UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de sistemas semi-sólidos mucoadesivos para
liberação de anestésico e aplicação de iontoforese na cavidade bucal

Camila Cubayachi

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de sistemas semi-sólidos mucoadesivos para
liberação de anestésico e aplicação de iontoforese na cavidade bucal

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Camila Cubayachi

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca
Vianna Lopez

Ribeirão Preto
2014

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.

Cubayachi, Camila.

Desenvolvimento de sistemas semi-sólido mucoadesivos para liberação de anestésico e aplicação de iontoforese na cavidade bucal. Ribeirão Preto, 2014.

90 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Lopez, Renata Fonseca Vianna.

1. Anestésicos. 2. Bucal. 3. Iontoforeses. 4. Mucoadesão.
5. Lidocaína. 6. Prilocaína.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Camila Cubayachi

Título do trabalho: Desenvolvimento de sistemas semi-sólidos mucoadesivos para liberação de anestésico e aplicação de iontoforese na cavidade bucal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, pela minha vida, por guiar meu caminho e pelos sonhos que me permite realizar.

Aos meus pais, Fausto e Solange, por estarem sempre presentes e não medirem esforços em oferecer apoio, incentivo, dedicação e seu amor incondicional.

À minha irmã Gabriela, com quem sempre posso contar com toda confiança, apoio e amizade.

Aos meus avós, Wanir e Geraldo, por todo seu apoio, cuidado e carinho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, pela oportunidade de aprendizado, confiança, paciência, apoio, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas, pela disponibilidade, dedicação, amizade e por toda sabedoria transmitida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas, ao Prof. Dr. Vinicius Pedrazzi, à Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani, ao Renê, Paulo e Talita, integrantes da equipe científica, por acreditarem nesta proposta, pelas contribuições e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica: Bia, Daniela, Danielle, Estael, Joel, Karina, Laura, Lucas, Natália, Raquel, Tatiana, Yomi e também ao Silas e Francisco, que compartilharam o cotidiano de bancadas, experiências e bons momentos.

Aos amigos do Laboratório de Farmacotécnica: Renê e Talita, pela ajuda, dedicação, apoio e confiança; Andrea, Maíra e Maria Paula, pelo incentivo, apoio e carinho; à Patrícia, pelo auxílio na interpretação dos resultados de DSC e também à Kariane, Fred, Danilo, Amanda e a todos que dividiram cafés e conversas.

À Patrícia, técnica do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, ao Zé Maria, técnico do laboratório de Farmacotécnica e ao Zé Luiz, pela amizade e disponibilidade em ajudar.

À Aurea, técnica do laboratório Processos Industriais Farmacêuticos e Biotecnológicos, pela realização das análises de DSC.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e aos funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP-USP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) (Proc. 472817/2012-4) pelo suporte financeiro.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado (Proc. 2012/05644-0) e pelo suporte financeiro (Proc. 2013/12174-3) concedido a este projeto.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"E bem pode ser que as pessoas descubram no fascínio do conhecimento uma boa razão para viver, se elas forem sábias o bastante para isto, e puderem suportar a convivência com o erro, o não saber e, sobretudo, se não morrer nelas o permanente encanto com o mistério do universo."

Rubem Alves

RESUMO

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

A anestesia local da cavidade bucal é uma etapa fundamental na maioria dos procedimentos odontológicos. A administração não-invasiva efetiva de anestésicos locais na cavidade bucal visando substituir as doloridas injeções, possibilitaria o aprimoramento de procedimentos rotineiros e cirúrgicos. No entanto, a anestesia profunda e pelo tempo adequado de regiões estratégicas da mucosa bucal requer a penetração do anestésico em quantidades efetivas. A combinação dos cloridratos de lidocaína (LCL) e prilocaína (PCL) é uma estratégia interessante do ponto de vista farmacocinético, visto que a lidocaína inicia sua ação mais rapidamente, porém a prilocaína apresenta uma potência maior. A velocidade de liberação e permeação dos fármacos pode ser aumentada e modulada através da aplicação da iontoforese. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a influência da iontoforese na permeação de PCL e LCL através de mucosa esofageal suína a partir de uma formulação semi-sólida mucoadesiva. Para tanto, um hidrogel à base de hidroxipropilmetilcelulose foi desenvolvido e o efeito do pH (5,8 e 7,0) avaliado em função da iontoforese (1 mA/cm² por 60 minutos). Um método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência foi validado para quantificação simultânea dos fármacos, apresentando satisfatória seletividade, linearidade no intervalo de 0,25 a 10 µg/mL, sensibilidade, precisão, exatidão e robustez. A recuperação dos fármacos a partir da mucosa esofageal suína forneceu níveis adequados conforme preconizado pela literatura. A formulação desenvolvida apresentou uniformidade de conteúdo e propriedades mecânicas e mucoadesivas adequadas para a aplicação bucal. A combinação dos fármacos na formulação não ocasionou a formação de uma mistura eutética, porém promoveu mudanças nos coeficientes de distribuição mucosa/formulação do PCL, tendo maior caráter hidrofílico em pH 7,0 e maior caráter hidrofóbico em pH 5,8. Nos estudos de permeação *in vitro* através de mucosa esofageal suína, a iontoforese a partir da formulação pH 7,0 foi capaz de aumentar as quantidades de PCL permeada e recuperada da mucosa quando isolada e combinada na formulação. Porém, as quantidades de LCL foram aumentadas por iontoforese apenas na mucosa quando combinada ao PCL. A iontoforese a partir da formulação contendo os fármacos isolados em pH 5,8, com o intuito de promover maior ionização dos fármacos, aumentou o fluxo do PCL e do LCL. No entanto, o fluxo passivo foi menor em pH 5,8 e o maior aumento de fluxo proporcionado pela iontoforese neste pH não acarretou em maiores quantidades de fármaco permeadas. O pré-tratamento da mucosa com LCL aumentou ligeiramente o fluxo passivo do PCL, porém quando a iontoforese foi aplicada, tanto o fluxo quanto o acúmulo do PCL na mucosa diminuíram após o pré-tratamento. Assim, para a anestesia não invasiva em procedimentos odontológicos, é recomendável aplicar a iontoforese diretamente na formulação que contém a combinação de PCL e LCL, em pH 7,0. Desta forma, alia-se início de ação mais rápido (LCL) e potência (PCL) e alcançam-se maiores quantidades permeadas e retidas na mucosa para ambos os fármacos.

Palavras-chave: Anestesia, bucal, iontoforese, mucoadesão, lidocaína, prilocaína.

ABSTRACT

CUBAYACHI, C. **Development of mucoadhesive semisolid systems for anesthetic release and iontophoresis application on the buccal cavity.** 2014. 90f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Local anesthesia of the oral cavity is a key step in most dental procedures. The effective non-invasive administration of local anesthetics in the oral cavity, in order to replace the painful injections, would enable the improvement of routine and surgical procedures. However, deep anesthesia for a suitable period of time of strategic regions of the oral mucosa requires penetration of the anesthetic in effective amounts. The combination of lidocaine hydrochloride (LCL) and prilocaine (PCL) is an interesting strategy, since lidocaine begins to act more quickly, but prilocaine has a higher potency. The rate of release and permeation of drugs can be enhanced and modulated by the application of iontophoresis. The objective of this study was to evaluate *in vitro* the influence of iontophoresis on the permeation of PCL and LCL through porcine esophageal mucosa from a mucoadhesive semisolid formulation. Thus, a hydroxypropyl methylcellulose hydrogel was developed and the effect of pH (5.8 and 7.0) evaluated in function of iontophoresis (1 mA/cm² for 60 minutes). An analytical method of high performance liquid chromatography was validated for the simultaneous quantification of drugs with satisfactory selectivity, linearity in the range 0.25 to 10 µg/mL, sensitivity, precision, accuracy and robustness. The recovery of the drugs from the porcine esophageal mucosa provided adequate levels, as related in the literature. The formulation developed had uniformity of content and mechanical and mucoadhesive properties suitable for buccal application. The combination of the drugs at the formulation did not cause the formation of an eutectic mixture, but provided changes in the distribution coefficients (mucosa/formulation) of PCL, having greater hydrophilicity at pH 7.0 and higher hydrophobic character at pH 5.8. Regarding the *in vitro* permeation studies across porcine esophageal mucosa, iontophoresis from the formulation at pH 7.0 was able to increase the amounts of PCL permeated and recovered when isolated and combined at the formulation. For LCL, the amount was enhanced by iontophoresis only at the mucosa when the drug was associated with PCL. Iontophoresis from the formulation at pH 5.8, in order to promote higher ionization of the drugs, increased the flow of PCL and the LCL. However, the passive flux was lower at pH 5.8 and the greater increase of flow provided by iontophoresis at this pH did not result in higher amounts of total permeated drug. Pretreatment of the mucosa with LCL slightly increased passive flux of PCL, but when the iontophoresis was applied, both the flow and the amount of PCL recovered from the mucosa decreased after pretreatment. Thus, for a non-invasive anesthesia for dental procedures, it is recommended to apply iontophoresis directly at the formulation containing the combination of PCL and LCL, at pH 7.0. Therefore, it combines a faster onset of action (LCL) and higher potency (PCL), providing larger amounts permeated and recovered from the mucosa for both drugs.

Keywords: Anesthesia, buccal, iontophoresis, mucoadhesion, lidocaine, prilocaine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática da mucosa bucal	04
Figura 2.	Representação esquemática dos diferentes revestimentos de mucosa na boca	05
Figura 3.	Representação esquemática das rotas de permeação através da mucosa bucal.....	06
Figura 4.	Estrutura química do cloridrato de lidocaína.....	08
Figura 5.	Estrutura química do cloridrato de prilocaína.....	09
Figura 6.	Representação dos mecanismos envolvidos na iontoforese	11
Figura 7.	Aparato utilizado para determinação do tempo de permanência.....	24
Figura 8.	Obtenção do eletrodo negativo (cátodo).....	26
Figura 9.	Preparo do ânodo em solução salina (5,78 M NaCl) com corrente elétrica de 0,4 mA por 16 h.....	26
Figura 10.	Representação da célula de difusão vertical e seus componentes ..	27
Figura 11.	Perfil cromatográfico de solução de trabalho contendo PCL e LCL na concentração de 2,5 µg/mL	32
Figura 12.	Perfis cromatográficos das amostras de (a) saliva artificial, (b) branco da formulação e (c) mucosa esofageal suína	34
Figura 13.	Gráficos de Pareto representando os efeitos dos fatores avaliados na área do pico de PCL, área do pico de LCL, número de pratos de PCL, número de pratos de LCL, fator de cauda de PCL, fator de cauda de LCL e resolução PCL e LCL	38
Figura 14.	Determinação dos coeficientes de distribuição mucosa esofageal/formulação (hidrogel de HPMC 5% nos pHs 7,0 e 5,8)	42
Figura 15.	Termogramas de A) gel HPMC, B) gel HPMC + PCL, C) gel HPMC + LCL e D) gel HPMC + PCL + LCL.....	43
Figura 16.	Ruptura da ligação mucoadesiva entre a formulação e a mucosa bucal suína	48
Figura 17.	Formulação (setas) aderida na mucosa no início (A) e ao final de 1 hora de experimento (B)	49
Figura 18.	Perfil de permeação passiva e iontoforética do PCL isolado e combinado com LCL a partir do gel de HPMC pH 7 contendo os fármacos incorporados na concentração de 2,5% cada	52

Figura 19.	Perfil de permeação passiva e iontoforética do LCL isolado e combinado com PCL, a partir do gel de HPMC pH 7 contendo os fármacos incorporados na concentração de 2,5% cada	53
Figura 20.	Quantidade total de PCL e LCL recuperados da mucosa após 60 min ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), a partir do gel de HPMC pH 7 contendo os fármacos incorporados isoladamente ou combinados, na concentração de 2,5% cada	54
Figura 21.	Perfil de permeação passiva e iontoforética do PCL a partir do gel de HPMC pH 5,8 contendo os fármacos incorporados isoladamente e em combinação com o LCL na concentração de 2,5% cada.....	57
Figura 22.	Perfil de permeação passiva e iontoforética do LCL a partir do gel de HPMC pH 5,8 contendo os fármacos incorporados isoladamente e em combinação com o PCL na concentração de 2,5% cada.....	57
Figura 23.	Quantidade total ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de PCL e LCL recuperados da mucosa após 1 hora ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir do gel de HPMC pH 5,8 contendo os fármacos incorporados isoladamente ou em associação (combinados), na concentração de 2,5% cada.....	59
Figura 24.	Fluxo de PCL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{minuto}$) através da mucosa pré-tratada ou não com solução de LCL a 2,5% por 1 hora, a partir do gel de HPMC pH 7 contendo 2,5% de PCL, na ausência e presença de corrente elétrica.....	61
Figura 25.	Quantidade de PCL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) recuperada da mucosa após 1 hora de permeação a partir do gel de HPMC pH 7 contendo 2,5% de PCL, pela mucosa pré-tratada ou não com solução de LCL 2,5% por 1 h, na ausência e presença de corrente elétrica	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades físico-químicas de PCL e LCL	09
Tabela 2.	Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com valores codificados.....	20
Tabela 3.	Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com valores decodificados.....	20
Tabela 4.	Composição dos hidrogéis.....	21
Tabela 5.	Resultados do teste de adequabilidade do sistema.....	32
Tabela 6.	Linearidade e sensibilidade do método analítico	35
Tabela 7.	Precisão e exatidão do método analítico	36
Tabela 8.	Recuperação de PCL e LCL a partir de mucosa esofageal suína ...	39
Tabela 9.	Parâmetros da Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	44
Tabela 10.	Propriedades mecânicas dos géis HPMC contendo PCL e LCL, a 25 e 37°C.....	45
Tabela 11.	Parâmetros de mucoadesão do gel de HPMC contendo PCL e LCL, em diferentes tempos de contato	47
Tabela 12.	Fluxos do PCL e do LCL em pH 7,0	53
Tabela 13.	Fluxos do PCL e do LCL em pH 5,8	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APT	Análise do perfil de textura
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coeficiente de variação
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EMLA	<i>Eutetic Mixture of Local Anesthetics</i>
ER	Erro relativo
FDA	<i>USA Food and Drug Administration</i>
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
LCL	Cloridrato de lidocaína
LD	Limite de detecção
LogD	Logaritmo do Coeficiente de Distribuição
LogP	Logaritmo do Coeficiente de Partição
LQ	Limite de quantificação
PCL	Cloridrato de prilocaína
pKa	Constante de dissociação acídica

