



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

LESLIÊ GARCIA PERES

**“EFEITO DA ALCALINIZAÇÃO DA EMLA SOBRE OS
PARÂMETROS DE PERMEAÇÃO NA PELE”**

PIRACICABA

2020

LESLIÊ GARCIA PERES

**“EFEITO DA ALCALINIZAÇÃO DA EMLA SOBRE OS
PARÂMETROS DE PERMEAÇÃO NA PELE”**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do
título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Doutorando Klinger de Souza Amorim

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
APRESENTADO PELA ALUNA LESLIÊ GARCIA PERES E
ORIENTADO PELO DOUTORANDO KLINGER DE SOUZA
AMORIM.

PIRACICABA

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

P415e Peres, Lesliê Garcia, 1996-
Efeito da alcalinização da EMLA sobre os parâmetros de permeação na pele /
Lesliê Garcia Peres. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Klinger de Souza Amorim.

Coorientador: Francisco Carlos Groppo.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Lidocaína. 2. Prilocaína. 3. Alcalinização. I. Amorim, Klinger de
Souza, 1990-. II. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Alkalinization effect of EMLA over the skin permeation parameters

Palavras-chave em inglês:

Lidocaine

Prilocaine

Alkalinization

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 27-11-2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer minha mãe Valdenice Cristina Larios Garcia Peres, meu pai James Peres Soares e meu irmão Gustavo Garcia Peres, agradeço também os meus padrinhos Denise Aparecida Garcia de Oliveira, Amarildo Bueno de Oliveira, Juliana Maria Garcia De Oliveira Sewaybricker e Rodrigo Gaete Sewaybricker por todo suporte, carinho, cuidado e amor que dedicaram a mim durante todo esse processo e toda a minha vida. Agradeço a minha afilhada Laura Sewaybricker por ser luz em meu caminho e me fazer ser uma pessoa melhor a cada dia. Agradeço aos meus avós Antonio Garcia, Hélia Maria Larios Garcia e Dolores Soares Peres por serem minha fonte de inspiração, meu aconchego e paz. Eu amo todos vocês, sem vocês eu não seria absolutamente nada.

Agradeço aos meus amigos Luiza Lourenço Sottovia, Tulio Mauricio Ferreira Paro, Janaina Cardoso Santos Couto, Matheus Nunes Gonsalves, Larissa Cristina Spirito Pena por tornarem a caminhada até aqui mais leve e inesquecível, a graduação é sem dúvidas a melhor época de nossas vidas e eu agradeço a todos vocês por tornarem esse momento, sem dúvida, muito mais especial.

Agradeço ao meu orientador Dourtorando Klinger de Souza Amorim, por toda dedicação, companheirismo e paciência durante a elaboração desse trabalho. Gostaria de agradecer também o Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo por ter me orientado durante toda a pesquisa necessária para a realização desse projeto.

Agradeço ao programa CNPq/PIBIC pelo financiamento do projeto de pesquisa.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da alcalinização sobre a capacidade de permeação *ex vivo* em pele de uma formulação tópica composta de lidocaína 2,5%/prilocaína 2,5% (EMLA). Foi utilizado tecido *ex vivo* de origem animal (orelha de suínos), por apresentarem semelhança estrutural com a pele dos seres humanos. Os geis à base de Aristoflex® AVC foram preparados contendo 2,5% de lidocaína e 2,5% de prilocaína para uma das formulações, a segunda formulação foi preparada com uso da primeira com adição de bicarbonato de sódio 8,5%. O experimento de permeação com as formulações através da pele de porco foi realizado na célula de difusão vertical tipo *Franz*, sendo a membrana substituída pela pele de orelha do porco. Os ensaios de permeação foram realizados durante um período de 8 horas, à temperatura controlada de 32°C e sob agitação constante. Comparando o parâmetro de permeação “fluxo” das formulações com e sem bicarbonato através da pele de porco, nota-se que houve um aumento significativo do fluxo da lidocaína no grupo com bicarbonato. Porém, esse mesmo efeito não foi observado no fluxo da prilocaína. Avaliado o parâmetro tempo de início de permeação, tanto para a lidocaína quanto para a prilocaína, foi possível notar um atraso no início da permeação no grupo com bicarbonato, quando comparado sem bicarbonato. Provavelmente, as formas moleculares com carga dos fármacos estariam ligadas nos polímeros dos géis e podem ter demorado alguns minutos a mais para mudar de forma e se soltar dos hidrogéis com bicarbonato, levando a esse leve atraso. Concluímos que a alcalinização da formulação contendo lidocaína e prilocaína melhora a permeabilidade da lidocaína, mas não afeta a prilocaína.

Palavras-chave: Lidocaína. Prilocaína, Alcalinização.

