



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

BIANCA CAMARGO DOMINGUES

**EFEITO DA ALCALINIZAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE
LIDOCAÍNA A 5% SOBRE OS PARÂMETROS DE PERMEAÇÃO
NA PELE**

PIRACICABA

2021

BIANCA CAMARGO DOMINGUES

**EFEITO DA ALCALINIZAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE
LIDOCAÍNA A 5% 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: Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO
PELA ALUNA BIANCA CAMARGO DOMINGUES E
ORIENTADA PELO PROF DR SIDNEY FIGUEROBA
RAIMUNDO

PIRACICABA

2021

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

D713e Domingues, Bianca Camargo, 1998-
Efeito da alcalinização de uma formulação de lidocaína a 5% sobre os
parâmetros de permeação na pele / Bianca Camargo Domingues. – Piracicaba,
SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Sidney Figueroba Raimundo.

Coorientador: Francisco Carlos Groppo.

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

1. Alcalinização. 2. Lidocaína. 3. Anestesia. I. Figueroba Raimundo,
Sidney, 1963-. II. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Effect of alkalization of 5% lidocaine formulation on skin permeation
parameters

Palavras-chave em inglês:

Alkalization

Lidocaine

Anesthesia

Titulação: Cirurgião-dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 15-10-2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que estiveram ao meu lado e me apoiaram durante toda trajetória para minha formação, especialmente aos meus pais, irmã e amigos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Serviço de Apoio ao Estudante – SAE/UNICAMP, processo nº 01-P-55/2018

Ao Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo, expresso meu agradecimento pela oportunidade de conhecimento e por orientar esse projeto.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP), na pessoa do seu Diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e do diretor associado Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar.

À minha família, dedico toda minha gratidão e amor por todo incentivo, dedicação e carinho para que eu pudesse chegar até aqui.

Às minhas companheiras de república, e todos os meus amigos que me deram suporte, e sempre me incentivaram e acompanharam durante minha vida acadêmica.

RESUMO

A primeira etapa para o desenvolvimento de produtos e técnicas capazes de aumentar a absorção de fármacos e cosméticos através da pele consiste do estudo da capacidade de difusão transdérmica desses produtos. O objetivo desse trabalho foi observar o efeito da alcalinização de uma formulação tópica composta de lidocaína a 5% sobre sua capacidade de permeação em pele. Foram testadas duas formulações (F1 e F2), sendo F1 constituída por um gel à base de Aristoflex®AVC com lidocaína a 5% e F2 composta por F1 adicionada de bicarbonato de sódio a 8,5%. Foram feitos ensaios para determinação da cinética de liberação in vitro utilizando células de difusão vertical tipo Franz (pele de orelha de porco em dimensões padronizadas (2 cm²)). O compartimento doador da célula foi preenchido com 300 mg das formulações avaliadas em condição de dose infinita, em intervalos de tempo pré-determinados. Alíquotas de 300 µL foram removidas da solução receptora e a quantidade de lidocaína foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados foram submetidos aos testes two-way ANOVA (Tukey) ou Friedman. A formulação F2 com bicarbonato promoveu melhora significativa da permeação da lidocaína, mostrando potencial para promover maior profundidade e duração da anestesia.

Palavras-chave: Alcalinização. Lidocaína. Tópica.

ABSTRACT

The first step in the development of products and techniques designed to increase the absorption of drugs and cosmetics through the skin consists of the study of transdermal diffusion capacity of these products. The objective of this project is to observe the alkalization effect of a lidocaine 5% topical formula on its skin permeation capacity. Two formulas were tested (F1 and F2), the first (F1) is constituted by a gel based on Aristoflex®AVC with lidocaine 5% and the second (F2) is composed by F1 with sodium bicarbonate 8,5%. Assays were done for determination of in vitro released kinetics using Franz-type vertical diffusion cells (pig ear skin in standardized dimensions (2 cm²)). The cell donor compartment was filled with 300 mg of the formulations evaluated in an infinite dose condition, at predetermined time intervals. The 300 µL aliquots were removed from the receptor solution and the amount of lidocaine was determined by high performance liquid chromatography. The results were submitted to two-way ANOVA (Tukey) or Friedman tests. Formula F2 with bicarbonate promoted a significant improvement in lidocaine permeation, showing potential to promote greater depth and duration of anesthesia.