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1. Mucosa bucal como sítio para liberação de fármacos.....	04
2.2. Cloridratos de prilocaína e lidocaína	08
2.3. Iontoforese	10
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo	13
3.2. Metas.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Material.....	14
4.1.1. Substâncias químicas, reagentes, solventes e adjuvantes	14
4.1.2. Equipamentos e Acessórios	14
4.1.3. Mucosa.....	15
4.1.4. Saliva Artificial	15
4.2. Métodos.....	16
4.2.1. Adequação e validação de método para quantificação dos fármacos em solução, nas formulações e em tecido biológico	16
4.2.1.1. Desenvolvimento do método	16
4.2.1.2. Avaliação dos parâmetros de adequabilidade do sistema (<i>System Suitability</i>).....	17
4.2.1.3. Validação do método.....	17
4.2.2. Recuperação a partir da mucosa esofageal	20
4.2.3. Preparo de sistemas semi-sólidos mucoadesivos	21

4.2.4. Caracterização das formulações	21
4.2.4.1. Determinação do Coeficiente de Distribuição ($K_{mucosa/formulação}$)..	21
4.2.4.2. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	22
4.2.4.3. Determinação da uniformidade de conteúdo	22
4.2.4.4. Avaliação das propriedades mecânicas	22
4.2.4.5. Determinação da força mucoadesiva	23
4.2.4.6. Avaliação <i>in vitro</i> do tempo de permanência	23
4.2.5. Estudos <i>in vitro</i> de permeação passiva e Iontoforese	24
4.2.5.1. Avaliação da resistência à passagem de corrente elétrica	24
4.2.5.2. Preparo de mucosa suína	25
4.2.5.3. Eletrodos	26
4.2.5.4. Estabilidade dos fármacos após aplicação da corrente elétrica	27
4.2.5.5. Ensaios de permeação passiva e iontoforética	27
4.2.5.6. Formulações.....	28
4.2.5.7. Determinação da concentração de fármaco permeado, fluxo e quantidade recuperada da mucosa	28
4.2.5.8. Avaliação do LCL como promotor de permeação do PCL.....	29
4.2.6. Análise estatística dos dados	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Método analítico	31
5.1.1. Validação do método.....	33
5.1.2. Recuperação a partir da mucosa esofageal	39
5.2. Preparo de formulações	40
5.3. Caracterização da formulação.....	41
5.3.1. Uniformidade de conteúdo	41
5.3.2. Determinação dos coeficientes de distribuição mucosa/formulação do PCL e LCL.....	41
5.3.3. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	43
5.3.4. Propriedades mecânicas	44

5.3.5. Mucoadesão	46
5.3.6. Avaliação <i>in vitro</i> do tempo de permanência	49
5.4. Permeação passiva e iontoforética do PCL e do LCL	50
5.4.1. Preparo das mucosas suínas	50
5.4.2. Estabilidade dos fármacos após aplicação da corrente elétrica	51
5.4.3. Ensaios de permeação passiva e iontoforética	52
5.4.4. Avaliação da influência do pH	66
5.4.5. Avaliação do LCL como promotor de permeação do PCL.....	60
 6. CONCLUSÃO	 63
 7. REFERÊNCIAS.....	 65

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de anestésicos locais, injetáveis, eficientes e seguros pode ser considerado como um dos principais avanços da área odontológica no século XX (MOORE & HERSH, 2010), possibilitando a realização e aprimoramento de procedimentos rotineiros e cirúrgicos, ampliando o acesso ao tratamento dental a milhares de pacientes. Entretanto, o uso do anestésico injetável representa uma das principais fontes de temor e até de fobia por parte significativa de pacientes (CLARK & YAGIELA, 2010), fazendo com que a visita ao consultório seja muitas vezes postergada e até evitada (SMITH & HEATOM, 2003; SOKOLOWSKI *et al.*, 2010; MCGRATH & BEDI, 2004). Avaliar o impacto deste inconveniente na saúde bucal é difícil por ser subjetivo (ARMFIELD, 2011; EITNER *et al.*, 2006; AGDAL *et al.*, 2008; GARCHA *et al.*, 2010; POHJOLA *et al.*, 2009), porém, é estimado que aproximadamente 36% da população sofra de algum tipo de ansiedade relativa à execução de tratamentos dentais, enquanto 12% tem medo extremo de procedimentos odontológicos, refletindo de modo negativo na saúde bucal e qualidade de vida (HILL *et al.*, 2013).

Várias estratégias tem sido utilizadas para minimizar o desconforto do paciente. Dentre elas, pode-se citar a utilização de procedimentos drásticos como a sedação e indução de anestesia geral (AMERICAN DENTAL ASSOCIATION, 2007; HIGGINS, 2006), mas também práticas menos invasivas como uso de equipamentos que substituem a agulha para realização da anestesia (*needle-free*) e a utilização de formulações anestésicas tópicas. A grande maioria das formulações farmacêuticas, administradas de forma não-invasiva, contendo anestésicos para uso tópico odontológico consiste em pomadas, géis ou *sprays*. Essas formulações são utilizadas *a priori* para minimizar o desconforto do paciente que será posteriormente submetido à injeção do anestésico local ou para realização de alguns procedimentos específicos e menos invasivos, sendo mais comumente utilizados os géis contendo benzocaína a 20%.

No tocante ao estudo de novas formulações, a maioria deles visa prolongar o efeito anestésico e minimizar o risco de efeitos tóxicos sistêmicos durante o tratamento da dor aguda e crônica, especialmente em condições pós-operatórias. Nesses casos, a principal estratégia é a encapsulação do fármaco em lipossomas ou em partículas poliméricas (micro/nano), veiculadas na forma injetável (DE MELO *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2009; CEREDA *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2003). Dessa

forma, o conhecimento obtido com o desenvolvimento desses sistemas pouco contribui para o aprimoramento de formulações tópicas de liberação imediata para aplicação não-invasiva na mucosa bucal.

A literatura relativa ao desenvolvimento de sistemas que possibilitem um efeito anestésico mais profundo a partir de formulação de uso tópico que viabilize a substituição do injetável é escassa. Em 1996, o FDA aprovou um sistema mais elaborado (*patch*; Dentipatch® – Noven Pharmaceuticals), preparado a partir de polímeros formadores de hidrogéis. Uma das faces do *patch* é protegida com revestimento hidrofóbico, enquanto a não revestida, em contato com a mucosa, hidrata, intumescce e libera o fármaco. O tempo de latência é de 05 minutos e a duração da ação 45 minutos (FERNANDEZ *et al.*, 2005). O contato íntimo com a mucosa possibilita maior retenção do fármaco no local de aplicação, penetração e duração do efeito, eliminando a possibilidade de diluição do produto pela saliva, como acontece com as formulações convencionais. É indicado em procedimentos superficiais (CARR & HORTON, 2002), em que o paciente apresenta elevado grau de ansiedade e sensibilidade à dor, ou em procedimentos que exigem múltiplas injeções de anestésico (DENTIPATCH®, 2011). Embora sustente a duração do efeito anestésico por maior período de tempo, não foram localizadas informações de aplicação em substituição à anestesia infiltrativa ou de bloqueio nervoso.

Duas outras formulações visando a minimização do uso de anestésico injetável estão sendo avaliadas em ensaios clínicos. Um *spray* nasal, contendo 3% de tetracaína e 0,05% de cloridrato de oximetazolina, vasoconstritor, finalizou recentemente os ensaios clínicos de Fase II (Empresa: St. Renatus, LLC). O sistema proporcionou um efeito comparável à injeção de lidocaína e a empresa pretende dar continuidade à avaliação clínica (CLINICAL TRIAL DATABASE, 2011). Este é o único produto que tem como proposta a substituição do uso da injeção do anestésico que já concluiu com sucesso as fases iniciais de ensaios clínicos, tendo sido idealizado para a realização de procedimentos na arcada dentária superior.

Um gel contendo ropivacaína a 1 e 2% encapsulada em lipossomas finalizou ensaios de Fase I, tendo sido avaliado quanto ao efeito anestésico pulpar e na diminuição da dor em ensaios de simulação de injeção (CLINICAL TRIAL DATABASE, 2011). Um artigo de divulgação científica, publicado pelas mesmas instituições que conduziram o ensaio clínico, relata que o efeito da formulação de ropivacaína a 1% sobre a resposta pulpar, duração da anestesia e a dor durante a

inserção de agulha foi equivalente à formulação padrão (EMLA[®]). No entanto, em nenhuma delas foi possível obter efeito pulpar (estudo conduzido pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba-SP) (FRANZ-MONTAN *et al.*, 2007).

Dessa forma, tanto o trabalho com formulações para uso tópico que possibilitem um efeito mais preciso para procedimentos superficiais (a exemplo do sistema *patch* contendo lidocaína a 20%), como formulações de aplicação não-invasiva que possibilitem um efeito anestésico mais profundo trariam ganhos significativos para a odontologia.

O desenvolvimento de dispositivo para liberação tópica de anestésico local que possibilite a substituição da anestesia local injetável, especialmente para uso odontológico é desejável, porém não é tarefa fácil, pois deve contemplar vários requisitos e para tanto deve combinar várias tecnologias farmacotécnicas. Entre outras, a) disponibilizar o fármaco rapidamente, assim como os sistemas *fast-dissolve*; b) manter o fármaco em íntimo contato com a mucosa em área restrita, assim como proporcionado pelos sistemas biomucoadesivos; c) direcionar a liberação visando à permeação do fármaco através da mucosa, como os transcutâneos; d) induzir o plano anestésico e mantê-lo por período de tempo adequado (aproximadamente 1 hora) e facilitar a remoção pós procedimento. Mas as maiores limitações da liberação local de fármacos na cavidade bucal são mesmo a baixa retenção da forma de dosagem no sítio de absorção e o baixo fluxo, reduzindo a biodisponibilidade. Essas limitações podem ser contornadas com a utilização de sistemas mucoadesivos e aplicação de iontoforese para melhorar a permeabilidade dos fármacos (SHOJAEI, 1998).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Mucosa bucal como sítio para liberação de fármacos

A cavidade bucal é inteiramente revestida por membranas mucosas (figura 1) divididas em: a) epitélio oral, b) membrana basal, que liga o epitélio e o tecido conjuntivo, c) lâmina própria, que é o tecido conjuntivo subjacente e d) uma área que contém tecido adiposo ou tecido conjuntivo glandular, com vasos sanguíneos e nervos importantes, e estes tecidos estão localizados sobre uma camada de músculo ou osso (WILSON *et al.*, 2001).

Figura 1. Representação esquemática da mucosa bucal (adaptado de PATEL *et al.*, 2011).

Áreas da mucosa sujeitas a estresse mecânico, como a gengiva e o palato duro (figura 2) são queratinizadas, sendo semelhantes à epiderme. A mucosa sublingual, do palato mole e das regiões bucais, entretanto, não é queratinizada, sendo mais permeável que a pele e mais conveniente para a transferência de fármacos hidrofílicos (SHOJAEI, 1998).

Figura 2. Representação esquemática dos diferentes revestimentos de mucosa na boca (adaptado de PATEL *et al.*, 2011).

O epitélio possui cerca de 40 a 50 camadas de células com uma espessura de aproximadamente 200 a 400 μm (SMART, 1993). Na primeira porção do epitélio encontram-se materiais intercelulares secretados por grânulos, os quais têm como função o espessamento da membrana, adesão e produção de revestimento celular, atuando como uma barreira à permeação. Esse padrão repete-se nos epitélios queratinizado e não-queratinizado da mucosa oral, sugerindo que a barreira à permeação devido a esses grânulos seja mais significativa do que a queratinização do epitélio (PATEL *et al.*, 2011).

As células epiteliais são circundadas por uma matriz intercelular hidrofílica, porém devido à secreção dos grânulos de revestimento de membrana, porções dos espaços intercelulares são preenchidos com lipídios apolares. As membranas celulares epiteliais lipofílicas estão circundadas por lipídios intercelulares relativamente polares na parte exterior e pelo citoplasma hidrofílico na parte interior. Assim, a existência de regiões hidrofílicas e lipofílicas na mucosa bucal levaram os pesquisadores a sugerirem duas rotas de transporte: paracelular (entre as células) e transcelular (intracelular) (NICOLAZZO *et al.*, 2005; PADERNI *et al.*, 2012), como mostra a figura 3.