ABSTRACT

This work aims to study the effect of alkalization on the ex vivo permeation capacity in skin of a topical formulation composed of 2.5% lidocaine / 2.5% prilocaine (EMLA). Ex vivo tissue of animal origin (pig ear) was used, as they have a structural similarity to human skin (Todo, 2017). Gels based on Aristoflex® AVC were prepared containing 2.5% lidocaine and 2.5% prilocaine for one of the formulations, the second formulation was prepared using the first with the addition of 8.5% sodium bicarbonate. The permeation experiment with the pigment skin formulations was carried out in the Franz-type vertical diffusion cell, the membrane being replaced by the pig's ear skin. The permeation tests were carried out over a period of 8 hours, at a controlled temperature of 32°C and under constant agitation. Comparing the "flow" permeation parameter of formulations with and without bicarbonate through pig skin, it is noted that there was a significant increase in the flow of lidocaine in the bicarbonate group. However, this same effect was not observed in the flow of prilocaine. After evaluating the time of onset of permeation, both for lidocaine and for prilocaine, it was possible to notice a delay in the beginning of permeation in the group with bicarbonate, when compared without bicarbonate. Probably, the molecularly charged forms of the drugs would be linked to the polymers in the gels and may have taken a few more minutes to change shape and detach from the hydrogels with bicarbonate, leading to this slight delay. We conclude that the alkalization of the formulation containing lidocaine and prilocaine improves the permeability of lidocaine, but does not affect prilocaine.

Key words: Lidocaine. Prilocaine. Alkalization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
3 PROPOSIÇÃO	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Delineamento experimental	14
4.2 Preparo das formulações em gel de Aristoflex® AVC à base de lidocaína e prilocaína	14
4.3 Metodologia analítica de quantificação dos fármacos para os ensaios de liberação e permeação	16
4.3.1 Ensaios de permeação in vitro através da pele de orelha de porco	17
4.3.2 Análise de dados	18
5 RESULTADOS	19
6 DISCUSSÃO	20
7 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23
ANEXOS	25
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	25
Anexo 2 – Iniciação Científica	26

1 INTRODUÇÃO

A pele é um órgão que tem como principal função a proteção do organismo contra a passagem de substâncias, funcionando como uma barreira contra agressões físicas e químicas externas (Tadicherla & Berman, 2006). Este órgão é composto da derme e da epiderme. A derme é a porção mais densa e localizada mais internamente, e é uma região vascularizada onde existem as terminações nervosas livres, responsáveis pela sensação de dor (Cevc, 2004; Tadicherla & Berman, 2006; Sawyer et al., 2009). A epiderme é a camada externa e avascular, revestida pelo estrato córneo (SC) que, por ser praticamente impermeável, é a principal barreira da pele e limita a absorção de drogas (Cevc, 2004; Tadicherla & Berman, 2006).

Por ser uma barreira, a pele dificulta o acesso dos anestésicos locais (AL) as terminações nervosas na região subcutânea, para exercer sua ação. Para que os AL consigam agir na pele, as composições tópicas devem conter relativamente altas concentrações do anestésico, em comparação as formulações injetáveis, para atingir a mesma potência. Além disso, essas formulações necessitam contato prolongado com a superfície da pele (30-60 min) para atingir efeito anestésico e, em geral, requerem a oclusão ou aplicação em adesivos, para aumentar a penetração.

A pele humana excisionada é considerada o padrão-ouro para experimentos de permeação *in vitro*. No entanto, considerações éticas são um grande problema para o uso de pele humana nesse tipo de experimento. Por apresentar estrutura, composição e permeabilidade mais próxima à dos seres humanos, a pele de porco tem sido a barreira de escolha para estudos pré-clínicos de permeação (Todo, 2017).

Diversos procedimentos realizados na pele, tais como biópsias, operações pequenas e cirurgias estéticas, podem promover dor. A anestesia local da região do procedimento ajuda a reduzir a ansiedade e o estresse dos pacientes. No entanto, a injeção de anestésicos locais pode ser extremamente dolorosa, podendo piorar a ansiedade do paciente e ainda promover edema da região, distorcendo a visão do cirurgião (Kaweski & Committee, 2008) e daí a necessidade de agentes anestésicos tópicos mais eficientes.

A mistura eutética dos AL lidocaína e prilocaína (ambos a 2,5%), comercialmente chamada de EMLA®, é uma das formulações tópicas para uso dermatológico mais utilizado, com eficácia e segurança comprovadas (Sawyer et al., 2009). A eficácia da EMLA é decorre da menor temperatura de fusão dos anestésicos

quando associados, permitindo assim absorção mais completa. Entretanto, apresenta tempo de latência prolongado. Este fato é uma desvantagem significativa para esta formulação tópica, pois se torna inconveniente tanto para o médico como para o paciente, especialmente na área de pediatria, onde tempo prolongado de tratamento contribui para o aumento da ansiedade do paciente (Castilho, 1999). Além disso, a presença de prilocaína na composição requer cuidado com relação à dose, pois a mesma pode causar metemoglobinemia.

Uma vez que essa está relacionada a dose e à massa corporal do paciente, crianças pequenas podem estar mais sujeitas a esse efeito tóxico (Malamed, 2013).