Key words: Alkalization. Lidocaine. Topical anesthesia.

SUMÁRIO

9

1 INTRODUÇÃO

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANESTÉSICOS TÓPICOS

2.2 PELE E PERMEAÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.3 PREPARO DAS FORMULAÇÕES EM GEL DE ARISTOFLEX® AVC À BASE DE LIDOCAÍNA

4.4 METODOLOGIA ANALÍTICA DE QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS PARA OS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO

5 RESULTADOS

6 DISCUSSÃO

7 CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

Anexo 2 – Iniciação científica

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 e Berman, 2006). Este órgão é composto da derme e da epiderme. A derme é a porção mais densa e localizada mais internamente, mede aproximadamente 250 μm , e é uma região vascularizada onde existem as terminações nervosas livres, responsáveis pela sensação de dor (Sawyer et al., 2009). A pele humana excepcionada 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). A epiderme é a camada externa e avascular que mede em média 50 μm de espessura, revestida pelo estrato córneo (SC) que, por ser praticamente impermeável, é a principal barreira da pele e limita a absorção de drogas (Tadicherla e Berman, 2006). Mais de 90% das células do SC são corneócitos células mortas ricas em proteínas (70-80% de queratina), microscopicamente são células diferenciadas achatadas e firmemente “empacotadas” em pilhas perpendiculares à superfície da pele, unidas umas às outras através de desmossomos. A difusão de substâncias topicamente aplicadas ocorre através do espaço intercelular, sendo este o caminho com menor resistência e de maior acesso para diferentes agentes penetrantes (Cevc, 2004).

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 o anestésico local consiga 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 sua penetração.

Estudos de permeação de fármacos através de barreiras biológicas como pele e mucosa vem crescendo nos últimos anos, especialmente quando envolve novas moléculas bioativas e/ou sistemas de liberação. Durante a fase pré-clínica de avaliação da eficácia de um medicamento de uso tópico, o estudo da permeação é de extrema importância, pois permite uma previsão do comportamento desta formulação frente à barreira utilizada, e

consequentemente, pode ajudar a melhorar a farmacocinética e biodisponibilidade deste produto (Caon e Simões, 2011).

Diversos procedimentos realizados na pele tais como biópsias, pequenas cirurgias e procedimentos estéticos, podem promover dor. A anestesia local ajuda no controle da dor, auxiliando no controle da ansiedade e do estresse dos pacientes. No entanto, a injeção de anestésicos locais pode ser extremamente dolorosa, podendo piorar a ansiedade do paciente e ainda promover efeitos adversos como edema no local da aplicação, esse e outros motivos levam a necessidade do desenvolvimento de agentes anestésicos tópicos mais eficientes (Kaweski e Committee, 2008)

A mistura eutética dos anestésicos locais 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 à dose e à massa corporal do paciente, crianças pequenas podem estar mais sujeitas a esse efeito tóxico (Malamed, 2013).

No Brasil foi lançada recentemente uma formulação comercial para uso tópico de lidocaína a 4% em creme (Dermomax®), com características especiais, pois embora não seja registrado como formulação em veículo lipossomal, apresenta componentes desse tipo de formulação, o que explicaria a menor concentração em relação às formulações comuns de lidocaína tópica (todas acima de 5%) e sua efetividade em pele com aplicação de 30 minutos (Taddio et al., 1998). A solução de lidocaína 10% tem sido utilizada como anestésico tópico, produzindo anestesia tópica de forma rápida (em 10 a 15 segundos) e profunda, com duração aproximada de 15 minutos (Bennett, 1986).