Figura 3. Representação esquemática das rotas de permeação através da mucosa bucal (adaptado de PADERNI *et al.*, 2012).

As células do epitélio oral são recobertas pelo muco, presente na saliva, secretado pelas glândulas salivares. São secretados cerca de 1 a 2 litros de saliva por dia em um fluxo basal de 0,5 mL/min que pode chegar a mais de 7 mL/min na presença de estímulos como pensamentos, odor ou sabor de alimentos. A saliva é viscosa, incolor, opalescente e hipotônica quando comparada ao plasma. Seu pH varia entre 6,2 a 7,4, mas ação de bactérias ao redor dos dentes pode diminuir esse valor para 3 ou 4 ao redor dos dentes. Além do muco, a saliva contém primariamente água, proteínas, sais mineirais e amilase, podendo também carrear restos alimentares, células bacterianas ou ainda leucócitos (WILSON *et al.*, 2001). A composição do muco é predominantemente água (95–99%), destacando-se as glicoproteínas da classe das mucinas (1–5%). As mucinas formam uma rede tridimensional, atuando como lubrificantes e permitindo o movimento relativo das células, contribuindo ainda para a adesão celular. Em pH fisiológico (5,5-7,0), o muco possui carga negativa, devido ao resíduos de ácido siálico e sulfato, formando uma estrutura de gel coesiva, a qual têm papel importante na mucoadesão (PATEL *et al.*, 2011).

A cavidade oral é a porta de entrada para todas as formulações orais. Os fatores que irão determinar a capacidade do fármaco de permear através da mucosa bucal são: a solubilidade, coeficiente de partição, tamanho e peso molecular, grau de ionização e pka do fármaco, pH da formulação, presença de saliva e de promotores de permeação. Moléculas hidrofílicas podem passar entre os poros

aquosos adjacentes às cabeças polares dos lipídios ou através do citoplasma. Moléculas lipofílicas por sua vez preferem a rota transcelular, onde a permeação irá depender do coeficiente de partição (BATHEJA, 2006). Porém, usualmente, o contato do fármaco com a mucosa oral é breve. Um dos maiores objetivos no desenvolvimento de formulações tópicas bucais é então prolongar o tempo de residência da forma farmacêutica no sítio de aplicação. Apesar da área total disponível para a absorção de fármacos ser um tanto limitada, de apenas aproximadamente 100 cm² (WILSON *et al.*, 2001), a mucosa oral possui uma rede de vasos sanguíneos mais concentrada do que a presente na pele, podendo promover um rápido início de ação dos fármacos administrados, sendo cerca de 4-4000 vezes mais permeável do que a pele (HU *et al.*, 2011). Além disso, a mucosa oral oferece proteção contra valores baixos de pH, proteases e metabolismo de primeira passagem, sendo atrativa para liberação de fármacos sensíveis, aumentando sua biodisponibilidade. A natureza altamente vascularizada da mucosa é uma vantagem adicional para casos em que o paciente apresenta dificuldade de deglutição e náusea, podendo até mesmo ser utilizada em pacientes inconscientes. Essa rota, por não ser invasiva, aumenta a adesão do paciente ao tratamento, além de diminuir os custos, visto que não necessita de profissional altamente qualificado para a administração (MANOHAR *et al.*, 2012).

Entretanto, os tecidos de mucosas são mais sensíveis à irritação por parte dos sistemas de liberação do que a pele ou mesmo a via oral e menos convenientes à sistemas adesivos (CANNON, 2011); a área superficial disponível para administração (cerca de 200 cm²) é pequena quando comparada ao trato gastrointestinal (350.000 cm²) ou à pele (20.000 cm²) (BATHEJA, 2006). Assim como as demais vias de administração, condições patológicas que influenciem a fisiologia e o funcionamento da mucosa oral podem afetar a extensão e o sucesso da terapia. Soma-se a esses fatores ainda o ambiente da própria mucosa oral, com o fluxo de saliva e ação da mastigação.

2.3 Cloridratos de prilocaína e lidocaína

Anestésicos locais ideais para uso clínico em odontologia devem apresentar algumas características, tais como: ação não irritante; pequena ou nenhuma alergenicidade; rápido início de ação e duração adequada de anestesia, a qual deve ser reversível; mínima toxicidade sistêmica e seletividade às rotas nociceptivas. Em odontologia clínica, os fármacos anestésicos do tipo amida satisfazem esses critérios e são os mais utilizados há mais de 20 anos (MOORE & HERSH, 2010).

As aminoamidas, quando comparadas aos anestésicos na forma de aminoésteres, apresentam maior lipossolubilidade devido ao coeficiente de partição óleo/água, facilidade de penetração tissular que contribui com a redução do tempo para a manifestação do efeito anestésico, maior tempo de duração da anestesia em função da estabilidade frente às enzimas tissulares (CATERRALL & MACKIE, 2006; RANG & DALE, 2007; LAGAN & MCLURE, 2004).

Dentre as aminoamidas, prilocaína e lidocaína são os anestésicos mais utilizados em odontologia atualmente para anestesia local infiltrativa (MOORE & HERSH, 2010). Elas são bases fracas, insolúveis em água, com rápido início de ação e média duração do efeito anestésico (SISK, 1992). Para tornarem-se hidrossolúveis, são administradas na forma de cloridratos de prilocaína (PCL) e de lidocaína (LCL) (figuras 4 e 5). Em solução injetável, com pH geralmente ácido (na faixa de 3,5 a 5,5) a maior parte está ionizada. Ao ser administrada, a solução é tamponada pelos sistemas tampão teciduais e a equação é desviada no sentido do aumento da forma não ionizada e, assim, os fármacos podem atravessar membranas e penetrar os tecidos. Ao chegar à membrana axonal, encontram um ambiente mais ácido, ionizam-se novamente e assim têm condições de agir, fazendo interações de cargas com pontos específicos do canal de sódio (CARVALHO, 1994).

Figura 4. Estrutura química do cloridrato de lidocaína (U.S. Pharmacopeial Convention, 2014).

Figura 5. Estrutura química do cloridrato de prilocaína (U.S. Pharmacopeial Convention, 2014).

A combinação de PCL e LCL é uma estratégia que vem sendo bastante utilizada no desenvolvimento de formulações anestésicas tópicas. O racional desta combinação está relacionado às propriedades físico-químicas dos dois fármacos, apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de PCL e LCL.

Propriedade	PCL	LCL
Massa molecular (g/mol) ^a	256,77	270,80
pKa, 25 °C ^b	7.9	7.8
LogP, 25 °C ^c	2.029	2.196

^aFonte: The Merck Index, 2001 (Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA); ^bFonte: De Paula & Schreier (1995); ^cFonte: Calculados para as formas base usando o *software* Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02 (©1994-2012 ACD/Labs).

O LCL apresenta maior lipossolubilidade (maior LogP) e, por isso, tem um início de ação mais rápido. Por outro lado, por apresentar maior valor de pKa, o PCL possui efeito mais durador (PAIVA & CAVALCANTI, 2005). Além disso, esses anestésicos na forma base formam uma mistura eutética, com ponto de fusão inferior à temperatura corporal, o que facilita sua permeação através da pele, sendo a estratégia empregada no preparo do EMLA® (GAJRAJ *et al.*, 1994).

O EMLA® foi aprovado pelo FDA em 1993 e é composto por 2,5 mg/mL de prilocaína e 2,5 mg/mL de lidocaína em uma emulsão óleo em água (GAJRAJ *et al.*, 1994; FRIEDMAN *et al.*, 2001). É a formulação mais utilizada atualmente na anestesia da pele para instilação de catéteres intravenosos, coleta de amostras de sangue e também na anestesia da mucosa genital para cirurgias superficiais ou antes da injeção local de outros anestésicos locais (Astrazeneca, 2012). Apesar de não ter sido aprovada para uso na mucosa bucal, existem vários estudos comprovando sua eficácia clínica. Vickers e Punnia-Moorthy (1993) obtiveram um grau de anestesia pulpar significativo após 30 minutos da aplicação do EMLA®. Em

um estudo posterior, Vickers e colaboradores (1997) determinaram parâmetros farmacocinéticos após a aplicação do EMLA®, sendo a máxima concentração plasmática (418 ng/mL de prilocaína e 223 ng/ml de lidocaína) alcançada após 40 minutos. O creme EMLA® foi capaz ainda de diminuir a dor durante procedimentos de raspagem e alisamento radicular (CHUNG *et al.*, 2011).

O gel ORAQIX®, também contendo prilocaína e lidocaína a 2,5% cada, foi desenvolvido para uso na bolsa periodontal. É um gel termorreversível, com baixa viscosidade na temperatura ambiente, podendo ser aplicado com auxílio de uma seringa e tornando-se viscoelástico na temperatura corporal. A formulação forneceu anestesia de cerca de 20 minutos em procedimentos de raspagem para tratamento de doença periodontal (FRISKOPP *et al.*, 2001). Estudo mais recente demonstrou que o creme EMLA® e o gel ORAQIX®, ambos contendo prilocaína e lidocaína a 2,5% (5% de fármaco anestésico) foram mais eficientes na redução da dor palatal que o gel contendo benzocaína a 20% (AL-MELH & ANDERSSON, 2007). No entanto, ambas as formulações tópicas não são capazes de promover uma anestesia mais profunda, capaz de substituir as injeções. Para essa finalidade, pode-se utilizar como estratégia um método físico promotor de permeação, como a iontoforese.

2.2. Iontoforese

A iontoforese é uma técnica não-invasiva, baseada na aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade para facilitar a liberação de uma variedade de fármacos, carregados ou não, através de membranas biológicas. A corrente elétrica é fornecida por uma fonte de energia ou bateria e distribuída com o auxílio de um eletrodo positivo (ânodo) e um eletrodo negativo (cátodo) através de uma solução eletrolítica. Quando a corrente é aplicada, os cátions presentes na solução em contato com o ânodo se movem em direção ao cátodo, enquanto os ânions presentes no cátodo movem-se na direção oposta (GRATIERI *et al.*, 2008).

Existem dois mecanismos pelos quais a iontoforese atua: eletromigração e eletrosmose (Figura 6). A eletromigração é resultante das interações eletrostáticas e é aplicável apenas a espécies carregadas, em que cargas semelhantes se repelem e cargas opostas se atraem. A eletrosmose ocorre em estruturas porosas, como os tecidos, com uma rede de carga predominante (por exemplo, as cargas negativas da superfície da pele e da mucosa oral quando em contato com formulações em pH

fisiológico), causando assimetria de cargas entre a solução móvel e a fase porosa estacionária. A mobilidade e a concentração de íons com a mesma carga do tecido é reduzida e a transferência de íons de carga oposta é favorecida. Esse fluxo iônico não simétrico induz movimento de solvente e de outras moléculas, carregadas e não carregadas (CIACH & MOSCICKA-STUDZINSKA, 2011).

Figura 6. Representação dos mecanismos envolvidos na iontoforese: (A) a eletromigração e (B) a eletrosmose (GRATIERI *et al.*, 2008).

A passagem da corrente iônica através da solução eletrolítica e das membranas depende dos íons que compõem a solução, pois a corrente iônica é por eles carregada. A fração de corrente carregada pelo fármaco ionizado e outros íons presentes no sistema (cátions e/ou ânions, univalentes e/ou divalentes) é denominada número de transporte. A razão máxima de transporte para dado íon ocorre quando o número de transporte deste íon é igual a um, ou seja, quando ele é capaz de carregar sozinho 100% da corrente através da membrana (PHIPPS & GYORY, 1992; LOPEZ *et al.*, 2003-B). Sendo assim, para maximizar a fração de corrente carregada pelo fármaco, isto é, para aumentar a eficiência da corrente, é necessário selecionar dispositivos iontoforéticos e formulações adequadas. Vários são os parâmetros de uma formulação que podem ser manipulados a fim de aumentar a eficiência da corrente, entre eles a concentração do fármaco, o pH, a concentração de íons extrâneos e a estabilidade do fármaco na solução. Pode-se também elevar o fluxo iontoforético de um fármaco através da manipulação de fatores elétricos, como o perfil e a densidade da corrente elétrica.

A iontoforese é conhecida desde 1900 e sua típica área de aplicação na medicina é na liberação transdérmica de fármacos, já sendo utilizada para aumentar a penetração de lidocaína e epinefrina, após aplicação tópica cutânea, na prevenção da dor associada a coletas de sangue e instilação de catéteres. A mucosa bucal representa uma área atrativa para a liberação iontoforética de fármacos, pois permanece umidificada por longos períodos e regenera-se rapidamente, além de oferecer menor resistência em relação ao estrato córneo (MOSCICKA-STUDZINSKA *et al.*, 2009; CIACH & MOSCICKA-STUDZINSKA, 2011). A técnica vem sendo utilizada na odontologia para o tratamento de hipersensibilidade da dentina, com fluoreto de sódio; de úlceras aftosas, com corticoesteróides e também de herpes labiais, com o antiviral idoxuridina (SACHDEVA *et al.*, 2011). Em relação ao uso de iontoforese com lidocaína para obtenção de efeito anestésico na mucosa, há apenas estudos clínicos ou associando a iontoforese a promotores químicos (GANGAROSA *et al.*, 1995; HU *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2011), não havendo estudos sobre os mecanismos que influenciam a permeação de fármacos através da iontoforese. Além disso, não há estudos com PCL ou com a combinação de PCL e LCL.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da iontoforese na penetração do LCL e PCL na mucosa a partir de uma formulação semi-sólida.

