UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Renê Oliveira do Couto

**Desenvolvimento de filmes mucoadesivos para liberação de
fármacos anestésicos na cavidade bucal**

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de filmes mucoadesivos para liberação de fármacos anestésicos na cavidade bucal

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Medicamentos e cosméticos

Orientado: Renê Oliveira do Couto
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências 30/03/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2015

COUTO, R. O.	Desenvolvimento de filmes mucoadesivos para liberação de fármacos anestésico na cavidade bucal		DOUTORADO FCFRP/USP 2015
--------------	---	--	--------------------------------

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Couto, Renê Oliveira do

Desenvolvimento de filmes mucoadesivos para liberação de fármacos anestésicos na cavidade bucal. Ribeirão Preto, 2015.

92 p. : il. ; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicamentos e cosméticos.

Orientador: Freitas, Osvaldo de.

1. Anestesia tópica. 2. Cloridrato de lidocaína. 3. Cloridrato de prilocaína 4. Filmes poliméricos. 5. Iontoforese. 6. Mucoadesão. 7. Mucosa oral.

DEDICATÓRIAS

A Deus, pai bondoso, misericordioso e protetor, pela oportunidade desta vida e pela missão a mim confiada.

Aos meus amados pais, José e Melessia, que por seu trabalho, carinho e apoio incondicional, me proporcionarem a realização de mais este sonho. Mesmo distantes nesta jornada, vocês estiverem sempre presentes e foram meu “porto-seguro”. Serei eternamente grato à educação que me proporcionaram e aos valores a mim transmitidos. Vocês são os verdadeiros responsáveis pela minha vitória, e tanto quanto eu, merecedores deste título.

À Nayara e sua família. Mais do que minha namorada, fostes minha melhor amiga e companheira do princípio ao fim desta caminhada, dividindo alegrias, tristezas, conflitos, expectativas e realizações.

Aos meus irmãos Hugo e Pedro; às minhas avós Juvência e Orozita; aos meus avôs Paulino (*in memoriam*) e Eurico (*in memoriam*); aos tios Paulino, João Marciano, Antônio, Divino e Pedro; às minhas tias Elzi, Wilma, Gercília, Dorvalina e Maria; Aos meus(minhas) primos(as) João Paulo, Larissa, Renato, Ludmila, Glória, Clesiane, Cléria, Jaqueline, Kemelli, Gleyzer, Fernanda, Júnio César, Dorvany, Vera Lúcia, e suas(seus) respectivas(os) companheiras(os). Suas orações, seu carinho, incentivo e apoio, além dos maravilhosos momentos que dividimos durante toda nossa vida foram essenciais para esta conquista.

Ao Prof. Osvaldo, mestre incomparável e grande exemplo de sabedoria, ética, postura e competência profissional.

Aos amigos de Goiânia Rafael, Igor, Adriano, Marcus Vinícius, Flávio, Eric, Eva, José Realino, Donizett, Idelma, Isabel, Cristyane, Érica e Leonardo pelo incentivo, apoio e pelos momentos e sentimentos compartilhados.

Ao Prof. Edemilson e família, grande amigo e para sempre orientador, pelos ensinamentos e exemplo de dedicação e comprometimento profissional.

À Dona Angelina e aos Sr. Antônio Marques (Nenê), bem como a todos os colegas de pensionato que me acolheram e foram tão importantes no princípio de minha passagem por Ribeirão Preto.

Aos amigos e colegas do programa de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) André Baldoni, Camilo Guidoni, Fernando Armani, Joel Gonçalves, Silas Arandas, Camila Cubaychi, Carol Marroni, Diego Rojas,

Juliana Barcellos, Carla Souza, Abayomi Ogunjimi, Tiago Branquinho, Tiago Reis (e demais do Centro de Pesquisa em Assistência Farmacêutica e Farmácia Clínica- CPAFF), Kariane Nunes, Ricardo Rodrigues, Gibson, Lorena Ayres, Frederico Martins, Annylori Rosa, Rodrigo Molina e Hugo Favacho. Juntos passamos por todo tipo de situações, e cada um marcou de forma singular a realização deste sonho.

Ao Sr. Marcos e Sra. Rúbia De La Marta, Marcos Vinícius e a todos do famigerado “Bar do Marcão” pela amizade, incentivo e momentos compartilhados.

Aos porteiros e seguranças terceirizados da FCFRP, em especial Sr. Antônio, Clóvis, Sr. Sérgio, Luzia e Donizeti; Aos prestadores de serviços gerais, em especial Ana Paula, Ana Viana e Sr. Sérgio, pela competência, dedicação, amizade, incentivo e momentos compartilhados.

Aos amigos feitos em New Jersey e que tão bem me acolheram durante o período de doutorado sanduíche: Mr. Joe Fabics, Sidney Fernandes, Robert e Sven Sommerfeld.

Aos funcionários e servidores técnico-administrativos da FCFRP que se esforçam sobremaneira para que possamos realizar nosso trabalho de maneira digna e eficiente, especialmente, aos amigos(as) José Maria, Maíra, Luiz, Luciana, João Franco, Jabor, Patrícia, Áurea, Sra. Evanira, Eleni e Rafael.

Aos amigos do Setor de Conservação e Restauração José Luis (Zé Pedreiro), Jaílson, Roni, Sr. Nivaldo, Sandoval, Cláudio e Alysson pelo profissionalismo, dedicação, incentivo e momentos compartilhados.

Aos cidadãos brasileiros, sem distinções, que acreditam na educação como a mais sublime ferramenta de desenvolvimento de nossa nação e, independente da atividade que exerçam, trabalham para que a oportunidade deste imenso crescimento profissional e pessoal que é a realização de um doutorado em uma Instituição de Ensino Superior pública, gratuita e, sobretudo, de qualidade, nos seja oportunizada.

Aos demais docentes da FCFRP, em especial aos Prof. Fernando B. da Costa, Renata Lopez, Leonardo Pereira e Cristiane Gaitani pelos exemplos de profissionalismo e competência, além de toda a sabedoria compartilhada.

Aos amigos feitos e colegas de trabalho que tive durante minha passagem pela Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), bem como aos estudantes aos quais lecionei, pela acolhida e por todo o aprendizado que me proporcionaram.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e desenvolver este trabalho; pela confiança em mim depositada; pela orientação integral; pela atenção dedicada e pelo compromisso com a formação crítica, ética e racional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão das bolsas de doutorado (Processo 2012/06167-1) e doutorado sanduíche (Processo 2013/12174-3), e pelo auxílio financeiro (Processo 2012/07251-6) que possibilitaram a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (Processo 472817/2012-4).

À USP e à FCFRP pela disponibilização da estrutura, profissionais, recursos e meios para que a realização deste trabalho fosse possível.

Ao Frigorífico Olhos D'água pela disponibilização dos esôfagos e bochechas de suínos usados na execução dos experimentos.

À equipe da Seção de Atividades de Apoio, em especial ao Sr. Paulo Brunello e aos colaboradores do Setor de Veículos, Sr. Evaldo (*in memoriam*), Sr. Odilon, Sr. Mauro e Sr. Douglas por viabilizaram a aquisição de insumos necessários para a realização deste trabalho.

Aos membros da equipe científica envolvida na execução deste projeto Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez (FCFRP-USP), Profa. Dr. Cristiane Masetto de Gaitani (FCFRRP-USP), Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi (FORP-USP), Camila Cubayachi (FCFRRP-USP), Talita Aona Mazotti (FCFRRP-USP) e Paulo Calefi Linares (FORP-USP), por acreditarem na proposta, ajudarem no delineamento e execução dos experimentos, além de proporcionarem situações de desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos colegas que durante estes 4 anos fizeram ou fazem parte da equipe do Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (P, D & I) Farmacotécnico Maria Paula, Andréa, Maíra, Patrícia, Frederico, Talita, Kariane, Roberto, Hugo, Amanda e Danilo, pela saudável convivência, pelo auxílio nos experimentos e nas atividades diárias, e pelas discussões científicas possibilitadas.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Camila Cubayachi, Joel, Silas, Yomi, Beatriz, Daniela, Danielle, Estael, Karina, Laura, Lucas,

Natália, Raquel, Tatiana, com quem compartilhei espaço, conhecimentos e vivências, além de cafés, carolinas e pizzas nas madrugadas de experimentos.

Aos funcionários das Oficinas de Precisão da USP-RP, pelo auxílio com a confecção dos dispositivos iontoforéticos e prestação de outros serviços essenciais para a realização deste projeto.

Ao técnico do Laboratório de P,D&I Farmacotécnico, Sr. José Maria Puga, pela disponibilidade e auxílio com as atividades rotineiras de ensino e pesquisa do laboratório.

À técnica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Srta. Patrícia Sper Simão, pelos ensinamentos e auxílio com os experimentos de permeação passiva e iontoforética.

Ao Prof. Dr. Joachim Kohn pela orientação no doutorado sanduíche e toda a equipe do *New Jersey Center for Biomaterials (NJCBM – Rutgers, NJ, EUA)*, por possibilitarem a execução do projeto. Em especial, agradeço aos senhores Sven Sommerfeld, Koustubh Dube, Barry Caningham, Carmine Iovine e Vinod Damodaran pela acolhida, pelos ensinamentos e vivências compartilhadas e pelo auxílio com o delineamento experimental e execução das atividades de pesquisa no laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP – USP e aos funcionários do Serviço de Pós-graduação.

Aos membros das bancas do exame de qualificação e de defesa pelas valiosas correções e sugestões dadas para o desenvolvimento do projeto.

...” Um dia me disseram, que as nuvens não eram de algodão
Um dia me disseram, que os ventos às vezes erram a direção
E tudo ficou tão claro, um intervalo na escuridão
Uma estrela de brilho raro, um disparo para um coração

A vida imita o vídeo, garotos inventam um novo inglês
Vivendo num país sedento, um momento de embriaguez
Somos quem podemos ser, sonhos que podemos ter

Um dia me disseram, quem eram os donos da situação
Sem querer eles me deram, as chaves que abrem esta prisão
E tudo ficou tão claro, o que era raro ficou comum
Como um dia depois do outro, como um dia, um dia comum

A vida imita o vídeo, garotos inventam um novo inglês
Vivendo num país sedento, um momento de embriaguez
Somos quem podemos ser, sonhos que podemos ter

Um dia me disseram, que as nuvens não eram de algodão
Um dia me disseram, que os ventos às vezes erram a direção
Quem ocupa o trono tem culpa
Quem oculta o crime também
Quem duvida da vida tem culpa
Quem evita a dúvida também tem

Somos quem podemos ser, sonhos que podemos ter” ...

Somos quem podemos ser (Engenheiros do Hawaii)

RESUMO

COUTO, R. O. **Desenvolvimento de filmes mucoadesivos para liberação de fármacos anestésicos na cavidade bucal.** 2015, 92 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A anestesia local normalmente precede a maioria dos procedimentos odontológicos. Porém, por ser realizada por processo invasivo (injetável), muitas vezes afastam o paciente do consultório. Portanto, a substituição do processo invasivo por não invasivo, além de inovador traria diversas vantagens a odontologia *i.e.*, possibilitaria o aprimoramento de procedimentos rotineiros e cirúrgicos devido à provável redução de custos, submissão do paciente, facilidade de aplicação e menores riscos de contaminação e intoxicações. Neste intuito, filmes poliméricos hidrofílicos mono ou trilaminados, compostos pelo polímero mucoadesivo HPMC K100 LV, glicerol ou PEG 400 como plastificantes, e contendo os anestésicos locais cloridratos de prilocaína (PCL) e lidocaína (LCL) em diferentes proporções foram desenvolvidos. Os filmes apresentaram flexibilidade e moldabilidade adequadas, além de uniformidade de massa e teor. Tanto a massa total de fármaco nos filmes ($11 - 55 \text{ mg}/0,64\text{cm}^2$), quanto suas contribuições relativas nas misturas ($0 - 100\% \text{ m.m}^{-1}$) modularam seus perfis e cinéticas de liberação e permeação, além das quantidades retidas no epitélio esofageal suíno. Quantidades menores dos fármacos conduziram aos maiores coeficientes de permeabilidade do LCL. O filme contendo mistura dos fármacos na proporção 1:1 (PCL:LCL) apresentou a melhor relação custo/benefício e foi escolhida para a continuidade dos estudos. O aumento na massa total de fármaco nos filmes de 12,5 para 25 mg aumentou significativamente sua força e trabalho de mucoadesão, mas reduziu sua resistência à tração e módulo de elasticidade. Os filmes apresentaram propriedades mecânicas e de mucoadesão adequadas para a finalidade proposta. A adição de camadas oclusiva (composta por Eudragit® S100 e trietil citrato como plastificante) e mucoadesiva (composta por HPMC K100 LV e policarbofil na proporção $3:1 \text{ m.m}^{-1}$ e PEG 400 como plastificante) aos filmes reduziu significativamente as quantidades dos fármacos liberadas, permeadas e retidas no epitélio e, portanto, a composição e arquitetura dos *patches* trilaminados deve ser aprimorada de modo a favorecer a hidratação da camada de liberação. Pela primeira vez foi demonstrada a eficiência da técnica de iontoforese (1 mA.cm^{-2}) na promoção da permeação destes fármacos em associação a partir de filmes poliméricos. Para que possa substituir a anestesia injetável (solução a 2%, equivalente a 36 mg de fármaco), a permeação dos fármacos a partir do filme mais promissor (12,5 mg de PCL:LCL 1:1, $3\% \text{ m.m}^{-1}$ HPMC K100LV e 30% PEG400 em função da massa de polímero mucoadesivo) deve ser aumentada em pelo menos 30 vezes.

Palavras-chave: anestesia tópica, cloridrato de lidocaína, cloridrato de prilocaína, filmes poliméricos, iontoforese, mucoadesão, mucosa oral.

ABSTRACT

COUTO, R. O. **Development of mucoadhesive films for anesthetic release in the buccal cavity**. 2015, 92 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Local anesthesia typically precedes the majority of dental procedures. However, due to be performed using an invasive process (injection), often it scares the patient out from the dentist office. Accordingly, besides its innovative character, the replacement of the painful injection by a noninvasive process might bring several advantages to the dentistry field. It might enable the improvement of routinely and surgical procedures as a function of cost saving, patient compliance, ease of application and lowering the risk of contamination and intoxication. In this pursuit, we developed hydrophilic polymeric films comprised by one or three layers, comprised by the mucoadhesive polymer HPMC K100 LV, glycerol or PEG 400 as plasticizers, and containing the local anesthetic drugs prilocaine (PCL) and lidocaine (LCL) hydrochloride in different proportions. The films showed suitable flexibility and plasticity, besides uniformities of mass and content. Both the total mass of drugs in the films ($11 - 55 \text{ mg}/0.64 \text{ cm}^2$), and their relative contribution in the mixtures ($0 - 100\% \text{ w.w}^{-1}$) have modulated their profiles and kinetics of both delivery and permeation, as well as their amount retained in the porcine esophageal epithelium. Lower drug loadings lead to an increase on the permeability coefficient of LCL. The film containing the drugs blended on a 1:1 (PCL:LCL) proportion has presented the most acceptable cost/benefit ratio. Hence, it was chosen for further investigations. Increasing the total amount of drug in the film from 12.5 to 25 mg significantly raised their force and work of mucoadhesion. On the other hand, it have decreased their tensile strength and elastic modulus. The films presented suitable mechanical e mucoadhesive properties for our purposes. Adding the mucoadhesive (comprised by HPMC K100 LV and polycarbophil at $3:1 \text{ w.w}^{-1}$ and PEG400 as plasticizer) and occlusive (Eudragit® S100 and triethyl citrate as plasticizer) layers on the delivery layer has significantly decreased the amount of drug released, permeated and retained on the epithelium from the films. Thereby, both composition and architecture of the patches must be refined in order to improve the hydration of the delivery layer. For the first time it was presented the efficiency of iontophoresis (1 mA.cm^{-2}) on the permeation enhancement of these drug in association from polymeric films. To reach the replacement of infiltrative anesthesia (2% solution, equivalent to 36 mg of drug), the amount of drug permeated from the most promising film (12.5 mg of PCL:LCL 1:1, $3\% \text{ w.w}^{-1}$ HPMC K100LV and 30% PEG400 as a function of the mass of mucoadhesive polymer) must be improved in at least 30 folds.

Keywords: lidocaine hydrochloride, iontophoresis, oral mucosa, mucoadhesion, polymeric films, prilocaine hydrochloride, topical anesthesia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos cloridratos de prilocaína (a) e lidocaína (b)	6
Figura 2 – Procedimentos realizados para dessecação das mucosas esofageais suínas	11
Figura 3 – Etapas do desenvolvimento dos filmes mucoadesivos com efeito anestésico	13
Figura 4 – Célula de difusão vertical usada nos experimentos de permeação	17
Figura 5 – Ensaio <i>in vitro</i> de mucoadesão	20
Figura 6 – Aparato usado nos ensaios <i>in vitro</i> de tempo de permanência	21
Figura 7 – Ensaio de determinação das propriedades mecânicas	21
Figura 8 – Representação gráfica dos <i>patches</i> mucoadesivos	23
Figura 9 – Procedimentos realizados no preparo dos eletrodos negativos (cátodos) para a execução dos ensaios de permeação <i>in vitro</i> associados a iontoforese	24
Figura 10 – Representação esquemática dos dispositivos iontoforéticos desenvolvidos a partir dos <i>patches</i> trilaminados (corte transversal)	24
Figura 11 – Célula de difusão vertical usada nos experimentos de permeação associada à iontoforese	25
Figura 12 – Filme mucoadesivo com efeito anestésico (F4)	29
Figura 13 – Perfis de liberação do PCL (a) e LCL (b) a partir de filmes contendo combinações dos fármacos nas proporções PCL:LCL de 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4)	31
Figura 14 – Perfis de permeação passiva do PCL (a) e LCL (b) a partir de filmes contendo combinações dos fármacos nas proporções PCL:LCL de 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4)	35
Figura 15 – Perfis de liberação do PCL (a) e LCL (b) a partir dos filmes contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo	43
Figura 16 – Perfis de permeação passiva de PCL (a) e LCL (b) a partir dos filmes contendo 12,5 ou 25 mg de PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo	45
Figura 17 – <i>Patches</i> trilaminados preparados a partir do filme F5	55
Figura 18 – Perfis de liberação do PCL (a) e LCL (b) a partir do filme F5 e dos <i>patches</i> trilaminados	56
Figura 19 – Perfis de permeação passiva do PCL (a) e LCL (b) a partir do filme F5 e dos <i>patches</i> trilaminados	57

Figura 20 – Perspectiva dos filmes mucoadesivos a serem desenvolvidos. (a) corte transversal; (b) corte longitudinal	59
Figura 21 – Força (a) e trabalho de mucoadesão (b) de: (●) filme F5, (■) camada mucoadesiva e (▲) <i>patches</i> trilaminados	60
Figura 22 – Dispositivos iontoforéticos preparados a partir dos <i>patches</i> trilaminados	62
Figura 23 – Perfis de permeação iontoforética e passiva do PCL (a) e LCL (b) a partir dos <i>patches</i> trilaminados	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos hidrogéis que deram origem aos filmes poliméricos mucoadesivos contendo LCL combinado em diferentes proporções com PCL ou isolado	13
Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} usado no desenvolvimento dos filmes mucoadesivos	19
Tabela 3 – Composição dos hidrogéis que deram origem aos filmes poliméricos mucoadesivos de acordo com o planejamento fatorial 2^{3-1}	19
Tabela 4 – Massas, espessuras e teores dos fármacos nos filmes poliméricos mucoadesivos contendo diferentes proporções entre PCL e LCL	29
Tabela 5 – Coeficientes de determinação (R^2) e F calculado (F_{calc}) médios das curvas de regressão linear obtidas na avaliação das cinéticas de liberação dos fármacos a partir de filmes contendo combinações dos fármacos nas proporções PCL:LCL de 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4)	32
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos relacionados a permeação passiva do PCL e LCL a partir de filmes contendo combinações dos fármacos nas proporções PCL:LCL de 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4)	36
Tabela 7 – Propriedades físico-químicas do PCL e LCL	38
Tabela 8 – Quantidades do PCL e LCL retidos no epitélio após 60 min de permeação passiva a partir de filmes contendo combinações dos fármacos nas proporções PCL:LCL de 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4)	40
Tabela 9 – Massas, espessuras e teores dos fármacos nos filmes poliméricos mucoadesivos contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção 1:1 e PEG400 ou Glicerol como plastificantes nas proporções de 15 ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo	42
Tabela 10 – Coeficientes de determinação (R^2) e F calculado (F_{calc}) médios das curvas de regressão linear obtidas na avaliação das cinéticas de liberação dos fármacos a partir dos filmes contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo	44
Tabela 11 – Parâmetros cinéticos e quantidades de fármaco retidas no epitélio relacionados a permeação passiva do PCL e LCL a partir dos filmes contendo 12,5 ou	46

25 mg do PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo

Tabela 12 – Efeitos dos fatores (valores de p) avaliados segundo o planejamento fatorial 2^{3-1} nos parâmetros cinéticos de permeação dos fármacos e em suas quantidades retidas no epitélio em estudos in vitro de permeação passiva 47

Tabela 13 – Mucoadesão, tempo de permanência e propriedades mecânicas de filmes mucoadesivos contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo 50

Tabela 14 – Efeitos dos fatores (valores de p) avaliados segundo o planejamento fatorial 2^{3-1} na mucoadesão, tempo de permanência e propriedades mecânicas de filmes mucoadesivos contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo 52

Tabela 15 – Matriz de correlação entre a quantidade dos fármacos anestésicos e parâmetros de desempenho dos filmes mucoadesivos 54

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos e quantidades de fármaco retidas no epitélio relacionados a permeação passiva do PCL e LCL a partir do filme F5 e dos patches trilaminados 58

Tabela 17 – Parâmetros cinéticos e quantidades de fármaco retidas no epitélio relacionados a permeação passiva e iontoforética do PCL e LCL a partir dos patches trilaminados 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
EMLA	<i>Eutectic Mixture of Local Anesthetics</i>
Esp.	Espessura dos filmes
FDA	<i>USA Food and Drug Administration</i>
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
LCL	cloridrato de lidocaína
LogD	Logaritmo do Coeficiente de Distribuição
LogP	Logaritmo do Coeficiente de Partição
PEG	polietilenoglicol
PCL	cloridrato de prilocaína
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação acídica
SIF	Serviço de Inspeção Federal
UV-vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 METAS	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 MATERIAL	8
3.1.1 Adjuvantes, padrões analíticos, reagentes e solventes	8
3.1.2 Equipamentos e Acessórios	9
3.1.3 Saliva artificial	10
3.1.4 Mucosa esofageal e bucal suína	10
3.2 MÉTODOS	11
3.2.1 Quantificação simultânea dos fármacos livre, nos filmes e em tecido biológico	11
3.2.2 Desenvolvimento de filmes mucoadesivos com propriedades anestésicas	12
3.2.2.1 Avaliação do efeito da proporção entre os fármacos	13
<i>3.2.2.1.1 Aspecto visual</i>	14
<i>3.2.2.1.2 Uniformidades de massa</i>	14
<i>3.2.2.1.3 Espessura</i>	14
<i>3.2.2.1.4 Teores dos fármacos</i>	14
<i>3.2.2.1.5 Avaliação in vitro dos perfis de liberação</i>	14
<i>3.2.2.1.6 Estudos in vitro de permeação passiva</i>	16
<i>3.2.2.1.6.1 Seleção dos epitélios</i>	16
<i>3.2.2.1.6.2 Ensaio de permeação</i>	18
3.2.2.2 Avaliação dos efeitos da quantidade dos fármacos, tipo e quantidade de plastificante	18
<i>3.2.2.2.1 Avaliação in vitro da mucoadesão</i>	19

3.2.2.2.2 <i>Avaliação in vitro do tempo de permanência</i>	20
3.2.2.2.3 <i>Propriedades mecânicas</i>	21
3.2.2.3 Avaliação do efeito das camadas mucoadesiva e isolante	22
3.2.2.4 Avaliação da viabilidade de aplicação da iontoforese nos filmes	23
3.2.2.4.1 <i>Eletrodos e confecção dos dispositivos iontoforéticos</i>	23
3.2.2.4.2 <i>Estudos in vitro de permeação associada a iontoforese</i>	25
3.2.3 Análise estatística	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES MUCOADESIVOS COM PROPRIEDADES ANESTÉSICAS	26
4.1.1 Avaliação dos efeitos da proporção entre os fármacos	28
4.1.1.1 Aspecto visual	28
4.1.1.2 Uniformidade de massa, espessura e teor dos fármacos	29
4.1.1.3 Perfis de liberação	30
4.1.1.4 Estudos <i>in vitro</i> de permeação passiva	33
4.1.2 Avaliação dos efeitos da quantidade dos fármacos, tipo e quantidade de plastificante	40
4.1.2.1 Aspecto visual	42
4.1.2.2 Uniformidade de massa, espessura e teor dos fármacos	42
4.1.2.3 Perfis de liberação	43
4.1.2.4 Estudos <i>in vitro</i> de permeação passiva	44
4.1.2.5 Mucoadesão, tempo de permanência e propriedades mecânicas	50
4.1.3 Efeitos das camadas mucoadesiva e isolante	55
4.1.3.1 Perfis de liberação	56
4.1.3.2 Estudos <i>in vitro</i> de permeação passiva	57
4.1.3.3 Mucoadesão e tempo de permanência	59
4.1.4 Viabilidade da aplicação da iontoforese	60
5 CONCLUSÕES	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

O manejo da dor local é, indiscutivelmente, o aspecto mais crítico relativo ao cuidado do paciente na prática clínica odontológica. No decorrer do último século, o êxito no desenvolvimento de fármacos injetáveis eficazes e seguros e o aprimoramento de técnicas de anestesia local são, provavelmente, as conquistas mais significativas no campo da odontologia (OGLE; MAHJOUBI, 2011). Além de possibilitarem a realização e aperfeiçoamento de procedimentos rotineiros e cirúrgicos, estes avanços foram o alicerce para a ampliação do acesso ao tratamento dental a milhares de pacientes em todo o mundo (MOORE; HERSH, 2010).

