; GURNY 2000).

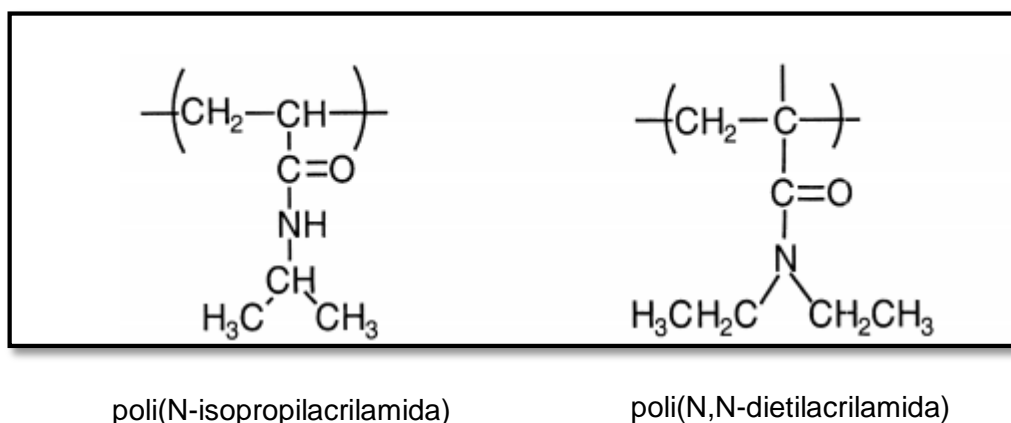


Figura 4 – Estrutura química dos polímeros termossensíveis: poli(N-isopropilacrilamida) e poli(N,N-dietilacrilamida)

Fonte: Adaptado de Qiu; Park, 2001, p.323

Na medicina veterinária os hidrogéis são utilizados principalmente para tratamento de desordens oculares, como por exemplo, na ceratoconjuntivite seca, uma doença no qual há um ressecamento da córnea e da conjuntiva devido

a uma menor porção aquosa da lágrima. Em coelhos também já foi testado hidrogéis para tratamento de ceratoconjuntivite seca utilizando os polaxâmeros (WARING; HARRIS, 1979). Um trabalho realizado por Ryo (1989) utilizando um hidrogel contendo o antibiótico tartrato de tilosina, foi aplicado na região ocular de bezerros, e foi capaz de diminuir consideravelmente o nível de proliferação bacteriana nesses. Em outro estudo desenvolvido por Sezer e colaboradores (2008), um hidrogel contendo quitosana e fucoidana, um agente cicatrizante, foi utilizado em sete coelhos da raça New Zealand. Os animais tiveram uma cicatrização mais rápida com a utilização desse hidrogel.

2.4.1.1 Polaxâmeros

Os Polaxâmeros (Pluronic® e Tetronics®) são uma classe de polímeros termorreversíveis muito utilizados em pesquisas e produtos devido a sua característica de formação de gel *in situ*, biodegradabilidade, atoxicidade e facilidade de aplicação. Esses polímeros são formados por estruturas tridimensionais em blocos normalmente na disposição A-B-A, onde duas estruturas químicas iguais ficam nas porções externas a essa disposição tribloco, e uma estrutura distinta na porção interna (BROMBERG; RON, 1998).

Dentre os grupamentos químicos mais utilizados na manufatura dessa classe de polímeros estão o óxido de polietileno e óxido de polipropileno, sendo que o primeiro usualmente se encontra nas porções externas do tribloco e o segundo na porção interna. Os principais polímeros dessa classe estão representados na figura 5 (WANG; JIANG, 2005).

A síntese da estrutura tribloco PEO (óxido de polietileno)-PPO (óxido de polipropileno)-PEO (óxido de polietileno), se dá através da adição sequencial do primeiro óxido de propileno (PO) e depois o óxido de etileno (EO) a um propilenoglicol de baixo peso molecular, solúvel em água, um oligômero óxido de polipropileno (ALEXANDRIDIS; HATTON, 1995). A figura 6 demonstra o processo de síntese das cadeias tridimensionais de PEO-PPO-PEO.

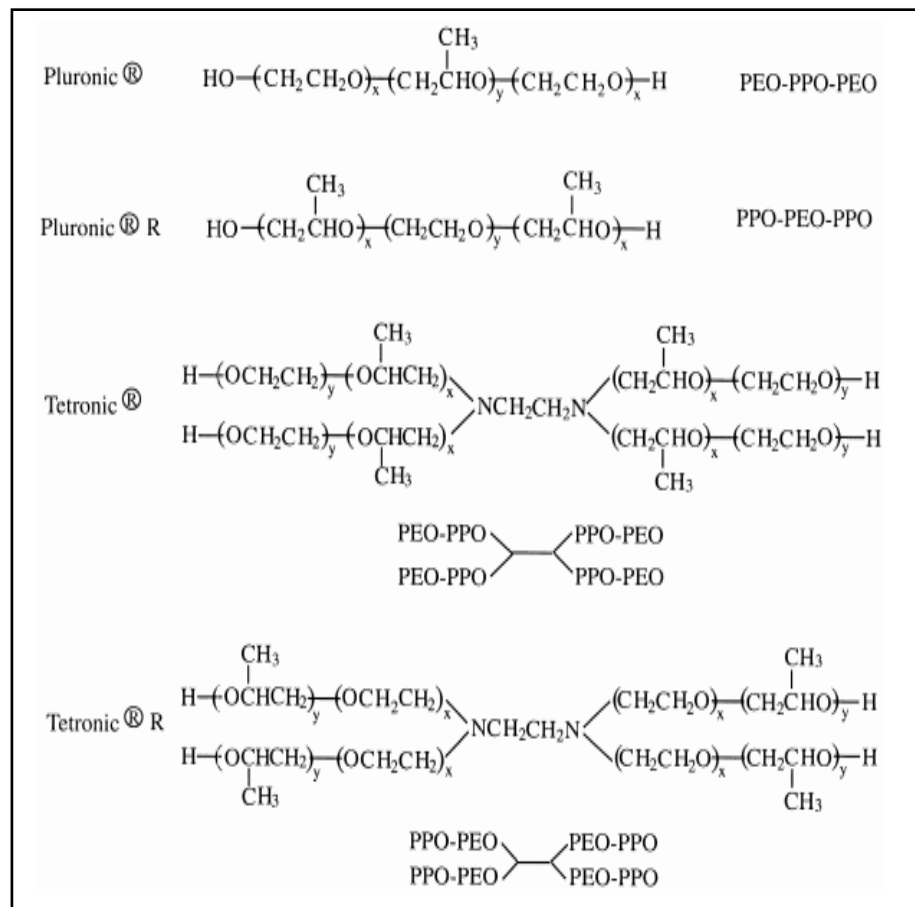


Figura 5 – Estrutura química dos polaxâmeros Pluronic®, Pluronic® R, Tetronic® e Tetronic® R.

Fonte: Qiu; Park, 2001, p.324

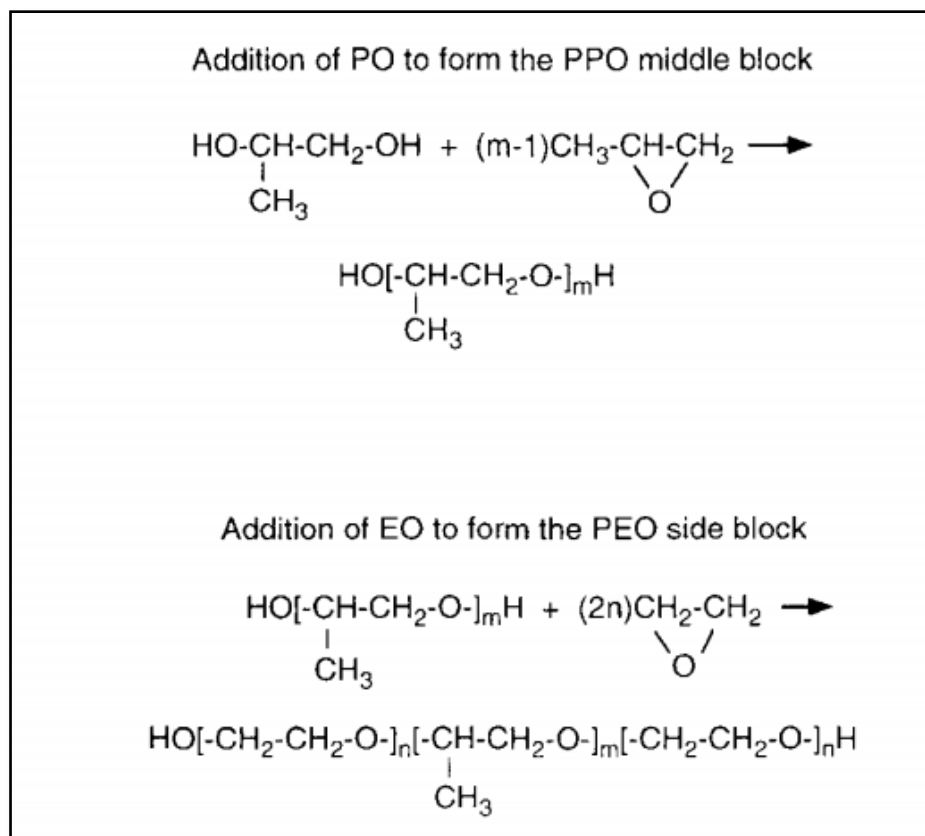


Figura 6 – Síntese da estrutura tribloco PEO-PPO-PEO do poloxâmero.

Fonte: Alexandridis; Hatton, 1995, p.2

As características surfactantes desses polímeros, além da sua capacidade de formação de micelas melhorando a capacidade de armazenamento e entrega de fármaco, os tornam um tipo polimérico com bastante potencial de utilização na liberação controlada (ALEXANDRIDIS; HATTON, 1995). Esses polímeros possuem em uma grande variedade de tamanhos e peso moleculares, com isso a sua viscosidade pode variar extensamente de acordo com essas características.