3.2 Metas

3.2.1 Adequar e validar metodologia analítica empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de PCL e LCL em solução, nas formulações e a partir da mucosa.

3.2.2 Padronizar metodologia para a extração dos fármacos da mucosa após a permeação.

3.2.3 Preparar formulação aquosa, semi-sólida, mucoadesiva contendo os fármacos anestésicos.

3.2.4 Avaliar o efeito da combinação de PCL e LCL nos coeficientes de distribuição mucosa/formulação e em seus pontos de fusão.

3.2.5 Caracterizar a formulação através da determinação das propriedades mecânicas, força mucoadesiva, tempo de permanência na mucosa bucal e uniformidade de conteúdo.

3.2.6 Avaliar o efeito do pH da formulação (5,8 e 7,0) na permeação passiva e iontoforética dos anestésicos.

3.2.7 Avaliar o efeito promotor do LCL na permeação do PCL

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1. Substâncias químicas, reagentes, solventes e adjuvantes

- Acetonitrila (grau cromatográfico) - J.T.Baker[®];
- Água milli-Q obtida por equipamento Millipore[®];
- Cloreto de prata (99%) - SIGMA[®]; lote: MKBJ8602V;
- Cloreto de sódio - LABSYNTH[®];
- Cloridrato de lidocaína – (99%); Henrifarma[®]; lote: LHB/31*025125/11-27574;
- Cloridrato de prilocaína - Henrifarma[®]; lote: 010429*023758/11-24268;
- Dietilamina - Sigma[®];
- Fio de platina - Aldrich;
- Fio de prata pura de 1,5 cm de diâmetro (99,99%) -Aldrich;
- Fosfato de potássio monobásico anidro - LABSYNTH[®];
- Fosfato de Sódio bibásico anidro – J.T.Baker[®];
- Fosfato de Sódio monobásico anidro – J.T.Baker[®];
- Glicerol (85%) - Merck[®];
- Hidroxipropilmetilcelulose (Alta viscosidade, USP) - Henrifarma[®];
- Metanol (grau cromatográfico) - J.T. Baker[®];
- Padrão de cloridrato de lidocaína mono-hidratada (100%) - SIGMA[®]; lote: 069K0002V;
- Padrão de cloridrato de prilocaína (100%) - SIGMA[®]; lote: 0001417729;

4.1.2. Equipamentos e Acessórios

- Agitador magnético - Variomag Multipoint, Labortechnik, Alemanha;
- Agitador de tubos - Phoenix;
- Analisador de textura TA-Xt plus - Stable Micro Systems, UK;
- Balança analítica AdventurTM - Ohaus, USA;
- Balança semi-analítica – Shimadzu[®];
- Banho termostaticado Ecoline 003 - E100, Lauda, Alemanha;
- Banho-Maria 314/4 - Nova Ética, Brasil;
- Bomba a vácuo - Tecnal[®];
- Bomba peristáltica (LKB P1) - Pharmacia;

- Calorímetro exploratório diferencial (DSC Modelo DSC50) - Shimadzu®;
- Células de difusão vertical;
- Coluna de fase reversa (Gemini RP-C18) - Phenomenex;
- Cromatógrafo Líquido modelo UFLC Prominence - Shimadzu®;
- Detector de Arranjo de Diodos (SPD – M20A Prominence) - Shimadzu®;
- Eletrodos de Ag/AgCl - In vivo Metrics®
- Filtro 0,45 µm Millex® - Millipore®;
- Fonte de energia (Modelo APH 500DM) - Kepco Power Supply;
- Gerador de sinal (Modelo 33210A) - Agilent;
- Homogeneizador de tecidos (Turratex TE-102) - Tecnal;
- Membrana de PVDF com poro de 45µm x 13 mm – Millipore®;
- Multímetro (Modelo ET 2053) - Minipa;
- Potenciômetro digital - Digimed®;
- Sistema de filtração de fase móvel e membrana G8 em éster de celulose, 0,22 µm de poro, 47 mm de diâmetro - Millipore®;
- Ultracentrífuga (Heraeus Megafuge 16R) - Thermo Scientific;
- Ultra som - Unique®.

4.1.3. Mucosa

As mucosas utilizadas nos experimentos *in vitro* foram obtidas de esôfagos de porco coletados imediatamente após o abate dos animais (Frigorífico Olhos D'água, Ipuã, SP, Brasil). Os esôfagos foram mantidos a aproximadamente 4°C enquanto transportados para o laboratório, onde as mucosas foram dissecadas.

4.1.4. Saliva Artificial

A composição da saliva artificial utilizada nos ensaios de permeação foi a mesma utilizada por Mashru e colaboradores (2005). A saliva foi preparada através da adição de 2,38 g/L de Na₂HPO₄, 0,19 g/L de KH₂HPO₄ e 8 g/L de NaCl em água milli-Q e depois o pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1M.

4.2. Métodos

4.2.1. Adequação e validação de método para quantificação dos fármacos em solução, nas formulações e em tecido biológico

4.2.1.1 Desenvolvimento do método

As análises foram realizadas usando um Cromatógrafo Líquido modelo UFLC Prominence (Shimadzu[®], Kyoto, Japão) equipado de uma bomba binária (LC – 20AD), degaseificador (DGU –20A3 Prominence), auto-amostrador (SIL – 20AHT Prominence) e Detector de Arranjo de Diódos (SPD – M20A Prominence). As separações cromatográficas foram conduzidas em coluna de fase reversa Gemini RP-C18 (250 mm x 4.6 mm, 3µm, 110Å) inserida em um compartimento com temperatura regulada por termostato (CTO–20A Prominence). A aquisição e análise dos dados foram feitas empregando um Módulo Controlador (CBM – 20A Prominence) acoplado a um computador com *software* Shimadzu[®] LC Solution. A condição analítica que se mostrou mais adequada foi composta por uma fase móvel contendo uma mistura de acetonitrila : tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (1:1 v/v) e 0,05% (v/v) de dietilamina, sob fluxo isocrático de 1,0 mL/min, comprimento de onda de detecção de 203 nm, temperatura do compartimento da coluna de 30°C, volume de injeção de 20 µL e tempo total de corrida fixado em 20 min.

Para a análise de PCL e LCL foram preparadas soluções estoque dos padrões dos fármacos, em metanol grau cromatográfico, na concentração de 10 mg/mL. A partir destas soluções estoque foram preparadas soluções mãe nas concentrações de 1 mg/mL usando o mesmo solvente. Estas soluções foram estocadas sob refrigeração (-20°C) e ao abrigo da luz.

A estabilidade das soluções mãe foi avaliada nos intervalos de 0 (recém-preparada), 2, 4 e 8 dias. A cada dia de análise, a partir das soluções-mãe, foram realizadas diluições sucessivas em fase móvel, obtendo-se soluções de trabalho contendo os fármacos na concentração de 2,5 µg/mL. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas em quintuplicata no cromatógrafo. Além disso, para a avaliação da estabilidade das amostras, soluções de trabalho recém-preparadas contendo os fármacos na concentração de 2,5 µg/mL foram acondicionadas em vials e inseridas no auto-amostrador do cromatógrafo à temperatura ambiente (25 ± 2°C). As amostras foram então analisadas em quintuplicata nos intervalos de 0, 2, 4 e 8 h. As áreas dos picos de PCL e LCL nos intervalos de análise foram comparadas por Análise de Variância (ANOVA) segundo

um único critério, seguida do teste de Tukey, usando o *software* GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). Não foram observadas variações nas concentrações dos fármacos em todas as condições testadas, indicando que as soluções do fármaco mantinham sua estabilidade durante o período de análise.

4.2.1.3 Avaliação dos parâmetros de adequabilidade do sistema (*System Suitability*)

Com intuito de assegurar o desempenho do sistema antes e durante as análises e definir as melhores condições cromatográficas, foram avaliados os seguintes parâmetros de adequabilidade do sistema: fator de cauda (T), resolução (Rs), número de pratos (N) e repetibilidade (determinada pelo coeficiente de variação, CV) (FDA, 1994). Os ensaios foram realizados em três dias consecutivos injetando-se em quintuplicata soluções de trabalho dos fármacos na concentração de 2,5 µg/mL.

4.2.1.4 Validação do método

O método foi validado quanto aos parâmetros analíticos de seletividade, linearidade e intervalo, sensibilidade (limites de detecção e quantificação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez segundo as diretrizes propostas na ICH 2B (ICH, 1996).

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada injetando-se amostras de i) saliva artificial, ii) formulações sem os fármacos (branco) e iii) homogenato de mucosa esofageal suína. No caso da amostra ii, amostras de 100 mg das formulações preparadas sem os fármacos foram dispersas em 5 mL de fase móvel por 15 minutos com o auxílio de banho de ultrassom. A dispersão resultante foi filtrada em filtro de 0,45 µm e injetada no cromatógrafo líquido. Para a amostra iii, amostras de 1 cm² de mucosa esofageal suína foram picotadas e dispersas em 5 mL de fase móvel com o auxílio de um homogeneizador de tecidos. A dispersão resultante foi filtrada em filtro de 0,45 µm e injetada no cromatógrafo líquido. Os perfis cromatográficos destas amostras foram comparados aos perfis dos padrões dos fármacos em concentração conhecida para verificar a presença de possíveis interferentes. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Linearidade

Para a construção das curvas analíticas, a partir das soluções estoque foram preparadas três soluções-mãe, em três dias consecutivos, na concentração de 1 mg/mL dos fármacos em metanol grau cromatográfico. A partir de cada solução-mãe foram realizadas diluições sucessivas em fase móvel, obtendo-se soluções de trabalho nas seguintes concentrações: 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5 e 10 µg/mL. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas em quintuplicata no cromatógrafo. As médias das áreas dos picos de cada concentração dos fármacos foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. As equações das retas foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados e expressas por $y = ax + b$, onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y . Já a faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de determinação (R^2), sendo os ajustes dos modelos de regressão linear propostos avaliados pelos parâmetros de *Lack of fit* e Teste F usando o *software* Statistica 11 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Na avaliação da sensibilidade do método, LD e LQ foram determinados com base nas curvas obtidas nos ensaios de linearidade. Construiu-se uma curva plotando-se as concentrações no eixo das abscissas e no eixo das ordenadas as médias das áreas dos picos obtidos. As equações 1 e 2, respectivamente, foram utilizadas para determinação dos LD e LQ :

$$LD = \frac{3,3 (\sigma)}{a} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 (\sigma)}{a} \quad (2)$$

onde, a é o coeficiente angular da equação da reta das médias das áreas dos picos e σ é o desvio padrão de a .

Precisão e Exatidão

A precisão foi avaliada em dois níveis: i) repetibilidade ou precisão intra-corrida (n=5 para cada concentração) e ii) precisão intermediária ou precisão inter-corridas (n=5 para cada concentração, em dois dias consecutivos). Para tanto, foram analisadas soluções de trabalho dos fármacos nas concentrações de 0,25, 2,5 e 10 µg/mL. A repetibilidade e a precisão intermediária foram expressas através do coeficiente de variação entre as amostras (CV), calculado segundo a equação 3:

$$CV(\%) = \frac{DP}{\bar{X}} \times 100 \quad (3)$$

em que: DP = desvio padrão; $\bar{X}$ = média das áreas dos picos.

Para a avaliação da exatidão, soluções de trabalho contendo os fármacos nas mesmas concentrações utilizadas no estudo de precisão foram analisadas em quintuplicata. A exatidão foi calculada usando a equação 4 e expressa em função da porcentagem do erro relativo (ER, %):

$$Exatidão(ER, \%) = \left(\frac{Concentração\ obtida - Concentração\ teórica}{Concentração\ teórica} \right) \times 100 \quad (4)$$

Robustez

A robustez do método foi avaliada empregando-se um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{4-1} (BARROS NETO *et al.*, 2001). Nesse tipo de planejamento experimental, são estudados os efeitos de 4 fatores em 2 níveis, em um total de 8 diferentes condições experimentais. Os fatores (variáveis independentes) avaliados foram comprimento de onda de detecção (λ , 203 ± 2 nm), temperatura do compartimento da coluna (T, $30 \pm 2^\circ\text{C}$), pH do tampão fosfato que compõe a fase móvel (pH, $7,0 \pm 0,2$) e fluxo da fase móvel (FI, $1,0 \pm 0,2$ mL/min) (Tabela 2 - níveis codificados; Tabela 3 - níveis com valores decodificados). As respostas (variáveis dependentes) foram as áreas dos picos, números de pratos, fatores de cauda e resolução entre os analitos. Soluções de trabalho dos fármacos na concentração de 1,0 µg/mL foram injetadas em duplicata. Os experimentos foram randomizados para minimizar os efeitos da variabilidade inexplicada nas respostas observadas devido a fatores externos. As respostas obtidas foram processadas usando o *software* Statistica 11 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com valores codificados.