A quantidade de cada forma em uma solução varia com o pH de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch. Em um pH de 3,5 uma solução de cloridrato de Lidocaína apresenta 99,996% da droga em sua fase ionizada, não lipossolúvel (RNH⁺) e somente 0,004% em sua forma não ionizada, lipossolúvel (RN). Somente a forma não ionizada, RN, consegue atravessar a membrana nervosa e exercer ação anestésica. Então, nesse pH, apenas uma pequena quantidade do anestésico local estará disponível para agir imediatamente após a injeção. Para compensar, o próprio organismo começa a realizar o tamponamento desse meio, o que leva tempo e está então relacionado diretamente com o início de ação do anestésico local (Malamed, 2013).

No cloridrato de lidocaína, por exemplo, o aumento no pH (de 3,5 para aproximadamente 7,4) da solução por adição de bicarbonato de sódio possibilita um incremento de aproximadamente 6000 vezes da fase não ionizada imediatamente à injeção. Esta fase não ionizada é lipossolúvel e capaz de atravessar a membrana do axônio para realizar o bloqueio dos canais de sódio pelo interior da membrana levando ao efeito de bloqueio da condução nervosa (Malamed, 2013).

Uma formulação tópica considerada ideal deve promover anestesia em poucos minutos, quando aplicada na pele intacta e apresentar duração de ação prolongada (Tadicherla & Berman, 2006). Diversos estudos recentes visam atingir esses objetivos, buscando essa formulação ideal (Wang & Black, 2013; Barbosa et al., 2013).

2 REVISÃO DA LITERATURA

A pele é uma barreira protetora eficaz que evita a entrada e saída de compostos através dela (Bucks e Maibach 2002). Sua principal barreira está localizada na camada mais externa (epiderme), o estrato córneo é composto por células mortas ricas em proteínas (corneócitos) e domínios lipídicos intercelulares, organizada em bicamadas lamelares. Os principais compostos encontrados no estrato córneo são: ceramidas, ácidos graxos livres, esteróis e triacilgliceróis (Bergh et al, 1997), sendo assim, pode afetar os parâmetros de permeação de anestésicos aplicados sobre pele.

A pele possui ainda uma camada mais interna, a derme, a qual possui estruturas vasculares e terminações nervosas livres, então quando um anestésico tópico é aplicado sobre a superfície da pele ele visa penetrar e agir sobre a derme e impedir a sensação de dor (Tadicherla S, Berman B., 2006).

O fármaco pode penetrar na epiderme por três maneiras diferentes: (1) intercecular: onde o fármaco fica ao redor dos corneócitos ficando dentro dos lípidos intercelulares, (2) transcelular: o fármaco passa diretamente entre os corneócitos e os lipídeos, (3) via apêndices (foliculo piloso, glandula sebácea): fármacos polares e de baixo peso molecular podem ser absorvidos (Moser et al, 2001).

A via mais fácil de penetração da droga é através dos lipídios intercelulares, mas para isso o pKa da droga deve ser o mais próximo possível do pH da pele, pois assim, mais droga ativa vai penetrar no tecido (Ranade e Hollinger 2003). Há outras duas maneiras de potencializar essa penetração da droga: utilizar um dispositivo que maximiza a liberação da droga; ou utilizar intensificadores de penetração que entram em contato com a pele e alteram reversivelmente para aumentar a permeação (Woodford e Barry 1986 ; Barry et al 1987). Pode-se ainda, administrar a droga em formulações contendo vesículas.

No entanto, a pele possui variâncias de permeabilidade entre os indivíduos e também em um mesmo individuo (Todo,2017), então, para estudos sobre a permeação vem sendo utilizada a pele de porco por apresentar-se histologicamente muito semelhante a pele humana. Tanto o tecido fresco como o tecido congelado apresentam o mesmo parâmetro de permeação.

A mistura eutética dos AL lidocaína e prilocaína (ambos a 2,5%), comercialmente chamada de EMLA®, é altamente utilizado como anestésico tópico para realizar procedimentos estéticos e pequenas biopsias. Entretanto, apresenta um início de anestesia muito demorado podendo ser de 25 minutos a duas horas dependendo do tipo de procedimento a ser realizado (Holmes, 1994).

As principais vantagens de usar uma formulação baseada em uma mistura eutética em vez de formulações mais convencionais são: (a) as bases dos anestésicos locais estão presentes em suas formas permeáveis sem carga; (b) o uso de um solvente pobre, a água, já que o veículo fornece um sistema saturado em baixas concentrações; (c) o solvente lipofílico está ausente na fase dispersa, o qual diminuiria os coeficientes de distribuição eficazes das substâncias ativas entre a pele e a formulação; (d) as gotículas consistem em fármaco solúvel e atuam como reservatórios para obter a liberação em seu estado estacionário (AA Nyqvist-Mayer , AF Brodin , SG Frank, 1986)

Após aplicada a solução, a duração da anestesia varia de acordo com a vascularização do local, quanto mais vascular, ocorre o efeito mais cedo. Já a profundidade de absorção está relacionada com a duração da aplicação, se aplicado por 60 segundos a profundidade do efeito anestésico encontrada foi de 3mm e se aplicado por 120 minutos a profundidade foi de 5mm (Bjerring e Arendt-Nielsen 1990). Quando o EMLA foi aplicado sobre a pele por 24 horas, os níveis encontrados no organismo humano ainda estavam abaixo do nível tóxico sistêmico.