Existe no mercado internacional uma formulação, chamada de ELA-Max®, que contém 4 ou 5% de lidocaína em uma matriz lipossomal. Esta é indicada, e aprovada pelo FDA, para cortes pequenos e abrasões. Na concentração de 5% é indicada para dor anorretal. Deve ser aplicada de 15 a 40 minutos na pele intacta (Kumar et al., 2015). Uma formulação tópica considerada ideal deve promover anestesia em poucos minutos, quando aplicada na

pele intacta e apresentar duração de ação prolongada (Tadicherla e Berman, 2006). Diversos estudos recentes visam atingir esses objetivos, buscando essa formulação ideal (Wang e Black, 2013; Barbosa et al., 2013).

Atualmente é crescente o interesse pelo desenvolvimento de produtos e técnicas capazes de aumentar a absorção de fármacos e cosméticos através da pele, como por exemplo, pela aplicação de ativos na forma de géis (Nnamani et al., 2013), emulsões e nanoemulsões (Ren et al., 2014; Lu et al., 2014) e vesículas lipídicas (Vázquez-González et al., 2014).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANESTÉSICOS TÓPICOS

Os anestésicos tópicos estão cada dia mais se popularizando em inúmeras áreas, como na odontologia, cirurgias estéticas e áreas médicas (Kumar et al., 2015). Esses passaram, nos últimos 150 anos, por um processo de evolução se sofisticando cada vez mais, e hoje apresentam inúmeros benefícios tanto para o profissional quanto para o paciente por provocar dessensibilização na área desejada e com isso a diminuição da sensação de dor (Tadicherla e Berman, 2006).

Na odontologia o uso de formulações anestésicas tópicas é mais difundido, utilizado antes de alguns procedimentos, como aplicação de anestesia local, para proporcionar um tratamento menos traumático para o paciente. Na mucosa oral, os anestésicos tópicos são mais facilmente absorvidos e tem mais eficácia do que na pele, que apresentam mecânica e fisiologia diferentes (Castilho, 1999).

Alguns dos benefícios apresentados pela anestesia via transdérmica são de evitar o metabolismo hepático e a possibilidade de encerrar a anestesia caso seja necessário, uma vez que por ser uma formulação tópica é só sua retirada da superfície aplicada. (Kumar et al., 2015) A eficiência de uma anestesia tópica se dá pelo tempo de latência reduzido e rápida absorção, é esperado que sua ação seja duradoura e suas implicações sejam mínimas (Tadicherla e Berman, 2006).

Porém, a principal desvantagem apresentada por esses anestésicos tópicos é o seu tempo de latência. Em razão dessa desvantagem, muitas formulações tópicas precisam ser aplicadas com um algum tempo de antecedência para que se obtenha o nível de anestesia necessária para o procedimento. O atraso no efeito da anestesia se mostra problemático porque estimula a ansiedade do paciente gerando situações desconfortáveis tanto para o paciente quanto para o profissional (Castilho, 1999; Sawyer et al., 2009).

Atualmente a mistura eutética de anestésicos locais estão disponíveis como anestésias tópicas, ELA-max, lidocaína, epinefrina, tetracaína, bupivacano, tetracaína a 4%, benzocaína, proparacaína, Betaacaina-LA, topicaína, lidoderme, adesivo S-caina TM. O tempo de reação da anestesia, sua profundidade e durabilidade são determinados pela força do ácido, nível de pH, lipossolubilidade, ligação a proteínas e efeitos vasodilatadores do anestésico local utilizado (Kumar et al., 2015). Um dos anestésicos transdérmicos mais utilizado e aceito pelos pacientes é o EMLA®, mistura eutética dos anestésicos locais

lidocaína e prilocaína (ambos a 2,5%) (Sawyer et al., 2009). A vantagem desse anestésico tópico é que ele permite uma maior e melhor absorção da droga, isto se por conta da menor temperatura de fusão dos anestésicos locais quando associados. (Castilho, 1999).