Paradoxalmente, a injeção de anestésicos locais é considerada a maior fonte de ansiedade e fobia dos pacientes que se submetem a procedimentos odontológicos (KUDO, 2005; CLARK; YAGIELA, 2010; SOKOLOWSKI; GIOVANNITTI JR; BOYNES, 2010), culminando na redução da frequência de suas visitas ao consultório (HEATON, 2003; MCGRATH; BEDI, 2004; SMITH; SOKOLOWSKI; GIOVANNITTI JR; BOYNES, 2010; HILL *et al.*, 2013) e, conseqüentemente, comprometendo suas saúde bucal e qualidade de vida.

A avaliação da correlação destes fatores configura uma tarefa difícil, especialmente em função de seu caráter subjetivo (EITNER *et al.*, 2006; AGDAL *et al.*, 2008; POHJOLA *et al.*, 2009; ARMFIELD, 2011). Apesar de demonstrarem resultados expressivos da ocorrência de algum tipo de ansiedade e fobia dos pacientes relativas à execução de tratamentos dentais (odontofobia), os poucos trabalhos existentes na literatura se limitam a populações pequenas e a regiões específicas (GATCHEL *et al.*, 1983; DIONNE *et al.*, 1998; MCGRATH; BEDI, 2004; ARMFIELD, 2011; HILL *et al.*, 2013), não existindo, portanto, estudos epidemiológicos recentes de abrangência global.

A incapacidade de se obter o controle adequado da dor, bem como a possibilidade de ocorrência de contaminações e intoxicações devido a acidentes ocupacionais durante o exercício profissional permanecem como preocupações significativas para os odontólogos. As razões pelas quais o uso de injeções causa dor são o pH da solução anestésica e, principalmente, a força da punção da agulha na mucosa bucal e a pressão com que a solução adentra a área a ser anestesiada (KUDO, 2005; OGLE; MAHJOUBI, 2011). Assim, a técnica anestésica usada pelo profissional exerce papel fundamental neste cenário.

Em função destes inconvenientes, recentemente tecnologias inovadoras têm sido desenvolvidas no intuito de auxiliar o odontólogo no alívio da dor causada por injeções e minimizar seus efeitos adversos *e.g.*:

- dispositivos vibratórios (VibraJect® - Miltex Inc, York, PA, EUA; DentalVibe® - BING Innovations LLC, Crystal Lake, IL, EUA; Accupal® - Accupal, Hot Springs, AR, EUA e CompuDent® - Milstone Scientific Inc, Livingston, NJ, EUA);
- sistemas de liberação lenta (The Wand® - Milestone Scientific, Livingston, NJ, EUA; Morpheus® – Morpheus Dental, Miami, FL, EUA);
- injetores a jato (Syrijet Mark II® - Keystone Industries, Cherry Hill, NJ, EUA; Med-Jet® - Medical International Technologies, Montreal, QC, Canadá);
- seringas odontológicas de segurança (Ultra Safety Plus XL® syringe - Septodont, Lancaster, PA, EUA; UltraSafe® syringe - Safety Syringes Inc, Carlsbad, CA, EUA; HypoSafety® syringe - Dentsply MPL Technologies, Susquehanna, PA, EUA; SafetyWand® - Milstone Scientific Inc, Livingston, NJ, EUA e RevVac™ Safety Syringe - Revolutions Medical, Charleston, SC, EUA);
- dispositivos para injeção intraóssea (Stabident - Fairfax Dental Inc, Miami, FL, EUA; X-Tip - Dentsply International Inc, Tulsa, OK, EUA e IntraFlow - Pro-Dex Medical Devices, Irvine, CA, EUA).

Existem na literatura revisões recentes acerca do racional do uso, *design* e das evidências de eficácia clínica destes dispositivos e técnicas usados para a administração de fármacos anestésicos na cavidade bucal (CLARK; YAGIELA, 2010; OGLE; MAHJOUBI, 2011; SAXENA; GUPTA; NEWASKAR, 2013). Entretanto, provavelmente em função de seus elevados custos, estes dispositivos ainda não se popularizaram nos consultórios e assim, os odontólogos têm buscado alternativas menos onerosas para minimizar o desconforto dos pacientes.

Neste cenário, figuram a administração de soluções injetáveis tamponadas (MALAMED; FALKEL, 2012), o emprego de procedimentos severos como a sedação (nos níveis mínimo, moderado e profundo) e indução de anestesia geral (HIGGINS, 2006; ADA, 2007), bem como práticas menos traumáticas como o uso de formulações anestésicas de efeito local administradas de forma não-invasiva, a exemplo dos géis XYLOCAÍNA® (cloridrato de lidocaína 2% - Astrazeneca, Londres, Inglaterra), BENZOTOP® (benzocaína 20% - Nova DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), ORAJEL™ (benzocaína 20% - Laleham Healthcare, Aulton, Inglaterra) (STECKER; SWIFT, 2002; WU; JULLIARD, 2002; AL-MELH; ANDERSSON,

2007; STOLTENBERG *et al.*, 2007), TOPEX[®] (benzocaína 20% - Sultan Healthcare Inc., Englewood, NJ, EUA) (KREIDER *et al.*, 2001) e ORAQIX[®] (lidocaína 2,5% / prilocaína 2,5% - Dentsply Pharmaceutical, York, PA, EUA) (AL-MELH; ANDERSSON, 2007; OGLE; MAHJOUBI, 2011), da pomada XYLOCAÍNA[®] (cloridrato de lidocaína 5% - Astrazeneca, Londres, Inglaterra), do creme EMLA[®] (lidocaína 2,5% / prilocaína 2,5% - AstraZeneca, King's Langley, Hertfordshire, Inglaterra) (VICKERS *et al.*, 1997; MCMILLAN; WALSHAW; MEECHAN, 2000; MEECHAN, 2001; AL-MELH; ANDERSSON, 2007; CHUNG *et al.*, 2011) e do *patch* Dentipatch[™] (Noven Pharmaceuticals, Inc., Miami, FL, EUA) (HERSH *et al.*, 1996; CARR; HORTON, 2001; KREIDER *et al.*, 2001; LEOPOLD *et al.*, 2002; STECKER; SWIFT, 2002; WU; JULLIARD, 2002; BÅGESUND; TABRIZI, 2008).

Desde sua aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) em 1996, o dispositivo Dentipatch[™] é considerado o “estado da arte” no âmbito da anestesia tópica na cavidade bucal (MANTELLE *et al.*, 2005). Trata-se de sistema filmógeno composto por polímero hidrofílico mucoadesivo (goma adragante), lidocaína (46,1 mg por *patch* de 2 cm²), lecitina, propilenoglicol, dipropilenoglicol, glicerol, aspartame e flavorizante.

Este dispositivo é arquitetado de maneira que uma das faces esteja protegida com revestimento hidrofóbico, enquanto a não revestida, quando em contato com a mucosa, capta água, hidrata, intumescce, adere e disponibiliza o fármaco. O contato íntimo com a mucosa, devido a suas propriedades mucoadesivas, possibilita maior retenção do fármaco no local de aplicação, penetração e duração do efeito, reduzindo ou eliminando a possibilidade de diluição do produto pela saliva como acontece com as outras formulações supracitadas.

A rigor, todas estas formulações são utilizadas com propósito pré-anestésico *i.e.*, visam minimizar o desconforto do paciente que será posteriormente submetido à administração do anestésico local injetável ou para realização de procedimentos específicos e menos invasivos. Contudo, cada uma destas apresenta limitações:

i) formulações semissólidas, além de apresentarem estabilidade limitada, dificultam o controle da quantidade de fármaco administrado sobre a mucosa, podendo aumentar o risco de efeitos colaterais e intoxicações;

ii) os géis e o creme disponíveis apresentam mucoadesão insatisfatória, o que dificulta sua permanência no sítio de aplicação desejado ou possibilitam a lixiviação dos fármacos pela saliva, resultando na diminuição ou total ineficácia da anestesia (FRANZ-MONTAN *et al.*, 2012);

iii) a despeito da maior duração do tempo de efeito anestésico quando comparado aos géis e o creme disponíveis no mercado, até o presente não há relatos da eficácia do Dentipatch® em substituição a anestesia infiltrativa ou de bloqueio nervoso (MANTELLE *et al.*, 2005).

Isto posto, tanto o desenvolvimento de formulações a serem administradas topicamente de maneira não invasiva que possibilitem o controle metódico da dor em procedimentos superficiais, quanto daquelas que propiciem efeitos anestésicos mais perspicazes trariam ganhos consideráveis para a odontologia, sobretudo em virtude da redução de custos, maior submissão dos pacientes, facilidade de aplicação e redução dos riscos de contaminações e intoxicações.

Para atender estas expectativas, as formulações devem ser delineadas de modo a combinar várias estratégias farmacotécnicas *e.g.*, i) disponibilizar o(s) fármaco(s) rapidamente, tal qual os sistemas de dissolução instantânea (*fast-dissolve*); ii) manter o(s) fármaco(s) em contato íntimo com a mucosa em área restrita, como possibilitado pelos sistemas mucoadesivos; iii) vetorizar a liberação visando à permeação do(s) fármaco(s) através da mucosa, como os transdérmicos e iv) induzir o plano anestésico e mantê-lo por tempo adequado (aproximadamente 1 hora).

Ademais, idealmente devem atender a diversos outros quesitos como: v) facilidades de administração e remoção ao término do procedimento; vi) conforto ao paciente em função de sua dimensão, aspecto e propriedades organolépticas; vii) hipoalergenicidade; viii) atoxicidade; ix) não causar irritações; x) apresentar estabilidade físico-química e microbiológica adequadas; xi) custo acessível, etc.

Por estes motivos, mesmo com todo o avanço científico e tecnológico alcançado no decorrer das últimas décadas, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos de administração não invasiva que possibilitem a substituição da anestesia local injetável constitui um enorme desafio para os cientistas da formulação tanto no âmbito acadêmico quanto industrial.

Reflexo disto, a literatura científica pertinente a este propósito é deveras incipiente. A maioria dos estudos visa prolongar o efeito anestésico e minimizar o risco de efeitos tóxicos sistêmicos durante o tratamento da dor aguda e crônica especialmente em estados pós-cirúrgicos.

Nestes casos, a principal estratégia é a incorporação do fármaco em lipossomas (FRANZ-MONTAN *et al.*, 2007, 2010a, 2010b, 2012, 2013; ZAGO *et al.*, 2011);, partículas poliméricas de escala micro ou nanométrica, veiculadas na forma injetável (JUG *et al.*, 2010;

MORAES *et al.*, 2009a, 2009b) e géis poliméricos (PIGNATELLO; BASILE; PUGLISI, 2009; KANG; SHIN, 2010, 2012).

Deste modo, o conhecimento gerado com o desenvolvimento destes sistemas pouco agrega para o aprimoramento de formulações tópicas de liberação imediata para aplicação não-invasiva na mucosa oral em substituição às dolorosas injeções.

Em estudos de pré-formulação, a seleção do(s) fármaco(s) anestésico(s) apropriado(s) é o primeiro passo no desenvolvimento de formulações para a anestesia bucal. Para tanto, o formulador deve se atentar a fatores como tempo de início (*onset*) e duração da anestesia, toxicidade e potência relativa. Idealmente, portanto, esses compostos devem apresentar: i) ação não irritante; ii) pequena ou nenhuma alergenicidade; iii) rápido *onset*; iv) duração adequada de ação, a qual deve ser reversível; v) mínima ou nenhuma toxicidade, vi) seletividade às rotas nociceptivas e vii) sabor agradável (MEECHAN, 2000).

Tipicamente, os anestésicos locais são divididos em 3 classes: amidas, ésteres (derivados do ácido benzoico ou para-amino benzóico) e quinolias (representado exclusivamente pela centibucridina). Dentre estas, os representantes da classe das amidas satisfazem esses critérios e são os mais utilizados há mais de 20 anos. Quando comparadas aos ésteres, as amidas apresentam menores valores de pKa e, em pH fisiológico, as maiores contribuições de suas frações não-ionizada lhes proporcionam menor *onset* (CARVALHO, 1994; MALAMED, 2013).

Tal qual, em sua maioria as amidas apresentam maior ligação proteica e, conseqüentemente, maior tempo de duração do efeito anestésico. Ainda, as amidas apresentam maior estabilidade frente as enzimas tissulares, o que também contribui para a analgesia. Por outro lado, as amidas apresentar maior efeito vasodilatador, o que pode reduzir o efeito anestésico (BECKER; REED, 2006; CARVALHO, 1994; LAGAN; MCLURE, 2005; MALAMED, 2013; MOORE; HERSH, 2010).

Prilocaina e lidocaína (Figura 1) são aminoamidas que possuem rápido *onset* (2-5 min) e média duração do efeito anestésico, sendo na atualidade os fármacos mais utilizados para anestesia local infiltrativa em procedimentos odontológicos de rotina e intervenções cirúrgicas (LAGAN; MCLURE, 2005). Neste caso, seus respectivos cloridratos são veiculados em solução injetáveis adicionadas ou não de agentes vasoconstrictores *e.g.*, norepinefrina, octopressina, etc. (BECKER; REED, 2006; MOORE; HERSH, 2010)

Figura 1: Estruturas químicas dos cloridratos de prilocaína (a) e lidocaína (b).

A combinação entre prilocaína e lidocaína tem sido uma estratégia empregada com sucesso na obtenção de formulações anestésicas tópicas, haja visto que existem dois produtos aprovados pelo FDA disponíveis no comércio, o creme EMLA[®] e o gel polimérico ORAQIX[®], ambos contendo os fármacos (forma base) na concentração de 2,5% (5% de fármacos anestésicos no total) (VICKERS *et al.*, 1997; AL-MELH; ANDERSSON, 2007).

O racional desta combinação está diretamente ligado as propriedades físico-químicas e farmacológicas dos fármacos. A lidocaína apresenta maior lipossolubilidade e por isso, tem maior potência, ao passo que a prilocaína, por apresentar maior valor de pKa, possui menor *onset*. Entretanto, a prilocaína possui a metade do efeito vasorrelaxante da lidocaína (0,5 e 1, respectivamente), o que pode prolongar o efeito anestésico (CARVALHO, 1994; MALAMED, 2013).

Em função do sucesso do dispositivo Dentipatch[®], o desenvolvimento de filmes poliméricos mucoadesivos carregados de anestésicos visando a liberação tópica bucal tem atraído o interesse de diversos pesquisadores em todo o mundo (KOHDA *et al.*, 1997; TAWARE *et al.*, 1997; YAMAMURA *et al.*, 1997; OKAMOTO *et al.*, 2002; REPKA *et al.*, 2005; ABU-HUWAIJ; ASSAF, 2007; ABU-HUWAIJ *et al.*, 2007; VARSHOSAZ; KARIMZADEH, 2007; ARAUJO *et al.*, 2010; CAVALLARI; FINI; OSPITALI, 2013; PREIS *et al.*, 2014).

Na maioria dos trabalhos, o fármaco modelo é o cloridrato de lidocaína e, apesar de ter grande potencial, a estratégia da combinação com o cloridrato de prilocaína nunca foi investigada. Além disto, nenhuma destas composições se mostrou ainda capaz de alcançar

níveis de liberação e permeação de fármaco suficientes para proporcionar efeito anestésico mais profundo e, portanto, que possibilitassem a substituição da anestesia injetável.

Estas constatações nos levam a crer que, além do contato íntimo com a mucosa e da liberação unidirecional e rápida do(s) fármaco(s), é necessária maior mobilidade deste para atingir as fibras nervosas mais profundas.

Vários métodos, incluindo o uso de promotores químicos de permeação (*e.g.*, tensoativos, sais biliares, ácidos graxos, óleos essenciais, álcoois, Azona[®], quitosana e seus derivados, etc.) pró-fármacos e métodos físicos (*e.g.*, iontoforese, eletroporação e sonoforese) podem ser empregados para superar a barreira imposta pelo epitélio da mucosa bucal para a permeação de fármacos e macromoléculas (SOHI *et al.*, 2010).

A iontoforese é uma técnica não-invasiva de promoção da permeação, fundamentada no transporte ativo de fármacos (carregados ou não) ou íons de interesse terapêutico através de membranas biológicas (*e.g.*, mucosas ou pele) por meio da aplicação de corrente elétrica direta de baixa intensidade.

Este fenômeno eletroforético ocorre quando o tecido é conectado a um circuito elétrico (formado por uma fonte de energia ou bateria, eletrodos de cargas opostas e solução/dispersão eletrolítica) que, quando acionado, gera um gradiente de corrente elétrica que induz o movimento dos íons em direções opostas as cargas dos eletrodos *i.e.*, os cátions presentes na solução/dispersão em contato com o ânodo (eletrodo positivo) se movem em direção ao cátodo (eletrodo negativo), ao passo que os ânions presentes no cátodo movem-se na direção oposta (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008; CIACH; MOSCICKA-STUDZINSKA, 2011).

Além de sua ampla aplicação como promotora da permeação transdérmica de fármacos e macromoléculas (KALIA *et al.*, 2004; GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008; KASHA; BANGA, 2008; PRAUSNITZ; LANGER, 2008), a várias décadas a iontoforese vem sendo utilizada no âmbito da odontologia, em especial nos tratamentos de hipersensibilidade da dentina, úlcera aftosas e herpes labial (SACHDEVA; GUPTA; GUPTA, 2011).

Ademais, esta técnica vem se mostrando uma alternativa interessante também no aumento da permeação de substâncias terapeuticamente ativas através da mucosa bucal, pois além de apresentar menor resistência quando comparada a derme, permanece umidificada e se regenera rapidamente (MOSCICKA-STUDZINSKA; KIJENSKA; CIACH, 2009; CIACH; MOSCICKA-STUDZINSKA, 2011).

Diversas publicações têm demonstrado o sucesso do uso da iontoforese para aumentar a permeação de lidocaína e outros fármacos através da mucosa bucal (MOPPETT;

SZYPULA; YEOMAN, 2004; GIANNOLA *et al.*, 2007; THAKUR; MICHNIAK; MEIDAN, 2007; MOSCICKA-STUDZINSKA; KIJEŃSKA; CIACH, 2009; CAMPISI *et al.*, 2010; CIACH; MOSCICKA-STUDZINSKA, 2011; HU *et al.*, 2011a, 2011b; OH *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2012). Nestes casos, as avaliações foram realizadas utilizando hidrogéis poliméricos mucoadesivos ou soluções aquosas contendo o fármaco, de modo que nunca antes foi investigada a possibilidade de sua aplicação em filmes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento racional de filmes mucoadesivos para veiculação dos cloridratos de prilocaína (PCL) e lidocaína (LCL) na cavidade bucal visando à minimização do desconforto de pacientes submetidos a punção da agulha em procedimentos odontológicos.