Exp.	λ (nm)	T (°C)	pH (-)	FI (mL/min)
1	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)
2	(+1)	(-1)	(-1)	(+1)
3	(-1)	(+1)	(-1)	(+1)
4	(+1)	(+1)	(-1)	(-1)
5	(-1)	(-1)	(+1)	(+1)
6	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)
7	(-1)	(+1)	(+1)	(-1)
8	(+1)	(+1)	(+1)	(+1)

λ , comprimento de onda de detecção (nm); T, temperatura do compartimento da coluna (°C); pH, pH do tampão que compõe a fase móvel; FI, fluxo da fase móvel (mL/min); -1, nível codificado inferior; +1, nível codificado superior.

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com valores decodificados.

Exp.	λ (nm)	T (°C)	pH (-)	FI (mL/min)
1	201	28	6,8	0,8
2	205	28	6,8	1,2
3	201	32	6,8	1,2
4	205	32	6,8	0,8
5	201	28	7,2	1,2
6	205	28	7,2	0,8
7	201	32	7,2	0,8
8	205	32	7,2	1,2

λ , comprimento de onda de detecção (nm); T, temperatura do compartimento da coluna (°C); pH, pH do tampão que compõe a fase móvel; FI, fluxo da fase móvel (mL/min).

4.2.2 Recuperação a partir da mucosa esofageal

Primeiramente, foram preparados três homogeneizados de mucosa esofageal com o auxílio de uma tesoura e um bisturi. Esses homogeneizados ($\sim 1 \text{ cm}^2$) foram transferidos a tubos de ensaio e adicionados de 1000 μL de uma solução de PCL e LCL em metanol em três níveis de concentração: baixa (1,25 $\mu\text{g/mL}$), média (5 $\mu\text{g/mL}$) e alta (50 $\mu\text{g/mL}$). O metanol foi então evaporado e 5 mL de fase móvel foram adicionados a cada tubo para a extração do PCL e LCL. A mistura foi levada a um banho de ultrassom por 30 minutos, filtrada e quantificada por CLAE (item 4.2.1.). Os experimentos foram realizados em triplicata. As porcentagens de PCL e

LCL quantificadas em relação às quantidades totais adicionadas foram consideradas como sendo as porcentagens de recuperação.

4.2.3. Preparo de sistemas semi-sólidos mucoadesivos

Géis hidrofílicos não iônicos foram preparados por dispersão da hidroxipropil metilcelulose de alta viscosidade USP (HPMC) em tampão fosfato 0,1 M (pH 5,8 e 7,0) e glicerina com o auxílio de bastão de vidro à temperatura ambiente. LCL e PCL foram adicionados na concentração de 2,5% (p/p) cada, isolados ou combinados. A composição dos hidrogéis pode ser visualizada na tabela 4.

Tabela 4. Composição dos hidrogéis.

	Composição (%)
LCL	2,5
PCL	2,5
HPMC	5
Glicerina	0,5
Tampão Fosfato 0,1M	q.s.p. 100

4.2.3. Caracterização das formulações

4.2.3.1. Determinação do Coeficiente de Distribuição ($K_{\text{mucosa/formulação}}$)

O coeficiente de distribuição mucosa/formulação do PCL e LCL foi determinado baseando-se no método proposto por Lopez *et al.* (2000). Amostras dos hidrogéis (1 g) foram primeiramente diluídas em 25 mL de tampão fosfato 0,1M nos pHs correspondentes. Amostras de mucosa esofageal (0,3 g) foram picotadas e colocadas em contato com 5 mL das diluições dos seguintes hidrogéis: (i) PCL (ii) LCL e (iii) PCL + LCL a 2,5% pH 5,8 e 7,0. As suspensões foram submetidas à agitação magnética por aproximadamente 12 horas (600 rpm), a seguir, foram agitadas em agitador de tubos (400 rpm) por 2 minutos, centrifugadas (6000 rpm, 10 minutos) e filtradas. Para análise por CLAE foram feitas as diluições necessárias. Os coeficientes de distribuição foram determinados através da equação 5:

$$K_{mucosa/formulação} = (C_1 - C_2)/C_2 \quad (5)$$

onde C1 é a concentração do fármaco na fase aquosa antes da homogeneização e C2 é a concentração do fármaco na fase aquosa após a homogeneização.

4.2.3.2. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

Os géis de HPMC pH 7,0 (sem fármacos, contendo PCL e LCL isolados e em combinação) foram congelados a -80°C e liofilizados. Aproximadamente 4,5 mg de cada amostra foi colocada em cadinho de alumínio, que foram lacrados e submetidos à análise no DSC, com a razão de aquecimento de 10°C/min na faixa de aquecimento de 25° a 300° em atmosfera de ar.

4.2.3.3. Determinação da uniformidade de conteúdo

Amostras de 1 grama dos hidrogéis foram colocadas em tubos falcon e os fármacos extraídos em banho de ultrassom por 90 minutos usando 25 mL de fase móvel como solvente, seguida de agitação em vórtex (400 rpm) por 2 minutos. Após diluição apropriada, as amostras foram filtradas e analisadas por CLAE. Os ensaios de quantificação foram realizados em triplicata, sendo a uniformidade expressa em função CV (%) e teor (%).

4.2.3.4. Avaliação das propriedades mecânicas

A análise do perfil de textura (APT) das formulações foi realizada utilizando-se um analisador de textura conforme descrito por Jones *et al.* (1997) e Gratieri *et al.* (2010). Amostras de 10 g de cada formulação foram colocadas em frascos de mesma altura, evitando a introdução de bolhas e deixadas em banho-maria a 37°C por 24 horas antes do teste. No módulo APT, uma prova analítica de policarbonato (10 mm de diâmetro) foi comprimida duas vezes no interior das amostras, com velocidade de 2 mm.s⁻¹, profundidade de 5 mm e tempo de 15 s entre o final da primeira e o início da segunda compressão. As análises foram realizadas em cinco replicatas para cada amostra nas temperaturas de 25 e 37°C. A partir dos gráficos, resultantes da força vs. distância e força vs. tempo, a dureza (força necessária para atingir uma dada deformação), a compressibilidade (trabalho necessário para deformar o produto durante a primeira compressão da prova) e a adesividade

(trabalho necessário para superar as forças de atração entre as superfícies da amostra e da prova) foram calculadas, com auxílio do *software Exponent* (Stable Micro Systems, UK).

4.2.3.5 Determinação da força mucoadesiva

A força necessária para destacar a formulação da mucosa foi avaliada em analisador de textura em módulo de tensão. Bochechas de suínos foram lavadas com água destilada e o tecido conjuntivo removido, preservando a membrana basal. Cortes da mucosa com espessura de 500 a 600 μm foram colocados no acessório do equipamento (parte inferior), e o corpo de prova (a formulação), fixado no acessório superior. A superfície da mucosa foi umedecida com 50 μL de saliva artificial por 5 minutos. Em seguida, o dispositivo superior do equipamento foi movimentado para baixo até encontrar a superfície da mucosa, mantendo contato sob forma de compressão de 0,5 N (JONES *et al.*, 1997). Foram avaliados os tempos de contato entre mucosa e formulação de 30, 60, 120, 180 e 300 segundos. Após este período, o acessório foi movimentado para cima (módulo de tensão) a velocidade constante de 1 $\text{mm}.\text{min}^{-1}$ até que o corpo de prova se destacasse da mucosa. Foram determinadas a força necessária para destacar a formulação da mucosa (força de destacamento) e o trabalho de mucoadesão (área sob a curva de força vs. distância), com auxílio do *software Exponent* (Stable Micro Systems, UK). O ensaio foi realizado em quintuplicata.

4.2.3.6 Avaliação *in vitro* do tempo de permanência

Foi determinado empregando aparato semelhante ao proposto por Rao e Bury (1989), como demonstrado na figura 7. Brevemente, esôfagos suínos foram lavados em água corrente, cortados longitudinalmente e fixados, com cola de cianoacrilato, em um suporte inclinado. A superfície da mucosa foi umedecida com 100 μL de saliva artificial por 10 minutos. Em seguida, amostra de 1 g de gel foi adicionada no centro da mucosa e submetida a um fluxo de saliva artificial de 1,0 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$ a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, fornecido por uma bomba peristáltica. Com o auxílio de um cronômetro, foi verificado o tempo necessário para a amostra desprender-se da mucosa ou desintegrar totalmente. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

Figura 7. Aparato utilizado para determinação do tempo de permanência: (1) Reservatório contendo saliva artificial; (2) bomba peristáltica; (3) suporte plástico; (4) mucosa; (5) recipiente coletor e (6) cronômetro.

4.2.5. Estudos *in vitro* de permeação passiva e Iontoforese

4.2.5.1 Avaliação da resistência à passagem de corrente elétrica

A formulação foi avaliada quanto à resistência à passagem de corrente elétrica. Para o ensaio, foi utilizado um gerador de sinal com o auxílio de um eletrodo de Ag/AgCl inserido na formulação. Foi aplicada uma corrente alternada de 100 mV (RMS) de potência e 10 Hz de frequência. A corrente elétrica gerada foi então medida através de outro eletrodo inserido no compartimento doador ligado a um multímetro.

A quantidade de íons necessários para transportar a corrente elétrica pelo tempo de experimento foi determinada pela equação 6:

$$T = \frac{i(A) \times t(s)}{F(C)} \quad (6)$$

Onde: T = número de mols necessários para transportar a corrente elétrica;

i = corrente elétrica contínua e constante;

t = tempo em segundos;

F = constante de Faraday = 96500 C.

Determinou-se a contribuição dos íons já presentes na formulação e a necessidade de adicionar NaCl para fornecer os íons necessários para transporte de corrente elétrica.

4.2.5.2. Preparo de mucosa suína

Os esôfagos foram retirados logo após o abate dos porcos no frigorífico (Olhos D'água, Ipuã, SP, Brasil) e transportados em isopor com gelo. As mucosas foram preparadas a partir dos esôfagos imediatamente após a chegada ao laboratório, conforme metodologia proposta por Del Consuelo e colaboradores (2005). A primeira e a última porção do esôfago foram descartadas e o tecido muscular foi separado do conjuntivo com auxílio de um bisturi. O interior do esôfago foi lavado em água corrente para retirar restos de alimentos e, em seguida, colocado em banho maria a 60-65°C por 3 minutos para obtenção do epitélio. O epitélio (mucosa) foi separado do tecido conjuntivo cuidadosamente com auxílio de um descolador gengival. As mucosas foram deixadas imersas em PBS durante 1 hora antes do uso. A integridade das mucosas foi verificada por meio da medida da resistividade elétrica com o auxílio de eletrodos de Ag/AgCl. A mucosa foi montada em células de difusão (descrita em detalhes na figura 10) e os compartimentos doador e receptor preenchidos com saliva artificial. Os eletrodos foram colocados separadamente nas soluções dos compartimentos doador e receptor, e ligados a um gerador de sinal e a um multímetro, respectivamente. Após a aplicação de corrente alternada de 100 mV (RMS) de potência e 10 Hz de frequência, a intensidade da corrente elétrica gerada foi medida com auxílio do multímetro. As resistividades das mucosas (r) foram calculadas segundo a lei de Ohm, pela equação 7:

$$r(K\Omega) = \frac{(P/I)}{A} \quad (7)$$

onde, P corresponde a potência da corrente alternada (100 mV), I representa a intensidade de corrente medida (μA) e A é a área da mucosa em contato com o meio receptor (0,64 cm²).

Foram considerados adequados valores de resistividades iguais ou superiores a 3,0 K Ω /cm². Os experimentos de permeação foram realizados em no máximo 24 horas após o abate dos animais.

4.2.5.3. Eletrodos

Eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl) foram preparados segundo Lopez *et al.* (2000). A extremidade de um fio de prata foi dobrada com alicate como mostra a figura 8. Cloreto de prata (AgCl) foi fundido em cadinho de porcelana, com auxílio de bico de Bunsen, em quantidade suficiente para mergulhar a ponta do fio de prata. Após a imersão, o fio foi retirado com a extremidade banhada coberta com cloreto de prata solidificado. Desta maneira, obteve-se o eletrodo negativo (cátodo).

Figura 8. Obtenção do eletrodo negativo (cátodo). Fio de prata foi dobrado (1) e mergulhado em cloreto de prata fundido em cadinho (2). Após a retirada do fio e a solidificação do cloreto de prata nele depositado (3) o eletrodo está pronto para o uso (SIMONETTI, 2004).

Para o preparo do eletrodo positivo (ânodo), uma solução salina de 5,78 M de NaCl foi utilizada para reduzir o AgCl, com o auxílio de fio de platina e a passagem de corrente elétrica. O terminal positivo do gerador foi conectado ao fio de platina e o terminal negativo foi conectado ao eletrodo de AgCl, o qual foi reduzido em Ag, através da passagem de uma corrente elétrica de 0,3 mA por 16 h (Figura 9).

Figura 9. Preparo do ânodo em solução salina (5,78 M NaCl) com corrente elétrica de 0,4 mA por 16 h (TAVEIRA, 2007).

4.2.5.4. Estabilidade dos fármacos após aplicação da corrente elétrica

Antes da realização dos experimentos de iontoforese verificou-se o impacto da corrente elétrica sobre a estabilidade dos fármacos. Para isso, 10 mL de soluções aquosas contendo 2,5 µg/mL de LCL e 2,5 µg/mL PCL foram preparadas em tampão fosfato 0,1 M nos pHs 7,0 e 5,8 em triplicata. As concentrações dos fármacos e o pH das soluções foram determinados antes e após serem submetidas a uma corrente elétrica de 0,64 mA por 1 h. A análise quantitativa das amostras foi feita por CLAE .