Um efeito colateral que pode ser causado pela EMLA é a metemoglobinemia pela presença da prilocaína. Ocorre devido a oxigenação do ferro na hemoglobina, do estado ferroso para o férrico, diminuindo o transporte de oxigênio na hemoglobina, resulta em cianose quanto atinge níveis 5-15% (Russell e Doyle, 1997). Por esse motivo o EMLA não é indicado para crianças menores de 12 anos.

Soluções anestésicas com vasoconstritor, a lidocaína por exemplo, apresentam pH baixo para aumentar sua vida útil e estabilizar a epinefrina presente. O baixo pH presente no início da aplicação faz com o que o corpo leve tempo para alcalinizar a substância e isso faz com que o inicio do efeito de anestesia demore um maior tempo para ocorrer (Malamed, 2011).

Soluções que não apresentam epinefrina, como a prilocaína, apresentam uma faixa de pH mais alta (próximo ao pH fisiológico) e isso explicaria seu tempo de início de ação ser menor. Estudos anteriores sobre adição de bicarbonato de sódio 8,4% a solução de prilocaína resultou em alterações de pH (Malamed, 2011).

O pH alto reduz a solubilidade dos anestésicos locais. No caso do anestésico tópico ele tem que penetrar através da mucosa e da membrana nervosa para prevenir o fluxo transmembrana de íons sódio. O momento do início da anestesia local depende de sua lipossolubilidade. Um anestésico local carregado é 4.000 vezes mais lipossolúvel do que as formas não carregadas (Li H, Cheng Y, Li J, Chen Y, Yuan J, Yang S, Shi H, Li W, Yang S, Wang W, Xu G, Zhao S., 2016).

O tamponamento dos anestésicos locais com bicarbonato de sódio pode potencializar o bloqueio do impulso nervoso sobre os nervos periféricos (Catchlove, 1972), além disso, pode fornecer uma diminuição da dor de injeção (no caso das soluções injetáveis), início de ação mais rápido e maior profundidade de ação.

O aumento do pH da solução anestésica em direção ao pH da faixa fisiológica melhora a qualidade neural bloqueio e resulta em um tempo de início mais rápido (Warren VT, Fisher AG, Rivera EM, Saha PT, Turner B, Reside G, Phillips C, White RP Jr., 2017).

Estudos relatam, por exemplo, que utilizar lidocaína tamponada pode ser uma estratégia para a utilização de uma menor quantidade de anestésico, visto que, sua absorção seria semelhante ao utilizar o dobro de sua concentração (Warren VT, Fisher AG, Rivera EM, Saha PT, Turner B, Reside G, Phillips C, White RP Jr., 2017).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi estudar o efeito da alcalinização sobre a capacidade de permeação ex vivo em pele de suínos de uma formulação tópica composta pela mistura eutética de anestésicos locais com lidocaína 2,5% e prilocaína 2,5% (EMLA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado tecido ex vivo de origem animal (porcos), por apresentarem semelhança estrutural com a pele dos seres humanos (Todo, 2017). As orelhas de porcos foram compradas em um abatedouro devidamente certificado pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (Frigorífico Frigodeliss Ltda, Capivari-SP). Assim está dispensado de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa em Animais – UNICAMP.

4.1 Delineamento experimental

Foram realizadas a preparação das orelhas de porco e a confecção dos géis anestésicos utilizados: imediatamente após o abate (tecido ex vivo porcos) as orelhas foram transportadas em tampão fosfato (pH 7,4) até a Faculdade de Odontologia de Piracicaba e iniciada a retirada da pele, como observado na figura 1.

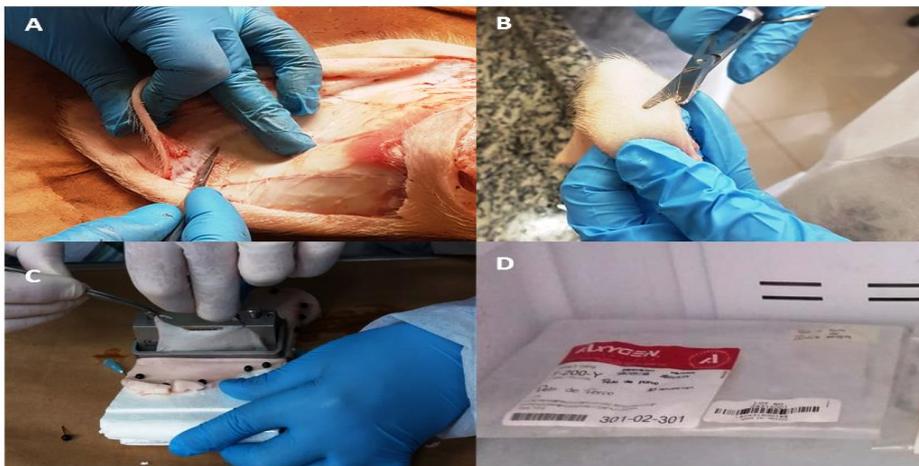


Figura 1. A: Retirada da derme das orelhas dos porcos com o auxílio de uma lâmina de bisturi. B: Corte dos pelos das orelhas dos porcos. C: Retirada dos tecidos subcutâneo e adiposo com o aparelho dermatômetro. D: Embalados para o congelamento a -20°C .