2.2 METAS

- ✓ Preparar filmes mucoadesivos contendo os fármacos anestésicos isolados e combinados;
- ✓ Caracterizações física e físico-química dos filmes;
- ✓ Avaliar os efeitos da quantidade e proporção entre os fármacos nos seus perfis de liberação e permeação a partir dos filmes;
- ✓ Avaliar o efeito de camadas de adesão e isolante (oclusiva) nos perfis de liberação e permeação dos fármacos a partir dos filmes;
- ✓ Avaliar as propriedades mecânicas, tempo de permanência e mucoadesão dos filmes;
- ✓ Avaliar a viabilidade de aplicação da iontoforese como promotora da permeação dos fármacos a partir dos filmes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Adjuvantes, padrões analíticos, reagentes e solventes

- acetonitrila (grau cromatográfico), cloreto de amônia, fosfato de sódio dibásico anidro, fosfato de sódio monobásico anidro e metanol (grau cromatográfico) - J.T.Baker® Co., Phillipsburg, NJ, EUA;
- ácido clorídrico 32%, cloreto de prata, dietilamina (99,5%), fio de prata (99%), padrões analíticos dos cloridratos de lidocaína monohidratada (100% - lote: 069K0002V) e

prilocaína (100% - lote: 0001417729) - Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Alemanha;

- água ultrapura obtida por purificador Milli-Q - Millipore®, Bedford, MA, EUA;
- citrato de trietila - Neon Reagentes Analíticos, São Paulo, SP, Brasil;
- cloreto de sódio, fosfato de potássio monobásico anidro, hidróxido de sódio e nitrato de magnésio hexahidratado - Labsynth®, Diadema, SP, Brasil;
- cloridratos de lidocaína (99% - lote: LHB/31*025125/11-27574) e prilocaína (99%-lote: 010429*023758/11-24268) - Henrifarma®, Cambuci, SP, Brasil;
- Eudragit® S100 - Evonik Industries AG, Essen, Alemanha;
- glicerol (85%) e PEG 400 - Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha;
- hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) K100 Premium LV - Colorcon®, Cotia, SP, Brasil;
- Noveon® AA-1 – Policarbofil - The Lubrizol Corporation, Wickliffe, Ohio, EUA);

3.1.2 Equipamentos e Acessórios

- agitador mecânico RW 20 digital - IKA® do Brasil, Campinas, SP, Brasil;
- balança analítica AdventurTM - Ohaus®, Barueri, SP, Brasil;
- balança semi-analítica - Shimadzu®, São Paulo, SP, Brasil;
- banho-Maria 314/4 - Nova Ética Ltda, Cotia, SP, Brasil;
- banho termostatizado Ecoline 003 - E100 - Lauda, Königshofen, Alemanha;
- bomba à vácuo Te-152 - Tecnal Ltda, Piracicaba, SP, Brasil;
- bomba peristáltica Pharmacia LKB pump p-1 - GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia;
- câmara climática TE4003; homogeneizador de tecidos Turrattec TE-102 - Tecnal Ltda, Piracicaba, SP, Brasil;
- células de difusão vertical - Unividros, Ribeirão Preto, SP, Brasil;
- descolador gengival Freer Quinelato QX 54618 - Surya Dental, Maringá, PR, Brasil;
- eletrodos de Ag/AgCl - In Vivo Metric, Healdsburg, CA, EUA;
- fita dupla face - 3M Brasil, Sumaré, SP, Brasil;
- fonte de energia APH 500DM - KEPCO Inc., Flushing, NY, EUA;
- gerador de sinal 33210A - Agilent Technologies, Barueri, SP, Brasil;
- lavadora ultrassônica USC 4800 - Unique group, Indaiatuba, SP, Brasil;
- membrana de éster de celulose MWC 12 – 14 KDa - Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA;
- membrana G8 em éster de celulose 0,22 µm x 47 mm; membrana de PVDF 45µm x 13

mm; filtro 0,45 µm Millex[®]; micropipetas automáticas de volume ajustável 10 – 200 µL, 100 – 1000 µL e 1000 – 5000 µL - Millipore[®], Bedford, MA, EUA;

- micrômetro digital - Starrett[®], Athol, MA, EUA;
- multímetro digital ET 2053 - Minipa, São Paulo, SP, Brasil;
- potenciômetro digital - Digimed[®], Santo Amaro, SP, Brasil;
- vazador de aço inoxidável (9 e 12 mm Ø) - Bonther Equipamentos de Ensino e Pesquisa, Ribeirão Preto, SP, Brasil;
- ultracentrífuga Heraeus Megafuge 16R; agitador magnético multipontos Variomag - ThermoScientific, Suwanee, GA, EUA;

3.1.3 Saliva artificial

Composta por 2,38 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,19 g.L⁻¹ de KH₂HPO₄ e 8 g.L⁻¹ de NaCl (MASHRU *et al.*, 2005). O pH foi ajustado para 7,0 usando soluções de HCl 0,1M e NaOH 0,1M.

3.1.4 Mucosas esofageal e bucal suína

Foram obtidas, respectivamente, de esôfagos e bochechas de suínos coletados imediatamente após o abate dos animais em frigorífico (Frigorífico Olhos D'água, Ipuã, SP, Brasil) fiscalizado pelo SIF. Estes materiais foram mantidos a aproximadamente 4°C enquanto transportados para o laboratório, onde após cuidadosa inspeção a olho nu, qualquer mucosa que apresentasse rupturas foi descartada, e as intactas apropriadamente dissecadas.

No caso dos esôfagos, procedeu-se conforme proposto por Del Consuelo *et al.* (2005a). Como apresentado na Figura 2, o interior dos esôfagos foi lavado em água corrente para a retirada de possíveis resquícios de alimentos (1). Porções de 2 a 3 cm de suas extremidades foram descartadas (2) e o tecido muscular foi separado com auxílio de bisturi. Os esôfagos foram seccionados longitudinalmente (3) e deixados em banho Maria a 60 - 65°C por 3 min para facilitar o descolamento do epitélio (4), o qual foi separado do tecido conjuntivo cuidadosamente com auxílio de descolador gengival (5). Após remoção, os epitélios eram acondicionados a temperatura ambiente (25 ± 2°C) em placas de acrílico preenchidas com saliva artificial (6) até o momento da seleção para a realização dos ensaios *in vitro* de permeação.

Figura 2: Procedimentos realizados para dessecção das mucosas esofageais suínas. (1) lavagem; (2) remoção das extremidades; (3) secção longitudinal; (4) tratamento térmico; (5) remoção do epitélio; (6) acondicionamento.

As bochechas foram lavadas com água destilada e tiveram a mucosa e o tecido conjuntivo separados do tecido muscular com o auxílio de bisturi, preservando a membrana basal.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Quantificação simultânea dos fármacos livre, nos filmes e em tecido biológico

Utilizou-se método analítico desenvolvido e validado por Cubayachi (2014). As análises foram realizadas usando um Cromatógrafo Líquido modelo UFLC Prominence (Shimadzu®, Kyoto, Japão) equipado de uma bomba binária (LC – 20AD), degaseificador (DGU –20A3

Prominience), auto-amostrador (SIL – 20AHT Prominience) e detector de arranjo de diodos (SPD – M20A Prominience).

A fase móvel foi composta por mistura de acetonitrila : tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (1:1 v/v) e 0,05% (v/v) de dietilamina. O volume de injeção foi de 20µL. As separações cromatográficas foram conduzidas em fluxo isocrático de 1,0 mL.min⁻¹ em coluna de fase reversa Gemini RP-C18 (250 mm x 4.6 mm, 3µm, 110Å - Phenomenex®, Torrance, CA, EUA) inserida em um compartimento com temperatura regulada a 30°C por termostato (CTO–20A Prominience). O tempo total de eluição foi fixado em 20 min e detecção a 203 nm. A aquisição e análise dos dados foram feitas empregando um Módulo Controlador (CBM – 20A Prominience) acoplado a um computador com *software* Shimadzu® LC Solution.

Este método apresentou seletividade, sensibilidade (Limites de detecção de 0,15 e 0,04 µg.mL⁻¹ para PCL e LCL, respectivamente; Limite de quantificação de 0,25 µg.mL⁻¹ para ambos os fármacos), linearidade (0,25 a 10 µg.mL⁻¹ para ambos os fármacos), precisão (desvio padrão relativo < 5% para ambos os fármacos), exatidão (erro relativo < 2% para ambos os fármacos) e robustez adequados.

3.2.2 Desenvolvimento de filmes mucoadesivos com propriedades anestésicas

Filmes poliméricos mucoadesivos com diferentes composições foram preparados por evaporação do solvente. Os filmes foram compostos por polímero mucoadesivo (HPMC K100 Premium LV), plastificante (glicerol ou PEG400) e diferentes quantidades e proporções entre os fármacos. Para tornar essa narrativa mais didática e facilitar sua compreensão, a Figura 3 apresenta um resumo das etapas envolvidas no desenvolvimento dos filmes.

Figura 3: Etapas do desenvolvimento dos filmes mucoadesivos com efeito anestésico.

3.2.2.1 Avaliação do efeito da proporção entre os fármacos

A composição dos hidrogéis que originaram os filmes avaliados está apresentada na Tabela 1. Em todos os casos, a massa final do gel foi de 50 g.

Componentes	Filmes			
	F1 ^a	F2 ^b	F3 ^c	F4 ^d
PCL (% m.m ⁻¹)	5	5	5	-
LCL (% m.m ⁻¹)	5	10	20	5
HPMC K100 LV (% m.m ⁻¹)	3	3	3	3
Glicerol* (% m.m ⁻¹)	0,18	0,18	0,18	0,18
Tampão fosfato 0,1M (pH 7,0)	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%

Tabela 1: Composição dos hidrogéis que deram origem aos filmes poliméricos mucoadesivos contendo LCL combinado em diferentes proporções com PCL ou isolado. *correspondente a 6 % (m.m⁻¹) da quantidade de polímero mucoadesivos; PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; Equivalente a aproximadamente ^a22, ^b33, ^c55 e ^d11 mg dos fármacos em amostras de 0,64 cm².

O plastificante foi homogeneizado em tampão fosfato 0,1M (pH7,0). Nesta solução foram dissolvidos os fármacos, e em seguida disperso o polímero, sendo o conjunto mantido em agitação branda em agitador mecânico a 300 rpm por 12 h. Após repouso por 1 h a

temperatura ambiente para a retirada de bolhas, as dispersões (50 g) foram espalhadas em placas de policarbonato com área total de 144 cm².

As placas foram colocadas em câmara climática mantida a temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $50 \pm 2\%$ por 24 horas para secagem das dispersões. Após avaliação da espessura, os filmes livres foram cortados em fragmentos circulares de 9 mm de diâmetro (0,64 cm²) com o auxílio de vazador de aço inoxidável, e mantidos, até o momento do uso, em dessecador a 25°C, e umidade relativa de $53 \pm 2\%$ obtida com solução saturada de nitrato de magnésio hexahidratado. Assim, foram preparados filmes contendo PCL em combinação com LCL nas proporções 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4).

3.2.2.1.1 *Aspecto visual*

Foram selecionados filmes homogêneos, flexíveis, com cor uniforme e que não apresentassem partículas insolúveis, sinais de bolhas e quebras ou áreas frágeis.

3.2.2.1.2 *Uniformidades de massa*

Amostras de 0,64 cm² de dez locais diferentes dos filmes foram pesadas separadamente, sendo determinadas as médias e o desvio padrão das massas obtidas.

3.2.2.1.3 *Espessura*

Foram feitas 10 medições aleatórias em diferentes partes dos filmes utilizando um micrômetro digital, sendo os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Estas medidas foram obtidas após a permanência dos filmes em ambiente de temperatura e umidade controladas (25°C e 50% de umidade relativa) por 48 horas.

3.2.2.1.4 *Teores dos fármacos*

Triplícatas de amostras de 0,64 cm² dos filmes foram colocadas em balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com tampão fosfato 0,1M (pH 7,0). O conjunto foi mantido em banho de ultrassom por 90 min. Após diluição apropriada, os fármacos foram quantificados usando o método analítico descrito no item 3.2.1. Os teores foram expressos como mg do fármaco por g de filme (mg.g⁻¹).

3.2.2.1.5 *Avaliação in vitro dos perfis de liberação*

Foi realizada usando células de difusão vertical tipo “Franz” MicroettePlus™ (Hanson Research, Chatsworth, CA, EUA) contendo área de permeação de 1,77 cm² e volume interno

de 7 mL, acopladas a sistema coletor de frações MultiFill™ (Hanson Research, Chatsworth, CA, EUA) equipado com banho termostatizado MocroettePlus™, e controlado pelo *software* Easy-Icon™ (Hanson Research, Chatsworth, CA, EUA). Como solução aceptora, foi utilizada saliva artificial mantida em agitação (300 rpm) a 37°C. Entre os compartimentos doador e o receptor foi inserido membrana de éster de celulose previamente hidratada.

Nos compartimentos doadores das células foram adicionados 50 µL de saliva artificial e, sobre estes, foram colocados cortes circulares dos filmes (área de 0,64 cm²). Alíquotas de 1,0 mL do líquido receptor foram coletadas em tempos predeterminados (*i.e.*, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min), e o volume equivalente repostado. Os fármacos foram quantificados usando o método analítico descrito no item 3.2.1. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. As quantidades cumulativas de fármaco dissolvidos foram calculadas segundo a **equação 1**:

$$Q_{real,t} = (C_{m,t} * V_r) + \left(\sum_{n=1} C_a * V_a \right) \quad (1)$$

Nesta,

$Q_{real,t}$ = quantidade real liberada acumulada no tempo t

$C_{m,t}$ = concentração determinada da amostra no tempo t

V_r = volume do receptor

V_a = volume de amostra coletada

C_a = concentração de amostra coletada

As cinéticas de liberação dos fármacos foram avaliadas a partir de seus perfis de dissolução aplicando diferentes tratamentos matemáticos a fim de se determinar o modelo de regressão linear mais bem ajustado *i.e.*, maior coeficiente de determinação (R^2) para a correlação entre os percentuais acumulativos liberados e o tempo de experimento. Em casos de modelos com mesmo valor de R^2 , consideramos como critério de seleção o maior valor de F calculado (F_{calc}) para o modelo de regressão linear.

No modelo de ordem zero, a dissolução ocorre a velocidade constante, independente da concentração do fármaco (**equação 2**):

$$\frac{mt}{m^\infty} = K_0 * t + b \quad (2)$$

mt/m^∞ corresponde a quantidade de fármaco liberado no meio de dissolução no instante “t”; t representa o tempo transcorrido até a amostragem considerada; b é a quantidade inicial de fármaco no meio de dissolução; e K_0 é a constante de velocidade de ordem zero (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

O modelo de Higuchi ou de pseudo primeira-ordem (**equação 3**) correlaciona a

quantidade de fármaco liberado em função da raiz quadrada do tempo transcorrido:

$$\frac{mt}{m\infty} = KH * t^{1/2} + b \quad (3)$$

$t^{1/2}$ representa a raiz quadrada do tempo transcorrido até a amostragem considerada; e KH é a constante de liberação de Higuchi (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

O modelo de primeira ordem correlaciona o logaritmo da quantidade de fármaco retido no filme em função do tempo (**equação 4**):

$$\log\left(1 - \frac{mt}{m\infty}\right) = K1 * t + b \quad (4)$$

$1 - mt/m\infty$ corresponde a quantidade de fármaco não dissolvida no instante “ t ” e $K1$ é a constante de liberação de primeira ordem (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Considerando os filmes desenvolvidos como sistemas matriciais hidrofílicos de liberação de fármacos e objetivando propor o possível mecanismo de liberação, utilizamos outro modelo matemático baseado na equação semi-empírica proposta por Korsmeyer e Peppas (1981) e Korsmeyer *et al.* (1983). Esta equação é utilizada para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER; PEPPAS, 1987).

Neste modelo, a relação entre a velocidade de liberação e o tempo é descrita pela seguinte **equação 5**:

$$\frac{mt}{m\infty} = K * t^n \quad (5)$$

K é uma constante cinética, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo e n é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco.

3.2.2.1.6 Estudos *in vitro* de permeação passiva

3.2.2.1.6.1 Seleção dos epitélios

Fragmentos dos epitélios (sessão 3.1.4) foram colocados entre os compartimentos doador e receptor das células de difusão vertical (Figura 4) com área de permeação de 0,64 cm² e utilizadas nos experimentos de permeação *in vitro* (Figura 2).

Figura 4: Célula de difusão vertical usada nos experimentos de permeação; **A**, compartimento doador; **B**, epitélio esofageal suíno. **C**, compartimento receptor; **D**, agitador magnético; **E**, barra magnética; **F**, porta para amostragem e **G**, presilha de vedação.

Após preenchimento de ambos os compartimentos com saliva artificial (pH 7,0), a viabilidade dos epitélios foi verificada por meio da medida da resistência à passagem de corrente elétrica com o auxílio de eletrodos de Ag/AgCl, assim como é recomendado nos protocolos de ensaios de permeação transdérmica (POLAT *et al.*, 2011; WHITE; ORAZEM; BUNGE, 2012).

Os eletrodos foram colocados separadamente nos compartimentos doador e receptor, ligados a um gerador de sinal e a um multímetro digital, respectivamente. Após a aplicação de corrente alternada de 100 mV (RMS) de potência e 10 Hz de frequência, a intensidade da corrente elétrica gerada era medida. As resistências dos epitélios (r) foram calculadas segundo a Lei de Ohm pela **equação 6**:

$$r \left(K\Omega.cm^{-2} \right) = \frac{\left(\frac{P}{I} \right)}{A} \quad (6)$$

P corresponde a potência da corrente alternada (100 mV), I representa a intensidade de corrente medida (μA) e A é a área do epitélio em contato com o meio receptor ($0,64 \text{ cm}^2$).

Com base em resultados preliminares de nosso grupo de pesquisa (CUBAYACHI, 2014), foram considerados adequados valores de $r \geq 3,0 \text{ K}\Omega.cm^{-2}$. Os experimentos de permeação foram realizados em no máximo 24 horas após o abate dos animais.

3.2.2.1.6.2 Ensaios de permeação

Após período de equilíbrio de 1 h, o conteúdo do compartimento doador das células montadas com os epitélios foi cuidadosamente retirado. Cinquenta microlitros (50 μL) de saliva artificial foram adicionados ao epitélio e então os filmes foram colocados nas no compartimento doador das células, sendo o meio de receptor mantido em agitação (300 rpm) a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) em agitador magnético multipontos. Coletas de 1,0 mL foram feitas nos tempos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min, sendo os mesmos volumes repostos com a solução receptora. As amostras foram analisadas por CLAE-DAD (item **3.2.1**), sendo as quantidades cumulativas de fármaco permeado foram calculadas segundo a **equação 1**.

Os perfis de permeação do PCL e LCL foram analisados graficamente por meio da correlação entre a quantidade permeada de fármaco (Q , $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) em função do tempo (min.). Usando o método dos mínimos quadrados foram construídos modelos de regressão linear simples que possibilitaram os cálculos do fluxo médio de permeação através do epitélio (J , $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$), representado pelo coeficiente angular do modelo, e o tempo de latência (*lag time*, Lt , min.), obtido pela razão entre o coeficiente linear do modelo e J . Os coeficientes de permeabilidade (Kp , $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$) foram determinados pela razão entre J e a quantidade dos fármacos nos filmes.

Ao final dos experimentos de permeação, as quantidades dos fármacos retidas no epitélio foram determinadas conforme proposto por Cubayachi (2014). Os epitélios foram removidos das células de difusão e lavadas com água destilada até a remoção de todo o filme. Em seguida, os epitélios foram colocados em tubos Falcon, adicionadas de 5 mL de fase móvel e trituradas usando homogeneizador de tecidos. Após extração dos fármacos em banho de ultrassom por 30 min, as suspensões foram centrifugadas a $10000 \times g$ por 10 min. Os sobrenadantes foram filtrados e analisados por CLAE-DAD (sessão **3.2.1**) para determinação das quantidades de fármaco retidas (Q_{epit} , $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Durante os estudos de padronização desta técnica, os percentuais de recuperação de PCL e LCL variaram de $95 \pm 2,8$ a $105 \pm 3,6$ e de $97 \pm 4,5$ a $103 \pm 0,3$, respectivamente.

3.2.2.2 Avaliação dos efeitos da quantidade dos fármacos, tipo e quantidade de plastificante

Foi empregado um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{3-1} (AGUIAR; DE GAITANI; BORGES, 2011). Como apresentado na Tabela 2, os fatores avaliados foram: i) quantidade dos fármacos na proporção de 1:1 incorporados nos filmes (Q_F , 12,5 e 25 mg), ii) tipo de plastificante (P , PEG400 e glicerol) e iii) quantidade de plastificante incorporado no filme em função da massa de polímero (Q_P , 15 e 30 %).

Filmes	Q_F (mg)	P (-)	Q_P (% m.m ⁻¹)
F5	12,5 (-1)	PEG400 (-1)	30 (+1)
F7	25 (+1)	PEG400 (-1)	15 (-1)
F8	25 (+1)	Glicerol (+1)	30 (+1)
F6	12,5 (-1)	Glicerol (+1)	15 (-1)

Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} usado no desenvolvimento dos filmes mucoadesivos. Q_F , quantidade da mistura dos fármacos na proporção de 1:1 incorporados nos filmes; P , tipo de plastificante; Q_P , quantidade de plastificante incorporado no filme em função da massa de polímero; -1, nível codificado inferior; +1, nível codificado superior.

A Tabela 3 apresentada a composição dos hidrogéis que originaram os filmes avaliados, com base no planejamento fatorial 2^{3-1} .

Componentes	Filmes			
	F5 ^a	F6 ^a	F7 ^b	F8 ^b
PCL (% m.m ⁻¹)	2,8	2,8	5,6	5,6
LCL (% m.m ⁻¹)	2,8	2,8	5,6	5,6
HPMC K100 LV (% m.m ⁻¹)	3	3	3	3
PEG400 (% m.m ⁻¹)*	0,9	-	0,45	-
Glicerol (% m.m ⁻¹)*	-	0,45	-	0,9
Tampão fosfato 0,1M (pH 7,0)	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%	q.s.p. 100%

Tabela 3: Composição dos hidrogéis que deram origem aos filmes poliméricos mucoadesivos de acordo com o planejamento fatorial 2^{3-1} . PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; *correspondente a 15 ou 30 % (m.m⁻¹) da quantidade de polímero mucoadesivos; Equivalente a ^a12,5 e ^b25 mg das misturas dos fármacos em amostras de 0,64 cm².

O preparo dos hidrogéis e a produção dos filmes seguiram os procedimentos descritos no item 3.2.2.1. Os filmes foram avaliados quanto ao aspecto visual, uniformidade de massa, espessura, teores dos fármacos e perfis *in vitro* de liberação e permeação passiva de acordo com os respectivos protocolos experimentais descritos anteriormente.

3.2.2.2.1 Avaliação *in vitro* da mucoadesão

Epitélios com espessura de 500 a 600 μ m preparadas conforme descrito no item 3.1.4 foram colocadas no acessório inferior de um analisador de textura TA XT *plus* (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). O filme foi aderido ao corpo de prova com fita dupla face, sendo este conjunto fixado ao acessório superior (Figura 5). A superfície da mucosa foi umedecida com 50 μ L de saliva artificial por 5 min.

Figura 5: Ensaio *in vitro* de mucoadesão. **A**, corpo de prova; **B**, fita dupla-face aderida ao topo do corpo de prova; **C**, Filme mucoadesivo aderido a fita dupla-face; **D**, mucosa de bochecha suína; **E**, Acessório superior do analisador de textura; **F**, suporte para mucosa.

Em seguida, o acessório superior do equipamento foi movimentado para baixo até tocar a superfície da mucosa, mantendo compressão de 0,5 N por 5 min (CUBAYACHI, 2014). Após este período, o acessório foi movimentado para cima (módulo de tensão) a velocidade constante de $0,1 \text{ mm.s}^{-1}$ até que o corpo de prova se destacasse da mucosa. A força necessária para destacar o filme da mucosa ou força de adesão (F_A , N), e o trabalho de mucoadesão referente à área sob a curva de força vs. distância (T_A , N x mm), foram determinadas por meio do *software* Exponent® (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) em quintuplicata.