Fármacos incorporados em micelas utilizando os poloxâmeros melhoram a penetração em tecidos devido as suas diferentes porções no qual as drogas estão solubilizadas (SAETTONNE et al, 1988). Normalmente, na preparação das formulações utiliza-se o “Cold Method”, que consiste em solubilizar o polímero em água fria (5°C – 10°C) utilizando um agitador magnético, a formulação deve ser refrigerada “overnight” para que tenha completa dissolução na água

(SCHMOLKA, 1972). Por fim o fármaco é adicionado, formando uma solução com características termoreversíveis, com a droga aprisionada na matriz do polímero.

Utilizando diferentes concentrações dos polímeros pode-se atingir temperaturas de geleificação diferentes, esse fator é de muita importância quando desenvolve-se um dispositivo para utilização em diferentes regiões fisiológicas do animal (NEWA et al, 2007). Na figura 7 podemos observar as diferentes temperaturas de geleificação variando-se as concentrações do polaxâmero POLYMER X. Podemos observar que ao aumentarmos as concentrações do polímero ocorre uma diminuição da temperatura de transição, portanto, quando se obtém interesse em desenvolver dispositivos para aplicação em tecidos fisiológicos, concentrações muito elevadas do polaxâmero não são indicadas.

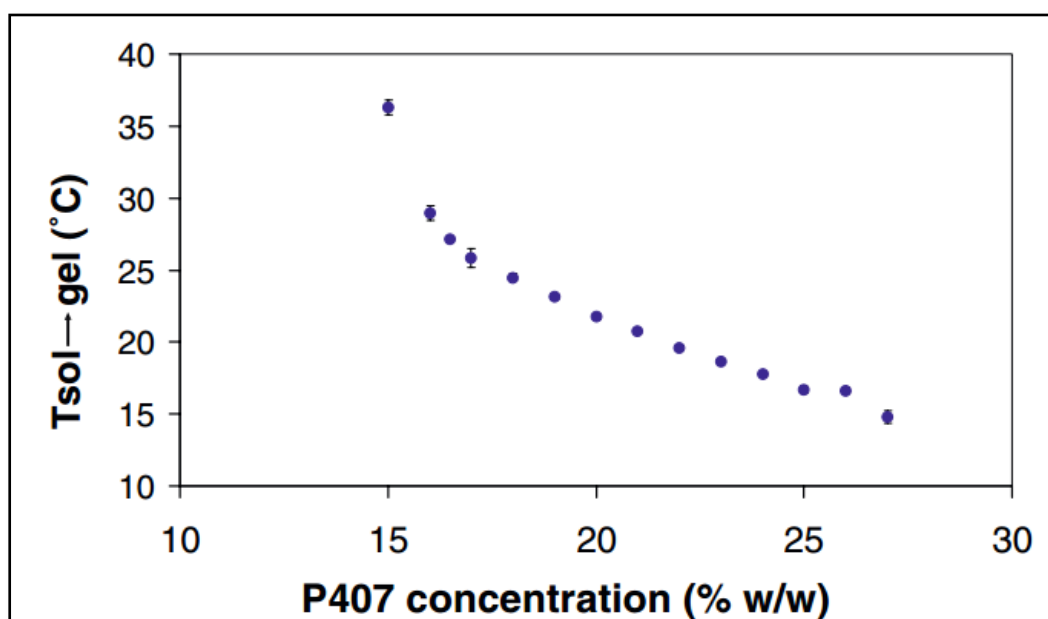


Figura 7 – Temperaturas de geleificação versus variação da concentração do polímero POLYMER X de 10% (w/w) - 30% (w/w)

Fonte: Dumortier et al, 2006, p.2713

Todos os polaxâmeros possuem estruturas químicas similares, variando o seu peso molecular e composição do bloco PEO hidrofílico, e do bloco

PPO hidrofóbico (PATEL et al, 2009). Os polaxâmeros disponíveis são comercializados baseados em parâmetros como massa molecular, porcentagem de alguma porção específica do polímero, como por exemplo o óxido de etileno. Os tipos mais utilizados desses polímeros são os polaxâmeros 68, 88, 98, 108, 124, 188, 237, 338 e 407 (PATEL et al, 2009).

3. Projeto de Pesquisa

PROJETO DE PESQUISA Inovação Farmacêutica em Medicina Veterinária: desenvolvimento farmacotécnico e ensaios clínicos

Qualificação do principal problema a ser abordado

O segmento de saúde animal é caracterizado como a indústria fabricante de produtos farmacêuticos veterinários, a qual é responsável por manter a saúde e produtividade dos diversos rebanhos em todo o mundo, bem como por assegurar a sanidade e a abundância do alimento que produzem. A expansão do mercado veterinário mundial está em evidência e pode ser atribuída à continuidade da ameaça das doenças, ao aumento do interesse da população pela segurança alimentar e a um maior rigorismo do arcabouço regulatório.

No Brasil, este setor é caracterizado por dois tipos de empresas: as multinacionais, que são de grande porte e têm ação global, e as empresas brasileiras, de pequeno porte e atuação, normalmente, local. As multinacionais lideram o processo de desenvolvimento e inovação, trazendo constantemente para o mercado brasileiro produtos modernos, embora, sua atuação global, não permita que sejam especializadas.

Essa especialização fica a cargo das empresas nacionais, que desenvolvem opções específicas para as necessidades locais e

determinados segmentos do mercado, ou surge das parcerias entre empresas multinacionais e universidades, onde estas, conhecendo a realidade local, propõem inovação baseadas nas demandas mercadológicas, amparadas por aquelas, as quais são beneficiadas por produtos inovadores, desenvolvidos com especialidades regionais e/ou nacionais, mas com tecnologias globais (Capanema, 2007).

Há também consideráveis sinergias nas fases iniciais do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos dos setores humano e veterinário. Essa similaridade faz com que a maioria das empresas que atua em uma delas atue também na outra. Esse aspecto vem sendo cada vez mais reconhecido pelas agências reguladoras, que, ao elaborarem as normas que regem a indústria veterinária, procuram se espelhar nas exigências existentes para a indústria farmacêutica humana (Capanema, 2007).

Deste modo, encontramos na medicina humana, muitas inovações em terapias medicamentosas, cujas tecnologias podem, muitas vezes, ser extrapoladas para a medicina animal, necessitando, obviamente, de ajustes, porém com grande possibilidade de fornecer à veterinária, produtos inovadores a partir de tecnologias avançadas já utilizadas e com eficácia e eficiência já comprovadas.

Assim sendo, as propostas apresentadas neste projeto, buscam fornecer às empresas do setor privado de desenvolvimento e produção de produtos veterinários, a possibilidade de especialização e inovação em seus produtos, buscando atender áreas específicas do mercado ancorado em exemplos muitas vezes já existentes na medicina humana e em estudos minuciosos de investigação científica no que tange à terapêutica veterinária propriamente dita.

Além disso, cabe a consideração de que, mesmo quando não envolve a descoberta de uma nova molécula, a inovação contribui para a melhoria da saúde animal, com medicamentos mais eficazes e contribuindo para o uso racional. Além disso, oferecendo terapias alternativas, com vias de administração mais simples, reduzidos efeitos colaterais ou mesmo alternativas de tratamento a preços menores, há a possibilidade de ampliação do acesso aos

medicamentos às classes antes não privilegiadas, caracterizando com isso benefícios sociais.

Todas estas estratégias possuem um único propósito: a melhora da qualidade de vida dos animais, através da otimização da ação terapêutica das formulações, com a redução dos eventos adversos, propiciando o uso racional e sustentável de medicamentos veterinários.

Objetivos e metas a serem alcançados

Objetivo geral

Desenvolver atividades de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de produtos farmacêuticos de uso veterinário, com potencial para geração de patentes.

Objetivos específicos

- Realizar ensaios *in vitro* de controle de qualidade de farmoquímicos para a indústria farmacêutica veterinária;
- Realizar testes de compatibilidade de adjuvantes farmacêuticos de uso veterinário: compatibilidade entre adjuvantes e entre estes e princípios ativos;
- Realizar ajustes farmacotécnicos de formulações farmacêuticas sob relatos de problemas oriundos de sua manipulação e/ou fabricação;
- A partir dos ajustes mencionados no item anterior, buscar implantação de novas metodologias;

- Realizar testes de inocuidade e de toxicidade de fármacos veterinários, através de ensaios em animais das espécies para as quais o medicamento foi desenvolvido;
- Realizar avaliações *in vitro* de formulações veterinárias, através de simuladores específicos apropriados para cada forma farmacêutica;
- Desenvolver sistemas farmacêuticos inovadores que reduzam o custo e o tempo de tratamento, sempre atendendo às premissas do bem estar animal;
- Aperfeiçoar a administração de princípios ativos veterinários através de novas formas farmacêuticas, alterando ou não sua via de administração;
- Desenvolver produtos farmacêuticos utilizando novos princípios ativos, até então utilizados apenas na medicina humana;
- Estudar associações de fármacos que possam trazer benefício para a terapêutica veterinária, e que contribuam com o uso sustentável de produtos farmacêuticos;
- Aperfeiçoar terapias veterinárias medicamentosas sob suspeitas de ineficácia, amparando-se nos registros do Serviço de Farmacovigilância Veterinária;
- Desenvolver a capacidade de pesquisa e laboratorial de alunos de graduação envolvido no projeto, oportunizando ao mesmo o acesso a métodos de pesquisa tecnológica.

Metas desta proposta

- Desenvolvimento de um sistema intravaginal polimérico de liberação sustentada para administração de fármacos em ruminantes;
- Validação *in vivo* e *in vitro* do sistema desenvolvido.