4.2 Preparo das formulações em gel de Aristoflex[®] AVC à base de lidocaína e prilocaína

O gel à base de Aristoflex[®] AVC foi preparado de acordo com sugestão do fabricante PharmaSpecial. A tabela 1 mostra os componentes que foram utilizados para confecção do gel de Aristoflex[®] AVC contendo 2,5% de lidocaína e 2,5% de

prilocaína. O preparo do gel consiste na mistura dos ingredientes da fase 1, seguida da pulverização da fase 2 sob agitação moderada até obtenção de um gel cristalino.

Tabela 1. Componentes utilizados no preparo dos géis de Aristoflex® AVC.

	Componente	Quantidade	Função	
1	FASE	Metilparabeno	0,2%	Conservante
		Propilenoglicol	5%	Solvente e umectante
		Glicerina	3%	Agente umectante e emoliente
		Prilocaína	2,5%	Anestésico local
		Lidocaína	2,5%	Anestésico local
		Água deionizada	Q.s.p. 100%	Solvente
2	FASE AVC	Aristoflex®	2,5%	Gelificante

Para a confecção do gel de EMLA com bicarbonato a 8,5% (Malamed, 2011), uma 3ª fase será utilizada, como mostra a Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Componentes utilizados no preparo dos géis com bicarbonato.

Componente	Quantidade	Função
FASE 1		
Metilparabeno	0,2%	Conservante
Propilenoglicol	5%	Solvente e umectante
Glicerina	3%	Agente umectante e emoliente
Prilocaína	2,5%	Anestésico local
Lidocaína	2,5%	Anestésico local
Água deionizada	Q.s.p. 100%	Solvente
FASE 2		
Aristoflex® AVC	2,5%	Gelificante
FASE 3		
Bicarbonato de sódio	8,5%	Agente alcalinizador

Os materiais necessários para a confecção dos géis foram separados e organizados segundo as suas proporções, os materiais foram dispostos em um recipiente, mistura dos ingredientes (fase 1), em seguida da pulverização (fase 2) sob agitação moderada até obtenção de um gel cristalino figura 2.



Fase 1

Fase 2

Figura 2. Preparo das fases para obtenção do gel.

Após atingirem a textura e geleificação adequada os géis foram armazenados em recipientes (tubos) de 100 ml figura3.



Figura 3. Fase de geleificação e acondicionamento do gel.

4.3 Metodologia analítica de quantificação dos fármacos para os ensaios de liberação e permeação

Foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Thermo®, acoplado com Coletor automático Thermo® e interligados com o software surveyor ChromQuest 5.0. As condições cromatográficas utilizadas durante todo processo de desenvolvimento e validação do método estão descritas no quadro 1 abaixo. Essas condições analíticas e a metodologia de quantificação do fármaco

foram validadas previamente segundo parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Quadro 1. Condições cromatográficas utilizadas para validação de metodologia analítica.

Amostra	Lidocaína e prilocaína em solução fisiológica
Fase móvel	Acetonitrila/Tampão (25 mM NH ₄ OH, pH ajustado para 7,0 com H ₃ PO ₄) (40/60, v/v)
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1,2 mL/min
Detector (λ)	Ultravioleta (UV), λ = 220nm
Coluna	Phenomenex, Gemini, C18 fase reversa 5µ, 150 x 4,60mm

4.3.1 Ensaios de permeação in vitro através da pele de orelha de porco

Esse experimento foi realizado utilizando células de difusão vertical (Figura 1) tipo Franz (Sistema Transdérmico Manual, Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA, USA), com área de permeação de 1,77 cm² e volume do compartimento receptor de 7 mL, de acordo com metodologias propostas por Herai et al. (2007) e Taveira (2007).

O experimento de permeação com as formulações através da pele de porco foi realizada na célula de difusão vertical tipo Franz, sendo a membrana substituída pela pele de orelha do porco. Os ensaios de permeação foram realizados durante um período de 8 horas, à temperatura controlada de 32°C e sob agitação constante. Em intervalos pré-estabelecidos, foram retiradas alíquotas da solução receptora (300 µL), e analisadas por CLAE. Ao compartimento receptor, foram adicionados volumes idênticos aos retirados os quais foram utilizados para o cálculo da diluição realizada.

Após a quantificação, foram calculados os parâmetros de permeação do fármaco tais como: tempo necessário para permeação inicial do fármaco ou time lag; fluxo e coeficiente de permeabilidade. Os experimentos foram realizados no mínimo

em sextuplicatas. A quantidade de droga acumulada no compartimento receptor foi calculada e obtida uma média.

Para cada célula, foi construído um gráfico a partir da quantidade de anestésico acumulado no compartimento receptor versus tempo (intervalos de tempo de cada coleta). A inclinação da porção linear dos gráficos representa o fluxo de penetração dos anestésicos locais através da mucosa e a sua intersecção com o eixo das abscissas permitirá determinar o valor do tempo de latência (time lag).