3.2.2.2.2 Avaliação *in vitro* do tempo de permanência

Foi empregado aparato estruturado como proposto por Rao e Bury (1989), com modificações. Esôfagos suínos obtidos como descrito no item 3.1.4 foram lavados com água corrente, cortados longitudinalmente e fixados em uma base de PVC inclinada na posição vertical (90°) e presa a um suporte universal (Figura 6). A superfície da mucosa foi umedecida com saliva artificial fornecida por uma bomba peristáltica com fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ por 5 min. Em seguida, amostras dos diferentes filmes foram aderidos a mucosa e submetidas a fluxo de saliva artificial de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). O desprendimento da mucosa ou a total desintegração da amostra foi verificado visualmente, sendo o tempo necessário para isto determinado com o auxílio de um cronômetro digital. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

Figura 6: Aparato usado nos ensaios *in vitro* de tempo de permanência. **A**, suporte universal; **B**, bomba peristáltica; **C**, reservatório doador de saliva artificial; **D**, linha de alimentação de saliva artificial; **E**, base de PVC; **F**, mucosa esofageal suína; **G**, dispositivo para medida de deslocamento; **H**, reservatório coletor de saliva artificial; **I**, filme mucoadesivo.

3.2.2.2.3 *Propriedades mecânicas*

Foram avaliadas usando um analisador de textura TA XT *plus* em módulo de tração, de acordo com a norma técnica ASTM D882- método 02 (ASTM, 2002). Amostras com 6 mm de largura e 80 mm de comprimento foram obtidas com o auxílio de molde de policarbonato e lâmina de aço inoxidável, sendo suas espessuras registradas em sextuplicata antes das análises. As extremidades das amostras (1 cm) foram revestidas com fita adesiva para evitar que o aprisionamento pelas garras de tração do equipamento ocasionasse o surgimento de pontos de ruptura. As amostras foram orientadas verticalmente, sendo suas extremidades posicionadas e fixadas exatamente no centro das garras (Figura 7).

Figura 7: Ensaio de determinação das propriedades mecânicas.

Foi utilizada célula de carga de 50 Kg, sendo a velocidade de teste de 1 mm.seg⁻¹ e a porcentagem de alongamento máximo de 190%. As análises foram realizadas a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) em quintuplicata. Com base nas curvas de tensão x deformação obtidas, a resistência à tração (RT, MPa) foi calculada dividindo-se a força de ruptura (FR, N) pela área da seção transversal do filme (largura x espessura inicial). O alongamento percentual na ruptura (E, %) foi determinado pela divisão dos valores da extensão diferencial de ruptura pela separação inicial das garras (60 mm) e multiplicado por 100. O Módulo de Elasticidade ou Módulo de Young (ME, MPa) foi calculado pela divisão de RT por E (MORALES; MCCONVILLE, 2011).

3.2.2.3 Avaliação do efeito das camadas mucoadesiva e isolante

Foram preparados *patches* compostos por três camadas diferentes (trilaminados) *i.e.*, i) camada de liberação (contendo os fármacos), ii) camada de adesão (composta por mistura de polímeros mucoadesivos) e iii) camada isolante ou oclusiva (composta por polímero não adesivo e impermeável a água).

A camada de liberação foi semelhante ao filme F5 (item 3.2.2.2). Para a confecção da camada adesiva, dispersões aquosas contendo 1,5% (m.m⁻¹) da mistura de HPMC K100 LV e Policarbofil na proporção de 3:1 (m.m⁻¹) e PEG400 a 15% da massa total de polímero foram preparadas por agitação branda (300 rpm por 12 horas).

No caso da camada isolante, inicialmente, Eudragit® S100 (6,5% m.m⁻¹) foi disperso em agitação (500 rpm por 1h) em água destilada (quantidade equivalente a 33% da massa final da dispersão). Em seguida, a esta dispersão foi adicionada solução de amônia 1N (4,5% m.m⁻¹), mantendo-se a agitação por mais 2h. Depois deste período, citrato de trietila (6,0% m.m⁻¹) e etanol (q.s.p. 100% da massa final da dispersão) foram adicionados e o sistema foi mantido em agitação por mais 30 min.

Após repouso por 1 hora a temperatura ambiente para a retirada de bolhas, as dispersões foram espalhadas em placas de policarbonato com área total de 144 cm² em quantidade suficiente para que, após secagem nas condições descritas no item 3.2.2.1, fossem obtidos filmes com massas equivalentes a 7 e 9 mg.cm⁻², respectivamente, para as camadas adesiva e isolante.

Tanto para a camada adesiva, quanto para a camada isolante, após avaliação da espessura, os filmes retirados das placas foram cortados em fragmentos circulares de 12 mm de diâmetro (1,13 cm²) com o auxílio de um vazador de aço inoxidável, e mantidos, até o momento do uso, em dessecador a 25°C, e umidade relativa de $53 \pm 2\%$.

Como representado na Figura 8, os *patches* foram arquitetados de modo que a camada de liberação foi recoberta pela camada adesiva e, sobre essas duas, foi adicionada a camada isolante.

Figura 8: Representação gráfica dos *patches* mucoadesivos. (a) corte transversal; (b) corte longitudinal.

Para a avaliação dos *patches* foram realizados estudos *in vitro* de liberação e permeação passiva dos fármacos, mucoadesão e tempo de permanência de acordo com os respectivos protocolos experimentais descritos anteriormente. No caso dos ensaios de mucoadesão, foram avaliados tanto o dispositivo trilaminado, quanto o dispositivo sem a camada de liberação.

3.2.2.4 Avaliação da viabilidade de aplicação da iontoforese nos filmes

3.2.2.4.1 Eletrodos e confecção dos dispositivos iontoforéticos

No preparo dos eletrodos negativos (cátodos), uma das extremidades de fragmentos de um fio de prata metálica (3,5 cm) foram dobradas em forma de alças semiabertas com o auxílio de alicate de bico redondo e longo. Como apresentado na Figura 9, cloreto de prata (AgCl), em quantidade suficiente para imersão das alças dos fios de prata, foi fundido em cadinho de porcelana com auxílio de bico de Bunsen adaptado (a). Após imersões e resfriamentos lentos consecutivos (b), as alças dos fios de prata foram recobertas com cloreto de prata solidificado (c) (CUBAYACHI, 2014).

Figura 9: Procedimentos realizados no preparo dos eletrodos negativos (cátodos) para a execução dos ensaios de permeação *in vitro* associados a iontoforese. **(a)** fusão de AgCl; **(b)** imersão de fio de prata no AgCl fundido e resfriamento lento; **(c)** solidificação do AgCl.

Os eletrodos positivos (ânodos) foram fios de prata (Ag^0) nos quais uma porção era modelada na forma de discos em espiral com aproximadamente 7 mm de diâmetro. Na arquitetura dos dispositivos iontoforéticos (Figura 10), estes eletrodos foram colocados entre as camadas de adesão e liberação de *patches* trilaminados obtido conforme descrito na sessão 3.2.2.3.

Figura 10: Representação esquemática dos dispositivos iontoforéticos desenvolvidos a partir dos *patches* trilaminados (corte transversal).

3.2.2.4.2 Estudos *in vitro* de permeação associada a iontoforese

Foram realizados de modo similar ao descrito para os estudos *in vitro* de permeação passiva (sessão 3.2.2.1.6), com adaptações. Após seleção dos epitélios com base em sua resistência a passagem de corrente elétrica, 50 μL de saliva artificial foram adicionados a estas e então, nos compartimentos doadores das células de difusão vertical, foram inseridos os *patches* trilaminados contendo os eletrodos positivos (fio de Ag°) em contato direto com a camada de liberação.

Por sua vez, os eletrodos negativos (AgCl) foram inseridos no compartimento inferior em contato com a solução receptora (saliva artificial pH 7,0) para formar o circuito montado em série com o auxílio de cabos de bateria (Figura 11).

Figura 11: Célula de difusão vertical usada nos experimentos de permeação associada à iontoforese: **A**, compartimento doador; **B**, epitélio esofageal suíno; **C**, compartimento receptor; **D**, barra magnética; **E**, porta para amostragem; **F**, dispositivo iontoforético contendo o eletrodo positivo (ânodo); **G**, eletrodo negativo (cátodo); **H**, agitador magnético.

Corrente elétrica constante de $1 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$, gerada por uma fonte de energia foi aplicada por um período de 60 min. Durante este período, os meios receptores das células de difusão foram mantidos em agitação (300 rpm) a 25°C usando agitador magnético multipontos. Coletas de 1,0 mL foram feitas nos tempos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min., sendo os mesmos volumes repostos com a solução receptora. As amostras foram analisadas por CLAE-DAD (sessão 3.2.1), sendo as quantidades cumulativas de fármaco permeado calculadas segundo a **equação 1**.

A partir dos perfis de permeação do PCL e LCL, foram calculados os parâmetros cinéticos de permeação (fluxos de permeação, tempos de latência e coeficientes de permeação), além das quantidades dos fármacos retidos no epitélio ao final dos experimentos.

Ainda, o fator de promoção da permeação (FP) foi calculada a partir da **equação 7**:

$$FP (-) = J_{iontofore} / J_{passivo} \quad (7)$$

3.2.3 Análise estatística

Os dados de duas populações foram comparados empregando Teste-t de Student, enquanto que para três ou mais populações, empregou-se Análise de Variância (ANOVA) segundo um critério, seguida do teste Tukey, utilizando o *software* GraphPad InStat 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). As análises de regressão e correlação linear foram realizadas usando o *software* Minitab 16 (Minitab Inc., PA, EUA). No caso dos planejamentos fatoriais, os dados experimentais foram analisados por ANOVA e regressão linear, empregando o módulo *General Regression* do *software* Statistica 12 (Statsoft Inc., OK, EUA), sendo considerados apenas efeitos de primeira ordem. Em todas as análises, foram considerados significativos valores de p menores ou iguais a 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES MUCOADESIVOS COM PROPRIEDADES ANESTÉSICAS

A região bucal é uma via atrativa para a administração de fármacos de efeito local ou sistêmico, uma vez que a mucosa bucal é moderadamente permeável e altamente vascularizada e, portanto, pode atuar como um excelente sítio de absorção de compostos de interesse terapêutico. Além disto, por ser de fácil acesso, a cavidade bucal é bastante conveniente para a autoadministração de formas farmacêuticas pelos pacientes, de modo que estas podem ser removidas sempre que houver a necessidade da interrupção do tratamento (BRUSCHI; FREITAS, 2005; ROSSI; SANDRI; CARAMELLA, 2005; PATHER; RATHBONE; SENEL, 2008; PATEL; LIU; BROWN, 2011).

No decorrer das últimas décadas, sistemas mucoadesivos vem sendo vastamente utilizados como plataformas na liberação de fármacos na cavidade bucal, em função de sua capacidade de aumentar o tempo de permanência dos princípios ativos em sítios específico de absorção, o que implica no favorecimento de sua biodisponibilidade. Vários tipos de sistemas de liberação mucoadesivos de administração bucal vem sendo desenvolvidos *e.g.*, comprimidos, géis e filmes (BRUSCHI; FREITAS, 2005; PATHER; RATHBONE; SENEL, 2008; PATEL; LIU; BROWN, 2011).

Dentre estes, os filmes poliméricos vêm se destacando em relação aos demais, principalmente devido sua maior conveniência de administração, flexibilidade e conforto (MORALES; MCCONVILLE, 2011; NAIR *et al.*, 2013). Além do mais, a gama de possibilidades em sua composição e arquitetura confere a este tipo de forma farmacêutica uma versatilidade singular na modulação da velocidade e extensão de liberação e permeação de fármacos para o atendimento a necessidades específicas.

Após a seleção do(s) fármaco(s), a escolha de polímero que combine propriedades mucoadesivas e de controle da velocidade e extensão de liberação adequadas é imprescindível para o desenvolvimento racional de filmes mucoadesivos. No desenvolvimento desta proposta, HPMC K100 Premium LV foi escolhida como polímero suporte na obtenção da camada de liberação dos filmes. Trata-se de um polímero semissintético derivado da celulose, biocompatível, não iônico, de baixa viscosidade (80 - 120 cP, solução a 2% em água, 20°C) que apresenta alta velocidade e extensão de hidratação.

Apesar de apresentar menor mucoadesão quando comparados a polímeros aniônicos (*e.g.* carbopol, policarbofil e carboximetilcelulose sódica) e catiônicos (*e.g.* quitosana e polimetilacrilatos) (WONG; YUEN; PEH, 1999; KHUTORYANSKIY, 2011), no desenvolvimento de formulações que visam à liberação imediata de fármacos, os polímeros não iônicos podem ser mais interessantes pelo fato de impossibilitarem interações de carga entre os fármacos e a matriz polimérica.

Para esta finalidade, polímeros de baixa viscosidade podem ser vantajosos frente aos demais, pois, além de apresentarem uma maior velocidade de hidratação, quando hidratados podem dar origem a hidrogéis menos viscosos (devido a maior interação polímero-água e menor interação polímero-polímero), facilitando a difusão do fármaco através da matriz.

Como plastificante, inicialmente optou-se pelo uso do glicerol. No desenvolvimento de filmes poliméricos, os plastificantes são empregados para melhorar as propriedades mecânicas dessas formulações em virtude do aumento da separação entre as moléculas dos polímeros e do abaixamento das temperaturas de transição vítrea destes (SNEJDROVA; DITTRICH, 2012).

Também, dependendo de suas propriedades físico-químicas (em especial massa molecular e higroscopicidade) e da finalidade pretendida para o filme, este tipo de adjuvante pode desempenhar papel determinante no controle da velocidade e extensão de liberação de fármacos (SNEJDROVA; DITTRICH, 2012; CAVALLARI; FINI; OSPITALI, 2013).

O glicerol é um poli álcool hidrossolúvel, biocompatível, de baixa massa molecular (92,09 g/mol) e alto ponto de ebulição (290°C) (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009) que,

devido sua elevada higroscopicidade, pode atuar como promotor da captação de água pela matriz polimérica e, além disto, por facilitar a distensão das cadeias poliméricas, deve favorecer a liberação do fármaco a partir do filme.

A princípio, este adjuvante foi usado na proporção de 6% (m.m^{-1}) em função da massa de polímero mucoadesivo. Proporções menores ocasionaram a obtenção de filmes quebradiços, ao passo que em proporções maiores os filmes apresentavam aspecto “oleoso” e forte adesão às placas de acrílico, dificultando a remoção.

O tampão fosfato pH 7 foi selecionado como solvente na obtenção dos hidrogéis, uma vez que um estudo anteriormente realizado em nosso laboratório (CUBAYACHI, 2014) evidenciou maior permeação dos fármacos a partir de géis de HPMC neste pH, em função do aumento da fração não ionizada dos fármacos.

4.1.1 Avaliação dos efeitos da proporção entre os fármacos

Selecionados os constituintes iniciais dos filmes, direcionamos nosso delineamento experimental a investigação dos efeitos das proporções entre os fármacos nos seus perfis de liberação e permeação. Para filmes originados de hidrogéis contendo PCL isolado ou em predominância na combinação com LCL, observou-se cristalização da PCL durante a secagem, o que impossibilitava a aplicação destes na continuidade dos estudos devido à não uniformidade de teor.

Como estratégia para a solução deste problema, investigou-se o uso de PVP K30 como agente anticristalizante nas quantidades de 0,1, 1, 10, 50 e 100% (m.m^{-1}) em função das massas de fármaco dos filmes. A concentração mínima adequada para evitar a cristalização do PCL em filmes onde este fármaco se encontrava isolado foi de 50% (m.m^{-1}).

Em contrapartida, o uso deste adjuvante nesta proporção desfavoreceu a obtenção de filmes contendo os fármacos combinados em diferentes proporções por aumentar em demasia suas espessuras e dificultar sua remoção das placas. Desta forma, concentramos nossos esforços na obtenção de filmes contendo PCL combinada com LCL nas proporções 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) e LCL isolado (F4) (Tabela 2).

4.1.1.1 Aspecto visual

Os filmes foram facilmente retirados das placas e apresentaram coloração homogênea, não sendo observados pontos característicos de cristalização de fármaco ou de bolhas. Além disso, devido à boa flexibilidade, estes se mostraram facilmente manipuláveis (Figura 12).

Figura 12: Filme mucoadesivo com efeito anestésico (F4).

4.1.1.2 Uniformidade de massa, espessura e teores dos fármacos

A Tabela 4 apresenta os resultados relativos à massa, espessura e teor dos fármacos. Em média, as massas dos filmes estão próximas das teóricas (29, 40, 62 e 18 mg para F1, F2, F3 e F4, respectivamente).

Filmes	M (mg)	Esp. (μm)	PCL (mg.g^{-1})	LCL (mg.g^{-1})
F1	32 ± 12	385 ± 125	410 ± 6	370 ± 4
F2	39 ± 9	480 ± 94	286 ± 14	522 ± 15
F3	65 ± 15	850 ± 209	194 ± 1	724 ± 27
F4	16 ± 7	292 ± 33	-	602 ± 7

Tabela 4: Massas, espessuras e teores dos fármacos nos filmes poliméricos mucoadesivos contendo diferentes proporções entre PCL e LCL. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Esp.: espessura dos filmes; M: massa dos cortes circulares dos filmes ($0,64 \text{ cm}^2$); Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Os filmes apresentaram espessuras variando de 292 ± 33 a $850 \pm 209 \mu\text{m}$. Segundo a literatura, filmes poliméricos que se destinam a liberação de fármacos na cavidade bucal devem apresentar espessuras entre 50 e $1000 \mu\text{m}$ (NAIR *et al.*, 2013).

Como esperado, o aumento da quantidade dos fármacos nos hidrogéis foi diretamente proporcional ao aumento da massa ($R^2 = 0,99$) e espessura ($R^2 = 0,97$) dos filmes. Além disto, foi observada correlação significativa entre as massas e espessuras dos filmes ($R^2 = 0,96$).

Os teores dos fármacos estão em conformidade com os esperados e variaram dentro dos limites recomendados pela literatura (85 - 115%) (DIXIT; PUTHLI, 2009). Ademais, os resultados referentes aos teores dos fármacos demonstram a uniformidade da distribuição destes, sendo observados a manutenção de suas proporções e valores de coeficientes de variação inferiores a 5% (Tabela 4).

Merece destaque a elevada capacidade de veiculação de fármaco apresentada pelos filmes, chegando em média a aproximadamente 78%, 81%, 92% e 60% (m.m⁻¹) para F1, F2, F3 e F4, respectivamente.

Com base em nossos conhecimentos, esta propriedade ratifica a vantagem do uso desse tipo de forma farmacêutica frente a outras usadas na prática clínica *i.e.*, géis e creme a 5% (m.m⁻¹), considerando que os filmes possibilitariam a veiculação de até 18 vezes mais fármaco em uma área reduzida, com maior moldabilidade quando comparados a comprimidos, maior estabilidade quando comparado aos injetáveis, e maior tempo de residência que géis e pomadas, os quais podem ser facilmente lixiviados ou removidos pelo *turnover* da saliva.

4.1.1.3 Perfis de liberação

As Figuras 13a e 13b mostram os perfis de liberação do PCL e LCL, respectivamente, a partir dos filmes.

Os estudos de liberação *in vitro* foram conduzidos em células de difusão vertical utilizando membrana de acetato de celulose como barreira permeável com o intuito de simular condições de fluxo unidirecional de transferência de massa similar com o que ocorreria se os filmes estivessem aderidos à membrana de permeação. Esta abordagem tem sido extensivamente empregada na avaliação do desempenho de filmes de liberação bucal (MORALES; MCCONVILLE, 2011; NAIR *et al.*, 2013). Em estudos anteriores, foi verificado que a prilocaína e lidocaína não interagem com esta membrana (FIALA; BROWN; JONES, 2008). Portanto, a liberação dos fármacos a partir dos filmes na ausência de partição foi avaliada.

(a)

(b)

Figura 13: Perfis de liberação do PCL (a) e LCL (b) a partir de filmes contendo combinações dos fármacos nas proporções PCL:LCL de 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4). PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Dados expressos como média ± desvio padrão (n = 4)

As quantidades do PCL liberadas pelos filmes F1 e F2 nos primeiros 10 min foram significativamente maiores que aquelas obtidas para F3 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Outrossim, nos primeiros 10 min. as quantidades do LCL liberadas pelos filmes F1, F2 e F4 foram significativamente maiores que as quantidades obtidas para o filme F3 ($p < 0,01$). Nesse mesmo tempo, as quantidades do LCL liberadas pelo filme F4 foram significativamente maiores que as obtidas para F1 e F2 ($p < 0,01$).

Tendência semelhante também é observada para os demais pontos analisados, o que pode ser atribuído a razão fármaco/polímero. Quanto maior esta razão, menos polímero disponível para captação de água e hidratação. Desta forma, o filme F3 que continha a maior quantidade da mistura dos fármacos (55 mg) por unidade e, conseqüentemente, a maior razão fármaco/polímero apresentou a menor velocidade de liberação.

Considerando o racional da combinação dos fármacos, em termos de perfil de liberação o filme F1 se mostrou o mais promissor, aliando a liberação das maiores quantidades do PCL com o gasto de uma menor quantidade do LCL na mistura, o que deve reduzir o custo do filme.

Os perfis de liberação dos fármacos a partir dos filmes propostos foram analisados graficamente, correlacionando as quantidades liberadas (% $m \cdot m^{-1}$) em função do tempo (min). Na análise e interpretação dos resultados foram usados três diferentes tratamentos matemáticos para a linearização dos dados: i) % liberada *versus* tempo (ordem zero); ii) % liberada *versus* tempo^{1/2} (Higuchi); iii) log % remanescente no filme *versus* tempo (primeira ordem).

Fármaco	Filmes	Modelo cinético de liberação ($R^2 / F_{calc0,05;1;16}$)				<i>n</i>
		Ordem zero	Higuchi	Primeira ordem	Korsmeyer	
PCL	F1	0,93 / 208,4	0,97 / 590,9	0,95 / 314,9	0,96	0,83
	F2	0,91 / 161,3	0,93 / 228,4	0,91 / 158,4	0,98	0,88
	F3	0,95 / 313,7	0,95 / 305,1	0,94 / 271,9	0,98	0,89
LCL	F1	0,95 / 286,2	0,99 / 1058,4	0,97 / 487,7	0,97	0,78
	F2	0,88 / 114,6	0,91 / 136,4	0,98 / 1028,7	0,94	0,88
	F3	0,97 / 505,5	0,92 / 582,8	0,97 / 474,5	0,98	0,96
	F4	0,98 / 635,5	0,95 / 309,3	0,94 / 248,9	0,98	0,83

Tabela 5: Coeficientes de determinação (R^2) e F calculado (F_{calc}) médios das curvas de regressão linear obtidas na avaliação das cinéticas de liberação dos fármacos a partir de filmes contendo combinações dos fármacos nas proporções PCL:LCL de 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4). PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; *n*: expoente de difusão obtido pelo modelo de Korsmeyer; 0,05;1;16: nível de significância do teste F, grau de liberdade da regressão e grau de liberdade do resíduo, respectivamente; Dados expressos como média $\pm$ desvio (*n* = 3).