Porém, um dos problemas do EMLA® é a demora de pelo menos 60 minutos para o início de sua ação. Foi observado também que sua eficácia depende de alguns fatores como local do procedimento, espessura da pele do local de aplicação e do fluxo sanguíneo na região. Assim como seu efeito analgésico, que varia de acordo com a duração da aplicação, tempo da retirada do creme e do início do procedimento. Os limites sensoriais e de dor são significativamente aumentados de acordo com a localização da aplicação, e podem durar até 240 minutos após a remoção do creme. (Taddio et al., 1998)

A presença de prilocaína na formulação do EMLA® requer outra precaução a respeito deste anestésico, pois pode causar metemoglobinemia (MetHba). Principalmente quando se trata de crianças, uma vez que a toxicidade da droga está relacionada com a proporção de peso, área corporal e também devido a maior imaturidade do tecido cutâneo, com isso pode resultar em uma maior exposição sistêmica. (Taddio et al., 1998)

2.2 PELE E PERMEAÇÃO

A pele é uma importante barreira de proteção para o corpo, defendendo este de possíveis danos físico, químico ou biológico. Dessa forma, apresenta-se também como uma dificuldade para a permeação das formulações anestésicas tópicas. (Tadicherla e Berman, 2006). A pele se dá em camadas: a epiderme é a primeira, sendo o estrato córneo a parte mais superficial da epiderme e avascular; seguida pela derme, vascularizada e composta por terminações nervosas livres. Esses tecidos são responsáveis pela absorção e circulação da droga nos tecidos (Taddio et al., 1998). A derme, em razão de suas terminações nervosas livres e vascularização, é responsável pela sensação de dor, suprimento e nutrição do tecido, por isso é a área principal para a anestesia (Taddio et al., 1998; Tadicherla e Berman, 2006; Taveira, 2007).

A principal barreira a ser ultrapassada para que a anestesia tópica possa ser eficaz é a camada superficial da epiderme, o estrato córneo, que é fundamental no processo de penetração da droga (Tadicherla e Berman, 2006). O estrato córneo é composto por colunas de corneócitos compactados e fundidos com desmossomos, estes são células mortas preenchidas por queratina, imerso em uma matriz lipídica intracelular em bicamadas

lamelares. A dificuldade de penetração do estrato se dá por conta dessas características estruturais do tecido (Cevc, 2004; Taveira, 2007).

Algumas características do estrato córneo controlam a permeação das moléculas na pele, estas são a hidrofobicidade molecular, o tamanho e interação das moléculas e as ligações de hidrogênio. Por conta das características estruturais do tecido, como as lamelas intercelulares, nota-se uma maior resistência para a movimentação das moléculas. Em razão disso, o transporte das moléculas ocorre pelos espaços nos quais as lamelas lipídicas estão menos aderidas, ou seja, nas proximidades das bordas celulares. (Cevc, 2004). O estrato córneo é lipofílico e para uma melhor penetração da droga no tecido é necessária a solubilização da pele, além da remoção mais superficial de lipídios menos organizados. Como consequência, a mobilidade dos lipídios na pele aumenta, e com isso a propagação das moléculas da droga por entre as camadas lipídicas é facilitada. (Cevc, 2004; Tadicherla e Berman, 2006).

Segundo Kumar et al., 2015, existem três maneiras para o anestésico tópico penetrar o estrato córneo, a primeira é a via intercelular, na qual as moléculas se movimentam através dos espaços intercelulares dos queratinócitos, segunda é via transcelular, na qual a droga se move através dos corneócitos compactados, e a via de derivação, que ocorre através da abertura dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi observar o efeito da alcalinização de uma formulação tópica composta de lidocaína a 5% sobre sua capacidade de permeação em pele.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

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.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizadas a preparação das orelhas de porco e a confecção dos géis anestésicos utilizados:

a) 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 figura1.