Metodologia

Todas as metodologias a serem utilizadas durante a execução deste projeto obedecerão às preconizações das farmacopeias (Brasileiras e Internacionais) e corresponderão àquelas utilizadas pela tecnologia farmacêutica humana e/ou veterinária.

Controle de qualidade de matérias primas

As matérias primas terão suas características farmacotécnicas avaliadas *in vitro* através da verificação macroscópica de sua consistência e seus aspectos morfológicos (Prista, 2002). Para tal, serão utilizadas as mais variadas técnicas metodológicas descritas na Farmacopéia Brasileira ou qualquer outra Farmacopéia ou compêndio compatível que contenha informações sobre a substância ativa e/ou adjuvante em estudo (Farmacopéia Brasileira, 1988; British Pharmacopeia, 2001; The United State Pharmacopeia, 2000).

Testes preliminares

São estudos de pré-formulação, ou seja, testes preliminares de matérias primas, cujo objetivo é verificar se as matérias primas possuem as características desejadas. Elas devem ser inertes química e farmacologicamente, porém imprescindíveis para a elaboração de uma formulação, protegendo e/ou melhorando as propriedades do fármaco. Mas eles podem reduzir ou ampliar o efeito farmacológico, sendo por isso importante a realização destes testes para avaliar a real compatibilidade todos os componentes da formulação (Kibbe, 2000).

Preparo de formulações

Preparo de formulação de acordo com as Boas Práticas de Manipulação e/ou Fabricação, utilizando insumos farmacêuticos (adjuvantes, substâncias ativas e outros materiais) obtidos de fornecedores qualificados e certificados, que tenham sido aprovados nos testes de controle de qualidade realizado durante seu recebimento (Lachman, 2001; Aulton, 2005).

Ensaio *in vitro* de formulações

Nessa etapa, as formulações desenvolvidas serão submetidas a ensaios laboratoriais, de acordo com as premissas das Farmacopeias nacional e/ou internacional, para verificação de seus comportamentos. Serão preparados, sempre que necessário, simuladores para verificação do comportamento das formulações em um ambiente semelhante ao que se propõe implantá-lo terapêuticamente e de acordo com a via de administração que estará sendo proposta. A partir destes testes serão feitos os ajustes necessários, tanto na concentração do ativo, como na quantidade dos adjuvantes ou substituição dos

mesmos (Farmacopéia Brasileira, 1988; British Pharmacopeia, 2001; The United State Pharmacopeia, 2000).

Análise *in vivo* de formulações

Após o ajuste da liberação do princípio ativo, a partir dos testes *in vitro*, serão feitos os testes em espécies animais, de modo a se averiguar se a liberação satisfatória observada nos testes *in vitro* se reproduz também *in vivo*. Nesta fase será avaliada a inocuidade dos adjuvantes, em relação aos efeitos farmacológicos (Vila Jato, 1997), e também serão feitos ajustes nas doses necessárias para garantirem o efeito terapêutico, independente da forma farmacêutica, da classe farmacológica e da via de administração, visto que estarão em análises os parâmetros farmacotécnicos (Anselet al., 2000). Todos estes ensaios serão realizados em animais adquiridos especificamente para esta finalidade, respeitando-se as exigências previstas no código de ética e bem estar animal.

Ensaio de Biodisponibilidade

Levando-se em consideração que sempre que a via de administração é alterada ou a forma farmacêutica é modificada, o medicamento adquire outra bioequivalência, necessitando então que este parâmetro seja novamente traçado para ajustes das doses terapêuticas e tóxicas. Tais ensaios serão realizados nos animais de espécies para as quais o medicamento foi desenvolvido, objetivando a padronização de intervalos de doses, bem como corrigir pequenos problemas que possam comprometer a farmacodinâmica e a farmacocinética da preparação (Gennaro, 2004).

Tais ensaios utilizarão as diversas técnicas já disponíveis para a medicina veterinária, mas poderão também passar por validação de

metodologias até então previstas somente para análise de medicamentos de uso humano ou restrito à apenas alguns princípios ativos.

Produção dos pilotos de bancada

Estes experimentos possuem o objetivo de reproduzir o comportamento da(s) formulação(ões) quando submetida a sucessivas produções. Para isso, serão fabricados lotes-teste, que passarão novamente pelos ensaios *in vitro* descritos anteriormente. Essa etapa, que antecede o *ScalingUp* (aumento de escala), possibilitará avaliar o comportamento da formulação quando submetida a um ciclo produtivo com quantidades maiores de matérias primas, onde os pontos críticos de uma formulação farmacêutica serão observados (Gennaro, 2004).

Revisão de Bulas

O processo de revisão de bula é uma ação de constante necessidade, que serve para atualizar as informações sobre o medicamento e seu comportamento. Informações estas que precisam chegar ao consumidor, da maneira mais clara possível.

Além do serviço de farmacovigilância exigir que esta revisão seja feita a cada renovação do registro de um medicamento já comercializado, todos os produtos farmacêuticos que sofrem um processo de inovação precisam ter suas informações atualizadas neste documento, a bula, que o acompanhará por toda a cadeia de produção e comercialização. Seja uma mudança na forma farmacêutica, na via de administração, uma ampliação na aplicabilidade do medicamento, uma nova interação medicamentosa detectada, um novo período de carência verificado, tudo deve ser incluso na bula deste produto.

Principais contribuições do projeto

Este projeto visa desenvolver estudos de inovação farmacêutica no setor de medicamentos de uso veterinário, conduzindo pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, bem como otimização das já existentes no mercado.

Também cabe a consideração de que, ainda que sejam disponíveis no mercado veterinário, alguns produtos inovadores, os mesmos se restringem a poucas classes terapêuticas utilizadas para pequenos animais, portanto a proposta de inovação contida neste projeto busca abranger as mais diversas linhas terapêuticas utilizadas em grandes animais. Dessa forma, a inovação e o patenteamento dos produtos pertencentes a este segmento sejam desenvolvidos e/ou inovados, bem como a possibilidade de sua utilização e/ou comercialização, são possibilidades de relevância.

A capacidade de inovação dos produtos veterinários depende de alguns fatores:

- a.** *Capacidade financeira* – gerar os fundos necessários para investir em inovação e desenvolvimento;
- b.** *Uma base forte na ciência da descoberta de medicamentos* - entender as causas e mecanismos das doenças;
- c.** *Know-how técnico* - capacidades de gestão e logística para transformar descobertas científicas em conhecimentos práticos e produtos;
- d.** *Congregar o conhecimento e a genialidade humana* – a capacidade de navegar nos mares muitas vezes arredios da tecnologia e da ciência.

O projeto não apresenta riscos maiores que impeçam atingir os objetivos propostos. Os insumos que serão utilizados são de fácil aquisição. Os Laboratórios de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da Universidade Federal de Pelotas, bem como de outras Instituições parceiras, estarão à disposição para contribuir tanto com estrutura física quanto com recursos humanos qualificados para a concretização das metodologias proposta neste projeto.

Aspectos Éticos

Todos os procedimentos a serem realizados durante a execução deste projeto obedecerão às preconizações legais da ética e do bem estar animal, e estarão de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal). Além disso, este projeto está em andamento, aprovado pelo Conselho Coordenador do Ensino da Pesquisa e da Extensão (COCEPE), sob o código 5.05.00.018.

Referências

1. ANSEL, H. C.; Manual de Cálculos Farmacêuticos. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
2. ANSEL, H. C.; Popovich, N. G.; Allen JR.; L. V. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
3. ANTUNES, A. M. S.; MAGALHÃES, J. L; Patenteamento & Prospecção Tecnológica no Setor Farmacêutico. 1. ed. São Paulo: Interciência, 2008.
4. AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
5. CARVALHO, P. L.; Patentes Farmacêuticas e Acesso à Medicamentos. 1. ed. São Paulo: Atlas, 2007.
6. BRITISH PHARMACOPEIA. 14. ed. London: Her Majesty's Stationery Office, 2001.
7. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
8. GENNARO, A. R. Remington: a Ciência e a Prática da Farmácia. 20. ed. São Paulo, Guanabara Koogan, 2004.
9. KIBBE, A. H. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

10. LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
11. LULLMANN H., MOHR, K., ZIEGLER, A., BIEGER, D. *Color Atlas of Pharmacology*. New York: Thieme Medical Publishers, 369 p. 1993.
12. PRISTA, L. V. N.; Alves, A. C.; Morgado, R. Tecnologia Farmacêutica. 6. ed. Porto Alegre: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.
13. THE UNITED STATE PHARMACOPEIA. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Easton: Mack, 2000.
14. VILA JATO, J. L. (ed.) Tecnologia Farmacêutica. Madrid: Síntesis, 1994, Vol I e II.
15. SINDAN, Portal. Disponível em <http://www.sindan.com.br>, acessado em 28 de junho de 2010.
16. CAPANEMA, L. X. L.; VELASCO, L. O. M.; SOUZA, J. O. B.; Noguti, M. B. BNDES. Panorama da indústria farmacêutica veterinária, 2007.

4 Metodologia

O molécula hidrofílica, com uma pureza de 99,70%, foi adquirido através da empresa Bayer Brasil, os polímeros utilizados no desenvolvimento das formulações foram adquiridos pela empresa Farben Brasil. A purificação da água, para utilização nas formulações, foi através do sistema Millipore ultra-pure water (Milford, USA).

4.1 Preparação das formulações de liberação controlada

As formulações foram desenvolvidas utilizando dois polímeros, através do *cold method* (SCHMOLKA, 1972). Os polaxâmeros POLYMER X e POLYMER Y, foram dispersos em 5ml de água para injetáveis, para que alcançassem as concentrações de, 26% ou 29%, no caso do polímero POLYMER X, e 10% ou 15% para o polímero POLYMER Y. Após a adição dos polímeros, as formulações ficaram em repouso sob uma temperatura de 4 °C, onde se mantiveram até completa dissolução (figura 8).



Figura 8 - Formulações poliméricas durante processo de preparação, após a hidratação das mesmas.