A Tabela 5 apresenta um resumo dos resultados da avaliação das cinéticas de liberação dos fármacos. O filme F1 apresentou cinéticas de liberação que se enquadram no modelo de Higuchi, o qual descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, sendo dependente da raiz quadrada do tempo. Para F2, a cinética de liberação dependeu do tipo de fármaco, sendo que para o PCL a que melhor se enquadrou foi a modelo de Higuchi e para o LCL, o de ordem 1. Por outro lado, para os

filmes F3 e F4 o modelo que se mostrou mais adequado foi o de ordem zero. Este modelo é comumente utilizado para descrever a liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas hidrofílicas onde, idealmente, a velocidade de difusão do fármaco do interior para o exterior da matriz é menor que a respectiva velocidade de dissolução, originando uma solução saturada que permite a liberação constante do fármaco (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; LOPES; LOBO; COSTA, 2005; CHAKRABORTY *et al.*, 2009; KAUNISTO *et al.*, 2011; SIEPMANN; PEPPAS, 2012)

O modelo de Korsmeyer foi aplicado para avaliarmos o possível mecanismo de liberação. Este modelo é geralmente utilizado para interpretar e descrever a liberação de fármacos quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: i) transporte do fármaco que obedece às leis de Fick ou transporte Fickiano, e ii) fenômenos de intumescimento/relaxamento do gel (expansão dinâmica) e que envolve a transição de um estado semirrígido a outro mais flexível, chamado transporte Caso-II. Desta forma, leva-se em conta não só a difusão do fármaco, mas também o relaxamento do gel como processos determinantes na liberação do fármaco (KORSMEYER; PEPPAS, 1981; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008, 2012; SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

Os valores de n variaram de 0,78 a 0,96 (Tabela 5). De acordo com a literatura (KORSMEYER; PEPPAS, 1981; SIEPMANN; SIEPMANN, 2008, 2012; SIEPMANN; PEPPAS, 2012), para formulações cuja forma geométrica se aproxima de filmes como os dispositivos mucoadesivos desenvolvidos, quando $0,5 < n < 1,0$ o modelo descreve uma cinética de transporte anômalo *i.e.*, uma combinação dos mecanismos de difusão e transporte Caso-II. Recentemente, Cavallari *et al.*(2013) identificaram mecanismo semelhante de liberação de lidocaína base a partir de filmes poliméricos compostos por diferentes tipos de HPMC (E50P, K4M, K15M), carbopol 940, Poloxamer, PEG400 e trietilcitrate.

4.1.1.4 Estudos *in vitro* de permeação passiva

A mucosa bucal de diversas espécies animais como coelhos, hamsters, cães e suínos tem sido empregada como modelo de membrana biológica em estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de permeação de fármacos em simulação a mucosa bucal humana (PATEL; LIU; BROWN, 2011). Destes, a mucosa da bochecha suína é a que mais se aproxima da mucosa bucal humana em termos de morfologia, composição lipídica e propriedades de membrana barreira.

Por isto, esta vem sendo reconhecida como um modelo representativo do tecido humano, e validado para experimentos de permeação bucal (HU *et al.*, 2011a). Outras razões

para o uso extensivo deste tipo de tecido são a grande disponibilidade no mercado e o baixo custo.

Por outro lado, este modelo apresenta limitações consideráveis como a dificuldade de obtenção de grandes áreas de tecido sem danos devido à mastigação e o fato de sua dessecação ser fastidiosa e demandar muito tempo, uma vez que a mucosa encontra-se fortemente aderida ao tecido muscular subjacente. Por estes motivos, a uma década a mucosa das bochechas vem perdendo espaço para a mucosa esofageal de suínos (DEL CONSUELO *et al.*, 2005a, 2005b).

Apesar de possuírem características estruturais e de permeabilidade, além de composição lipídica qualitativa e quantitativamente semelhantes, do ponto de vista prático o uso do epitélio esofageal como modelo de barreira em estudos de permeação se mostra mais vantajoso em função de sua maior extensão ($> 150 \text{ cm}^2$), menor demanda de tempo e esforço em sua dessecação e menor variabilidade em termos de barreira à permeabilidade, especialmente no tocante a espessura intra e entre amostras (DEL CONSUELO *et al.*, 2005a, 2005b).

Muito embora diversos trabalhos já tenham sido publicados relatando o uso de mucosa esofageal suína em experimentos *in vitro/ex vivo* de permeação de fármacos (DEL CONSUELO *et al.*, 2005b; KULKARNI *et al.*, 2010; CAON; SIMÕES, 2011), percebe-se uma contradição nos resultados referentes à avaliação do impacto de fatores como o tempo e temperatura de armazenamento com refrigeração na manutenção da integridade e capacidade de barreira deste tecido.

Portanto, durante toda a execução desta proposta os experimentos de permeação foram conduzidos em no máximo 24 h após o abate dos animais utilizando apenas mucosas frescas, as quais tiveram sua viabilidade verificada por meio da medida da resistência à passagem de corrente elétrica, sendo considerando como adequados valores de resistividade igual ou superior a $3,0 \text{ K}\Omega/\text{cm}^2$.

A Figura 14 apresenta os perfis de permeação passiva do PCL e LCL a partir dos filmes contendo o LCL isolado e combinado com PCL em diferentes proporções.

(a)

(b)

Figura 14 - Perfis de permeação passiva do PCL (a) e LCL (b) a partir de filmes contendo combinações dos fármacos nas proporções PCL:LCL de 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4). PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

Com base nos resultados, foram feitas as seguintes constatações:

- a permeação do LCL depende de sua contribuição relativa (%) na mistura dos fármacos (Fig. 14b), sendo que o aumento da massa do LCL foi diretamente proporcional ao aumento das quantidades permeadas ($R^2 = 0,9881$);
- o aumento da contribuição relativa do LCL nas misturas causou, em média, a redução de 25,9% e 41,1% na permeação do PCL a partir dos filmes F2 e F3, respectivamente (Fig. 14a);

iii) as quantidades permeadas do LCL isolado (F4) foram 5,69, 3,17 e 2,04 vezes superiores a aquelas observadas para os filmes compostos pelos fármacos em combinação nas proporções 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3), respectivamente (Fig. 14b).

A Tabela 6 apresenta os resultados dos parâmetros cinéticos calculados a partir dos perfis de permeação dos fármacos.

Fármaco	Filmes	J ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$)	Lt (min)	$Kp \times 10^{-4}$ ($\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$)	R^2
PCL	F1	$1,5 \pm 0,01$	$14,6 \pm 1$	$1,3 \pm 0,1$	$0,95 \pm 0,02$
	F2	$1,2 \pm 0,1^{**}$	$12,2 \pm 2$	$0,9 \pm 0,1$	$0,97 \pm 0,03$
	F3	$0,9 \pm 0,1^{***\#}$	$13,8 \pm 3$	$1,0 \pm 0,3$	$0,96 \pm 0,02$
LCL	F1	$1,5 \pm 0,1^c$	$12,7 \pm 1$	$1,5 \pm 0,2^a$	$0,97 \pm 0,01$
	F2	$2,6 \pm 0,2^c$	$10,9 \pm 2$	$1,1 \pm 0,1^a$	$0,99 \pm 0,01$
	F3	$4,1 \pm 0,3^{c,b}$	$10,6 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,1^a$	$0,99 \pm 0,01$
	F4	$8,3 \pm 1,1$	$11,6 \pm 2$	$6,3 \pm 1,8$	$0,99 \pm 0,01$

Tabela 6: Parâmetros cinéticos relacionados a permeação passiva do PCL e LCL a partir de filmes contendo combinações dos fármacos nas proporções PCL:LCL de 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4). PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; J , fluxo médio de permeação; Lt , lag time; Kp , coeficiente de permeabilidade; R^2 , coeficiente de determinação do modelo de regressão linear. $^{**} p < 0,01$ quando comparado a PCL F1; $^{***} p < 0,001$ quando comparado a PCL F1; $^{\#} p < 0,05$ quando comparado a PCL F2; $^a p < 0,001$ quando comparado a LCL F4; $^c p < 0,001$ quando comparado a LCL F4; $^b p < 0,01$ quando comparado a LCL F1 (ANOVA seguido de Teste Tukey); Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

O aumento da contribuição relativa do LCL na mistura com PCL de 50% (1:1, F1) para 66,6% (1:2, F2) e 80% (1:4, F3), levou a uma redução no fluxo médio de permeação do PCL da ordem de 23,7% ($p < 0,01$) e 42,1% ($p < 0,001$), respectivamente ($R^2 = 0,9999$).

Quando em combinação com PCL, o aumento da contribuição relativa do LCL nos filmes foi seguido do aumento do seu fluxo médio de permeação ($p < 0,01$) (Tabela 6). Em comparação com F4 (LCL isolado), a combinação com o PCL nas proporções de 20% (F3), 33,3% (F2) e 50% (F1) acarretou uma redução de 51,3% ($p < 0,001$), 68,6% ($p < 0,001$) e 81,8% ($p < 0,001$), respectivamente, no fluxo médio de permeação do LCL.

O fluxo do LCL, quando isolado (F4), é superior aos descritos por Abu-Huwaij *et. al.* (2007) na avaliação da permeação *in vitro* deste fármaco ($2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$) a partir de filmes mucoadesivos bi ou trilaminados contendo glicerol como plastificante e ácido oleico e Tween 20 como promotores de permeação.

Utilizando o mesmo modelo experimental, estudos anteriores realizados em nosso laboratório revelaram tendência semelhante na permeação passiva do PCL e LCL isolados ($2,5\% \text{ m} \cdot \text{m}^{-1}$) ou em combinação na proporção 1:1 ($5\% \text{ m} \cdot \text{m}^{-1}$) a partir de géis mucoadesivos.

Neste caso, a combinação com PCL reduziu em 60% o fluxo médio do LCL (CUBAYACHI, 2014). Embora os fluxos médios de permeação dos fármacos em combinação a partir dos filmes não sejam significativamente diferentes daqueles verificados para os géis, os fluxos de permeação do LCL isolado a partir dos filmes são praticamente 100% maiores que os das formulações semissólidas ($p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores estimados para o parâmetro de *lag time* (tempo de latência de permeação) para o PCL e LCL, o que sugere que os fármacos iniciam sua permeação através do epitélio ao mesmo tempo.

Em comparação com F4 (LCL isolado), a combinação com o PCL nas proporções de 20% (F3), 33,3% (F2) e 50% (F1) reduziu o coeficiente de permeabilidade do LCL em 85,7% ($p < 0,001$), 82,5% ($p < 0,001$) e 77,9% ($p < 0,001$), respectivamente. Outrossim, os coeficientes de permeabilidade do PCL tiveram redução de 32,9% ($p < 0,05$) e 41,9% ($p < 0,01$) em F2 e F3, respectivamente, quando comparados aos de F1.

Analisando por outra perspectiva, estes resultados sugerem que o aumento da contribuição relativa do LCL e, conseqüentemente, da massa final dos fármacos de 22 para 55 mg nos filmes contendo o PCL e LCL em combinação resultou em redução nos coeficientes de permeação do LCL. Tais achados não devem ser atribuídos à ocorrência de competição entre os fármacos, mas sim à Lei de Ação das Massas proposta por Guldberg e Waage (LUND, 1965).

Fiala *et al.* (2008, 2010) observaram tendências semelhantes na avaliação da permeação de soluções binárias saturadas e misturas eutéticas contendo diferentes proporções de prilocaína e lidocaína (forma base) através de membranas de acetato de celulose regenerada (hidrofílica, onde a permeação é governada pelo processo de difusão) e silicone (lipofílica, onde a permeação é governada por ambos os processos de difusão e partição).

Assim como nestes estudos anteriores, estas diferenças na transferência de massa através do epitélio podem ser atribuídas a redução da área e volume de difusão disponível causada pela “ocupação de espaço” em função das proporções entre os fármacos na interface ou no interior da membrana.

Merece destaque os elevados fluxo e coeficiente de permeabilidade apresentados pelo filme F4, contendo 11 mg do LCL isolado. Comparados com os resultados dos filmes F1, F2 e F3, uma das hipóteses é a de que o uso de menores quantidades dos fármacos pode favorecer suas permeações, o que provavelmente se deve à menor razão fármaco/polímero que, como discutido anteriormente para os ensaios de liberação, favorece a hidratação do filme e disponibilização dos fármacos.

Os valores de coeficiente de determinação (R^2) dos modelos de regressão linear determinados pela correlação entre as quantidades permeadas pelo tempo ($Q \times t$) demonstram que a permeação dos fármacos é ditada por uma cinética de ordem zero. Igualmente, Cubayachi (2014) observou cinética de ordem zero na permeação passiva *in vitro* de PCL e LCL isolados ou em combinação na proporção de 1:1, a partir de géis mucoadesivos de HPMC.

Em contrapartida, Padula *et. al.* (2013) observaram que o modelo cinético ao qual a permeação *in vitro* de LCL a partir de filmes mucoadesivos foi o de Higuchi (pseudo primeira-ordem). Esta diferença nos modelos cinéticos pode estar relacionada ao tempo de permeação analisado nos ensaios e aos tipos de polímeros utilizados, uma vez que, nesse último caso, os autores acompanharam a permeação por 8 horas e usaram diferentes tipos de PVA (83 ou 115) e Plastoid E35H na composição dos filmes. Em ambos os casos foi utilizado epitélio esofageal suíno como barreira à permeação.

Para a compreensão dos comportamentos de permeação do PCL e LCL, devemos levar em consideração tanto as características do epitélio, quanto as propriedades físico-químicas dos fármacos, as quais são apresentadas na Tabela 7.

Propriedade	PCL	LCL
Massa molecular (g.mol^{-1}) ^a	256,77	270,80
pKa, 25 °C ^b	7.89	7.86
LogP, 25 °C*	2.029	2.196
LogD, 25 °C pH 7,0*	1.32	1.36
Área de superfície polar (Å^2)*	41.1	32.3
% ionização pH 7,0**	88,59	87,87

Tabela 7: Propriedades físico-químicas do PCL e LCL; ^aFonte: The Merck Index, 2001 (Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA; ^bFonte: PubChem (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine - NCBI, Bethesda, MD, EUA; *Calculados para as formas base usando o *software* Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02 (©1994-2012 ACD/Labs). **Calculados a partir dos dados de pKa; PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína.

O espaço intercelular do tecido epitelial da mucosa bucal é preenchido com cerca de 50% de lipídios polares *e.g.*, fosfolipídios e glicosilceramidas (SQUIER; COX; WERTZ, 1991), de modo que a permeação através desta pode acontecer por duas vias: i) lipídica, que engloba a passagem de soluto por ambos os transportes transcelular e intracelular por partição; e ii) aquosa, onde o transporte de massa se dá por difusão devido a ocorrência de moléculas de água aprisionadas as porções polares dos lipídios intercelulares (SHOJAEI; BERNER; XIAOLING, 1998).

Considerando os fármacos na mesma proporção, o maior logP do LCL favorece sua maior partição pelo epitélio e, consequentemente, sua permeação através desta membrana. Por outro lado, pode ocorrer um equilíbrio na transferência de massa do LCL e PCL devido a este último ter sua difusão através da membrana facilitada pela sua menor massa molecular e maior polaridade. O transporte de fármacos pela via aquosa exerce papel importante no fluxo total de permeação através do epitélio bucal (KOKATE *et al.*, 2009).

Deste modo, embora pequenas, as diferenças entre as massas moleculares do LCL e PCL (14,03 g.mol⁻¹, cerca de 6% da massa do LCL) exercem papel crucial na permeação dos fármacos através do epitélio. Estes resultados corroboram com os apresentados por Kokate *et al.* (2009), os quais no desenvolvimento de um método *in silico* para a predição da permeabilidade de fármacos através do epitélio bucal de suínos, demonstraram por meio do uso de análises de regressão linear de um conjunto de dados experimentais que o volume molecular é o principal descritor relacionado ao coeficiente de permeabilidade de soluto através da membrana, seguido da lipofilicidade, número de ligações doadoras de hidrogênio e número de ligações rotacionais.

Por fim, a diferença no grau de ionização dos fármacos no pH da saliva simulada utilizada nos experimentos (0,72%) parece ser o fator que menos influencia na permeação. De fato, quando fármacos apresentam grau de ionização próxima a 90% as contribuições das atividades termodinâmicas das frações ionizada e não ionizada na permeação através da mucosa bucal suína são semelhantes (KOKATE *et al.*, 2008). Portanto, podemos sugerir que o LCL permeie preferencialmente pela via lipídica, ao passo que a permeação do PCL ocorre preferencialmente pela via aquosa.

Após os ensaios de permeação, as quantidades totais do PCL e LCL retidos no epitélio foram determinadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 8. Assim como observado para o fluxo, o aumento na contribuição relativa do LCL aumentou sua quantidade retida no epitélio, mas diminuiu as quantidades retidas do PCL. A retenção de anestésico na mucosa é desejável, pois pode proporcionar ação tópica combinada à ação profunda alcançada pela quantidade de fármaco permeada, além de servir como reservatório de fármaco, promovendo uma duração de ação mais prolongada. Tipicamente, baseando-se na composição bioquímica e estrutura da mucosa bucal, a retenção de fármacos neste tecido aumenta junto a lipofilicidade destes (KUROSAKI; VANO; KIMURA, 1997).

Fármaco	Filmes	<i>Qepit</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
PCL	F1	$4566 \pm 164^{***}$
	F2	$3676 \pm 131^{\$}$
	F3	2289 ± 113
LCL	F1	4463 ± 107
	F2	$9784 \pm 79^{\textcirc}$
	F3	$16784 \pm 910^{\#}$
	F4	5035 ± 78

Tabela 8: Quantidades do PCL e LCL retidos no epitélio após 60 min de permeação passiva a partir de filmes contendo combinações dos fármacos nas proporções PCL:LCL de 1:1 (F1), 1:2 (F2) e 1:4 (F3) ou LCL isolado (F4). PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; *Qepit*: quantidade de fármaco retido no epitélio esofageal suíno; *** $p < 0,001$ quando comparado a PCL F2 e F3; \$ $p < 0,001$ quando comparado a PCL F3; # $p < 0,001$ quando comparado a LCL F1, F2 e F4; @ $p < 0,001$ quando comparado a LCL F1 e F4 (ANOVA seguido de Teste Tukey); Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

Aliados aos resultados observados nos ensaios de liberação *in vitro*, a retenção de quantidades intermediárias do PCL e LCL no epitélio e os maiores fluxos e coeficientes de permeação de ambos os fármacos com o uso de quantidades medianas do PCL e LCL fizeram com que a combinação PCL:LCL na proporção 1:1 apresentasse a relação custo/benefício mais favorável, sendo escolhida para a continuidade dos estudos.

Uma vez selecionada a proporção entre os fármacos e considerando o desempenho geral apresentado pelos filmes F1 e F4, contendo aproximadamente 22 e 11 mg de fármaco, respectivamente, concentramos nossos esforços na avaliação dos efeitos da quantidade dos fármacos, tipo e quantidade de plastificante nos perfis de liberação e permeação dos fármacos, bem como nas propriedades mecânicas e de mucoadesão dos filmes.

4.1.2 Avaliação dos efeitos da quantidade dos fármacos, tipo e quantidade de plastificante

No desenvolvimento de formulações destinadas a aplicação na cavidade bucal, além dos perfis *in vitro* e *in vivo* de liberação e permeação dos fármacos, outras características de desempenho como a mucoadesão e propriedades mecânicas devem levadas em consideração (MORALES; MCCONVILLE, 2011). De modo geral, as características do produto são influenciadas por diversos fatores, entre eles as propriedades físicas e físico-químicas dos materiais de sua composição, além dos métodos e processos empregados em sua obtenção.

Na maioria das vezes, a relação entre a formulação, as variáveis de processo e as características de desempenho supracitadas não são bem entendidas devida a complexidade de sua composição. Portanto, a predição quantitativa do desempenho de uma formulação em

função das propriedades físicas e físico-químicas de seus constituintes é uma tarefa difícil que, por se tratar de um processo de otimização multifatorial, configura um dos maiores desafios para os cientistas da formulação.

Diversas abordagens estatísticas de análise multivariada podem ser empregadas como ferramentas para facilitar a compreensão das correlações entre os fatores envolvidos no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos *e.g.*, planejamentos fatoriais fracionários (MORAES *et al.*, 2009a, 2009b) e completos (HIORTH, 2003; MASHRU *et al.*, 2005; SHARMA; PHILIP; PATHAK, 2008; SINGH; PHILIP; PATHAK, 2008; KUMAR; SA, 2009; PATIL; SAWANT, 2009; BUKKA; PRAKASAM; PATEL, 2010; PANCHAL *et al.*, 2012; CHAKRABORTY *et al.*, 2013), metodologia de superfície de resposta (CHOPRA *et al.*, 2007; PATIL; SAWANT, 2009; ADELEKE *et al.*, 2010; LATE; BANGA, 2010), redes neurais artificiais (SUN *et al.*, 2003; BARMPALEXIS *et al.*, 2010; WOOLFSON *et al.*, 2010), análises de componente principal (CILURZO *et al.*, 2011; VETCHY *et al.*, 2014) entre outros.

Em essência, a aplicação dessas ferramentas visa tanto a avaliação dos efeitos de fatores de forma isolada, quanto de suas interações nas diversas características de desempenho do produto com um número reduzido de experimentos.

Para o desenvolvimento desta proposta, foi empregado um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{3-1} , onde são avaliados os efeitos de 3 fatores em 2 níveis, totalizando 4 filmes com diferentes composições quali e quantitativas. Os fatores avaliados foram a quantidade total da mistura dos fármacos na proporção 1:1 no filme (12,5 e 25 mg), o tipo (PEG400 e glicerol) e a quantidade de plastificante em função da massa total de polímero mucoadesivo no filme (15 e 30%).

Estes fatores e seus níveis (Tabela 2) foram selecionados em função das tendências observadas na avaliação da proporção entre os fármacos e em resultados de outros trabalhos publicados na literatura (ABU-HUWAIJ; ASSAF, 2007; ABU-HUWAIJ *et al.*, 2007; PADULA *et al.*, 2013). As variáveis dependentes (respostas ou características de desempenho) foram: a massa, espessura e teor dos fármacos nos filmes; os parâmetros cinéticos de permeação (fluxo e coeficiente de permeabilidade) e a quantidade dos fármacos retida no epitélio; força e trabalho de mucoadesão e tempo de permanência; as propriedades mecânicas de alongamento, resistência a tração, força de ruptura, módulo de elasticidade dos filmes.

4.1.2.1 Aspecto visual

Os filmes foram facilmente removidos das placas e apresentavam coloração homogênea e flexibilidade adequada.

4.1.2.2 Uniformidade de massa, espessura e teores dos fármacos

A Tabela 9 apresenta os resultados da caracterização da uniformidade de massa, espessura e teores dos fármacos nos filmes.