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.

4.3 PREPARO DAS FORMULAÇÕES EM GEL DE ARISTOFLEX® AVC À BASE DE LIDOCAÍNA

O preparo do gel base de Aristoflex® AVC contendo 5% de lidocaína consiste na mistura dos ingredientes da fase1, seguida da pulverização da fase2 sob agitação moderada até obtenção de um gel cristalino (tabela 1).

Tabela 1 - Componentes utilizados no preparo dos géis de Aristoflex® AVC. (Lidocaína 5%).

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

A preparação do gel base de Aristoflex® AVC contendo 10% de lidocaína consiste na mistura dos ingredientes da fase1, seguida da pulverização da fase2 sob agitação moderada até obtenção de um gel cristalino sem Bicarbonato de Sódio (tabela 2).

Tabela 2 - Componentes utilizados no preparo dos géis de Aristoflex® AVC. (Lidocaína 10%).

	<i>Componente</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Função</i>
FASE 1	Metilparabeno	0,2%	Conservante
	Propilenoglicol	5%	Solvente e umectante
	Glicerina	3%	Agente umectante e emoliente
	Lidocaína	10%	Anestésico local
	Água deionizada	q.s.p. 100%	Solvente
FASE 2	Aristoflex® AVC	2,5%	Gelificante

A preparação do gel base de Aristoflex® AVC contendo 10% de lidocaína consiste na mistura dos ingredientes da fase1, seguida da pulverização da fase2 sob agitação moderada até obtenção de um gel cristalino com bicarbonato de sódio (tabela 3).

Tabela 3 - Componentes a serem utilizados no preparo dos géis com bicarbonato.

	<i>Componente</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Função</i>
FASE 1	Metilparabeno	0,2%	Conservante
	Propilenoglicol	5%	Solvente e umectante
	Glicerina	3%	Agente umectante e emoliente
	Água deionizada	q.s.p. 100%	Solvente
FASE 2	Aristoflex® AVC	2,5%	Gelificante
FASE 3	Bicarbonato de sódio	de 17%	Agente alcalinizador

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



Figura 2 -

Após atingirem a textura e geleificação adequada os géis foram armazenados em recipientes (tubos) de 100ml como mostra a figura 3.



Figura 3: Geleificação

4.4 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 na tabela 4 abaixo. Essas condições analíticas e a metodologia de quantificação do fármaco foram validadas previamente segundo parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Tabela 4 - Condições cromatográficas útil 1.

Amostra	Lidocaína 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

4.4.1 Ensaio e determinação da cinética de liberação in vitro

Esse experimento foi realizado utilizando células de difusão vertical 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 Heraí et al. (2007) e Taveira (2007).

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

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 serão 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 sextuplicadas. 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:

$$J = P \times C_d$$

na qual J é o fluxo de fármaco através da mucosa, P é o coeficiente de permeabilidade e C_d 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 ± desvio padrão (n = 6).

4.4.3 Análise dos 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 aos testes estatísticos apropriados. O nível de significância para todos os testes será de 5% e o software utilizado será o GraphPad Prism 7.0.

5 RESULTADOS

O experimento de permeação com as formulações através da pele de porco foi realizada na célula de difusão vertical tipo Franz, e analisado através do sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Thermo®, acoplado com Coletor automático Thermo® e interligados com o software surveyor ChromQuest 5.0. De acordo com os termos do ensaio e determinação da cinética de liberação in vitro e ensaios de permeação in vitro através da pele de orelha de porco, nota-se na tabela 5 que o time lag da formulação 2 é maior que o da formulação 1, sendo time lag o tempo que a formulação leva para começar a passar pela membrana. Da mesma forma o fluxo se apresenta maior na formulação 2 (36,07) do que na formulação 1 (19,15), e quanto menor o fluxo mais retida a droga fica no compartimento doador, ou seja, passa menos pela membrana. Com isso a permeação da formulação 2 se mostra mais eficaz, como apresentado no gráfico 1.