Após a identificação da dissolução dos polímeros, em torno de 24 h, era adicionado o molécula hidrofílica, as quantidades adicionadas era o suficiente para as formulações atingirem as concentrações de fármaco final de 10% ou

15%. Foram testadas diversas combinações entre diferentes concentrações dos polímeros e do fármaco.

4.2 Análise *in vitro* das formulações

Após a realização das formulações foram feitas análises de erosão do gel e liberação do fármaco. Primeiramente para análise de erosão do gel foram feitas alíquotas de 5 ml das formulações e então realizado o processo de geleificação (figura 9). Nesse processo as formulações eram colocadas em tubos de ensaio e levadas a um banho-maria sob aquecimento. A temperatura inicial de 4 °C e era aumentada em 2 °C a cada 2 minutos após a estabilização da temperatura. Posteriormente, em cada tubo foi adicionado 15 ml de tampão PBS (tampão fosfato-salino) para mimetizar os fluidos corporais e pH (7,4). Os tubos foram levados a um banho-maria sob agitação (Visomes Plus) a 37 °C. A cada 24 horas era retirado todo o meio e realizada a pesagem dos géis para verificar a erosão desses.

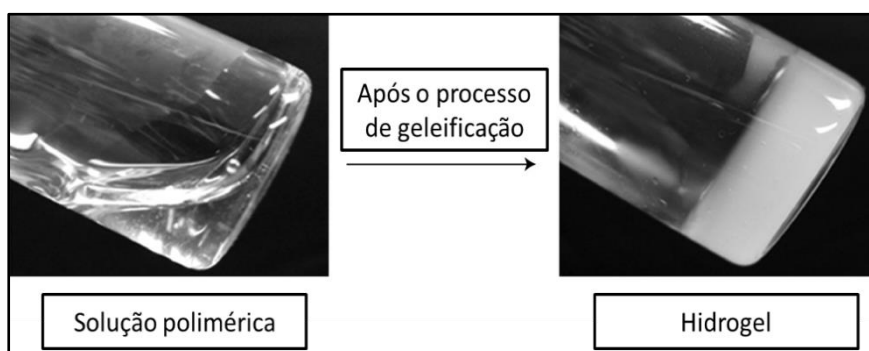


Figura 9 - Processo de *in vitro* de termogeificação, as formulações após alcançaram uma determinada temperatura mudam de estado semissólido para estado sólido

No mesmo período era analisado o perfil de liberação do molécula hidrofílica, através de análise por espectrofotometria (Femto 700 Plus) do meio de liberação coletado, no comprimento de onda de 254 nm. Para o cálculo da concentração liberada, com base na absorbância gerada no espectrofotômetro, foi elaborada uma curva de calibração com concentrações conhecidas do fármaco. Após todos os testes realizados, duas formulações foram escolhidas

para serem testadas *in vivo*, com base nos resultados de geleificação, duração do gel e liberação do fármaco, obtidos *in vitro*. Os resultados das análises estão descritos na seção de resultados e discussão.

4.3 Manejo de animais e instalações

Após a seleção das formulações, o experimento *in vivo* foi conduzido, do dia 11/08/2015 – 20/08/2015, no Centro de Pesquisas em Animais do Brasil (CPABR), localizada no município de Amparo, estado de São Paulo (22°40'59.3''S; 46°52'06.5''W) (figura 10). Foram utilizadas 10 vacas da raça Holandês (116 a 404 DEL), com peso entre 459 – 657 kg, e idade entre 2 e 6 anos (figura 11). Os animais foram aclimatados por um período de 5 dias anterior ao estudo, e foram observados ao menos uma vez ao dia para verificação da saúde dos mesmos. Caso fosse observada alguma anormalidade com qualquer animal durante o período de aclimatação, o mesmo seria excluído do estudo. Todos os animais possuíam escore de condição corporal (ECC) igual a 4, conforme escala de 1 a 5 de Wildman et al. (1982). Durante esse período, nenhuma medicação ou vacina foi permitida.



Figura 10 - Centro de Pesquisas em Animais do Brasil (CPABR), Amparo, São Paulo.



Figura 11 – Animais utilizados no experimento, vacas da raça Holandês, com peso variando de 459 kg – 657 kg e idade entre 2 e 6 anos.

As vacas foram divididas em dois grupos: Grupo 1 (G1, n=5) e Grupo 2 (G2, n=5). O grupo 1 recebeu aplicação única de uma solução polimérica de concentração de 10 mg/kg de molécula hidrofílica (formulação 1). O grupo 2 recebeu aplicação única de uma solução polimérica de concentração também de 10 mg/kg de molécula hidrofílica (formulação 2). Ambos os grupos recebiam as aplicações na região do pescoço pela via subcutânea.

4.4 Coletas de sangue

Amostras de sangue foram coletadas nos seguintes períodos: 0h (pré-tratamento), nos minutos 4, 8, 16, 30 min pós-aplicação, nas horas 2, 5, 8, 12, 24 (1 dia), 48 (2 dias), 72 (3 dias), 96 (4 dias), 120 (5 dias), 144 (6 dias), 168 (7 dias), 192 (8 dias) e 216h (9 dias) pós-aplicação. Aproximadamente 5 ml de sangue foi coletado através da veia mamária de cada animal em tubos Vacutainer® contendo EDTA, após a coleta era realizada a centrifugação para obtenção do plasma, e armazenado sob refrigeração a -20°C para posteriores análises. Pequenos desvios de horário (respeitando um limite máximo de 10

minutos a partir das coletas de horas) foram permitidos. Na figura 12 é possível observar o local de contenção dos animais para as coletas de sangue.

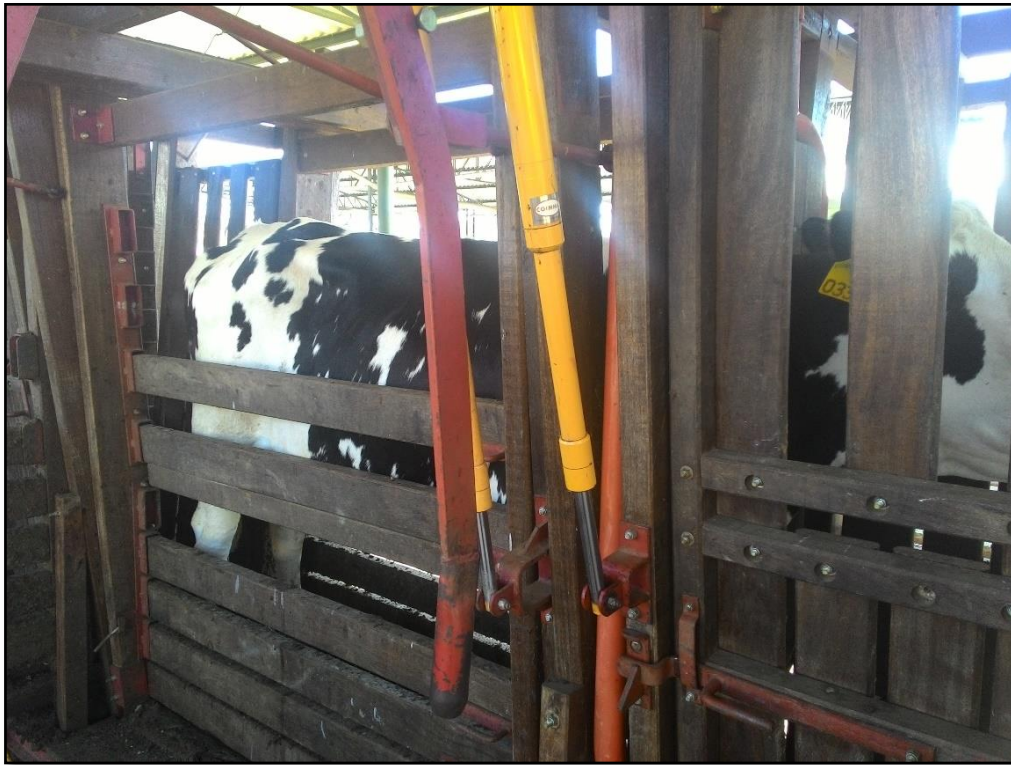


Figura 12 – Infraestrutura do local de coletas sanguíneas e pesagem dos animais.

4.5 Análises sanguíneas

A fim de identificar possíveis alterações fisiológicas nos animais foram realizadas diversas análises para estipular um perfil hematobioquímico dos animais 5 dias antes e no último dia de experimento, as análises realizadas foram: valores individuais do hematócrito (Ht), hemácias (He), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), valores individuais do número de leucócitos (LEUC), neutrófilos segmentados (SEG), eosinófilos (EOS), basófilos (BAS), linfócitos (LINF), monócitos (MONO), bastonetes (BAST) e plaquetas (PQT).

4.6 Análises farmacocinéticas

As análises farmacocinéticas foram realizadas junto ao laboratório LabFor – Análises Laboratoriais Ltda (Campinas, SP). A partir dos resultados referentes as análises cromatográficas e da dosagem de fósforo, foram definidos os seguintes parâmetros farmacocinéticos da formulação: concentração plasmática máxima (C_{max}), tempo para concentração plasmática máxima (T_{max}) e área sob a curva (AUC). Com essas informações foi possível construir as curvas de farmacocinética de cada uma das formulações.

4.7 Análises estatísticas

Para verificar as diferenças farmacocinéticas entre o grupo 1 e 2 foi utilizado o *software* R 3.2.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), pacote estatístico *R commander*, e a análise realizada foi o teste t de Student a um nível de significância de $P \leq 0,05$.

5. Aspectos éticos

O estudo foi conduzido de acordo com o GSP (Boas Práticas Científicas) usando o VICH GL9 (Boas Práticas Clínicas) como referência, seguindo as normas nacionais de bem-estar animal e outros requisitos regulatórios aplicáveis. O estudo só teve início após aprovação ética, conforme a Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).