4.2.5.5. Ensaios de permeação passiva e iontoforética

Foram utilizadas células de difusão vertical com área de 0,64 cm², previamente validadas no laboratório (GRATIERI, 2010), conforme demonstrado na figura 10.

Figura 10. Representação da célula de difusão vertical e seus componentes: a) compartimento doador, b) eletrodo positivo c) mucosa esofageal suína, d) compartimento receptor, e) eletrodo negativo f) porta para amostragem g) banho termostatizado e h) barra magnética (GRATIERI, 2010).

As células foram montadas com as mucosas separando os compartimentos doador e receptor. Este último foi preenchido com a solução receptora, saliva artificial, obtida conforme proposto por, mantida a 37°C e agitada a 600 rpm. Após período de equilíbrio de 1 h, o conteúdo do meio doador foi substituído por cada formulação a ser avaliada, em dose infinita. O eletrodo positivo (Ag) foi colocado em contato com a formulação contendo os fármacos, pois quando dissociados apresentam carga positiva. O eletrodo negativo (AgCl) foi colocado em contato com a solução receptora (saliva artificial) para completar o circuito. Foi aplicada uma corrente elétrica constante de 1 mA/cm² gerada por uma fonte de energia (GRATIERI, 2010). Coletas de 1,0 mL foram feitas nos tempos 10, 20, 30, 40, 50 e

60 minutos, sendo os mesmos volumes repostos com a solução receptora. As amostras foram analisadas por CLAE. Foram determinadas as quantidades permeadas e os fluxos dos fármacos.

4.2.5.6. Formulações

As permeações passiva e iontoforética de LCL e PCL foram estudadas a partir dos géis de HPMC em diferentes pHs e mistura dos fármacos, como descrito a seguir:

- a) Gel pH 7,0 contendo 2,5%LCL e 2,5%PCL
- b) Gel pH 5,8 contendo 2,5%LCL e 2,5%PCL
- c) Gel pH 7,0 contendo 2,5%LCL
- d) Gel pH 7,0 contendo 2,5%PCL
- e) Gel pH 5,8 contendo 2,5%LCL
- f) Gel pH 5,8 contendo 2,5%PCL

4.2.5.7. Determinação da concentração de fármaco permeado, fluxo e quantidade recuperada da mucosa

Devido à reposição de solução receptora depois da retirada das amostras para análise a cada hora, fez-se necessária a correção dessa diluição no cálculo da quantidade liberada acumulada de LCL e PCL ao longo do experimento, sendo a quantidade real liberada acumulada de ativo no tempo t igual à quantidade mensurada no tempo t , somada à quantidade total retirada do compartimento receptor para quantificação das amostras anteriores.

O perfil de permeação do LCL e do PCL foi analisado por meio de métodos gráficos, relacionando-se a quantidade de fármaco liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h). Foram construídas curvas em regressão linear para determinar o modelo cinético de permeação do LCL e PCL a partir das formulações estudadas. O modelo de regressão linear com maior coeficiente de determinação (R^2) foi utilizada para calcular o fluxo (J) (velocidade de permeação através da membrana, representado pela inclinação da curva).

No final dos experimentos de permeação, a mucosa foi removida da célula de difusão, gentilmente lavada com água destilada, picotada e a quantidade de fármaco nela presente extraída com 5 mL de fase móvel em banho de ultrassom por 30 minutos. Após filtração, a solução foi analisada por CLAE para determinação da

quantidade de fármaco retida neste tecido.

4.2.5.10. Avaliação do LCL como promotor de permeação do PCL

Welin-Berger e colaboradores (2002) demonstraram que anestésicos locais seriam capazes de atuar como promotores de permeação, desestruturando a membrana lipídica. Para avaliar se o LCL estaria atuando como um promotor de permeação para o PCL foi realizado um pré tratamento da mucosa com 2 mL de solução de LCL 2,5% em tampão fosfato pH 7,0 por 1 hora. Após esse período, a solução foi retirada e substituída pela formulação pH 7,0 contendo PCL a 2,5%. Foram realizadas as permeações passiva e iontoforética do PCL a partir dessa formulação por 1 hora, assim como descrito anteriormente. Quantificou-se então a quantidade de PCL permeada e retida na mucosa.

4.2.6 Análise estatística dos dados

As comparações das médias de duas populações foram realizadas empregando teste-t de Student. No caso de três ou mais populações, os dados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) segundo um ou dois critérios, seguidos do teste Tukey, utilizando o *software* GraphPad Instat 3.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). Foram considerados significativos valores de p menores ou iguais a 5% ($p \leq 0.05$). As análises de regressão e correlação linear foram realizadas usando o *software* Origin 8.0 (OriginLab Co., MA, EUA). No caso dos planejamentos fatoriais, as análises estatísticas dos dados experimentais foram realizadas por ANOVA e regressão linear, empregando o módulo *General Regression* do *software* Statistica 11 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos procedimentos odontológicos envolve uma etapa de anestesia injetável, que muitas vezes é motivo de ansiedade e medo por parte significativa dos pacientes. O desenvolvimento de um sistema não invasivo, capaz de fornecer uma anestesia profunda traria benefícios significativos. A lidocaína é considerada o anestésico padrão em odontologia e inicia sua ação após cerca de 2 a 3 minutos. A prilocaína apresenta uma potência duas vezes maior que a lidocaína e um início de ação mais retardado, após cerca de 2 a 4 minutos, após a aplicação injetável (PAIVA & CAVALCANTI, 2005). Do ponto de vista farmacocinético, a combinação dos anestésicos é uma estratégia interessante, que já vêm sendo estudada para liberação tópica na pele (EMLA®) e na bolsa periodontal (ORAQUIX®). No entanto, essas formulações utilizam os fármacos em sua forma base, sendo relatada a formação de uma mistura eutética, capaz de promover um aumento da penetração dos fármacos, já que quando misturados a fusão é reduzida para um valor abaixo da temperatura corporal (GAJRAJ *et al.*, 1994).

Este trabalho então contemplou o desenvolvimento de um sistema semi-sólido mucoadesivo, contendo a combinação de PCL e LCL, associado ao uso de iontoforese como promotor de permeação. Para isso, primeiramente foi necessário desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência capaz de separar e quantificar simultaneamente PCL e LCL, sem interferência da formulação e de componentes da mucosa. Após essa etapa, foi desenvolvida uma formulação com características ideais para aplicação bucal e para passagem de corrente elétrica. A formulação foi então caracterizada, com relação ao efeito da combinação dos fármacos, por meio de determinação do coeficiente de distribuição mucosa/formulação e de estudos de calorimetria exploratória diferencial, para melhor interpretação dos resultados de permeação. Foram determinadas as propriedades mecânicas da formulação a partir do perfil de textura, das características mucoadesivas e do tempo de permanência. Após a caracterização da formulação, foram realizados os estudos de permeação passiva e iontoforese em mucosa esofageal suína. Nesta etapa foram avaliados os efeitos da combinação dos fármacos e também do pH, sendo determinadas as quantidades permeadas, fluxo e da quantidade recuperada na mucosa após o tempo de experimento. Foi investigada ainda a ação promotora do LCL na permeação do PCL.

5.1. Método analítico

Objetivando desenvolver um método de CLAE em fase reversa que permitisse a quantificação simultânea de PCL e LCL, inicialmente avaliou-se a aplicabilidade de métodos oficiais como o proposto pela USP XXX (USP, 2007) para a quantificação de LCL em soluções injetáveis e outros métodos descritos na literatura (JUNIOR *et al.*, 2012; REPKA *et al.*, 2005; MOHAMMAD, 2009; KOKATE *et al.*, 2008; SROKA-MARKOVIC *et al.*, 2012). Esses métodos mostraram-se inadequados ao desenvolvimento da proposta, principalmente com relação ao tempo de análise e resolução entre os picos cromatográficos referentes aos compostos de interesse. Assim, com base nas propriedades físico-químicas dos fármacos e nos resultados obtidos nas análises da viabilidade dos métodos previamente publicados, diversas condições analíticas foram avaliadas. A condição que se mostrou mais promissora, com melhor separação entre os dois analitos, está descrita na metodologia e foi a validada.

A figura 11 mostra o perfil cromatográfico de uma solução de PCL e LCL em fase móvel composta por uma mistura de acetonitrila : tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (1:1 v/v) e 0,05% (v/v) de dietilamina. A eluição foi realizada sob fluxo isocrático de 1,0 mL/min, comprimento de onda de detecção de 203 nm, temperatura do compartimento da coluna de 30°C, volume de injeção de 20µL e tempo total de corrida fixado em 20 min. Nesta condição os tempos de retenção obtidos para PCL e LCL foram de $8,91 \pm 0,052$ min e $12,98 \pm 0,048$ min, respectivamente. Ainda, a resolução entre os compostos se mostrou adequada para a continuidade do trabalho.

Figura 11. Perfil cromatográfico de solução de trabalho contendo PCL e LCL na concentração de 2,5 µg/mL.

Para verificar se a eficiência, resolução e reprodutibilidade dessa separação cromatográfica estava adequada para que análises de rotina fossem conduzidas, o teste de adequabilidade do sistema (*system suitability*, do inglês) foi realizado (tabela 5).

Tabela 5. Resultados do teste de adequabilidade do sistema.

Parâmetro	PCL (n = 15)	LCL (n = 15)	Recomendações da Literatura (FDA, 1994)
Tempo de Retenção (min)	8,93 (0,635)	12,99 (0,365)	CV (%) < 2
Fator de cauda	1,06 (1,52)	1,02 (1,55)	T < 2
Número de pratos	35370,2 (0,834)	35974,53 (1,21)	N > 2000
Resolução*	17,02 (2,28)		Rs > 2

Resultados expressos como média (CV, %); CV, coeficiente de variação expresso em %; * Resolução entre os analitos.

Com base nos resultados apresentado na tabela 5, é possível afirmar que todos os parâmetros avaliados no teste de adequabilidade do sistema apresentaram resultados aceitáveis quando comparados aos níveis recomendados pela literatura (ICH,1996). Uma vez assegurada a adequabilidade do sistema, foi possível proceder aos estudos de validação do método analítico desenvolvido.

5.1.1. Validação do método

Por definição, a validação é o processo pelo qual estudos laboratoriais são estabelecidos para a avaliação das características de desempenho de um método para satisfazer os requisitos da aplicação analítica a que se destina (USP, 2007; FDA, 1994; ICH, 1996). A validação é necessária para qualquer método, novo ou adaptado, para garantir que ele é capaz de fornecer resultados reprodutíveis e confiáveis, quando usado por diferentes operadores que utilizam os mesmos procedimentos em laboratórios iguais ou diferentes. Embora não configure uma tarefa fácil, no decorrer das últimas décadas a validação de métodos analíticos vem recebendo atenção considerável tanto pela comunidade científica quanto pelas indústrias farmacêuticas em todo o mundo (USP, 2007; MOHAMMAD, 2009; SROKA-MARKOVIC *et al.*, 2012; FDA, 1994; ICH, 1996; AGUIAR *et al.*, 2011). Tal fato pode estar intimamente ligado ao aumento do rigor por parte das agências regulatórias com relação ao controle e garantia da qualidade, eficácia e segurança de produtos destinados a saúde humana.

A fim de se verificar a confiabilidade do método analítico, estudos de validação foram realizados seguindo as diretrizes propostas na ICH Q2B (ICH, 1996). No desenvolvimento deste projeto, seletividade, linearidade e intervalo, sensibilidade (limites de detecção e quantificação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez foram as figuras de mérito avaliadas durante a validação do método analítico estabelecido.

A figura 12 mostra os perfis cromatográficos das amostras de (a) saliva artificial, (b) branco da formulação e (c) mucosa bucal suína analisados no estudo de seletividade.

Figura 12. Perfis cromatográficos das amostras de (a) saliva artificial, (b) branco da formulação e (c) mucosa esofageal suína.

Na avaliação da seletividade, em todas as amostras (saliva artificial, formulação isenta dos fármacos e mucosa esofageal suína) não foram encontrados compostos com o mesmo tempo de retenção de PCL (aproximadamente 9 min) e LCL (aproximadamente 13 min). A seletividade é um parâmetro muito importante no desenvolvimento de métodos analíticos, uma vez que fornece informações sobre a ocorrência de interferentes durante a determinação dos analitos (USP, 2007; FDA, 1994; ICH, 1996). Ademais, a avaliação da seletividade antes da realização de ensaios de quantificação pode contribuir por assegurar a exatidão do método.

Na tabela 6 é apresentado o resumo dos resultados dos parâmetros estatísticos obtidos a partir da construção e análise de três curvas de calibração na avaliação da linearidade do método.

Tabela 6. Linearidade e sensibilidade do método analítico.