Tabela 5 - Formulação 1: gel sem a presença de bicarbonato.
Formulação 2: gel com a presença de bicarbonato.

	Fluxo	time lag	r ²
Formulação 1	19,15 ^b	1,96 ^b	0,995
	± 2,48	± 0,49	± 0,003
Formulação 2	36,07 ^a	3,99 ^a	0,995
	± 1,62	± 0,93	± 0,002

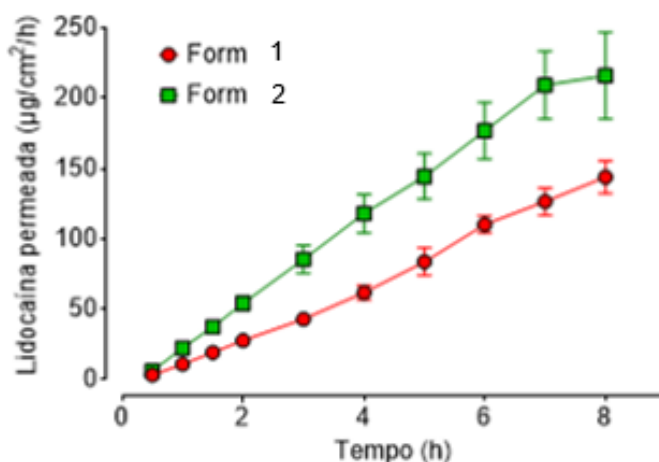


Gráfico 1: Permeação das formulações.

Legenda: símbolos diferentes p<0,01. Letras diferentes p<0,05. ANOVA Turkey

6 DISCUSSÃO

As formulações tópicas e transdérmicas são amplamente utilizadas para administrar drogas à pele e tecido subjacente. A grande maioria dos tratamentos aplicados topicamente são formulações semissólidas, incluindo cremes, pomadas e géis, que oferecem tempo de residência adequado na pele e geralmente são bem aceitos pelos pacientes. As formulações tópicas fornecem os ingredientes farmacêuticos ativos em diferentes camadas da pele, permitindo assim que várias doenças sejam prevenidas e tratadas (Zsikó et al., 2019).

A pele humana seria considerada o tecido ideal para a realização dos testes in vitro, porém eticamente é muito difícil a utilização destas para estudos transdérmicos. Por isso, o porco tem sido uma alternativa importante para estudos in vitro, por apresentarem características da pele semelhantes à de humanos, assim como a taxa de permeação de drogas tópicas. (Todo, 2017).

Métodos in vitro e ex vivo tem sido uma maneira muito utilizada e eficaz para testagem de drogas pré-clínica, uma vez que sua difusão e permeação podem ser controladas, testando também suas condições de transporte da droga. O tecido suíno apresenta vantagens tanto econômicas, tendo em vista os pequenos pedaços de tecido que são utilizados, quanto estruturais, uma vez que sua composição se assemelha muito a humana (Caon e Simões, 2011).

O método in vitro para estudo de permeação na pele está incluído na Diretriz da OECD 428 (OECD, 2004). Vantagens do método in vitro é que as medições podem ser realizadas em amostras de pele humana e animais, entre outras membranas potenciais; múltiplos testes podem ser realizados em uma amostra de pele do mesmo doador, várias as formulações podem ser testadas ao mesmo tempo; não há necessidade de marcação do material utilizado no teste e não fere as questões éticas (Zsikó et al., 2019). O método para avaliação da permeação da lidocaína em pele de porco adotado em nosso estudo é confiável e validado, segundo a literatura o uso de o uso de células de difusão de Franz pode prever in vivo absorção de outras drogas (Simon, et al., 2016).