Filmes	M (mg)	Esp. (μm)	PCL (mg.g^{-1})	LCL (mg.g^{-1})
F5	19 ± 3	292 ± 61	292 ± 10	291 ± 11
F6	18 ± 1	244 ± 53	295 ± 13	299 ± 4
F7	38 ± 2	423 ± 42	351 ± 8	348 ± 5
F8	30 ± 3	399 ± 46	352 ± 18	343 ± 15

Tabela 9: Massas, espessuras e teores dos fármacos nos filmes poliméricos mucoadesivos contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção 1:1 e PEG400 ou Glicerol como plastificantes nas proporções de 15 ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Esp.: espessura dos filmes; M: massa dos cortes circulares dos filmes ($0,64 \text{ cm}^2$); Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

As massas dos filmes foram próximas das teóricas *i.e.*, 21, 20, 32 e 33 mg para F5, F6, F7 e F8, respectivamente. Nenhum dos fatores avaliados afetou significativamente este parâmetro.

Os filmes apresentaram espessuras variando de 244 ± 53 a $423 \pm 42 \mu\text{m}$. Estes valores estão em conformidade com os apresentados na Tabela 4 para os filmes F4 e F1, que foram compostas por LCL isolado ou em mistura com o PCL, e continham quantidades equivalentes a 11 e 22 mg dos fármacos, respectivamente. De acordo com as ANOVAs realizadas, dentro os fatores analisados por meio do planejamento fatorial, apenas a quantidade de fármaco exerceu efeito significativo na espessura dos filmes ($p = 0,0335$).

As quantidades dos fármacos nos filmes variaram dentro dos limites recomendados pela literatura (DIXIT; PUTHLI, 2009). Da mesma forma como observado para a espessura, o aumento na quantidade de fármaco incorporado aumentou significativamente os teores do PCL ($p = 0,0007$) e LCL ($p = 0,0086$) nos filmes. Nem o tipo, nem a quantidade de plastificante exerceram efeitos significativos nestes parâmetros.

4.1.2.3 Perfis de liberação

As Figuras 15a e 15b mostram os perfis de liberação do PCL e LCL, respectivamente, a partir dos filmes preparados de acordo com um planejamento fatorial do tipo 2^{3-1} . Nenhum dos fatores influenciou a liberação dos fármacos.

(a)

(b)

Figura 15: Perfis de liberação do PCL (a) e LCL (b) a partir dos filmes contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$).

Quando comparada ao F1 (PCL:LCL 1:1, 22 mg, 6% Glicerol), o filme F8 (PCL:LCL 1:1, 25 mg, 30% Glicerol) apresentou quantidades iniciais liberadas do PCL ($p = 0,0338$) e LCL ($p = 0,0292$) significativamente maiores. Essa diferença pode ser atribuída a maior quantidade de plastificante utilizado, o qual aumenta a velocidade e extensão de captação de

água do polímero hidrofílico (ABU-HUWAIJ; ASSAF, 2007; ELMESHAD; EL HAGRASY, 2011).

Um resumo dos resultados da avaliação das cinéticas de liberação dos fármacos a partir dos filmes desenvolvidas segundo planejamento fatorial 2^{3-1} é apresentado na Tabela 10.

Fármaco	Filmes	Modelo cinético de liberação (R^2 / $F_{calc_{0,05;1;22}}$)				n
		Ordem zero	Higuchi	Primeira ordem	Korsmeyer	
PCL	F5	0,97 / 757	0,99 / 1642,1	0,97 / 528,6	0,97	0,73
	F6	0,95 / 440,9	0,98 / 1272,5	0,98 / 881,5	0,98	0,62
	F7	0,97 / 543,2	0,98 / 910	0,98 / 755,3	0,98	0,85
	F8	0,83 / 107,9	0,86 / 132,1	0,81 / 92,2	0,91	0,75
LCL	F5	0,94 / 375,2	0,98 / 1029,4	0,97 / 722,9	0,97	0,71
	F6	0,95 / 451,9	0,99 / 1964,8	0,98 / 1091,5	0,98	0,61
	F7	0,98 / 726,5	0,99 / 1972,6	0,99 / 2014,6	0,99	0,8
	F8	0,88 / 155,2	0,9 / 197,3	0,87 / 141,3	0,93	0,69

Tabela 10: Coeficientes de determinação (R^2) e F calculado (F_{calc}) médios das curvas de regressão linear obtidas na avaliação das cinéticas de liberação dos fármacos a partir dos filmes contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; n : expoente de difusão obtido pelo modelo de Korsmeyer; $0,05;1;22$: nível de significância do teste F, grau de liberdade da regressão e grau de liberdade do resíduo, respectivamente; Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$).

O modelo de liberação no qual todos os filmes se enquadraram, com exceção do LCL do filme F7, foi o de pseudo primeira-ordem (Higuchi). Ainda, pelo modelo de Korsmeyer foi verificado que a cinética de liberação dos fármacos a partir dos filmes é ditada por transporte anômalo ($0,5 < n < 1,0$).

4.1.2.4 Ensaios *in vitro* de permeação passiva

A figura 16 apresenta os perfis de permeação passiva do PCL e LCL a partir dos filmes desenvolvidos segundo planejamento fatorial 2^{3-1} .

(a)

(b)

Figura 16: Perfis de permeação passiva de PCL (a) e LCL (b) a partir dos filmes contendo 12,5 ou 25 mg de PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 5).

Os resultados dos parâmetros cinéticos calculados a partir dos perfis de permeação passiva dos fármacos e as quantidades destes retidas no epitélio após 60 min. são apresentados na Tabela 11.

Fármaco	Filmes	J ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$)	Lt (min)	$Kp \times 10^{-4}$ ($\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$)	R^2	Q_{epit} ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)
PCL	F5	$5,2 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,8$	$0,99 \pm 0,01$	2257 ± 46
	F6	$3,5 \pm 0,3$	$8,2 \pm 3,3$	$6,5 \pm 0,6$	$0,99 \pm 0,01$	2211 ± 45
	F7	$2,7 \pm 0,3$	$4,4 \pm 1,2$	$1,9 \pm 0,2$	$0,99 \pm 0,01$	4151 ± 31
	F8	$2,3 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,3$	$0,99 \pm 0,01$	4146 ± 37
LCL	F5	$5,8 \pm 0,5$	4 ± 1	$9,9 \pm 0,7$	$0,99 \pm 0,01$	2245 ± 42
	F6	$4,4 \pm 0,5$	$7 \pm 1,8$	$8,1 \pm 0,8$	$0,99 \pm 0,01$	2272 ± 17
	F7	$4,2 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,8$	$3,3 \pm 0,3$	$0,99 \pm 0,01$	4254 ± 46
	F8	$3,3 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,8$	$3,2 \pm 0,4$	$0,99 \pm 0,01$	4227 ± 57

Tabela 11: Parâmetros cinéticos e quantidades de fármaco retidas no epitélio relacionados a permeação passiva do PCL e LCL a partir dos filmes contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; J , fluxo médio de permeação; Lt , lag time; Kp , coeficiente de permeabilidade; R^2 , coeficiente de determinação do modelo de regressão linear; Q_{epit} , quantidade de fármaco retida no epitélio esofageal suíno; Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

De modo geral, os filmes com menores quantidades dos fármacos (F5 e F6) apresentaram os maiores fluxos e coeficientes de permeabilidade. Por outro lado, foram os que eram compostos com maiores quantidades dos fármacos (F7 e F8) que proporcionaram as maiores retenções do PCL e LCL no epitélio.

Considerando o filme F8, o tempo de latência estimado para a permeação do LCL foi significativamente menor que o apresentado pelo filme F1 ($p < 0,001$). Estes resultados corroboram com aqueles verificados na avaliação das quantidades iniciais liberadas do LCL (Figura 11b), e reforçam a hipótese de que o aumento da quantidade de glicerol nos filmes contendo cerca de 25 mg da mistura dos fármacos ocasiona o aumento na velocidade de hidratação inicial do polímero.

Para todos os filmes, as permeações do PCL e LCL se adequaram a modelos cinéticos de ordem zero, de forma semelhante ao observado nos estudos dos efeitos da proporção entre os fármacos. Ademais, as quantidades do PCL e LCL retidas no epitélio a partir dos filmes F7 e F8 foram próximas das obtidas para o filme F1 (Tabela 8), que continha a mistura dos fármacos na mesma proporção e em quantidade similar (22 mg), demonstrando a reprodutibilidade dos filmes e dos ensaios de permeação *in vitro*.

Um resumo das ANOVAs realizadas para a verificação dos efeitos dos fatores avaliados segundo o planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} nos parâmetros cinéticos de permeação passiva *in vitro* do PCL e LCL e em suas quantidades retidas no epitélio são apresentados na Tabela 12.

Resposta	Fator		
	Q_F	P	Q_P
J PCL ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$)	0,1605	0,5466	0,7004
J LCL ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$)	0,2573	0,3407	0,8826
K_p PCL ($\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$)	↓0,0401*	0,7739	0,8342
K_p LCL ($\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$)	↓0,0248*	0,8385	0,8485
Q_{epit} PCL ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	↑0,0001***	0,9868	0,9892
Q_{epit} LCL ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	↑0,0001***	0,9999	0,9862

Tabela 12: Efeitos dos fatores (valores de p) avaliados segundo o planejamento fatorial 2^{3-1} nos parâmetros cinéticos de permeação dos fármacos e em suas quantidades retidas no epitélio em estudos *in vitro* de permeação passiva. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Q_F , quantidade de fármaco (mg); P , tipo de plastificante; Q_P , quantidade de plastificante em função da massa de polímero mucoadesivo; J , fluxo; K_p , coeficiente de permeabilidade; Q_{epit} , quantidade de fármaco retido no epitélio esofageal suíno; Significante a: *, 5% e ***, 0,1%; ↑, efeito positivo; ↓, efeito negativo.

Nenhum dos fatores avaliados afetou significativamente os fluxos do PCL ou LCL ($p > 0,05$). Todavia, o aumento da quantidade de fármaco nos filmes diminuiu significativamente

os coeficientes de permeabilidade do PCL e LCL ($p < 0,05$). Os maiores fluxos e coeficientes de permeabilidade do PCL e LCL foram alcançados com o nível inferior do fator quantidade de fármaco *i.e.*, 12,5 mg (F5 e F6), sendo que o filme F5 foi o que apresentou os melhores resultados para ambos os fatores.

Esses resultados ratificam as tendências observadas na avaliação da proporção entre os fármacos, e reforçam o racional do uso de menores quantidades da mistura do PCL e LCL na proporção 1:1 para se atingir maiores níveis de permeação a partir dos filmes. Tal qual observado na avaliação da proporção entre os fármacos, o aumento da quantidade do PCL e LCL nos filmes aumentou significativamente suas quantidades retidas no epitélio ($p < 0,001$).

Um estudo duplo-cego randomizado foi realizado para avaliar a eficácia e segurança de *patches* de 2 cm² contendo lidocaína (DentiPatch™, Noven Pharmaceuticals Inc., USA) a 10 e 20% (correspondente a 23,05 e 46,1 mg de fármaco, respectivamente) em 100 pacientes adultos saudáveis, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos (HERSH *et al.*, 1996).

Neste estudo, os filmes foram aderidos a região pré-molar maxilar ou mandibular, a 2 mm da junção mucogengival e a resistência ao estímulo doloroso causado pelo contato com agulhas de calibre 25 foi medida por meio de escalas de analgesia padronizadas. A eficácia foi dependente da quantidade de fármaco, de modo que o filme a 20% demonstrou maior potencial.

Para esta, a anestesia iniciava após 2,5 min e durava por todo o tempo de aplicação (15 min), persistindo por 30 min após sua remoção totalizando, portanto, 45 min. Além de poder ser empregada com pré-anestésico em procedimentos superficiais, caso o paciente apresente elevado grau de ansiedade e sensibilidade à dor, este *patch* é indicada para uso em intervenções cirúrgicas em tecidos moles *e.g.*, curetagem, gengivectomia e biópsias ou outros procedimentos que exigem múltiplas injeções de anestésico.

Na avaliação da segurança, o perfil farmacocinético foi comparado ao de injeção de lidocaína a 2% associada a epinefrina 1:100000 (1,8 mL, equivalente a 36 mg de lidocaína). Os níveis máximos de lidocaína encontrados no plasma (21,8 ng.mL⁻¹) foram observados após 15 min da aplicação do dispositivo e se mantiveram constantes por 30 min, sendo em média aproximadamente 10 vezes inferiores aos da forma injetável (220 ng.mL⁻¹). Considerando o nível de concentração plasmático tóxico para este fármaco (1,5 – 6 µg.mL⁻¹) (BURSELL; RATZAN; SMALLY, 2009), os valores alcançados pelo dispositivo são aproximadamente 200 vezes inferiores. Ainda, não foram observados efeitos colaterais significativos devido ao uso do filme.

Com base nestes estudos de segurança e eficácia, e considerando que o filme F5 tenha a mesma área de contato que o dispositivo disponível no mercado (DentPatch™), estimamos que para que possa substituir as formulações injetáveis, a quantidade de fármaco permeado a partir de F5 deve ser aumentada em pelo menos 30 vezes. Para tanto, a quantidade de fármaco liberada deve ser aumentada, o que representa um desafio farmacotécnico a ser superado. Para tanto, podemos adicionar agentes promotores da captação de água (*e.g.*, sorbitol, celulose microcristalina, amido etc) ou superdesintegrantes (*e.g.*, crospovidona, croscarmellose sódica, glicolato sódico de amido, etc).

Paralelamente ao desenvolvimento desta tese, foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), um estudo clínico randomizado, controlado, *crossover* e triplo-cego de eficácia de filmes mucoadesivos anestésicos na prevenção da dor pré-procedimento operatório em odontologia (CALEFI, 2013).

As amostras consistiram em: a) placebos (controles negativos *i.e.*, filmes isentos de fármacos), b) filmes contendo 60 mg.cm⁻² do LCL isolado, e c) filmes contendo 60 mg.cm⁻² do LCL associado ao PCL na proporção 1:1. Em todos os casos, os filmes foram confeccionados de modo a conter 2 cm² de área total, sendo que a superfície que não entrava em contato com a mucosa gengival foi revestida com filme Contact® (Tilibra®, Bauru, SP, Brasil).

Em seu preparo, foram utilizados HPMC K100 LV (3% m.m⁻¹), glicerol 85% (6% em função da massa de polímero mucoadesivo) e tampão fosfato pH 7,0, procedendo-se como proposto no item 3.2.2. A população de estudo consistiu em 21 voluntários de ambos os gêneros, normotipos, saudáveis, com faixa etária entre 18 e 30 anos (CAAE n°-00592112.8.0000.5419).

Dois tipos de teste de sensibilidade a estímulos dolorosos pré e pós aplicação dos filmes foram empregados: i) teste de *stress* mecânico (pressão) empregando sonda computadorizada Florida Probe® System (Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, EUA), aplicada no sentido perpendicular ao tecido mucoso, simulando o uso de agulha gengival e com pressão constante de 25 gramas; ii) teste térmico com o uso de Endo-Frost® Roeko para verificação da profundidade anestésica em nível pulpar.

Para a mensuração da sintomatologia dolorosa foi utilizada escala visual analógica (EVA) e a versão em Língua Portuguesa do McGill Pain Questionnaire (VAROLI, 2006). A sensibilidade a dor foi verificada após 5, 15, 25 e 50 min. da aplicação dos filmes na região do fórnice do vestíbulo dos pré-molares superiores.

Os resultados evidenciaram a eficiência dos filmes contendo os fármacos isolados ou em combinação em ambos os testes, de modo que o efeito anestésico iniciou em 5 min, atingindo ação máxima nos tempos de 15 e 25 min e perdurando até 50 min. Nos tempos de pressão, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os filmes. Contudo, nos testes térmicos o efeito anestésico dos filmes contendo os fármacos combinados foi significativamente maior quando comparado os filmes contendo somente o LCL, sugerindo que a combinação dos fármacos proporciona o efeito em fibras mais profundas.

Além de sugerirem que os filmes podem ser pré-anestésicos tão ou mais eficazes que o dispositivo disponível no mercado, os resultados reforçam o racional da utilização dos fármacos em combinação como proposto por nossa equipe científica. Ademais, considerando as tendências observadas nos ensaios de permeação passiva *in vitro*, acreditamos que ao reduzirmos as quantidades totais dos fármacos nos filmes, conseguiremos aumentar suas quantidades permeadas e, conseqüentemente, a eficácia clínica dos filmes.

4.1.2.5 Mucoadesão, tempo de permanência e propriedades mecânicas

Os resultados da caracterização dos filmes quanto aos parâmetros de mucoadesão, tempo de permanência e propriedades mecânicas estão apresentados na Tabela 13.

Propriedades	Filmes			
	F5	F6	F7	F8
F _A (N)	0,05 ± 0,002	0,06 ± 0,004	0,13 ± 0,001	0,2 ± 0,002
T _A (N.mm)	0,15 ± 0,03	0,2 ± 0,02	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
T _P (min.)	> 60	> 60	> 60	> 60
E (%)	123 ± 4	111 ± 5	103 ± 4	110 ± 6
RT (MPa)	10 ± 1	10 ± 1	5 ± 0,3	5 ± 0,5
FR (N)	18 ± 4	13 ± 4	12 ± 1	12 ± 1
ME (MPa)	0,08 ± 0,005	0,09 ± 0,001	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,003

Tabela 13: Mucoadesão, tempo de permanência e propriedades mecânicas de filmes mucoadesivos contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo. F_A, Força de adesão; T_A, Trabalho de adesão; T_P, Tempo de permanência; E, alongamento; RT, resistência a tração; FR, força de ruptura; ME, módulo de elasticidade. Dados expressos como média ± desvio padrão (n = 5).

Em média, os resultados de força e trabalho de adesão variaram, respectivamente, de 0,05 a 0,2 N e 0,15 a 0,6 N.mm. Os filmes compostos por 25 mg da mistura dos fármacos (F7 e F8) apresentaram forças e trabalhos de adesão superiores aos os filmes contendo 12,5 mg (F5 e F6).

Formulações destinadas a aplicação na cavidade bucal devem apresentar força de mucoadesão suficiente para que se mantenham aderidas durante o tempo desejado, e que permitam sua remoção com facilidade após os procedimentos clínicos. Portanto, formulações excessivamente mucoadesivas podem provocar desconforto ao paciente e, até mesmo, lesões à mucosa durante sua remoção.

Não houveram diferenças entre os tempos de permanência dos filmes, sendo que em todos os casos, estes ficaram aderidos à mucosa esofageal suína por mais de 60 min, que é o tempo médio de procedimentos odontológicos de rotina. Os resultados sugerem que as diferenças observadas no trabalho e força de adesão dos filmes não impactaram em sua aplicabilidade.

Em ambos os casos, os resultados destes experimentos *in vitro* estão próximos daqueles alcançados por Cubayachi (2014) na avaliação da mucoadesão de géis de HPMC (5% m.m⁻¹) contendo o PCL e LCL combinados na proporção 1:1 (5% m.m⁻¹). O sucesso dos filmes em relação os parâmetros de mucoadesão e tempo de permanência está diretamente correlacionado à seleção adequada do polímero mucoadesivo. De fato, o efeito mucoadesivo do polímero utilizado já vem sendo descrito na literatura (GAJDZIOK *et al.*, 2010).

O alongamento dos filmes variou de 103 (F7) a 123% (F5), ou seja, quando tracionados seus comprimentos originais aumentaram de 1,03 a 1,23 vezes. Os filmes F5 e F6 apresentaram valores de resistência a tração e módulos de elasticidade superiores aos verificados para os filmes F7 e F8. A resistência à tração de filmes vem sendo definida como a resistência do material à ruptura. Geralmente, quanto maior a resistência a tração, maior é o alongamento e a força de ruptura. Já o módulo de elasticidade está relacionado com a avaliação da rigidez ou de como o material se deforma na região elástica (MORALES; MCCONVILLE, 2011).

De acordo com a literatura (MASHRU *et al.*, 2005), filmes destinados a aplicação na cavidade bucal (mucoadesivos ou orodispersíveis) devem possuir as propriedades mecânicas de materiais macios e fortes *i.e.*, moderada resistência a tração, baixo módulo de elasticidade e elevado grau de alongamento. Os filmes em desenvolvimento atendem estes a requisitos e, portanto, se adequam à finalidade proposta.

A Tabela 14 apresenta um resumo das ANOVAs realizadas para a verificação dos efeitos dos fatores avaliados segundo o planejamento fatorial fracionário 2³⁻¹ na mucoadesão, tempo de permanência e propriedades mecânicas dos filmes mucoadesivos em desenvolvimento.

Resposta	Fator		
	Q_F	P	Q_P
F_A (N)	$\uparrow 0,0379^*$	0,7351	0,9352
T_A (N x mm)	$\uparrow 0,0215^*$	0,8067	0,9281
T_P (min.)	0,9999	0,9999	0,9999
E (%)	0,2797	0,8226	0,3294
RT (MPa)	$\downarrow 0,0012^{**}$	0,9666	0,965
FR (N)	0,2514	0,5191	0,5436
ME (MPa)	$\downarrow 0,0123^*$	0,8889	0,8898

Tabela 14: Efeitos dos fatores (valores de p) avaliados segundo o planejamento fatorial 2^{3-1} na mucoadesão, tempo de permanência e propriedades mecânicas de filmes mucoadesivos contendo 12,5 ou 25 mg do PCL e LCL na proporção de 1:1 e PEG400 ou Glicerol nas proporções de 15% ou 30% em função da massa de polímero mucoadesivo. Q_F , quantidade da mistura dos fármacos na proporção de 1:1 incorporados nos filmes; P , tipo de plastificante; Q_P , quantidade de plastificante incorporado no filme em função da massa de polímero; F_A , Força de adesão; T_A , Trabalho de adesão; T_P , Tempo de permanência; E, alongamento; RT, resistência a tração; FR, força de ruptura; ME, módulo de elasticidade; Significante a: *, 5% e **, 1%; $\uparrow$, efeito positivo; $\downarrow$, efeito negativo.

Nem a quantidade de fármaco, nem o tipo e a quantidade de plastificante influenciaram os tempos de permanência, o alongamento e a força de ruptura dos filmes. Entretanto, o aumento na quantidade dos fármacos aumentou significativamente as forças e trabalhos de adesão dos filmes.

A mucoadesão de uma formulação destinada ao uso na cavidade bucal representa o grau de sua interação com o epitélio bucal, exercendo papel determinante na eficiência de disponibilização de fármacos. Esse fenômeno vem sendo explicado pela aplicação (individualmente ou de forma conjunta) das teorias da adesão *i.e.*, eletrônica, da adsorção, da hidratação, da difusão, mecânica e da fratura.

O mecanismo de mucoadesão pode ser dividido em dois estágios: i) contato, onde processos como a hidratação da periferia e difusão de moléculas de água para o interior do filme induzem sua adesão à mucosa; ii) consolidação, em que ocorre a difusão da malha polimérica pelo muco e sua interpenetração na mucosa, permitindo que interações (ligações iônicas, de Van der Waals, de hidrogênio e hidrofóbicas) entre os grupos funcionais do polímero e dos constituintes da mucosa sejam estabelecidas (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005; CARVALHO *et al*, 2010; KHUTORYANSKIY, 2011; PATEL; LIU; BROWN, 2011).