6. Resultados e discussão

6.1 Análises *in vitro*

6.1.1 Formulações com 29% do polímero x

As concentrações e temperaturas de geleificação das formulações em triplicata, estão representadas na tabela 1 abaixo:

Tabela 1 - Concentrações utilizadas dos polímeros e fármaco nas formulações, e temperatura de geleificação das triplicatas:

Formulação	Polímero x (%)	Polímero y (%)	Molécula hidrofílica (mg)	Triplicatas (temperatura em °C)		
1	29	0	0	22	22	22
2	29	0	500	18	18	18
3	29	0	750	17	17	17
4	29	10	0	33	33	33
5	29	10	500	31	31	31
6	29	10	750	30	30	30
7	29	15	0	34	34	34
8	29	15	500	32	32	32
9	29	15	750	31	31	31

De acordo com a tabela 1 observou-se que quando houve a adição do polímero y nas formulações, houve um aumento nas temperaturas de geleificação, em todas as formulações, a partir da formulação 4. Esse polímero é utilizado muitas vezes para que ocorra a modulação da temperatura de geleificação das formulações (CHEN et al, 2013), em nosso caso, utilizamos esse polímero para aumentar as temperaturas de geleificação.

Também pode-se observar que quando o molécula hidrofílica era adicionado, as temperaturas de geleificação diminuía, esse fenômeno era amplificado quando as concentrações eram aumentadas, como pode-se observar principalmente nas formulações 3, 6 e 9. Em relação a esses resultados, sabe-se que o molécula hidrofílica é uma molécula bastante hidrofílica, com isso, quando aumentamos as concentrações desse fármaco fazemos com que ocorra um aumento da entrada de água na matriz do gel, fazendo com que esse se desfaça mais rapidamente. Nas formulações onde não ocorre a presença da molécula, possivelmente ocorra uma menor pressão hidrostática interna, com isso o gel dissolve de forma mais controlada.

As formulações 4 e 7 foram satisfatórias em se aproximar da temperatura fisiológica de 37 °C, mostrando-se promissoras para utilização *in vivo*.

Na figura 13 pode-se observar os resultados da erosão cumulativa das formulações:

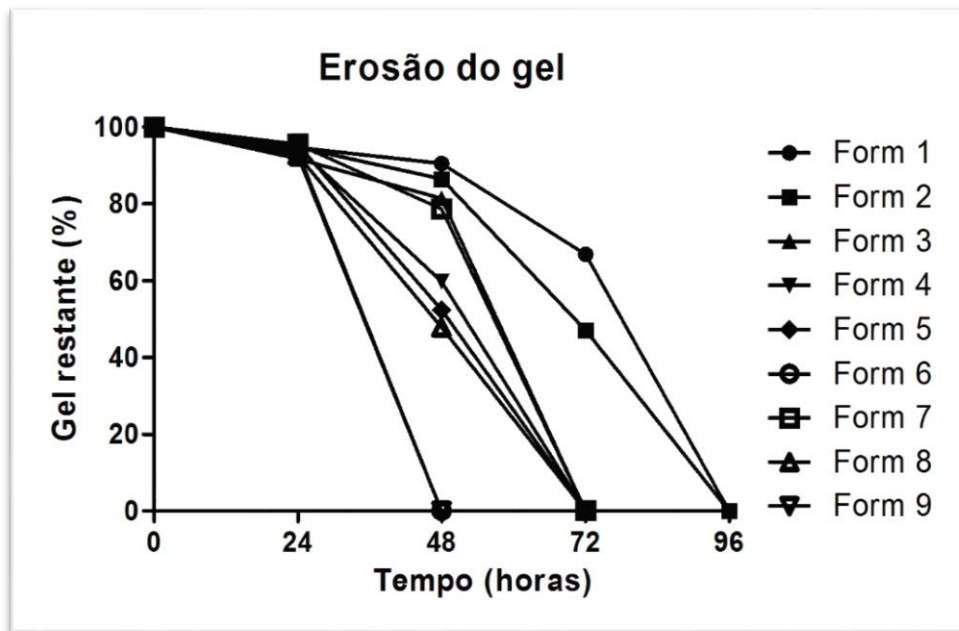


Figura 13 - Perfil de erosão dos géis ao longo de 96 horas de duração

Em relação à erosão dos géis, podemos observar que ao longo de 96 horas as formulações tiveram diferentes períodos e porcentagem de erosão. As formulações mais promissoras foram as que duraram 72 horas e 96 horas. Dentre as formulações que perduraram por um período de até 72 horas, as seguintes formulações: 3,5 e 8 possuíam o fármaco em suas formulações.

As formulações 1,2 e 3 demonstraram uma velocidade de erosão menor até as 72 horas, fato que pode ser explicado pela ausência do polímero POLYMER Y, como mencionado anteriormente esse polímero modula as temperaturas de geleificação, porém foi observado em nossos testes que sua adição nas formulações desestabilizava a estrutura matricial do gel, aumentando a velocidade de erosão. Passerini e colaboradores (2002) também verificaram esse fenômeno quando adicionavam o polímero y nas formulações em combinação com fármaco ibuprofeno, identificando um aumento na taxa de dissolução do gel.

A figura 14 apresenta os resultados referentes à liberação do fármaco.

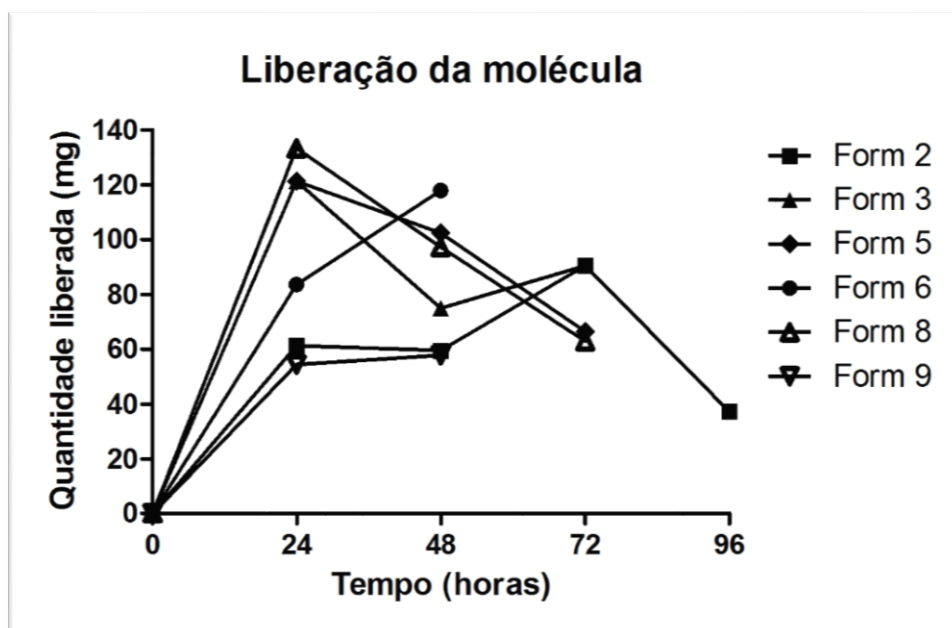


Figura 14 – Quantificação de molécula hidrofílica liberado até as 96 horas, após teste de quantificação *in vitro*

Até as 96 horas percebemos uma grande variação na liberação de fármaco entre as formulações. As formulações com maior potencial foram a 2, 5 e 8, pois foram capazes de liberar o fármaco por 72 horas ou 96 horas. As amostras 5 e 8, ambas com 500 mg de molécula hidrofílica, liberaram o fármaco por 72 horas, a formulação 8 demonstrou um alto pico inicial com queda de liberação pós período de 24 horas. Embora essa formulação não tenha se mantido por 96 horas, essa alta liberação inicial é um fator interessante quando desejamos a recuperação rápida de um animal em situação energética crítica, como por exemplo, animais em cetose clínica.

Na amostra 2, com 500 mg de molécula hidrofílica, houve a liberação por um período de 96 horas sem grandes oscilações na liberação, mostrando-se um resultado promissor, visto que esse é o padrão de liberação que se espera de uma plataforma de liberação controlada. A ausência de grandes oscilações possibilita a manutenção de uma dose terapêutica, e a permanência do dispositivo por um período satisfatório (FRASER et al. 1996).

6.1.2 Formulações com 26% do polímero x

Na tabela 2 abaixo estão representadas as concentrações das formulações analisadas, e as temperaturas de geleificação das triplicatas.

Tabela 2 - Concentrações dos polímeros e molécula hidrofílica utilizadas nas formulações, e temperaturas de geleificação das triplicatas:

Formulação	Polímero x (%)	Polímero y (%)	Molécula hidrofílica (mg)	Triplicatas (temperatura em °C)		
1	26	0	0	23	23	23
2	26	0	500	21	21	21
3	26	0	750	17	17	17
4	26	10	0	37	37	37
5	26	10	500	34	34	34
6	26	10	750	32,5	32,5	32,5
7	26	15	0	38,5	38,5	38,5
8	26	15	500	34	34	34
9	26	15	750	33	33	33

Em relação às temperaturas de geleificação, o que se pode perceber é que o comportamento das formulações de 26% era bastante similar às de 29%.

Sempre que a concentração do polímero y era aumentada, ocorria um aumento nas temperaturas, como é possível observar nas formulações de número 4 a 9. As formulações 4,5,6,7,8 e 9 alcançaram a temperatura de geleificação de 37 °C, 34°C, 32,5°C, 38,5°C, 34°C e 33°C respectivamente, demonstrando um grande potencial de utilização para estudos *in vivo*. Em relação a adição de molécula hidrofílica, as formulações se que continham uma maior quantidade do fármaco demonstravam uma menor temperatura de geleificação, como demonstrado na figura 16. Destacamos as formulações 3, 6 e 9 como as formulações mais afetadas pelo fármaco, devido a adição de 750 mg do fármaco nesses hidrogéis.