Segundo Kottke et al., 2020, a lidocaína é um anestésico local do tipo aminoamida com valor de pKa relatado de 7,7, que é típico para aminas terciárias. Esta é um lipofílico, na qual a base pode se difundir através da membrana em sua forma não ionizada. Dessa forma, conclui-se que quanto maior o pH, maior o número de moléculas disponíveis, resultando em um coeficiente de permeabilidade mais alto. Assim como demonstrado no presente estudo, o

gel com bicarbonato de sódio possui um maior pH, uma vez que apresentou maior fluxo do que a formulação sem a presença de bicarbonato de sódio.

Os anestésicos locais são bases fracas, por isso é conduzida pelo pH do meio e pelo pKa da molécula. Como a forma não ionizada da droga é a que atravessa a membrana para chegar ao local de ação e os anestésicos locais são bases fracas, portanto se ocorre um aumento no pH, deve-se aumentar a taxa de difusão. Segundo um estudo de Meehan JG et al., 2008, a taxa de transferência de lidocaína a 1% através da mucosa oral aumentou de 0,05 mg $\pm$ 5 minutos em pH 5,9 para 0,07 mg $\pm$ 5 minutos em pH 8,6.

O fluxo e o tempo de permeação do gel de lidocaína a 5% sem a adição de bicarbonato de sódio foram semelhantes com o estudo realizado por Omar et al., 2019, in vitro, nesse mesmo estudo o gel de lidocaína preparado com dimetilsulfóxido (DMSO) como potenciador de permeação com pH de 5,3 com características ácidas pode provocar irritação na pele. Em nosso estudo o gel de lidocaína com bicarbonato mostrou ter um maior fluxo de permeabilização em comparação com o gel sem bicarbonato. Das B et al., 2013, mostra em seu estudo a permeação de dois géis com pH 5,98-6,06, no qual o grupo com pH 6,06 foi maior.

7 CONCLUSÃO

Através dos testes realizados e dos resultados obtidos pudemos observar que a presença do bicarbonato nos géis anestésicos apresentou uma melhora significativa na permeação da lidocaína, mostrando potencial para promover maior profundidade e duração da anestesia tópica.

REFERÊNCIAS*

- Barbosa RM, da Silva CMG, Bella TS, de Araújo DR, Marcato PR, Durán N, et al. 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. doi: 10.1088/1742-6596/429/1/012035.
- Bennett CR. Monheim - Anestesia local e controle da dor na prática dentária. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986.
- 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. doi: 10.1208/s12249-011-9621-2.
- Castillo, J. Topical anesthetic formulation. — US Patent. United States; 1999.
- Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004 Mar 27;56(5):675-711. doi: 10.1016/j.addr.2003.10.028.
- Heraí 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. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.08.021.
- Kaweski S. Plastic Surgery Educational Foundation Technology Assessment Committee. Topical anesthetic creams. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Jun;121(6):2161-5. doi: 10.1097/PRS.0b013e318170a7a4.
- Kottke D, Majid H, Breitzkreutz J, Burckhardt BB. Development and evaluation of mucoadhesive buccal dosage forms of lidocaine hydrochloride by ex-vivo permeation studies. *Int J Pharm*. 2020 May 15;581:119293. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119293.
- Kumar M, Chawla R, Goyal M. Topical anesthesia. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2015 Oct-Dec;31(4):450-6. doi: 10.4103/0970-9185.169049.
- 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. doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.10.013.
- Malamed SF. Buffering local anesthetics in dentistry. *Pulse*. 2011;44(1):7-9.

* 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.

Malamed SF. Handbook of local anesthesia. 6.ed. Saint Louis: Elsevier; 2013.

Malamed SF, Falkel M. Buffered local anaesthetics: the importance of pH and CO₂. SAAD Dig. 2013 Jan;29:9-17.

Malamed SF, Tavana S, Falkel M. Faster onset and more comfortable injection with alkalized 2% lidocaine with epinephrine 1:100,000. Compend Contin Educ Dent. 2013 Feb;34(Spec N. 1):10-20.

Meechan JG. Intraoral topical anesthesia. Periodontol 2000. 2008;46:56-79. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00231.x.