Dessa forma, os dados obtidos a partir dos experimentos de permeação foram expressos em quantidades cumulativas de fármaco permeado em função do tempo, em um intervalo de 5 horas e analisados de acordo com a equação:

$$J = P \times Cd$$

onde J é o fluxo de fármaco através da mucosa, P é o coeficiente de permeabilidade e Cd é a concentração de fármaco utilizado no compartimento doador. Os dados foram analisados utilizando o programa Origin 6.0 (Microcal™ Software, Inc., Northampton, MA, USA) e expressos em média \pm desvio padrão (n = 6).

4.3.2 Análise de dados

Para se testar a hipótese nula de que qualquer diferença encontrada nos tratamentos deva ser devida meramente ao acaso, esses dados serão testados quanto à normalidade de distribuição (teste de Shapiro-Wilks) e equivalência das variâncias (teste de Levene) e, posteriormente submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e Dunn. O nível de significância para todos os testes foi de 5% e o software utilizado foi o GraphPad Prism 7.0.

5 RESULTADOS

A Tabela 3 mostra o fluxo e o time lag para os dois anestésicos utilizados na mistura testada.

Tabela 3. Comparação dos parâmetros de permeação dos diferentes géis.

LDC-PLC 2.5%	Lidocaína		Prilocaína	
	Fluxo	Time Lag	Fluxo	Time Lag
c/bicarbonato	36.50 ^a ± 12.28	3.09 ^c ± 1.20	44.21 ^a ± 14.64	3.51 [*] ± 0.32
s/bicarbonato	20.70 ^b ± 0.74	1.60 ^d ± 0.09	42.42 ^a ± 2.18	2.33 [#] ± 0.34

Legendas: $p < 0.05$, Kruskal-Wallis/Dunn. Letras diferentes: diferença entre os parâmetros da lidocaína. Símbolos diferentes: diferença entre os parâmetros da prilocaína.

Comparando o parâmetro de permeação “fluxo” das formulações com e sem bicarbonato através da pele de porco, pode-se notar que houve um aumento significativo do fluxo da lidocaína ($p < 0,05$) no grupo com bicarbonato. Porém, esse mesmo efeito não foi observado no fluxo da prilocaína ($p > 0,05$), sendo que não houve diferença no fluxo entre as formulações.

Quando avaliado o parâmetro time lag, que é o tempo de início de permeação, tanto para a lidocaína quanto para a prilocaína, foi possível notar um atraso no início da permeação no grupo com bicarbonato, quando comparado com sem bicarbonato ($p < 0,05$).

O perfil de permeação de lidocaína e prilocaína dos géis com e sem anestésicos pode ser observado na Figura 4 abaixo.

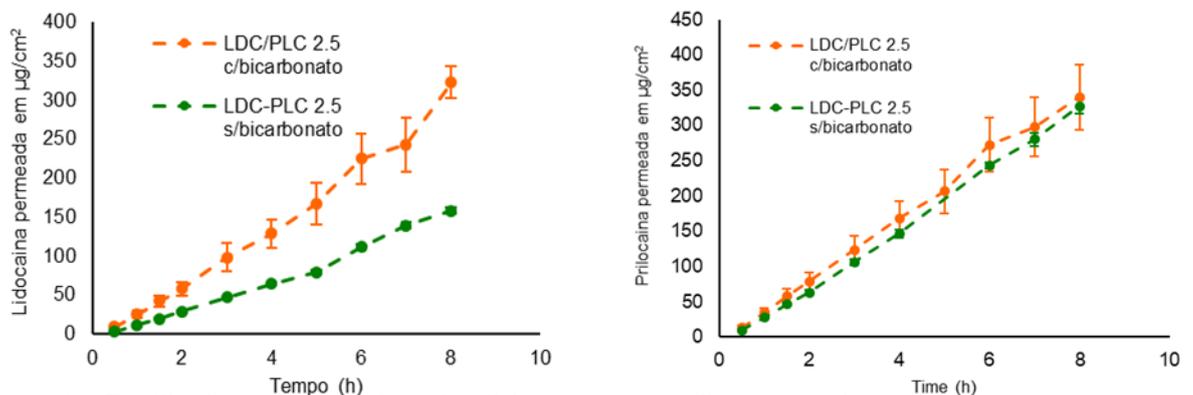


Figura 4. Perfil de permeação de lidocaína e prilocaína dos géis com e sem bicarbonato.

6 DISCUSSÃO:

A permeação das drogas em pele sadia ainda é considerada um desafio, novas formulações vem sendo desenvolvidas e para estudá-las existem diferentes modelos animais, incluindo suíno, camundongo, rato e pele de cobra. Estas peles de animais possuem uma pequena variabilidade quando se comparada à pele humana e são as preferidas quando se trata de estudos para estimar a permeabilidade de drogas na pele humana. O tecido utilizado pode estar fresco ou congelado que apresentam o mesmo padrão de permeação (Todo, 2017).