Diversos fatores ligados a mucosa, a formulação e ao método de avaliação estão envolvidos no fenômeno de mucoadesão (BRUSCHI; FREITAS, 2005; ROSSI; SANDRI; CARAMELLA, 2005; SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; KHUTORYANSKIY, 2011; PATEL; LIU; BROWN, 2011). Isto

posto, até o presente a comunidade científica não logrou êxito na validação de um método universal para a avaliação deste importante parâmetro relacionado ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. No tocante a formulação, podemos destacar o tipo de forma farmacêutica, sua hidrofilicidade e quantidade de fármacos, polímeros e plastificantes.

Considerando as teorias e mecanismos propostos para a mucoadesão, estes resultados podem ser explicados da seguinte forma:

a) Os filmes foram administrados no estado não hidratado à mucosa. Devido à natureza hidrofílica dos fármacos utilizados, o aumento em sua contribuição na massa total dos filmes pode ter ocasionado o aumento da atração e captação de água pelos filmes, em quantidade suficiente para estabelecer força capilar e proporcionar o aumento na interação entre os filmes e a mucosa durante o tempo de contato (5 min.);

b) Além do glicerol e PEG400, os fármacos podem ter exercido efeito plastificante nos filmes, diminuindo a temperatura de transição vítrea do polímero mucoadesivo. Os plastificantes podem fragilizar ou romper as atrações intermoleculares entre as cadeias poliméricas pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio secundárias. Dessa forma, o aumento na quantidade de plastificante pode ter causado o aumento destas ligações secundárias, seguido do aumento na mobilidade das cadeias poliméricas, que por sua vez facilitou sua interpenetração na camada de muco e, conseqüentemente, aumentou a força e o trabalho de mucoadesão (ABU-HUWAJ *et al.*, 2007). Apesar de determinante para as propriedades das formulações, o efeito plastificante que fármacos podem exercer sobre filmes poliméricos tem sido alvo de poucos estudos (NAIR; NYAMWEYA, 2001; KALOGERAS, 2011).

Tão importantes quanto a mucoadesão e tempo de permanência, as propriedades mecânicas de filmes exercem papel crucial em sua integridade física, estando também correlacionadas com sua aplicabilidade e eficácia clínica. Para serem aplicados na cavidade bucal, formulações filmógenas devem apresentar elasticidade e flexibilidade adequadas para sempre removidas da embalagem primária, moldadas e aderidas no sítio de aplicação.

Apesar do efeito plastificante exercido pelos fármacos, o aumento de suas contribuições na massa total dos filmes de aproximadamente 60% (12,5 mg – F5 e F6) para 76% (25 mg – F7 e F8) ocasionou a redução na resistência a tração (RT) e elasticidade (ME) dos filmes (Tabela 14). Estes resultados confirmam as tendências apresentadas anteriormente (Tabela 13).

Isto pode ter ocorrido em função do aumento da razão fármaco/polímero nos filmes, conduzindo a diminuição exacerbada da fração de cadeias poliméricas disponíveis para

estabelecerem interações intermoleculares primárias entre si o que, conseqüentemente, tornou-as relativamente mais frágeis. É válido ressaltar que, embora apresentassem diferenças significativas em suas propriedades mecânicas, todos os filmes possuíam flexibilidade adequada para manuseio e aplicação nos estudos *in vitro*.

De modo geral, os resultados demonstram um efeito expressivo da quantidade de fármaco nas características de desempenho dos filmes. Para facilitar a compreensão da intercorrelação entre a quantidade de fármaco nos filmes, as suas quantidades retidas no epitélio e as propriedades de mucoadesão e mecânicas dos filmes, foi preparada uma matriz de correlação (Tabela 15).

	Q_F	Q_{epit} PCL	Q_{epit} LCL	F_A	T_A	RT	ME
Q_F	↑1	↑0,99	↑0,99	↑0,83	↑0,96	↓1	↓0,96
Q_{epit} PCL	↑0,99	↑1	↑0,99	↑0,83	↑0,95	↓0,99	↓0,97
Q_{epit} LCL	↑0,99	↑0,99	↑1	↑0,82	↑0,96	↓0,99	↓0,96
F_A	↑0,83	↑0,83	↑0,82	↑1	↑0,94	↓0,83	↓0,78
T_A	↑0,96	↑0,95	↑0,96	↑0,94	↑1	↓0,96	↓0,89
RT	↓1	↓0,99	↓0,99	↓0,83	↓0,96	↑1	↑0,96
ME	↓0,96	↓0,97	↓0,96	↓0,78	↓0,89	↑0,96	↑1

Tabela 15: Matriz de correlação entre a quantidade dos fármacos anestésicos e parâmetros de desempenho dos filmes mucoadesivos. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Q_F , quantidade da mistura dos fármacos na proporção de 1:1 incorporados nos filmes (mg); Q_{epit} , quantidade de fármaco retido no epitélio esofageal suíno ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$); F_A , Força de adesão (N); T_A , Trabalho de adesão ($\text{N} \times \text{mm}$); RT, resistência a tração (MPa); ME, módulo de elasticidade (MPa); Valores expressos como coeficiente de determinação (R^2) dos modelos de regressão linear; ↑, efeito positivo; ↓, efeito negativo.

Os coeficientes de determinação (R^2) demonstram correlação significativa entre os parâmetros analisados, ratificando as tendências apontadas (Tabelas 12 e 14) e reforçando as hipóteses propostas. Por exemplo, o aumento na quantidade dos fármacos apresentou correlação positiva de cerca de 96% com o trabalho de adesão dos filmes que, por sua vez, apresentou correlação positiva de 95% e 96%, respectivamente, com as qualidades de PCL e LCL retidas no epitélio.

Este conjunto de resultados da avaliação da mucoadesão, tempo de permanência e propriedades mecânicas, associados aos perfis e parâmetros cinéticos de permeação, nos levou a selecionar o filme F5 para dar continuidade no desenvolvimento desta proposta. É necessário que estudos ainda sejam realizados visando a melhor compreensão dos efeitos da razão fármaco/polímero nas características de desempenho dos filmes.

4.1.3 Efeitos das camadas mucoadesiva e isolante

No estudo clínico mencionado anteriormente, foi verificado que embora a adesão dos filmes estivesse adequada, quando totalmente hidratados, os filmes originavam hidrogéis de baixa viscosidade, fazendo com que ocorresse pequena lixiviação dos fármacos pela saliva, causando sensação de desconforto nos pacientes devido ao seu sabor amargo. Portanto, buscando minimizar esse inconveniente, optamos por usar a estratégia de adicionar camadas mucoadesiva e oclusiva à camada de liberação. Dessa forma, a partir do filme F5 foram preparados *patches* trilaminados como apresentado na Figura 17.

Figura 17: *Patches* trilaminados preparados a partir do filme F5.

A camada mucoadesiva foi adicionada por sobre a camada de liberação para que, quando hidratados, os polímeros hidrofílicos que a compunham (*i.e.*, HPMC e poliacarbofil) formassem uma barreira física para a passagem de saliva das regiões periféricas para o centro dos filmes, evitando então a lixiviação dos fármacos.

Por sua vez, a camada oclusiva foi adicionada por sobre a camada mucoadesiva com o objetivo de evitar a adesão das lâminas mucoadesiva e de liberação aos lábios e a bochecha e, ainda, vetorizar os fluxos dos fármacos no sentido da mucosa onde os filmes fossem administrados (Figura 8).

As camadas mucoadesiva e oclusiva apresentaram espessuras de aproximadamente 150 μm , além de flexibilidade e moldabilidade adequadas. Igualmente, os *patches* trilaminados se mostraram suficientemente flexíveis e moldáveis.

Figura 18: Perfis de liberação do PCL (a) e LCL (b) a partir do filme F5 e dos *patches* trilaminados. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$).

4.1.3.1 Perfis de liberação

As Figuras 18a e 18b mostram os perfis de liberação do PCL e LCL, respectivamente, a partir do filme F5 e dos *patches* trilaminados. Para ambos os fármacos, os *patches* trilaminados apresentaram perfis de liberação que se enquadram no modelo de Higuchi. Ainda, os valores do expoente de difusão (n) calculados pelo modelo de Korsmeyer para o PCL e LCL foram $0,86 \pm 0,04$ e $0,87 \pm 0,05$, respectivamente, os quais correspondem ao mecanismo de liberação de transporte anômalo.

É possível notar que a adição da camada mucoadesiva ao filme F5 diminuiu as quantidades iniciais e totais liberadas do PCL e LCL. Provavelmente, devido a elevada extensão de captação de água apresentada pelos polímeros selecionados para compor a

camada mucoadesiva, pode ter ocorrido uma diminuição da quantidade de líquido disponível para a hidratação da camada de liberação. Por este mesmo motivo, o fluxo de hidratação da camada mucoadesiva pode ter competido com o fluxo de liberação do fármaco a partir da camada de liberação hidratada.

(a)

(b)

Figura 19: Perfis de permeação passiva do PCL (a) e LCL (b) a partir do filme F5 e dos *patches* trilaminados. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

4.1.3.2 Estudos *in vitro* de permeação passiva

Os perfis de permeação passiva do PCL e LCL a partir do filme F5 e dos *patches* trilaminados são apresentados na Figura 19. De modo semelhante ao observado nos estudos de liberação, ao contrário do esperado, a adição das camadas mucoadesiva e de isolamento ao

filme F5 diminuiu significativamente as quantidades permeadas de ambos os fármacos ($p < 0,001$).

A Tabela 16 apresenta os parâmetros cinéticos e as quantidades retidas no epitélio relacionada a permeação passiva do PCL e LCL a partir do filme F5 e dos *patches* trilaminados.

Parâmetro	Fármaco			
	PCL		LCL	
	F5	Patches	F5	Patches
J ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$)	$5,2 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,1^{***}$	$5,8 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,1^{***}$
Lt (min)	$1,7 \pm 0,3$	$6,3 \pm 4,2$	4 ± 1	$7,8 \pm 0,6^{**}$
$Kp \times 10^{-4}$ ($\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$)	$8,8 \pm 0,8$	$0,5 \pm 0,3^{***}$	$9,9 \pm 0,07$	$0,6 \pm 0,2^{***}$
R^2	$0,99 \pm 0,01$	$0,96 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,03$
Q_{epit} ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	2257 ± 46	$202 \pm 4^{***}$	2245 ± 42	$204 \pm 4^{***}$

Tabela 16: Parâmetros cinéticos e quantidades de fármaco retidas no epitélio relacionados a permeação passiva do PCL e LCL a partir do filme F5 e dos *patches* trilaminados. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; J , fluxo médio de permeação; Lt , lag time; Kp , coeficiente de permeabilidade; R^2 , coeficiente de determinação do modelo de regressão linear; Q_{epit} , quantidade de fármaco retida no epitélio esofageal suíno; $** p < 0,01$ e $*** p < 0,001$, quando comparado a F5 (Teste t de Student); Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

E possível notar que, para ambos os fármacos, a adição das camadas mucoadesiva e oclusiva à camada de liberação proporcionaram uma redução de aproximadamente 10 vezes nos parâmetros cinéticos de fluxo e coeficiente de permeabilidade, e nas quantidades retidas no epitélio. Apesar de reduzidos pela presença das camadas mucoadesiva e isolante, os fluxos passivos do LCL estiveram próximos daqueles observados por Hu et. al. (HU et al., 2011a) na avaliação do sinergismo entre a aplicação da iontoforese ($0,3 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$) e o uso de promotores químicos na permeação do LCL (2,5%) a partir de gel de carboximetilcelulose usando modelo de mucosa bucal de suínos.

Analisados isoladamente ou em conjunto com as tendências observadas nos ensaios de liberação *in vitro* (Figura 18), os resultados de permeação demonstram que tanto a composição da camada mucoadesiva, quanto a arquitetura dos *patches* devem ser aprimoradas.

No tocante à composição da camada de adesão, pode ser utilizado polímero mucoadesivo com menor capacidade de captação de água *e.g.*, hidroxipropil celulose, Plastoid® E35H e outros tipos de HPMC de baixa ou média viscosidade (*e.g.*, E5, E15, E50). Com relação a arquitetura dos *patches*, estes podem ser projetados de modo que as arestas laterais da camada de liberação sejam revestidas por polímero impermeável a água e fiquem

envolvida pela lâmina mucoadesiva (formando um reservatório de fármacos) e, sobre esse conjunto, seja adicionado a camada isolante como ilustrado na Figura 20.

Figura 20: Perspectiva dos filmes mucoadesivos a serem desenvolvidos. (a) corte transversal; (b) corte longitudinal.

Considerando a proposta do desenvolvimento racional de uma plataforma de liberação de fármacos na cavidade bucal na qual este projeto está inserido (Processo FAPESP 2012/07251-6), da forma que foi conduzida até o momento, a arquitetura dos *patches* pode ser uma estratégia para modular a liberação e permeação destes e de outros fármacos em atendimento a necessidades terapêuticas específicas.

4.1.3.3 Mucoadesão e tempo de permanência

A Figura 21 apresenta os resultados dos parâmetros de força e trabalho de mucoadesão do filme F5, da camada mucoadesiva e dos *patches* trilaminados. Tanto a força quanto o trabalho de mucoadesão do filme F5 foram menores que os verificados para a camada adesiva e para os *patches*. Para ambos os parâmetros, se somados, os resultados do filme F5 e a camada adesiva aproximam daqueles apresentados pelos *patches*, confirmando a reprodutibilidade dos ensaios *in vitro* de mucoadesão.

Assim como observado para o filme F5 (Tabela 13), os *patches* também se mantiveram aderidos a mucosa por tempo superior a 60 min, sugerindo que apesar de inferiores ao de algumas formulações apresentadas na literatura (ABU-HUWAIJ *et al.*, 2007), a força e trabalho de mucoadesão dos filmes por nós desenvolvidos podem ser adequados para o uso na prática clínica odontológica.

Figura 21: Força (a) e trabalho de mucoadesão (b) de: (●) filme F5, (■) camada mucoadesiva e (▲) *patches* trilaminados. * $p < 0,001$ quando comparado a camada mucoadesiva e *patches* trilaminados; # $p < 0,001$ quando comparado a *patches* trilaminados (ANOVA seguido de Teste Tukey); Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

4.1.4 Viabilidade da aplicação da iontoforese

Muitos fármacos disponíveis atualmente podem estar sendo subutilizados por não conseguir atingir seu local de ação em concentrações adequadas. Tendo em vista que, quando em contato com fluidos biológicos, parte destas substâncias se encontra na forma ionizada, elas normalmente não conseguem permear através dos tecidos de maneira que sua concentração efetiva máxima seja alcançada (SACHDEVA; GUPTA; GUPTA, 2011).

Baseando-se nas leis da física da eletricidade, pela primeira vez em 1900 postulou-se que esta limitação poderia ser superada pela aplicação de corrente elétrica orientada nos tecidos de modo que a penetração dos fármacos e, conseqüentemente sua concentração no local de ação desejado fosse amplificada. Assim surgiu a iontoforese, termo médico dado ao transporte eletroforético de princípios ativos ou íons de interesse terapêutico (CIACH; MOSCICKA-STUDZINSKA, 2011).

São dois os mecanismos pelos quais podem ocorrer a migração de moléculas sujeitas a influência de um campo elétrico orientado: i) eletromigração e ii) eletroosmose. A eletromigração é resultado de interações eletrostáticas e se aplica a espécies carregadas. Já a eletroosmose ocorre em estruturas porosas (*e.g.*, tecidos epitelial e mucoso) que apresentam uma rede tridimensional de cargas predominantes causando assimetria de cargas entre a solução móvel e a fase estacionária porosa.

Neste caso, a mobilidade e a concentração de íons com carga semelhante a do tecido são reduzidas e a transferência de íons de carga oposta favorecida. Este fluxo iônico não simétrico induz o fluxo convectivo de solvente e de outras moléculas carregadas ou neutras. A título de exemplificação, por apresentar residual de carga negativo em condições fisiológicas, o fluxo eletroosmótico através do epitélio bucal ocorreria no sentido do eletrodo positivo para o eletrodo negativo (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

Desta forma, o advento desta técnica contribuiu de forma apreciável para a promoção da permeação através da pele e mucosas não apenas de fármacos e outras moléculas carregadas, mas também de moléculas neutras, proteínas e hormônios o que, consequentemente, proporcionou grande avanço nas áreas médica e odontológica (GANGAROSA; HILL, 1995; CIACH; MOSCICKA-STUDZINSKA, 2011; SACHDEVA; GUPTA; GUPTA, 2011).

Aliada a moderada permeabilidade apresentada pela mucosa bucal, a possibilidade de aplicação da iontoforese para aumentar a permeação de anestésicos locais no intuito de diminuir a sensibilidade dolorosa em procedimentos odontológicos vem sendo o alvo de poucos estudos (HU *et al.*, 2011a; WEI *et al.*, 2012; CUBAYACHI, 2014;), o que valoriza ainda mais o desenvolvimento desta proposta.

Apesar de ter caráter inovador, a aplicação da iontoforese em filmes poliméricos na cavidade bucal é desafiadora, pois requer o desenvolvimento de dispositivo adequado ou a miniaturização e adequação dos eletrodos comumente utilizados para fins de permeação transdérmica. Dentre as características que estes dispositivos devem apresentar estão: i) flexibilidade adequada para que seja moldável a região de aplicação; ii) não oferecer resistência a passagem da corrente elétrica, não causando irritação a mucosa do paciente e o ressecamento do filme; iii) fácil aplicação e remoção após o procedimento e iv) custo acessível.

A Figura 22 mostra os dispositivos iontoforéticos desenvolvidos para a execução dos estudos de permeação. Para a finalidade proposta estes dispositivos se mostraram adequados. Além de serem facilmente confeccionados, se adaptaram corretamente as células de

permeação e permitiram a condução dos experimentos sem interrupção na corrente elétrica devido ao desgaste dos eletrodos ou ao não estabelecimento de contato adequado com as interfaces das mucosas. Além disto, não foram verificados aumento exacerbado da resistência nem sinais de queimaduras e perfurações nos epitélios no decorrer dos 60 min de experimentos.

Figura 22: Dispositivos iontoforéticos preparados a partir dos *patches* trilaminados.

Os perfis de permeação iontoforética e passiva dos anestésicos a partir dos *patches* trilaminados estão apresentados na Figura 23.

(a)

Figura 23: Perfis de permeação iônica e passiva do PCL (a) e LCL (b) a partir dos *patches* trilaminados. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

Os parâmetros cinéticos e as quantidades retidas no epitélio relacionada as permeações passiva e iônica do PCL e LCL a partir dos *patches* trilaminados são apresentados na Tabela 17.

Parâmetro	Fármaco			
	PCL		LCL	
	Passiva	Iônica	Passiva	Iônica
J ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$)	$0,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1^{***}$	$0,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2^{**}$
Lt (min)	$6,3 \pm 4,2$	$5,4 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,9^{**}$
$Kp \times 10^{-4}$ ($\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$)	$0,5 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,1^{***}$	$0,6 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2^{***}$
R^2	$0,96 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,01$
Q_{epit} ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	202 ± 4	$956 \pm 20^{***}$	204 ± 4	$967 \pm 19^{***}$
FP (-)	-	3	-	3,25

Tabela 17: Parâmetros cinéticos e quantidades de fármaco retidas no epitélio relacionados a permeação passiva e iônica do PCL e LCL a partir dos *patches* trilaminados. PCL: cloridrato de prilocaína; LCL: cloridrato de lidocaína; J , fluxo médio de permeação; Lt , lag time; Kp , coeficiente de permeabilidade; R^2 , coeficiente de determinação do modelo de regressão linear; Q_{epit} quantidade de fármaco retida no epitélio esofageal suíno; FP , fator de promoção da permeação; $^{**} p < 0,01$ e $^{***} p < 0,001$, quando comparado a permeação passiva (Teste t de Student); Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$).

O uso da técnica de iontoforese aumentou em cerca de 3 vezes os fluxos e os coeficientes de permeabilidade de ambos os fármacos. Os fluxos iônicos do LCL por nós observados estão próximos daqueles observados por Hu *et al* (2011a) na avaliação do

sinergismo entre a aplicação da iontoforese ($0,3 \text{ mA.cm}^{-2}$ por 8 horas) e diversos promotores químicos na permeação do LCL (2,5%) a partir de gel de carboximetilcelulose.

Outrossim, as quantidades retiradas no epitélio do PCL e LCL aumentaram cerca de 5 vezes. Ademais, houve diminuição de cerca de 50% o tempo de latência do LCL. Esses resultados ressaltam o caráter inovador de nosso trabalho e confirmam a aplicabilidade desta técnica de promoção de permeação não apenas para formulações líquidas e semissólidas, mas também para filmes poliméricos passíveis de hidratação quando em contatos com a mucosa bucal.

Possivelmente, ao realizarmos modificações na composição e arquitetura dos dispositivos iontoforéticos visando facilitar a hidratação da camada de liberação, a condução de corrente elétrica será favorecida. Assim, poderemos maximizar as quantidades dos fármacos mobilizadas para as fibras nervosas mais profundas.

5 CONCLUSÕES

- Os filmes apresentaram aspecto visual e flexibilidade adequados, além de elevada capacidade de veiculação de fármaco;
- HPMC K100 LV pode ser empregada com sucesso na obtenção de sistemas mucoadesivos de liberação de fármacos;
- A mistura dos fármacos na proporção 1:1 apresenta melhor relação custo/benefício;
- A massa molecular e a lipofilicidade exercem papel fundamental no comportamento de permeação do PCL e LCL;
- Os filmes apresentaram mucoadesão e propriedades mecânicas adequadas para a finalidade pretendida;
- A razão fármaco/polímero nos filmes modula seus desempenhos de liberação e permeação, além das propriedades mecânicas e de mucoadesão;
- A composição das camadas isolante e mucoadesiva, bem como suas disposições na arquitetura dos filmes multilaminados (*patches*) exercem efeito significativo no desempenho de liberação e permeação dos fármacos;
- A iontoforese pode ser empregada com sucesso na promoção da permeação de aminoamidas através do epitélio esofageal suíno a partir de filmes poliméricos hidrofílicos;

- A composição das camadas de liberação e mucoadesiva, bem como a arquitetura dos filmes devem ser modificadas para favorecer a hidratação da camada de liberação e, conseqüentemente, maximizar a promoção da permeação dos fármacos;
- Para que consigamos lograr êxito na substituição total das formas injetáveis, o filme mais promissor (F5) deverá sofrer alguns ajustes farmacotécnicos e tecnológicos para que a permeação dos fármacos seja aumentada em pelo 30 vezes;
- Este trabalho fornece subsídios para o aprimoramento de sistemas de liberação de anestésicos na cavidade bucal e contribui de forma inovadora para o manejo da dor em procedimentos odontológicos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-HUWAIJ, R. *et al.* Mucoadhesive dosage form of lidocaine hydrochloride: I. Mucoadhesive and physicochemical characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, p. 855–864, 2007.