Nnamani PO, Kenekwukwu FC, Dibua EU, Ogbonna CC, Monemeh UL, Attama AA. Transdermal microgels of gentamicin. Eur J Pharm Biopharm. 2013 Jun;84(2):345-54. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.11.015.

Omar MM, Hasan OA, El Sisi AM. Preparation and optimization of lidocaine transferosomal gel containing permeation enhancers: a promising approach for enhancement of skin permeation. Int J Nanomedicine. 2019 Feb 26;14:1551-62. doi: 10.2147/IJN.S201356.

Ren Q, Deng C, Meng L, Chen Y, Chen L, Sha X et al. 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. doi: 10.1002/jps.23958.

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. doi: 10.1093/bja/aen364.

Simon A, Amaro MI, Healy AM, Cabral LM, de Sousa VP. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. Int J Pharm. 2016 Oct 15;512(1):234-41. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.08.052.

Taddio A, Ohlsson A, Einarson TR, Stevens B, Koren G. A systematic review of lidocaine-prilocaine cream (EMLA) in the treatment of acute pain in neonates. Pediatrics. 1998 Feb;101(2):E1. doi: 10.1542/peds.101.2.e1.

Tadicherla S, Berman B. Percutaneous dermal drug delivery for local pain control. Ther Clin Risk Manag. 2006 Mar;2(1):99-113.

Taveira SF. 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. 2007.

Todo H. Transdermal Permeation of Drugs in Various Animal Species. *Pharmaceutics*. 2017 Sep 6;9(3):33. doi: 10.3390/pharmaceutics9030033.

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. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.009.

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.

Warren VT, Fisher AG, Rivera EM, Saha PT, Turner B, Reside G, et al. Buffered 1% Lidocaine With Epinephrine Is as Effective as Non-Buffered 2% Lidocaine With Epinephrine for Mandibular Nerve Block. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017 Jul;75(7):1363-6. doi: 10.1016/j.joms.2016.12.045.

Zsikó S, Cutcher K, Kovács A, Budai-Szűcs M, Gácsi A, Baki, G et al. Nanostructured Lipid Carrier Gel for the Dermal Application of Lidocaine: Comparison of Skin Penetration Testing Methods. *Pharmaceutics*. 2019 Jul 2;11(7):310. doi: 10.3390/pharmaceutics11070310.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

tcc			
ORIGINALITY REPORT			
20%	20%	4%	%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	repositorio.unicamp.br Internet Source	14%	
2	repositorio.unesp.br Internet Source	1%	
3	www.bibliotecadigital.unicamp.br Internet Source	1%	
4	repositorio.ufu.br Internet Source	1%	
5	docplayer.com.br Internet Source	1%	
6	lume.ufrgs.br Internet Source	<1%	
7	repositorio.ufsc.br Internet Source	<1%	
8	www.science.gov Internet Source	<1%	
9	pesquisa.bvsalud.org Internet Source	<1%	

Anexo 2 – Iniciação Científica

Relatório Final

Efeito da alcalinização de uma formulação de lidocaína a 5% sobre os parâmetros de permeação na pele

Versão enviada em 11/11/2019 15:33:04

 ver relatório (.../arquivos/rel_final/AlunoCod_20892_2-RelFinal_2018.pdf)

— **Parecer do orientador emitido em 11/11/2019 15:46:37**

Desempenho do aluno no projeto: Considero pertinente a solicitação feita pelo examinador, sendo a reformulação do relatório realizada pela aluna antes do prazo determinado. Att. Prof. Sidney Figueroba Raimundo Pós doutorando FOP-UNICAMP e Prof. Permanente do Programa de Pós-Graduação.

Desempenho acadêmico do aluno: A aluna apresenta um bom desempenho acadêmico.

— **Parecer do Assessor dado em 13/11/2019 11:35:36**

Atendidas as solitações considero o relatório aprovado

● **Aprovado**