Apesar do pKa de ambos os anestésicos locais serem em torno de 7,9 (Nyqvist-Mayer et al, 1986), essa diferença no comportamento dos AL frente a alteração do pH já foi reportada na literatura usando lipossomas com gradiente de concentração iônico, onde o pH do interior do lipossoma é diferente do externo (Engström et al. (1999)). Observaram que a lidocaína foi mais sensível ao pH de 7.4 no interior do lipossoma, gerando mais formas carregadas positivamente do que a prilocaína, a qual interagiu com as cargas negativas dos fosfolipídios de membrana.

Esse mesmo comportamento não foi observado para a prilocaína que teve uma menor interação com a membrana. Provavelmente essa diferença de comportamento pode justificar o porquê de apenas o fluxo da lidocaína ter sido alterado na presença de bicarbonato. Além disso, a prilocaína, apresenta uma faixa de pH mais alta (próximo ao pH fisiológico) e isso explicaria seu tempo de início de ação ser menor. Ainda sobre adição de bicarbonato de sódio 8,4%, a solução de prilocaína resultou em uma alteração mínima de pH (Malamed, 2011).

O maior fluxo da lidocaína no grupo com bicarbonato poderia significar um tempo de anestesia mais longo in vivo, devido a maior quantidade de moléculas de lidocaína que poderiam atravessar a barreira e estariam efetivamente prontas para acessar neurônios. Os parâmetros de permeação (Figura 4) mostram que esse maior fluxo é sustentado ao longo do tempo, mostrando a vantagem do sistema. Sendo assim, utilizar a lidocaína tamponada pode ser uma estratégia para a utilização de uma menor quantidade de anestésico, visto que, sua absorção seria semelhante ao utilizar o dobro de sua concentração (Warren VT, Fisher AG, Rivera EM, Saha PT, Turner B, Reside G, Phillips C, White RP Jr., 2017).

Esse atraso no time lag em sistemas de liberação já foi observada para ambos os fármacos em mistura eutética em mucosa palatina (queratinizada) (Muniz et al., 2018). O momento do início da anestesia local dependente de sua lipossolubilidade. Um anestésico local não carregado é 4.000 vezes mais lipossolúvel do que as formas carregadas (Li H, Cheng Y, Li J, Chen Y, Yuan J, Yang S, Shi H, Li W, Yang S, Wang W, Xu G, Zhao S., 2016). A presença do bicarbonato pode ter influenciado na ligação entre droga e polímero da formulação e as formas moleculares com carga dos fármacos que estariam ligadas nos polímeros dos géis podem ter demorado alguns minutos a mais para mudar de forma e se soltar dos hidrogéis com bicarbonato, levando a esse leve atraso no início da permeação, o que pode ter sido compensado em seguida pelo efeito do tamponamento aumentando o fluxo de permeação por a lidocaína.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que a alcalinização da formulação contendo lidocaína e prilocaína melhora a permeabilidade da lidocaína, mas não afeta a prilocaína.

REFERÊNCIAS^{1*}

- 1) Barbosa RM, da Silva CMG, Bella TS, de Araújo DR, Marcato PR, Durán N, de Paula E. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing the local anesthetic dibucaine designed for topical application. *J Phys Conf Series*. 2013;429:012035
- 2) Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL. Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Nov 1;54 Suppl 1:S41-55.
- 3) Caon T, Simões CM. Effect of freezing and type of mucosa on ex vivo drug permeability parameters. *AAPS PharmSciTech*. 2011 Jun;12(2):587-92.
- 4) Castillo, J. Topical anesthetic formulation. — US Patent. United States. 1999
- 5) Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004 Mar 27;56(5):675-711.
- 6) Engström S, Nordén TP, Nyquist H. Cubic phases for studies of drug partition into lipid bilayers. *Eur J Pharm Sci*. 1999 Aug;8(4):243-54.
- 7) Herai H, Gratieri T, Thomazine JA, Bentley MV, Lopez RF. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. *Int J Pharm*. 2007 Feb 1;329(1-2):88-93.
- 8) Kaweski S & Plastic Surgery Educational Foundation Technology Assessment Committee. Topical anesthetic creams. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Jun;121(6):2161-5.
- 9) Lan Y, Wu Q, Mao YQ, Wang Q, An J, Chen YY, Wang WP, Zhao BC, Liu N, Zhang YW. Cytotoxicity and enhancement activity of essential oil from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. as a natural transdermal penetration enhancer. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2014 Feb;15(2):153-64.
- 10) Li H, Cheng, Y, Li J, Chen Y, Yuan J, Yang S, Zhao, S. NaHCO₃-Buffered Lidocaine Gel for Outpatient Rigid Cystoscopy in Men. *Journal of PeriAnesthesia Nursing* 2016 31(2), 154–157.
- 11) Lu WC, Chiang BH, Huang DW, Li PH. Skin permeation of D-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification. *Ultrason Sonochem*. 2014 Mar;21(2):826-32.
- 12) Malamed SF. Buffering Local Anesthetics in Dentistry. *The Pulse*, v. 44, n. 1, p. 7–9, 2011.
- 13) Malamed SF. *Handbook of local anesthesia*. 6.ed. Saint Louis: Elsevier; 2013.
- 14) Muniz BV, Baratelli D, Di Carla S, Serpe L, da Silva CB, Guilherme VA, Ribeiro LNM,