Como mencionado anteriormente, a provável causa dessa alteração seja a alta hidrofiliabilidade do fármaco, fator que favorece a entrada de água nas formulações, aumentando assim a dissolução do gel.

Em relação a erosão do gel, os resultados estão demonstrados na figura 15 abaixo.

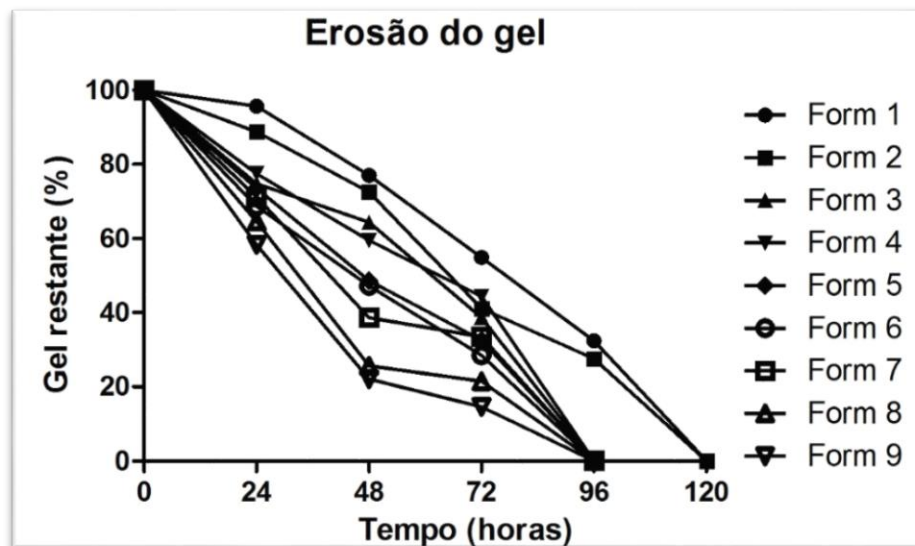


Figura 15 – Avaliação do gel restante em 120 horas de erosão

Após análise dos dados, percebe-se que com adição de 3% a mais do polímero x houve um maior período de liberação de fármaco. As formulações 1 e 2, que continham apenas 26% desse polímero, se mantiveram por até 120 horas, sem grandes oscilações na erosão ao longo dos dias. As formulações com maior quantidade de fármaco e também com uma concentração do polímero y maior, obtiveram uma erosão superior e duração do gel menor a partir da observação do gráfico, resultado já esperado, em virtude das características do fármaco e polímero y.

A maioria das formulações se manteve por até 96 horas demonstrando um ganho considerável em relação as formulações de 24% de 407, onde a maioria se manteve por até 72 horas. Os resultados de liberação de fármaco estão demonstrados na figura 16.

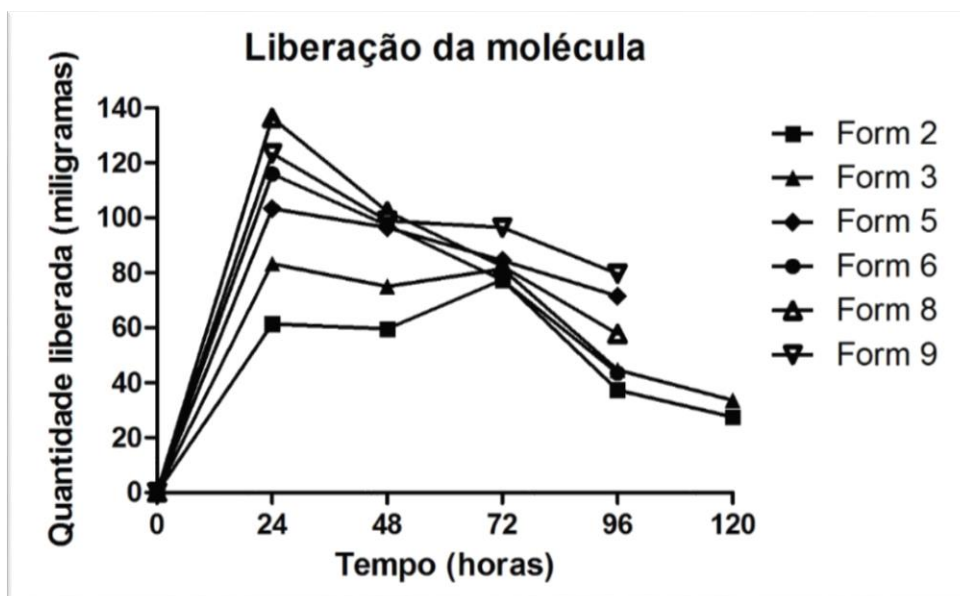


Figura 16 – Quantificação de molécula hidrofílica liberado ao longo de 120 horas de liberação

Ao longo de 120 horas de análises, as formulações 2 e 3 foram as únicas que mantiveram uma liberação por até 120 horas. Essas formulações continham 500 mg e 750 mg de molécula hidrofílica respectivamente. As formulações 5, 8 e 9 mantiveram uma liberação por até 96 horas, as formulações 5 e 8 continham 500 mg do fármaco e a formulação 9 apresentava 750 mg.

Um fator bastante importante nos resultados foi que não houve grandes oscilações nas formulações. Esse fator é muito importante em formulações de liberação controlada onde normalmente busca-se manter um padrão similar de liberação ao longo dos dias.

Na análise de 24 horas observamos um pico inicial de liberação, esse fato pode ser devido a liberação inicial logo após a aplicação da formulação e o tempo necessário para que ocorra a geleificação dentro do animal.

Com esses resultados, selecionou-se duas formulações para utilização no estudo *in vivo*, a formulação que continha 29% do polímero x, 10% do polímero y e 750 mg de molécula hidrofílica (grupo 1), e a formulação que continha 26% do polímero x, 15% do polímero y e 500 mg de molécula hidrofílica (grupo 2).

6.2 Resultados *in vivo*

6.2.1 Análises hematobioquímicas

Nas tabelas 3 e 4 abaixo estão os resultados das análises sanguíneas dos animais 5 dias antes e no último dia de coleta.

Tabela 3 - Resultados referentes as análises de hematócrito (Ht), hemácias (He), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

ANIMAL	TEMPO	HT	HE	Hb	VCM	HCM	CHCM
1	D-5	25,8	5,76	8,3	45	14,3	32
	D+9	26,4	5,85	8,9	45	15,2	33,7
2	D-5	25,2	5,59	8,3	45	14,8	32,7
	D+9	27,4	5,97	9,2	46	15,4	33,6
3	D-5	27,1	5,83	8,5	46	14,6	31,5
	D+9	27,6	5,95	9	46	15,2	32,7
4	D-5	26,8	6,3	8,4	42	13,4	31,5
	D+9	27,3	6,33	9	43	14,3	33,2
5	D-5	31,1	6,48	9,9	48	15,2	31,7
	D+9	34,8	7,26	11,4	48	15,8	32,9
6	D-5	31,5	7,16	9,6	44	13,4	30,6
	D+9	28,4	6,51	9,5	44	14,5	33,3
7	D-5	29,2	7,66	9,3	38	12,1	31,7
	D+9	27,7	7,16	9,2	39	12,8	33,2
8	D-5	21,2	4,72	6,9	45	14,6	32,4
	D+9	22,4	4,57	7,6	49	16,6	33,8
9	D-5	32,7	7,56	10,3	43	13,6	31,5
	D+9	34,5	7,91	11,3	44	14,3	32,8
10	D-5	26	5,84	8,4	44	14,4	32,4
	D+9	25,3	5,64	8,4	45	15	33,4

He ($10^6/\mu\text{L}$); Hb (g/dL); Ht (%); VCM (fL); HCM (pg); CHCM (g/dL).

Tabela 4 – Valores referentes as análises do número de leucócitos (LEUC), neutrófilos segmentados (SEG), eosinófilos (EOS), basófilos (BAS), linfócitos (LINF), monócitos (MONO), bastonetes (BAST) e plaquetas (PQT).

ANIMAL	TEMPO	LEU	MONO	LINF T	BAS	EOS	SEG	BAST	PQT
1	D-5	15800	0	6952	0	1264	7584	0	682000
	D+9	11200	672	5600	0	560	4368	0	542000
2	D-5	18800	1692	14288	0	376	2444	0	518000
	D+9	18500	1480	13135	0	740	3145	0	444000
3	D-5	22900	916	17404	0	2061	2519	0	127000
	D+9	29300	2344	21682	0	2637	2637	0	125000
4	D-5	9700	485	5335	0	679	3104	97	534000
	D+9	12200	1098	6100	0	854	4026	122	354000
5	D-5	28500	855	20805	0	1995	4845	0	302000
	D+9	24800	1736	19096	0	992	2976	0	527000
6	D-5	11300	565	6893	0	339	3503	0	520000
	D+9	13800	966	7452	0	0	5382	0	358000
7	D-5	17700	531	14868	0	0	2301	0	476000
	D+9	21000	1260	14070	0	420	5250	0	341000
8	D-5	8500	850	5355	0	170	2040	85	479000
	D+9	9700	873	5626	0	194	3007	0	670000
9	D-5	15300	612	8874	0	1989	3825	0	684000
	D+9	15000	750	7800	0	2250	4200	0	541000
10	D-5	9700	97	4074	0	1552	3977	0	600000
	D+9	10800	216	5724	0	324	4536	0	702000

LEUC(ce/μL); SEG(ce/μL); EOS (ce/μL); BAS (ce/μL); LINF T (ce/μL); MONO(ce/μL); BAST (ce/μL); PQT (ce/μL)

Não foram identificadas alterações fisiológicas importantes nas análises hematológicas antes e após o estudo. Os resultados demonstram que as formulações não interferiram no perfil hematobioquímico dos animais.