ABU-HUWAIJ, R.; ASSAF, S. Potential mucoadhesive dosage form of lidocaine hydrochloride: II. *In vitro* and *in vivo* evaluation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 4, p. 437–448, 2007.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION (ADA). **Guideline for the use of sedation and general anesthesia by dentists**. 2007. Disponível em: <http://ada.org/sections/about/pdfs/anesthesia_guidelines.pdf. Acesso em 13/07/2013>.

ADELEKE, O. *et al.* Construction and *in vitro* characterization of an optimized porosity-enabled amalgamated matrix for sustained transbuccal drug delivery. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 391, n. 1-2, p. 79–89, 2010.

AGDAL, M. L. *et al.* Oral health and oral treatment needs in patients fulfilling the DSM-IV criteria for dental phobia. Possible influence on the outcome of cognitive behavioral therapy. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 66, n. 1, p. 1–6, 2008.

AGUIAR, F. A.; DE GAITANI, C. M.; BORGES, K. B. Capillary electrophoresis method for the determination of isradipine enantiomers: stability studies and pharmaceutical formulation analysis. **Electrophoresis**, v. 32, n. 19, p. 2673–2682, 2011.

AL-MELH, M.; ANDERSSON, L. Comparison of topical anesthetics (EMLA/Oraqix vs. benzocaine) on pain experienced during palatal needle injection. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 103, n. 5, p. 16–20, 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. Designation: D 882 – 02, 2002.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505–518, 2009.

ARAUJO, D. R. DE *et al.* Bioadhesive Films Containing Benzocaine : Correlation Between In Vitro Permeation and In Vivo Local Anesthetic Effect. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 1677–1686, 2010.

ARMFIELD, J. Australian population norms for the Index of Dental Anxiety and Fear (IDAF-4C). **Australian Dental Journal**, v. 56, p. 16–22, 2011.

BÅGESUND, M.; TABRIZI, P. Lidocaine 20% patch vs lidocaine 5% gel for topical anaesthesia of oral mucosa. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 18, p. 452–460, 2008.

BARMPALEXIS, P. *et al.* Artificial neural networks in the optimization of a nimodipine controlled release tablet formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 2, p. 316–323, 2010.

BECKER, D. E.; REED, K. L. Essentials of local anesthetic pharmacology. **Anesthesia Progress**, v. 53, n. 3, p. 98–108; quiz 109–110, 2006.

BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O. Oral Bioadhesive Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 3, p. 293–310, 2005.

BUKKA, R.; PRAKASAM, K.; PATEL, C. D. Preparation and Evaluation of Intraoral Drug Delivery System for Rasagiline mesylate. **Receptor**, v. 2, n. 4, p. 294–301, 2010.

BURSELL, B.; RATZAN, R.; SMALLY, A. Lidocaine toxicity misinterpreted as a stroke. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. X, n. 4, p. 292–294, 2009.

CALEFI, P. L. **Avaliação clínica de um dispositivo polimérico não invasivo desenvolvido para anestesia local**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2013, 83 p.

CAMPISI, G. *et al.* Bioavailability *in vivo* of naltrexone following transbuccal administration by an electronically-controlled intraoral device: a trial on pigs. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 214–220, 2010.

CAON, T.; SIMÕES, C. M. O. Effect of freezing and type of mucosa on *ex vivo* drug permeability parameters. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 2, p. 587–592, 2011.

CARR, M.; HORTON, J. Evaluation of a transoral delivery system for topical anesthesia. **The Journal of the American Dental Association**, v. 132, n. 12, p. 1714–1719, 2001.

CARVALHO, J. Farmacologia dos anestésicos locais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 44, n. 1, p. 75–82, 1994.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1–17, 2010.

CAVALLARI, C.; FINI, A.; OSPITALI, F. Mucoadhesive multiparticulate patch for the intrabuccal controlled delivery of lidocaine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 3, p. 405–414, abr. 2013.

CEREDA, C. *et al.* Liposomal prilocaine: preparation, characterization, and *in vivo* evaluation. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 235–240, 2004.

CEREDA, C. *et al.* Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 53, n. 11, p. 1092–1097, 2006.

CHAKRABORTY, P. *et al.* Mathematical optimization and characterisation of pharmaceutically developed novel buccoadhesive wafers for rapid bioactive delivery of Loratadine. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 43, n. 2, p. 133–143, 2013.

CHAKRABORTY, S. *et al.* Effects of drug solubility on the release kinetics of water soluble and insoluble drugs from HPMC based matrix formulations. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, p. 313–323, 2009.

CHOPRA, S. *et al.* Optimisation of polyherbal gels for vaginal drug delivery by Box-Behnken statistical design. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 120–131, 2007.

CHUNG, J.-E. *et al.* Effect of Eutectic Mixture of Local Anesthetics on Pain Perception During Scaling by Ultrasonic or Hand Controlled Trial. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 2, p. 259–266, 2011.

CIACH, T.; MOSCICKA-STUDZINSKA, A. Buccal iontophoresis : an opportunity for drug delivery and metabolite monitoring. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 7-8, p. 361–366, 2011.

CILURZO, F. *et al.* Diclofenac fast-dissolving film: suppression of bitterness by a taste-sensing system. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 3, p. 252–259, 2011.

CLARK, T. M.; YAGIELA, J. A. Advanced techniques and armamentarium for dental local anesthesia. **Dental clinics of North America**, v. 54, n. 4, p. 757–768, 2010.

CUBAYACHI, C. **Desenvolvimento de sistemas semi-sólidos mucoadesivos para liberação de anestésico e aplicação de iontoforese na cavidade bucal.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2014, 90 p.

DEL CONSUELO, I. D. *et al.* Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 12, p. 981–987, 2005a.

DEL CONSUELO, I. D. *et al.* Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 12, p. 2777–2788, 2005b.

DIONNE, R. A. *et al.* Assessing the need for anesthesia and sedation in the general population. **Journal of the American Dental Association**, v. 129, n. 2, p. 167–173, 1998.

DIXIT, R. P.; PUTHLI, S. P. Oral strip technology : Overview and future potential. **Journal of Controlled Release**, v. 139, n. 2, p. 94–107, 2009.

EITNER, S. *et al.* Dental anxiety - an epidemiological study on its clinical correlation and effects on oral health. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 33, n. 8, p. 588–593, 2006.

ELMESHAD, A. N.; EL HAGRASY, A. S. Characterization and optimization of orodispersible mosapride film formulations. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1384–92, 2011.

FIALA, S.; BROWN, M. B.; JONES, S. A. An investigation into the influence of binary drug solutions upon diffusion and partition processes in model membranes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 12, p. 1615–1623, 2008.

FIALA, S.; JONES, S. A.; BROWN, M. B. A fundamental investigation into the effects of eutectic formation on transmembrane transport. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, n. 1-2, p. 68–73, 2010.

FRANZ-MONTAN, M. *et al.* Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. **Anesthesia and Analgesia**, v. 104, n. 6, p. 1528–1531, 2007.

FRANZ-MONTAN, M. *et al.* Pharmacokinetic profile of liposome-encapsulated ropivacaine after maxillary infiltration anaesthesia. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1945–1951, 2010a.

FRANZ-MONTAN, M. *et al.* Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 110, n. 6, p. 800–804, 2010b.

FRANZ-MONTAN, M. *et al.* Liposomal delivery system for topical anaesthesia of the palatal mucosa. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 50, n. 1, p. 60–64, 2012.

FRANZ-MONTAN, M. *et al.* Liposomal-benzocaine gel formulation: correlation between *in vitro* assays and *in vivo* topical anesthesia in volunteers. **Journal of Liposome Research**, v. 23, n. 1, p. 54–60, 2013.

GAJDZIOK, J. *et al.* Oxycellulose as mucoadhesive polymer in buccal tablets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 9, p. 1115–1130, 2010.

GANGAROSA, L. P.; HILL, J. M. Modern iontophoresis for local drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 123, p. 159–171, 1995.

GATCHEL, R. J. *et al.* The prevalence of dental fear and avoidance: a recent survey study. **Journal of the American Dental Association**, v. 107, n. 4, p. 609–610, 1983.

GIANNOLA, L. I. *et al.* Release of naltrexone on buccal mucosa: permeation studies, histological aspects and matrix system design. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 2, p. 425–433, 2007.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.; LOPEZ, R. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490–1498, 2008.

HERSH, E. *et al.* Analgesic efficacy and safety of an intraoral lidocaine patch. **The Journal of the American Dental Association**, v. 127, n. 11, p. 1626–1634, 1996.

HIGGINS, M. Dental Anesthesiology - An Access to Care Issue. **Alpha Omegan**, v. 99, n. 2, p. 56–63, 2006.

HILL, K. B. *et al.* Adult Dental Health Survey 2009: Relationships between dental attendance patterns, oral health behaviour and the current barriers to dental care. **British Dental Journal**, v. 214, n. 1, p. 25–32, 2013.

HIORTH, M. The formation and permeability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 2, p. 175–181, 2003.

HU, L. *et al.* Transdermal and transbuccal drug delivery systems: Enhancement using iontophoretic and chemical approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, n. 1, p. 53–62, 2011a.

HU, L. *et al.* Enhanced in vitro transbuccal drug delivery of ondansetron HCl. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 66–74, 2011b.

JUG, M. *et al.* Preparation and solid-state characterization of bupivacaine hydrochloride cyclodextrin complexes aimed for buccal delivery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 9–18, 2010.

KALIA, Y. N. *et al.* Iontophoretic drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 619–658, 2004.

KALOGERAS, I. M. A novel approach for analyzing glass-transition temperature vs. composition patterns: application to pharmaceutical compound+polymer systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 5, p. 470–483, 2011.

KANG, C.; SHIN, S. Preparation and Evaluation of Bioadhesive Dibucaine Gels for Enhanced Local Anesthetic Action. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 8, p. 1277–1283, 2010.

KANG, C.; SHIN, S. Development of prilocaine gels for enhanced local anesthetic action. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 7, p. 1197–1204, 2012.

KASHA, P. C.; BANGA, A. K. A review of patent literature for iontophoretic delivery and devices. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 2, n. 1, p. 41–50, 2008.

KAUNISTO, E. *et al.* Mechanistic modelling of drug release from polymer-coated and swelling and dissolving polymer matrix systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 54–77, 2011.

KHUTORYANSKIY, V. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, p. 748–764, 2011.

KOHDA, Y. *et al.* Controlled release of lidocaine hydrochloride from buccal mucosa-adhesive films with solid dispersion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, p. 147–155, 1997.

KOKATE, A. *et al.* Effect of thermodynamic activities of the unionized and ionized species on drug flux across buccal mucosa. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 10, p. 4294–4306, 2008.

KOKATE, A. *et al.* *In silico* prediction of drug permeability across buccal mucosa. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1130–1139, 2009.

KORSMEYER, R.; GURNY, R.; DOELKER, E. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25–35, 1983.

KORSMEYER, R.; PEPPAS, N. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. **Journal of Membrane Science**, v. 9, p. 211–227, 1981.

KREIDER, K. *et al.* Reducing children's injection pain: lidocaine patches versus topical benzocaine gel. **Pediatric Dentistry**, v. 23, n. 1, p. 19–23, 2001.

KUDO, M. Initial injection pressure for dental local anesthesia: effects on pain and anxiety. **Anesthesia Progress**, v. 52, p. 95–101, 2005.

KULKARNI, U. *et al.* Porcine buccal mucosa as *in vitro* model: effect of biological and experimental variables. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1265–1277, 2010.

KUMAR, T.; SA, B. Statistical Evaluation of Influence of Polymers Concentration on Disintegration Time and Diazepam Release from Quick Disintegrating Rapid Release Tablet. **Yakugaku zasshi Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 129, n. 9, p. 1069–1075, 2009.

KUROSAKI, Y.; VANO, K.; KIMURA, T. Perfusion cells for studying regional variation in oral-mucosal permeability in humans. I: Kinetic aspects in oral-mucosal absorption of alkylparabens. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 9, p. 1241–1245, 1997.

LAGAN, G.; MCLURE, H. Review of local anaesthetic agents. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 71, n. 3, p. 59–74, 2005.

LATE, S. G.; BANGA, A. K. Response Surface Methodology to Optimize Novel Fast Disintegrating Tablets Using β Cyclodextrin as Diluent. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 4, p. 1627–1635, 2010.

LEOPOLD, A. *et al.* Pharmacokinetics of lidocaine delivered from a transmucosal patch in children. **Anesthesia Progress**, v. 49, p. 82–87, 2002.

LOPES, C.; LOBO, J.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LUND, E. Guldberg and Waage and the law of mass action. **Journal of Chemical Education**, v. 42, n. 10, p. 548–550, 1965.

MALAMED, S. F. Pharmacology of local anesthetics. In: STANLEY F. MALAMED (Ed.). **Handbook of Local Anesthesia, 6th Edition**, Cap 2, Elsevier, 2013. p. 25–38.

MALAMED, S. F.; FALKEL, M. Advances in local anesthetics: pH buffering and dissolved CO₂. **Dentistry Today**, v. 31, n. 5, p. 88–93, 2012.

MANADAS, R.; PINA, M.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 375–399, 2002.

MANTELLE, J. A. *et al.* Oral Transmucosal Systems for Local Anesthetics: Dental and Oral Surgical Premedication. In: TAPASH K. GHOSH and WILLIAM R. PFISTER (Eds.). **Drug Delivery to the Oral Cavity: Molecules to Market**. Cap. 10, Informa Healthcare, 2005. p. 233–259.

MASHRU, R. C. *et al.* Development and Evaluation of Fast-Dissolving Film of Salbutamol Sulphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 1, p. 25–34, 2005.

MCGRATH, C.; BEDI, R. The association between dental anxiety and oral health-related quality of life in Britain. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 32, n. 1, p. 67–72, 2004.

MCMILLAN, A. S.; WALSHAW, D.; MEECHAN, J. G. The efficacy of Emla and 5% lignocaine gel for anaesthesia of human gingival mucosa. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 38, p. 58–61, 2000.

MEECHAN, J. G. Intra-oral topical anaesthetics : a review. **Journal of Dentistry**, v. 28, p. 3–14, 2000.

MEECHAN, J. G. The use of EMLA for an intraoral soft-tissue biopsy in a needle phobic: a case report. **Anesthesia Progress**, v. 48, n. 01, p. 32–34, 2001.

MOORE, P. A; HERSH, E. V. Local Anesthetics: Pharmacology and Toxicity. **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 4, p. 587–599, 2010.

MOPPETT, I. K.; SZYPULA, K.; YEOMAN, P. M. Comparison of EMLA and lidocaine iontophoresis for cannulation analgesia. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 21, n. 3, p. 210–213, 2004.

MORAES, C. *et al.* Benzocaine loaded biodegradable poly-(d, l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. **Materials Science and Engineering B**, v. 165, p. 243–246, 2009a.

MORAES, C. *et al.* Encapsulation of local anesthetic bupivacaine in biodegradable poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres: Factorial design, characterization and cytotoxicity studies. **Macromolecular Symposia**, v. 281, p. 106–112, 2009b.

MORALES, J. O.; MCCONVILLE, J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 187–199, 2011.

MOSCICKA-STUDZINSKA, A.; KIJENSKA, E.; CIACH, T. Electroosmotic flow as a result of buccal iontophoresis–Buccal mucosa properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 595–599, 2009.

NAIR, A. B. *et al.* *In vitro* techniques to evaluate buccal films. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 1, p. 10–21, 2013.

NAIR, R.; NYAMWEYA, N. Influence of various drugs on the glass transition temperature of poly (vinylpyrrolidone): a thermodynamic and spectroscopic investigation. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 225, p. 83–96, 2001.

OGLE, O. E.; MAHJOUBI, G. Advances in local anesthesia in dentistry. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 3, p. 481–499, 2011.

OH, D.-H. *et al.* Enhanced transbuccal salmon calcitonin (sCT) delivery: effect of chemical enhancers and electrical assistance on *in vitro* sCT buccal permeation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 357–363, 2011.

OKAMOTO, H. *et al.* Development of polymer film dosage forms of lidocaine for buccal administration: II. Comparison of preparation methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 11, p. 2424–2432, 2002.

P. SAXENA, S. K. GUPTA, V. NEWASKAR, A. C. Advances in dental local anesthesia techniques and devices: An update. **National Journal of Maxillofacial Surgery**, v. 4, n. 1, p. 19–24, 2013.

PADULA, C. *et al.* *In vitro* evaluation of mucoadhesive films for gingival administration of lidocaine. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 4, p. 1279–1283, 2013.

PANCHAL, M. *et al.* Formulation and Evaluation of Mouth Dissolving Film of Ropinirole Hydrochloride by Using Pullulan Polymers. **International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences**, v. 1, n. 2012, p. 60–72, 2012.

PATEL, V. F.; LIU, F.; BROWN, M. B. Advances in oral transmucosal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 2, p. 106–116, 2011.

PATHER, S. I.; RATHBONE, M. J.; SENEL, S. Current status and the future of buccal drug delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 5, p. 531–542, 2008.

PATIL, S.; SAWANT, K. Development, optimization and *in vitro* evaluation of alginate mucoadhesive microspheres of carvedilol for nasal delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 5, p. 432–443, 2009.

PIGNATELLO, R.; BASILE, L.; PUGLISI, G. Chitosan glutamate hydrogels with local anesthetic activity for buccal application. **Drug delivery**, v. 16, n. August 2008, p. 176–181, 2009.

POHJOLA, V. *et al.* Dental fear and subjective oral impacts among adults in Finland. **European Journal of Oral Sciences**, v. 117, n. 3, p. 268–272, 2009.

POLAT, B. E. *et al.* Transport Pathways and Enhancement Mechanisms Within Localized and Non-Localized Transport Regions in Skin Treated with Low-Frequency Sonophoresis and Sodium Lauryl Sulfate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 2, p. 512–529, 2011.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1261–1268, 2008.

PREIS, M. *et al.* Design and evaluation of bilayered buccal film preparations for local administration of lidocaine hydrochloride. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 552–561, 2014.

RAO, K. V. R.; BURI, P. A novel *in situ* method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 52, p. 265–270, 1989.

REPKA, M. *et al.* Characterization of cellulosic hot-melt extruded films containing lidocaine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 189–196, 2005.

RITGER, P.; PEPPAS, N. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37–42, 1987.

ROSSI, S.; SANDRI, G.; CARAMELLA, C. M. Buccal drug delivery: A challenge already won? **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, n. 1, p. 59–65, 2005.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition**. Pharmaceutical Press, 2009. 917 p.

SACHDEVA, S.; GUPTA, R.; GUPTA, G. Iontophoresis and Dentistry. **Journal of the Indian Dental Association**, v. 5, n. 1, p. 46–48, 2011.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1666–1691, 2005.

SHARMA, V.; PHILIP, A.; PATHAK, K. Modified polysaccharides as fast disintegrating excipients for orodispersible tablets of roxithromycin. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 87–94, 2008.

SHOJAEI, A H.; BERNER, B.; XIAOLING, L. Transbuccal delivery of acyclovir: I. *In vitro* determination of routes of buccal transport. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 8, p. 1182–1188, 1998.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxipropylmethylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 163–174, 2012.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 328–343, 2008.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 351–362, 2012.

SINGH, J.; PHILIP, A.; PATHAK, K. Optimization studies on design and evaluation of orodispersible pediatric formulation of indomethacin. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 60–66, 2008.

SMITH, T. A.; HEATON, L. J. Fear of dental care: are we making any progress? **Journal of the American Dental Association**, v. 134, n. 8, p. 1101–1108, 2003.

SNEJDROVA, E.; DITTRICH, M. Pharmaceutically Used Plasticizers. In: MOHAMMAD LUQMAN (Ed.). **Recent advances in plastisizers**. 1. ed., Cap. 3, InTech, 2012. p. 45–68.

SOHI, H. *et al.* Critical evaluation of permeation enhancers for oral mucosal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 3, p. 254–282, 2010.

SOKOLOWSKI, C. J.; GIOVANNITTI JR, J. A.; BOYNES, S. G. Needle phobia: etiology, adverse consequences, and patient management. **Dental clinics of North America**, v. 54, n. 4, p. 731–744, 2010.

SQUIER, C. A.; COX, P.; WERTZ, P. W. Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 96, n. 1, p. 123–126, 1991.

STECKER, S.; SWIFT, J. Should a mucoadhesive patch (DentiPatch) be used for gingival anesthesia in children? **Anesthesia Progress**, v. 49, n. 3, p. 3–8, 2002.

STOLTENBERG, J. *et al.* A preliminary study of intra-pocket topical *versus* injected anaesthetic for scaling and root planing. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, p. 892–896, 2007.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery — A promising option for orally less efficient drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 15 – 40, 2006.

SUN, Y. *et al.* Application of artificial neural networks in the design of controlled release drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1201–1215, 2003.

TAWARE, C. P. *et al.* A bioadhesive delivery system as an alternative to infiltration anesthesia. **Pathology**, v. 84, n. 6, p. 609–615, 1997.

THAKUR, R. A; MICHNIAK, B. B.; MEIDAN, V. M. Transdermal and buccal delivery of methylxanthines through human tissue *in vitro*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 5, p. 513–521, 2007.

VAROLI, F. K. Adapted Version of the McGill Pain Questionnaire to Brazilian Portuguese. **Dental Materials**, v. 17, p. 328–335, 2006.

VARSHOSAZ, J.; KARIMZADEH, S. Development of cross-linked chitosan films for oral mucosal delivery of lidocaine. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 43–52, 2007.

VETCHY, D. *et al.* Determination of dependencies among *in vitro* and *in vivo* properties of prepared mucoadhesive buccal films using multivariate data analysis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, p. 498–506, 2014.

VICKERS, E. R. *et al.* Pharmacokinetics of EMLA cream 5% application to oral mucosa. **Anesthesia Progress**, v. 44, n. 1, p. 32–37, 1997.

WEI, R. *et al.* Effects of iontophoresis and chemical enhancers on the transport of lidocaine and nicotine across the oral mucosa. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 4, p. 961–971, 2012.

WHITE, E.; ORAZEM, M.; BUNGE, A. Single-Frequency LCR Databridge Impedance Measurements as Surrogate Measures for the Integrity of Human Skin. **ECS Transactions**, v. 41, n. 28, p. 3–14, 2012.

WONG, C. F.; YUEN, K. H.; PEH, K. K. An *in vitro* method for buccal adhesion studies: importance of instrument variables. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 180, n. 1, p. 47–57, 1999.

WOOLFSON, A. D. *et al.* Freeze-dried , mucoadhesive system for vaginal delivery of the HIV microbicide , dapivirine: Optimisation by an artificial neural network. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, p. 136–143, 2010.

WU, S.; JULLIARD, K. Children's preference of benzocaine gel *versus* the lidocaine patch. **Pediatric dentistry**, v. 25, n. 4, p. 401–405, 2002.

YAMAMURA, K. *et al.* Oral Mucosal Adhesive Film Containing Local Anesthetics : *In Vitro* and Clinical Evaluation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 43, n. 3, p. 313–317, 1997.

ZAGO, P. M. W. *et al.* Anesthetic efficacy of liposomal prilocaine in maxillary infiltration anesthesia. **Journal of Liposome Research**, v. 21, n. March 2010, p. 81–87, 2011.