^{1*} De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Cereda CMS, de Paula E, Volpato MC, Groppo FC, Fraceto LF, Franz-Montan M. Hybrid Hydrogel Composed of Polymeric Nanocapsules Co-Loading Lidocaine and Prilocaine for Topical Intraoral Anesthesia. *Sci Rep*. 2018 Dec 19;8(1):17972. doi: 10.1038/s41598-018-36382-4.
- 15) Nnamani PO, Kenechukwu FC, Dibua EU, Ogbonna CC, Monemeh UL, Attama AA. Transdermal microgels of gentamicin. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013 Jun;84(2):345-54.
 - 16) Nyqvist-Mayer AA, Brodin AF, Frank SG. Drug release studies on an oil-water emulsion based on a eutectic mixture of lidocaine and prilocaine as the dispersed phase. *J Pharm Sci*. 1986 Apr;75(4):365-73.
 - 17) Ren Q, Deng C, Meng L, Chen Y, Chen L, Sha X, Fang X. In vitro, ex vivo, and in vivo evaluation of the effect of saturated fat Acid chain length on the transdermal behavior of Ibuprofen-loaded microemulsions. *J Pharm Sci*. 2014 Jun;103(6):1680-91.
 - 18) Sawyer J, Febbraro S, Masud S, Ashburn MA, Campbell JC. Heated lidocaine/tetracaine patch (Synera, Rapydan) compared with lidocaine/prilocaine cream (EMLA) for topical anaesthesia before vascular access. *Br J Anaesth*. 2009 Feb;102(2):210-5.
 - 19) Tadicherla S, Berman B. Percutaneous dermal drug delivery for local pain control. *Ther Clin Risk Manag*. 2006 Mar;2(1):99-113.
 - 20) Taveira SF. (2007). Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos: estudo in vitro em cultura de células tumorais. [dissertação]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
 - 21) Todo H. Transdermal Permeation of Drugs in Various Animal Species. *Pharmaceutics*. 2017 Sep 6;9(3). pii: E33. doi: 10.3390/pharmaceutics9030033.
 - 22) Vázquez-González ML, Bernad R, Calpena AC, Domènech O, Montero MT, Hernández-Borrell J. Improving ex vivo skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers. *Int J Pharm*. 2014 Jan 30;461(1-2):427-36.
 - 23) Wang X, Black L. Ex vivo percutaneous absorption of ketamine, bupivacaine, diclofenac, gabapentin, orphenadrine, and pentoxifylline: comparison of versatile cream vs. reference cream. *Int J Pharm Compd*. 2013 Nov-Dec;17(6):520-5.
 - 24) Warren, V. T., Fisher, A. G., Rivera, E. M., Saha, P. T., Turner, B., Reside, G., White, R. P. (2017). Buffered 1% Lidocaine With Epinephrine Is as Effective as Non-Buffered 2% Lidocaine With Epinephrine for Mandibular Nerve Block. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 75(7), 1363–1366.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

ORIGINALITY REPORT			
22%	21%	10%	%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	repositorio.unicamp.br Internet Source		15%
2	docplayer.com.br Internet Source		1%
3	www.locus.ufv.br Internet Source		1%
4	bibliotecaflorestal.ufv.br Internet Source		1%
5	koreascience.or.kr Internet Source		1%
6	Lígia Nunes de Moraes Ribeiro, Michelle Franz-Montan, Márcia Cristina Breitzkreitz, Gustavo Henrique Rodrigues da Silva et al. "Nanohybrid hydrogels designed for transbuccal anesthesia", International Journal of Nanomedicine, 2018 Publication		1%
7	worldwidescience.org Internet Source		1%
	issuu.com		
8	Internet Source		1%
Exclude quotes	Off	Exclude matches	Off
Exclude bibliography	On		

Anexo 2 – Iniciação Científica



Universidade Estadual de Campinas
Pró-Reitoria de Pesquisa
Programas de Iniciação Científica e Tecnológica
www.prp.unicamp.br | Tel. 55 19 3521-4891

PARECER SOBRE RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES

Bolsista: LESLIÊ GARCIA PERES – RA 178689

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) FRANCISCO CARLOS GROPPPO

Projeto: “Efeito da alcalinização da EMLA sobre os parâmetros de permeação na pele”

Bolsa: PIBIC/CNPq

Processo: 121810/2018-6

Vigência: 01/08/2018 a 31/07/2019

PARECER

O relatório apresentado mostra que o projeto foi desenvolvido, e apresenta de forma clara e objetiva a descrição e discussão dos resultados obtidos. A aluna manteve seu bom desempenho acadêmico. Assim, avalio que os objetivos do estágio de IC foram atingidos, e aprovo o relatório final apresentado.

Conclusão do Parecer:

Aprovado

Pró-Reitoria de Pesquisa, 12 de novembro de 2020.


Mirian Cristina Marcançola
PRP / PIBIC - Unicamp
Matr. 299062