6.2.2 Avaliações farmacocinéticas

Os gráficos de farmacocinética estão demonstrados na figura 19.

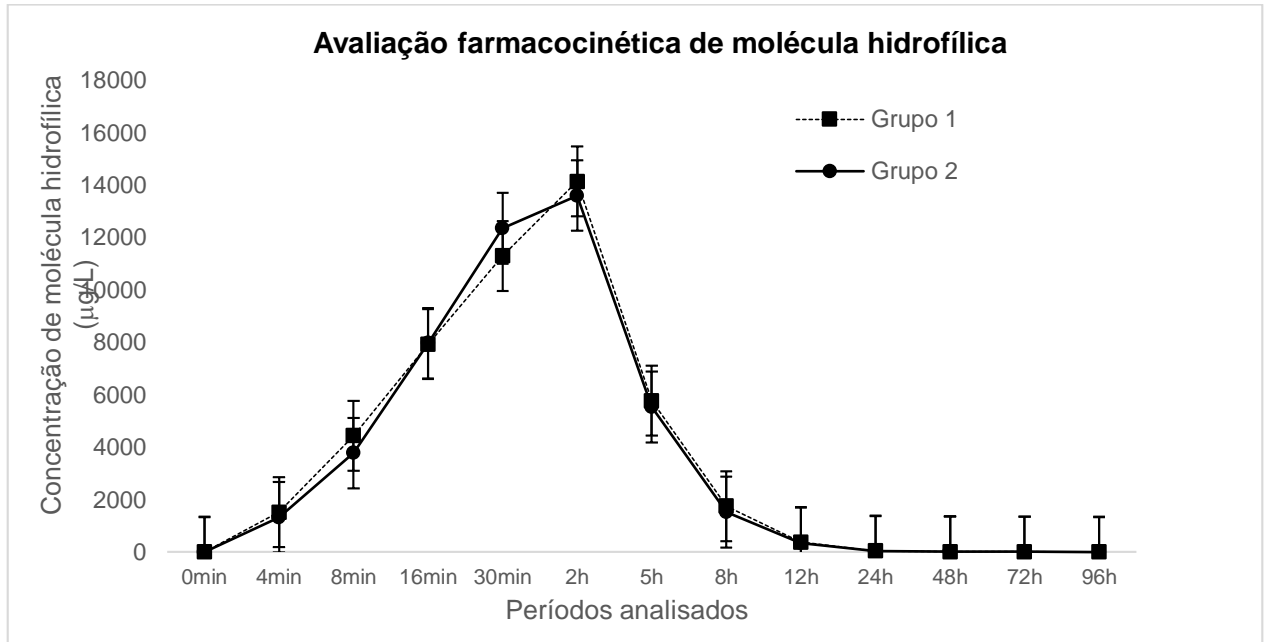


Figura 17 – Resultados referentes as concentrações de molécula hidrofílica em todos os períodos analisados do estudo *in vivo*.

Ambos os grupos (grupo 1 - 29% do polímero x, 10% do polímero y, e grupo 2 - 26% do polímero x, 15% do polímero y), foram capazes de manter uma liberação por um período entre 72 horas e 96 horas, o pico de liberação das formulações em ambos os grupos foram 2 horas após aplicação. Na tabela 5 abaixo temos as médias das concentrações plasmáticas dos grupos em todos os períodos analisados:

Tabela 5 – Média das concentrações plasmáticas de molécula hidrofílica ($\mu\text{g/L}$), dos grupos 1 e 2, após diferentes períodos

Períodos	Formulações	
	Grupo 1	Grupo 2
0 min	0	0
4 min	1512,0	1326,0
8 min	4434,0	3772,0
16 min	7932,0	7968,0
30 min	11298,0	12350,0
2h	14140,0	13600,0
5h	5774,0	5536,0
8h	1749,8	1514,0
12h	379,2	345,2
24h	35,34	27,98
48h	8,98	7,66
72h	6,63	5,21
96h	0	0

Referente as concentrações de molécula hidrofílica nos períodos analisados, não houve diferença estatística entre os 2 grupos após análise das médias das concentrações de molécula hidrofílica ($p=0,58$).

Na tabela 6 estão apresentados os dados referentes aos parâmetros farmacocinéticos T_{max} (minutos), C_{max} ($\mu\text{g/L}$) e AUC (área sob a curva).

Tabela 6 – Média dos parâmetros farmacocinéticos dos grupos

Formulações	C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	T_{max} (minutos)	AUC ($\mu\text{g. 96h/L}$)
Grupo 1	14.140,00	120,00	4.262.717,04
Grupo 2	13.600,00	120,00	4.120.091,60

T_{max} (minutos) = tempo para concentração plasmática máxima; C_{max} ($\mu\text{g/L}$) = concentração plasmática máxima; AUC = área sob a curva a partir da concentração plasmática em função do tempo entre 0 e 96 horas.

A biodisponibilidade do composto dada pela AUC no grupo 1 foi de 4.262.717,04 $\mu\text{g/L}$, e no grupo 2 a foi de 4.120.091,60 $\mu\text{g/L}$, não havendo novamente diferença estatística ($p>0,05$) novamente demonstrando uma similaridade na liberação do fármaco em ambas as formulações. As concentrações máximas também obtiveram resultados similares, não havendo diferença estatística entre as formulações ($p= 0,43$).

As formulações desenvolvidas foram capazes de manter a liberação por um período entre 72 horas a 96 horas, mantendo o fornecimento de molécula hidrofílica para os animais. Não houve nenhuma reação inflamatória local nos animais em todos os períodos analisados. A fácil manipulação dos polímeros e síntese das formulações são fatores que possibilitam a produção em larga escala desse tipo de plataforma de entrega sustentada de fármacos. A combinação dos polímeros com a molécula hidrofílica, geram grandes possibilidades no tratamento e prevenção de desordens energéticas em animais de produção, principalmente se tratando de vacas leiteiras pelo fato desses animais passarem por situações de extremo desbalanço energético em períodos como o periparto.

Estudos já ressaltam a importância dos polaxâmeros na liberação controlada de substâncias, como um estudo realizado por Ricci e colaboradores (2005) no qual desenvolveram uma formulação de liberação prolongada contendo o fármaco Lidocaína, um anestésico local, em combinação com o polímero x, polímero que confere liberação prolongada, e foram capazes de manter a liberação por um período maior que 6 horas, não havendo necessidade de reaplicação. Outro trabalho realizado por Heilmann e colaboradores (2013) utilizaram o polímero x em combinação com a morfina, opioide com alto poder analgésico, na geração de uma formulação de aplicação tópica, obtendo uma liberação do fármaco por mais de 24 horas em pele humana sintética.

É muito provável que a não duração por um período maior do gel, *in vivo*, no presente estudo, seja devido ao fato de que a molécula de molécula hidrofílica contribua de para desestabilizar a estrutura micelar do gel, devido a sua hidrofiliidade, dificultando assim sua estabilidade por um número maior de horas, e também favorecendo a maior liberação inicial do fármaco. Os testes *in vitro* corroboram com essa hipótese, visto que quando uma maior quantidade de molécula hidrofílica era adicionada nas formulações, diminuía a resistência do gel, além de alterar a temperatura de geleificação das mesmas.

A adição do polímero y também é um fator que provavelmente afetou a duração do gel, tal qual ocorreu nos testes *in vitro*. Esse polímero foi utilizado nas formulações com objetivo de modular a temperatura, fazendo com que ela geleificasse próximo aos 37 °C.

Os hidrogéis podem ter sua força aumentada utilizando polímeros diferentes na sua composição, como por exemplo Chen e colaboradores (2013), utilizaram o polímero Carbopol 940 combinado com o polímero y e 407, e o fármaco 2 – hidroxipropil- β -ciclodextrina, para desenvolver um hidrogel com maior força e conseqüentemente menor taxa de liberação do fármaco. Nesse estudo o hidrogel demonstrou uma maior bioadesividade, força, e dureza, além da temperatura de geleificação de 38,3 °C ser alcançada.

Em nossos estudos a realizamos testes com outras substâncias afim de aumentar a força do gel, e portanto sua permanência por um maior tempo. Utilizamos a hidroxipropilmetilcelulose para aumentar a força do gel, porém não obtivemos resultados satisfatórios, além do que dificultava muito a solubilização das formulações em geral. Em outro teste, também foi adicionado cloreto de sódio nas formulações na tentativa de obter aumento da força dos géis, em virtude do ressecamento da rede matricial, porém após alguns testes não identificamos diferença em relação ao tempo de permanência dos géis.

O estudo *in vivo* foi bastante importante para identificarmos dificuldades de aplicação a campo, principalmente em relação as características de seringabilidade das formulações. As formulações com 29% do polímero x demonstraram maior viscosidade, e portanto, maior dificuldade de aplicação em comparação com as formulações de 26%. O fator da alta temperatura ambiental afetar a viscosidade das formulações pode ser contornado através da refrigeração dessas quando forem utilizadas a campo. Embora houvesse uma viscosidade aumentada nas formulações, não foi identificado efeitos fisiológicos negativos que dificultariam a utilização das formulações a campo.

Também pode-se utilizar as formulações prontas dentro das seringas, nas quantidades necessárias, refrigeradas, a fim de facilitar a aplicação e manipulação das formulações.

7. Conclusão

Os estudos demonstraram que foi possível desenvolver e avaliar *in vitro* e *in vivo*, formulações de liberação prolongada utilizando os polímeros 188 e

407, além da utilização da molécula de molécula hidrofílica. Essas formulações se mostraram efetivas em manter uma liberação por um período de 72 horas a 96 horas, não causando nenhum efeito fisiológico negativo nesses animais demonstrando segurança na utilização *in vivo*.

Novos estudos serão desenvolvidos com intuito de diminuir a erosão do gel e conseqüentemente prolongar a liberação do fármaco, assim, os próximos objetivos serão manter um nível terapêutico de fósforo por um maior período, fazendo com que o número de aplicações das formulações seja reduzido.