Parâmetros Avaliados	PCL	LCL
Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	0,25 – 10	0,25 – 10
Eq. do modelo de regressão linear	$y = 94197,9x + 947$	$y = 110104x - 1586$
(R^2)*	(0,997)	(0,999)
Fc <i>Lack of Fit</i> ($p = 0,05$; 4, 84 g.l.) (p)*	0,03 (0,999)	1,34 (0,263)
Fc/Ft – Regressão ($p = 0,05$; 1, 88 g.l.) *	7289,16	36912,47
Fc/Ft – <i>Lack of Fit</i> ($p = 0,05$; 4, 84 g.l.) *	0,012	0,54
LD ($\mu\text{g/mL}$)*	0,152	0,042
LQ ($\mu\text{g/mL}$)*	0,462	0,127

a) Curvas de regressão linear foram preparadas para as concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 5$ para cada concentração); PCL, cloridrato de prilocaína; LCL, cloridrato de lidocaína; $y = ax + b$, onde y é área do pico do analito, a é o coeficiente angular e b é o coeficiente linear; Fc, valor de F calculado; Ft, valor de F tabelado; Fc/Ft, razão entre valores de F calculado e tabelado; R^2 , coeficiente de determinação; g.l., grau de liberdade; LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação; *Lack of fit*, parâmetro de avaliação da falta de ajuste; *Resultados referentes a média entre as curvas de regressão linear obtidas nos 3 dias de análise.

Para ambos os analitos, no intervalo de linearidade avaliado (0,25-10 $\mu\text{g/mL}$), a regressão linear apresentou coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99, resíduos com distribuição homocedástica e razões entre o valores de F calculado e F tabelado para a regressão superiores a 1. Ainda, os modelos de regressão linear propostos se mostraram bem ajustados considerando que não houve significância do parâmetro de falta de ajuste ou *Lack of fit* ($p \geq 0,05$) e que as razões entre o valores

de F calculado e F tabelado da falta de ajuste foram inferiores a 1. Estes resultados confirmam a linearidade do método no intervalo de concentração de 0,25 a 10 µg/mL, estando os parâmetros estimados em conformidade com os preconizados pela literatura (USP, 2007; FDA, 1994; ICH, 1996, PIMENTEL & NETO, 1996; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Com base nos resultados obtidos na avaliação da linearidade, a sensibilidade do método foi estimada pelos parâmetros de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ). O LD é considerado a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada com exatidão. Já o LQ é a menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Como observado na tabela 5, o LD e LQ calculados por meio da equação (1) para PCL foi de 0,152 µg/mL e de 0,462 µg/mL, respectivamente. O LD e o LQ calculado através da equação (2) para a LCL foi de 0,042 µg/mL e de 0,127 µg/mL, respectivamente. No entanto, na prática, a concentração de 0,25 µg/mL para PCL foi quantificada com precisão e exatidão, podendo ser considerada como LQ real para este analito, como demonstrado na tabela 7.

Tabela 7. Precisão e exatidão do método analítico.

Parâmetro	PCL			LCL		
Concentração nominal (µg/mL)	0,25	2,5	10,0	0,25	2,5	10,0
Intra-dia (n* = 5)						
Concentração média analisada (µg/mL)	0,248	2,511	9,986	0,246	2,506	9,985
Precisão (CV, %) ⁱ⁾	2,855	1,151	2,229	1,242	0,832	0,418
Exatidão (ER, %) ⁱⁱ⁾	-0,827	0,461	-0,137	-1,549	0,256	-0,155
Inter-dias (n** = 2)						
Concentração média analisada (µg/mL)	0,247	2,519	9,993	0,254	2,506	10,0
Precisão (CV, %) ⁱ⁾	3,561	4,819	4,876	1,536	0,845	1,288
Exatidão (ER, %) ⁱⁱ⁾	-1,118	0,748	-0,063	1,604	0,253	0,006

ⁱ⁾ Precisão expressa em coeficiente de variação (CV, %); ⁱⁱ⁾ Exatidão expressa em porcentagem de erro relativo (ER, %); PCL, cloridrato de prilocaína; LCL, cloridrato de lidocaína; *n = número de replicatas de cada concentração; **n = número de dias de análise.

Como pode ser observado, ambos os analitos apresentaram valores de coeficientes de variação e erro relativo inferiores a 5% e 2%, respectivamente, tanto na avaliação da repetibilidade quanto da precisão intermediária e, portanto, estão de

acordo com os critérios estabelecidos pela literatura (USP, 2007; FDA, 1994; ICH, 1996). Assim, os resultados obtidos atestam a precisão e exatidão do método.

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade de se manter inalterado por modificações pequenas, mas deliberadas nos parâmetros analíticos e fornece uma indicação de sua confiabilidade durante as análises de rotina (USP, 2007; FDA, 1994; ICH, 1996). Para a avaliação deste parâmetro, empregou-se um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{4-1} para investigar o efeito do comprimento de onda de detecção (λ , 203 ± 2 nm), temperatura do compartimento da coluna (T, $30 \pm 2^\circ\text{C}$), pH do tampão fosfato que compõe a fase móvel (pH, $7,0 \pm 0,2$) e fluxo da fase móvel (FI, $1,0 \pm 0,2$ mL/min) nas áreas dos picos, números de pratos, fatores de cauda e resolução entre os analitos. Este tipo de abordagem vem sendo empregado com sucesso na prática analítica, pois permite ao analista avaliar um grande número de fatores por meio de um reduzido número de experimentos, o que acarreta na redução do tempo e dos custos necessários ao desenvolvimento e validação do método (HIBBERT, 2012; AGUIAR *et al.* 2011 FERREIRA *et al.*, 2007; HUND *et al.*, 2000). Os resultados da avaliação da robustez do método são apresentados na figura 13.

Figura 13. Gráficos de Pareto representando os efeitos dos fatores avaliados na área do pico de PCL, área do pico de LCL, número de pratos de PCL, número de pratos de LCL, fator de cauda de PCL, fator de cauda de LCL e resolução PCL e LCL.

Como pode ser observado na figura 13, o comprimento de onda não apresentou efeito significativo sobre as respostas avaliadas, e ainda, nenhum dos fatores investigados afetou o fator de cauda de PCL. Entretanto, FI e pH influenciaram negativamente as áreas dos picos PCL e LCL, o que significa que a medida que se aumenta o fluxo e o pH do tampão que compõe a fase móvel, menores são as áreas dos picos dos analitos. O número de pratos de PCL foi influenciado positivamente por FI, isto é, quanto maior o fluxo de fase móvel, maior o número de pratos. Efeito semelhante de FI foi observado para o número de pratos de LCL, o qual ainda mostrou ser influenciado positivamente pelo pH e negativamente pela temperatura de análise. Por fim, o fluxo de fase móvel apresentou efeito negativo sobre o fator de cauda de LCL e resolução dos analitos. Portanto, o pH, a temperatura de análise e, em especial, o fluxo da fase móvel devem ser controlados com rigor durante as análises de rotina.

5.1.2 Recuperação a partir da mucosa esofageal

Nos estudos de permeação passiva e iontoforese foi determinada a quantidade de fármacos presentes na mucosa esofageal após o experimento. Assim, foi necessário desenvolver e validar um método de recuperação de ambos os fármacos a partir desse tecido. Os resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Recuperação de PCL e LCL a partir de mucosa esofageal suína.

Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração de PCL recuperada (µg/mL)	% de Recuperação de PCL	Concentração de LCL recuperada (µg/mL)	% de Recuperação de PCL
0,25	0,234±0,021	93,531±8,342	0,225±0,033	90,144±13,391
1	1,024±0,030	102,418±3,047	1,014±0,028	101,353±2,798
10	9,774±0,329	97,741±3,292	9,888±0,286	98,876±2,858

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Como pode ser observado na tabela 8, os resultados do ensaio de recuperação dos fármacos a partir da mucosa esofageal suína confirmam uma recuperação satisfatória em todos os níveis, em conformidade com os limites preconizados pela literatura (USP, 2007; FDA, 1994; ICH, 1996). Esses resultados

são importantes, pois garantem a confiabilidade dos resultados relacionados a quantificação do fármaco retido na mucosa durante os estudos de permeação.

5.2. Preparo de formulações

Os sistemas semi-sólidos mucoadesivos para liberação de anestésico e aplicação de iontoforese foram desenvolvidos na forma de hidrogéis pois a formulação deve ser hidrofílica para permitir a passagem da corrente elétrica na iontoforese. De maneira geral, hidrogéis apresentam vantagens como uma liberação do relativamente rápida do princípio ativo, facilidade de preparo, de administração, além de elevada biocompatibilidade e características mucoadesivas, permitindo adesão à mucosa e rápida eliminação através de rotas catabólicas, diminuindo riscos de irritação e alergias (BANSAL *et al.*, 2009).

O polímero escolhido para o preparo dos hidrogéis foi a HPMC devido ao seu caráter não iônico, que minimiza as interações com os fármacos catiônicos, facilitando a liberação dos mesmos. Além disso, a HPMC é um éter de celulose que apresenta mucoadesão considerável (SUDHAKAR *et al.*, 2006), já que o gel deve promover o contato e manutenção da formulação com a mucosa bucal durante a aplicação da iontoforese.

Na iontoforese com eletrodos de Ag/AgCl, as reações eletroquímicas no ânodo (eletrodo de Ag) necessitam da presença de íons cloro, os quais reagem com a prata e formam cloreto de prata. No cátodo (eletrodo de AgCl), o cloreto de prata é reduzido com a chegada do elétron liberado pela oxidação da prata no ânodo e há formação de prata sólida. O circuito elétrico é, portanto, completado pelos íons inorgânicos presentes na formulação ou na membrana biológica, principalmente Na^+ e Cl^- e, desta forma, esses íons podem interferir na eficiência de transporte da corrente pelo fármaco (GRATIERI *et al.*, 2008).

Segundo a equação 6, para carrear uma corrente elétrica de 1 mA por 1 hora seriam necessários $6,2176 \times 10^{-4}$ mol de íons. Não foi necessário adicionar NaCl para sustentar a corrente pelo período do experimento, já que 10 g da formulação fornece cerca de $9,5 \times 10^{-3}$ mol de íons cloreto provenientes de cada cloridrato. O transporte da corrente elétrica é competitivo entre os íons presentes no sistema e a presença de outros íons pode reduzir o fluxo do fármaco, assim é interessante minimizá-los. No entanto, utilizou-se tampão fosfato para o preparo das formulações

para manter o pH em 7,0 e 5,8 e avaliar o efeito da ionização dos fármacos no transporte eletromigratório durante a iontoforese.

5.3. Caracterização da formulação

A combinação de prilocaína e lidocaína em uma mesma formulação já é uma estratégia utilizada em formulações de uso tópico na pele (EMLA®) e na bolsa periodontal (ORAQUIX®). A literatura relata que prilocaína e lidocaína na forma base em partes iguais formam uma mistura eutética, que pode ser definida como um composto que funde a uma temperatura menor do que seus componentes (GAJRAJ *et al.*, 1994; FRIEDMAN *et al.*, 2001). Assim, a formação de uma mistura eutética nos géis que continham PCL e LCL foi investigada através da calorimetria diferencial exploratória. Determinou-se ainda o efeito da combinação dos fármacos nos coeficientes de distribuição mucosa/formulação nos dois valores de pH estudados nos ensaios de permeação. A formulação também foi caracterizada quanto às suas propriedades mecânicas e mucoadesivas, como discutido nos próximos itens.

5.3.1 Uniformidade de conteúdo

Segundo a literatura (USP, 2007), hidrogéis de cloridrato de lidocaína não devem conter menos de 95% e não mais que 105% de fármaco. Para a formulação desenvolvida, foi encontrado um teor de $97,16 \pm 0,85\%$, sendo o coeficiente de variação entre as amostras de 0,88%, estando, portanto, em conformidade com a literatura.

5.3.2. Determinação dos coeficientes de distribuição mucosa/formulação do PCL e LCL

Coeficientes de distribuição ou partição são importantes descritores da lipofilicidade de um fármaco, o que influencia sua liberação, penetração, captação, distribuição, biotransformação e excreção. Mais especificamente, o coeficiente de partição (P) representa a razão da concentração do composto em duas fases distintas, geralmente octanol e água, quando em equilíbrio. O P deve ser determinado com as espécies na forma não ionizada (JEPSON *et al.*, 1994). No entanto, compostos ionizáveis podem estar parcialmente ionizados dependendo do pH. Uma vez que espécies neutras e ionizadas possuem polaridades diferentes, sua distribuição entre meios distintos é dependente do pH. O comportamento de

espécies ionizáveis em uma solução em um determinado valor ou intervalo de pH é então determinado em função de seu coeficiente de distribuição (D) (KAH & BROWN, 2008). Desta forma, o Log D deve ser usado preferencialmente ao Log P como descritor da lipofilicidade, especialmente para espécies ionizáveis em pH fisiológico (BHAL *et al.*, 2007).

Os coeficientes de distribuição mucosa/formulação de PCL e LCL foram determinados a fim de se investigar alterações nessa propriedade físico-química decorrentes da mistura entre os fármacos em pH 5,8 e 7. Optou-se por avaliar a distribuição entre a mucosa e a formulação, por ser mais representativo do sistema estudado. O espaço intercelular do tecido epitelial da mucosa bucal é preenchido com cerca de 50% de lipídios polares, destacando-se os fosfolipídios, colesterol e glicosilceramidas (SQUIER *et al.*, 1991). Já o hidrogel possui cerca de 90% de água (tabela 3). Assim, a mucosa foi considerada como a fase mais lipofílica (“oleosa”) e a formulação a fase mais hidrofílica (“aquosa”).