8. Referências

ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, T. A. Poly (ethylene oxide)□ poly (propylene oxide)□ poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, n. 1, p. 1-46, 1995.

ALVINERIE, M. et al. Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 66, n. 1, p. 57-61, 1999.

ARIELI, A. et al. Production and health of cows given monensin prepartum and a high-energy diet postpartum. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 5, p. 1845-1851, 2008.

BAJPAI, A. et al. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 11, p. 1088-1118, 2008.

BANKER, G.; RHODES, C. Modern Pharmaceutics, 3rd Edn., mercel Dekker. **Inc., New York**, 1995.

BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of dairy science**, v. 63, n. 9, p. 1514-1529, 1980.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Biochemistry. **The Citric Acid Cycle**, v. 5, 2006.

BROMBERG, L. E.; RON, E. S. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 31, n. 3, p. 197-221, 1998.

CAMPOS, R. et al. Determinação de corpos cetônicos na urina como ferramenta para o diagnóstico rápido de cetose subclínica bovina e relação com a composição do leite. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 49-54, 2005.

CHEN, J. et al. Mechanical, rheological and release behaviors of a polymer x/polymer y/carbopol 940 thermosensitive composite hydrogel. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12415-12425, 2013.

CHUNG, Y.-H. et al. Effects of rumen-protected choline and dry propylene glycol on feed intake and blood parameters for Holstein dairy cows in early lactation. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 6, p. 2729-2736, 2009.

COLAZO, M. et al. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 1, p. 25-34, 2004.

CUTERI V, N. L., ATTILI AR, ROMERO TEJADA A, PREZIUSO S, FRUGANTI A. Clinical Field evaluation of a molécula hidrofílica + vitamin B12 compound (Phosphorum B12®/Catosal®) in the treatment of subclinical ketosis in dairy cows. Oral and Poster Presentations. . **Proc XXVth World Buiatrics Congress (Budapest). Hungary**, 2008.

DE LYRA, M et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.5, p 784-793, 2007.

DEFRAIN, J. et al. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 12, p. 4195-4206, 2004.

DETERMAN, M. D.; COX, J. P.; MALLAPRAGADA, S. K. Drug release from pH-responsive thermogelling pentablock copolymers. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 81, n. 2, p. 326-333, 2007.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of dairy science**, v. 82, n. 11, p. 2259-2273, 1999.

DUFFIELD, T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. **Veterinary clinics of north america: Food animal practice**, v. 16, n. 2, p. 231-253, 2000.

DUFFIELD, T. et al. Effect of a monensin-controlled release capsule on cow health and reproductive performance. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 11, p. 2377-2384, 1999.

DUMORTIER, G. et al. A review of polymer x pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 2006.

FRASER, P. M.; BURMEISTER, P. H.; PETERSON, D. A. **Stent delivery apparatus and method**: Google Patents 1996.

FÜRLL, M. Vorkommen, Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik und medikamentelle Beeinflussung von Leberschäden beim Rind.[Habilschr. med. vet.]. **Leipzig: Univ. Leipzig**, 1989.

GAVINI, E. et al. Mucoadhesive vaginal tablets as veterinary delivery system for the controlled release of an antimicrobial drug, acriflavine. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, n. 3, p. 32-38, 2002.

GEISHAUSER, T. et al. Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 2, p. 296-299, 2000.

GONZÁLES, F.; SILVA, S. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 1999.

GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of animal science**, v. 73, n. 9, p. 2820-2833, 1995.

HEEP, Iris; TATERRA, Hans-Rolf. **Stabilization of vitamin b12**. U.S. Patent Application n. 12/045,831, 11 mar. 2008.

HEILMANN, S. et al. A thermosensitive morphine-containing hydrogel for the treatment of large-scale skin wounds. **International journal of pharmaceutics**, v. 444, n. 1, p. 96-102, 2013.

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 215-230, 2000.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 8, p. 1993-2007, 2008.

KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. Microengineered hydrogels for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 28, n. 34, p. 5087-5092, 2007.

KREIPE, L. et al. First report about the mode of action of combined molécula hidrofílica and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 10, p. 4904-4914, 2011.

KRISTENSEN, N. B. et al. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 3, p. 1364-1377, 2007.

LACOUNT, D.; DRACKLEY, J.; WEIGEL, D. Responses of dairy cows during early lactation to ruminal or abomasal administration of L-carnitine. **Journal of dairy science**, v. 78, n. 8, p. 1824-1836, 1995.

MARTINEZ, M. et al. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal reproduction science**, v. 86, n. 1, p. 37-52, 2005.

MCART, J. Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: component and total cost per case. 2014 ADSA-ASAS-CSAS Joint Annual Meeting, 2014.

MCART, J.; NYDAM, D.; OETZEL, G. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 9, p. 5056-5066, 2012.

MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of α -chitin. **Journal of molecular biology**, v. 120, n. 2, p. 167-181, 1978.

NEIVA, J. N. M. et al. Utilização de subprodutos de biocombustíveis na alimentação de bovinos leiteiros. **VI simpósio mineiro e I simpósio nacional sobre nutrição de gado de leite**, p. 128, 2012

NETO, A. C. et al. Problemas metabólicos provenientes do manejo nutricional incorreto em vacas leiteiras de alta produção recém paridas. **REDVET-Rev. electrón. vet.-Revista electrónica de Veterinaria**, v. 12, n. 11, 2011.

NEWA, M. et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with polymer y. **International journal of pharmaceutics**, v. 343, n. 1, p. 228-237, 2007.

OETZEL, G.; GOFF, J. Milk fever (parturient paresis) in cows, ewes and doe goats. In: (Ed.). **Current Veterinary Therapy 4: Food Animal Practice**: WB Saunders Co Philadelphia, 1998.

OETZEL, G.; GOFF, J. Milk fever (parturient paresis) in cows, ewes and doe goats. In: (Ed.). **Current Veterinary Therapy 4: Food Animal Practice**: WB Saunders Co Philadelphia, 1998.

PATEL, H. R.; PATEL, R. P.; PATEL, M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 2, p. 299-303, 2009.

PEREIRA, R. A. 'Effect of hydrophilic molecule and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows, **Animal**, v.7, n.7, p. 1143–1147, 2013

PEREIRA, R. A. Efeitos da administração de Molécula hidrofílica e Cianocobalamina após o parto, sobre parâmetros metabólicos e produtivos de vacas leiteiras. **Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas**, 2010.

PEREIRA, R. A. et al Metabolic parameters and dry matter intake of ewes treated with hydrophilic molecule and cyanocobalamin in the early postpartum period. **Small Ruminant Research**, v. 114, n.1, p. 140-145, 2013.

PREYNAT, A. et al. Effects of supplements of folic acid, vitamin B 12, and rumen-protected methionine on whole body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 2, p. 677-689, 2009.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 53, n. 3, p. 321-339, 2001.

RATHBONE, M. J.; GURNY, R. **Controlled release veterinary drug delivery: biological and pharmaceutical considerations**. Elsevier, 2000. ISBN 0080529976.

RICCI, E. et al. Sustained release of lidocaine from Polymer x gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, n. 2, p. 235-244, 2005.

ROLLIN, E. et al. The effect of injectable hydrophilic molecule and cyanocobalamin on postpartum serum β -hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 3, p. 978-987, 2010.

RUEL-GARIEPY, E.; LEROUX, J.-C. In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 409-426, 2004.

RYOO, J.-P. Hydrogel ocular inserts for the treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis. 1989.

SAETTONE, M. F. et al. Solubilization of tropicamide by poloxamers: physicochemical data and activity data in rabbits and humans. **International journal of pharmaceutics**, v. 43, n. 1-2, p. 67-76, 1988.

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.

SEZER, A.D. et al. Preparation of Fucoidan-Chitosan Hydrogel and Its Application as Burn Healing Accelerator on Rabbits **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.12, p. 2326-2333, 2008.

SOSNIK, A.; COHN, D. Ethoxysilane-capped PEO–PPO–PEO triblocks: a new family of reverse thermo-responsive polymers. **Biomaterials**, v. 25, n. 14, p. 2851-2858, 2004.

UHRICH, K. E. et al. Polymeric systems for controlled drug release. **Chemical reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181-3198, 1999.

UNDERWOOD, E. J. **The mineral nutrition of livestock**. Cabi, 1999. ISBN 0851991289.

VAN DER STAAY, F. et al. Effects of Molécula hidrofílica on salivary cortisol and behavioral response to social stress in piglets. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 30, n. 5, p. 410-416, 2007.

VILLANOVA, J. C. et al. Pharmaceutical applications of polymers. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WANG, Q.; LI, L.; JIANG, S. Effects of a PPO-PEO-PPO triblock copolymer on micellization and gelation of a PEO-PPO-PEO triblock copolymer in aqueous solution. **Langmuir**, v. 21, n. 20, p. 9068-9075, 2005.

WARING, G.; HARRIS, R. R. Double-masked evaluation of a poloxamer artificial tear in keratoconjunctivitis. Symposium on Ocular Therapy, 1979. **John Wiley New York**. p.127-140.

WATHES, D. et al. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, p. S232-S241, 2007.

ZEIDNER, N. S. et al. A sustained-release formulation of doxycycline hyclate (Atridox) prevents simultaneous infection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* transmitted by tick bite. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 463-468, 2008.

ANEXOS

Anexo A - Artigo (Artigo de revisão submetido, formatado nas normas da revista Journal Of Applied Animal Research)

Utilization of biodegradable polymers in veterinary science and routes of administration

– A literature review

Bilhalva, A.F^a; Finger, I.S^a; Pereira, R.A;^a; Corrêa, M.N^a; Del Pino, F.A.B^a

^a Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC – www.ufpel.edu.br/nupeec),

Departamento de Clínicas Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, S/N, 8A, CEP 96010-900

Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.