Os resultados para as distribuições entre mucosa e as formulações em pH 7,0 e 5,8 estão apresentadas na figura 14.

Figura 14. Determinação dos coeficientes de distribuição mucosa esofageal/formulação (hidrogel nos pHs 7,0 e 5,8) (n=3) *p<0,05 (Teste-t de Student).

Em pH 7,0, o coeficiente de distribuição do PCL isolado é significativamente maior do que o do LCL. Após a combinação, o coeficiente de distribuição mucosa/formulação do PCL diminuiu, demonstrando um aumento significativo da quantidade do fármaco na fase aquosa, o que sugere um aumento do seu caráter hidrofílico, além de ficar bastante semelhante ao do LCL, que não foi alterado com a

combinação. Em pH 5,8, o coeficiente de distribuição mucosa/ formulação do PCL isolado é menor do que o do LCL. Após a combinação, o coeficiente de distribuição do PCL aumentou, indicando aumento da hidrofobicidade do fármaco e ficando semelhante ao do LCL, que não se alterou. Esses resultados demonstram que a combinação dos fármacos é capaz de alterar os coeficientes de distribuição do PCL nos dois valores de pH, sugerindo algum tipo de interação entre esses cloridratos.

5.3.3. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A análise térmica foi realizada para avaliar a formação de mistura eutética de PCL e LCL, assim como ocorre com a forma básica dos fármacos. Os termogramas dos sistemas contendo PCL e LCL estão apresentados na figura 15 e os parâmetros da calorimetria diferencial exploratória na tabela 9.

Figura 15. Termogramas de A) gel HPMC, B) gel HPMC + PCL, C) gel HPMC + LCL e D) gel HPMC + PCL + LCL.

Tabela 9. Parâmetros da Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).

	Pico	Início	Fim	Entalpia
A	65,22°C	31,48°C	90,25°C	-228.46 mJ
B	79,53°C	35,53°C	110,92°C	-234.27 mJ
	241,97°C	233,0°C	256,29°C	-128.98mJ
C	67,48°C	35,06°C	98,69°C	-79.91 mJ
	239,40°C	232,59°C	251,67°C	-76.10 mJ
D	239,17°C	226,35°C	251,34°C	-213.67 mJ

Amostras: A) gel HPMC, B) gel HPMC + PCL, C) gel HPMC + LCL e D) gel HPMC + PCL + LCL.

Na curva A, é possível observar um pico endotérmico em 65,22°C, correspondente à formulação. Picos similares podem ser observados nas curvas B e C, com uma pequena variação (79,53°C em B e 67,48°C em C). Os dois fármacos apresentam pontos de fusão bastante semelhantes. O pico endotérmico correspondente à fusão de PCL pode ser observado em 241,97°C na curva B e o pico endotérmico da fusão de LCL em 239,40°C na curva C. Na curva D há um único pico endotérmico de fusão em 239,17°C com aumento de entalpia devido à combinação entre PCL e LCL em uma mesma formulação. Entretanto, não ocorreu uma redução da temperatura de fusão da mistura de PCL e LCL em relação às temperaturas de fusão dos fármacos isolados. Isso demonstra que PCL e LCL nesse sistema não formam uma mistura eutética, ao contrário do que ocorre com as formas básicas.

5.3.4 Propriedades mecânicas

As principais características a serem consideradas no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos são a facilidade da remoção da formulação da embalagem primária, facilidade de aplicação do produto na área desejada e a retenção no sítio de aplicação sem desintegração devendo, portanto, apresentar propriedades mecânicas adequadas para um máximo benefício do paciente (KARAVANA *et al.*, 2009). Assim, a análise em modo de análise de perfil de textura vem sendo utilizada para caracterizar as propriedades mecânicas de géis farmacêuticos e sistemas semi-sólidos. Essa técnica rápida e simples pode fornecer informações como dureza, adesividade, compressibilidade, coesividade e elasticidade das formulações (JONES *et al.*, 1997; BANSAL *et al.*, 2009).

Os resultados de dureza, compressibilidade, elasticidade, coesividade e

adesividade dos hidrogéis estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Propriedades mecânicas dos géis HPMC contendo PCL e LCL, a 25 e 37°C.

	25°C	37°C
Dureza (N)	0,1313 ± 0,005338*	0,08348 ± 0,01247
Compressibilidade (N.mm)	0,06563 ± 0,002669*	0,04174 ± 0,006235
Elasticidade	1,084 ± 0,009119	1,069 ± 0,01205
Coesividade	1,169 ± 0,003202	1,180 ± 0,005203
Adesividade (N.mm)	0,3222 ± 0,0128*	0,2430 ± 0,002793

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=5). *p<0,05 (Teste-t de Student).

A dureza expressa a força necessária para aplicação do hidrogel, devendo esses valores serem baixos para possibilitar uma fácil administração (JONES *et al.*, 1999). A 37°C a dureza foi significativamente menor que a 25°C, porém em ambas temperaturas a formulação apresentou valores semelhante aos obtidos por Karavana e colaboradores (2009) para hidrogéis de HPMC (E5, E15, E50 e K100M, de 1 a 15%) contendo cloridrato de benzidamina para aplicação bucal, que variaram de 0,02 a 0,17 N. A compressibilidade expressa o trabalho necessário para a retirada da formulação da embalagem e também a facilidade de espalhamento no local desejado (JONES *et al.*, 1999; TAN *et al.*, 2000). Mais uma vez, os valores a 37°C foram menores que a 25°C, mas ambos dentro do aceitável, sendo ainda menores dos que os obtidos por Karavana e colaboradores (2009), de até 1,21 ± 0,01 N.mm. Essa diminuição da dureza e compressibilidade dos géis em função do aumento da temperatura também foi observada por Jones e colaboradores (1999). Esses autores correlacionaram este efeito às características reológicas nas diferentes temperaturas. Em temperaturas mais altas, a maior energia cinética das moléculas diminui as forças intermoleculares, acarretando na diminuição da viscosidade, consistência, dureza e compressibilidade dos géis.

A elasticidade das cadeias poliméricas está diretamente relacionada ao mecanismo básico da mucoadesão, devido à formação de ligações adesivas entre o polímero e o muco. Valores baixos indicam uma maior elasticidade do produto (JONES *et al.*, 1996). A elasticidade da formulação se mostrou adequada a 37 e 25°C, com valores semelhantes aos obtidos por Karavana e colaboradores (2009), entre 0,90 e 1,0.

A coesividade está relacionada aos aspectos espaciais da recuperação da estrutura; seguinte à compressão. A coesividade do polímero é alta se suas próprias forças atrativas no interior do gel são altas. Esse parâmetro aumenta a retenção da formulação no local desejado. Valores altos representam uma recuperação estrutural completa após a aplicação (RICHARDSON *et al.*, 1992; JONES *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1997; TAN *et al.*, 2000). Karavana e colaboradores (2009) obtiveram valores semelhantes, entre 0,85 e 1,11, considerados adequados.

5.3.5 Mucoadesão

Bioadesão é o termo que descreve a adesão de um polímero, sintético ou natural, a um substrato biológico; quando esse substrato é o muco ou membrana mucosa, denomina-se mucoadesão. A bioadesão fornece vantagens como uma liberação prolongada do fármaco, localização da terapia, alcance de tecidos específicos e contato íntimo com o substrato (NEEDLEMAN & SMALES, 1995).

Diversos mecanismos foram propostos para explicar a mucoadesão, baseando-se principalmente em três etapas: o intumescimento, a interpenetração e a interação entre o polímero e o substrato. O intumescimento decorre do fato de que o muco é composto predominantemente por água, assim o polímero deve ser capaz de intumescer para propiciar um contato íntimo com a superfície das mucosas. Essa etapa geralmente ocorre para formas sólidas ou com baixo teor de água, ao contrário dos hidrogéis com os polímeros já hidratados. Na segunda etapa, o polímero difunde-se por entre as redes do muco, por isso, o mesmo deve possuir um comprimento de cadeia linear adequado, além de uma mobilidade dessa cadeia, para que essa interpenetração seja satisfatória. Na última etapa, polímero e muco interagem eletrostaticamente ou por ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e de Van der Waals, e a força dessas ligações determinará a força mucoadesiva do polímero (KELLAWAY & WARRERS, 1996; SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005). Assim, polímeros capazes de formar ligações de hidrogênio e hidrofóbicas com a rede de muco são os mais desejáveis para a mucoadesão.

Hidrogéis de polímeros derivados da celulose como carboximetilcelulose, hidroxipropilcelulose e HPMC demonstram habilidade de interação com a mucina. Essa interação é interpretada como ligação à camada de muco que recobre o epitélio bucal e aumenta o tempo de retenção do gel na mucosa (FINI *et al.*, 2011). Acredita-se que as forças mucoadesivas predominantes para a HPMC sejam as

ligações de hidrogênio e/ou a interpenetração das cadeias poliméricas, porém o mecanismo exato é desconhecido (SURAPANENI *et al.*, 2006).

Os experimentos de mucoadesão foram realizados utilizando uma força de contato de 0,5 N, tipicamente utilizada para avaliação de formulações para uso bucal (KARAVANA *et al.*, 2009; NUNES, 2012). No entanto, o tempo de contato entre a formulação e a mucosa é bastante variável. Assim, a força de destacamento e o trabalho de mucoadesão, obtidos pelo cálculo da área da curva de força vs. distância, foram determinados em diferentes tempos de contato, conforme demonstrado na tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros de mucoadesão do gel de HPMC contendo PCL e LCL, em diferentes tempos de contato.

Tempo de contato (s)	Força de Destacamento (N)	Trabalho de Mucoadesão (mJ/cm ²)
30	0,067 ± 0,0122	0,0945 ± 0,0080
60	0,126 ± 0,0336	0,1188 ± 0,0604
120	0,136 ± 0,0134	0,1055 ± 0,0686
180	0,140 ± 0,0353	0,0938 ± 0,0650
300	0,134 ± 0,0702	0,1277 ± 0,0407

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=7).

O polímero utilizado já havia sido descrito como bioadesivo (SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005), então já era esperado que a formulação apresentasse boas propriedades mucoadesivas.

É possível observar que não houve diferença significativa entre os valores de força de destacamento e trabalho de mucoadesão após diferentes tempos de contato entre a mucosa e a formulação. Mortazavi e Smart (1994) sugeriram que a HPMC seria capaz de interagir rapidamente com a superfície da mucosa, portanto os 30 s já seriam suficientes para a formação de tais interações.

O resultado obtido para o trabalho de mucoadesão, de aproximadamente 0,1 mJ/ cm² foi semelhante ao obtido por Karavana e colaboradores (2009) para hidrogéis de HPMC. Os autores relataram uma variação de trabalho de 0,03 a 0,21 mJ/ cm², de acordo com o aumento da porcentagem de HPMC (de 1 a 15%). Amasya e colaboradores (2012) desenvolveram hidrogéis bucais de HPMC e quitosana com triacínolona e também obtiveram valores de trabalho de mucoadesão

de 0,1 mJ/ cm² para os hidrogéis contendo de 1 a 2% de HPMC e 3% de quitosana.

Em sistemas semi-sólidos, a ruptura ou falha da ligação mucoadesiva pode ocorrer em três regiões: dentro do muco (quando as ligações mucoadesivas são fortes), na interface entre o sistema e o muco (quando as interações são fracas) ou ainda na parte hidratada do próprio sistema (quando as ligações são muito fracas) (SMART, 2005). Conforme demonstrado na figura 16, a ruptura ocorreu na camada hidratada do sistema mucoadesivo.

Figura 16. Ruptura da ligação mucoadesiva entre a formulação e a mucosa bucal suína.

Polímeros não iônicos como a HPMC apresentam menor desempenho mucoadesivo quando comparados aos polieletrólitos, como carbopol e quitosana. Assim, as interações entre os polímeros não iônicos e a mucina geralmente são bastante fracas. Essa mucoadesão ocorre predominantemente por difusão das macromoléculas do hidrogel e pela interpenetração na camada de muco (KHUTORYANSKIY, 2011). Em face desses resultados, pode-se utilizar técnicas complementares para avaliar as características mucoadesivas de um sistema, como a determinação do tempo de permanência.

5.3.6. Avaliação *in vitro* do tempo de permanência

O método para avaliação do tempo de permanência utilizado foi descrito primeiramente por Rao e Buri (1989) e vem sendo utilizado para estimar propriedades mucoadesivas de formas de dosagens administradas em regiões do corpo humano em que os tecidos são afetados por fluxo de fluídos biológicos (Khutoryanskiy, 2011).

A figura 17 mostra a formulação (seta) aderida na mucosa do início (A) ao final de 1 h de experimento (B).

Figura 17. Formulação (setas) aderida na mucosa no início (A) e ao final de 1 hora de experimento (B).

O experimento foi interrompido ao final de uma hora, tempo médio de um procedimento odontológico. Foi possível observar que a formulação se deslocou do local de aplicação inicial após cerca de 20 minutos, porém ao final de uma hora ainda era possível observar formulação aderida ao longo da mucosa. Mortazavi e Smart (1994) demonstraram que a HPMC, apesar de ser um dos polímeros com menor força mucoadesiva possibilitou uma maior duração da adesão, quando comparada a polímeros como carbopol (907, 910, 934P, EX55), carboximetilcelulose sódica, Pemulen TR-1, hidroxietilcelulose e alginato de sódio, devido à rápida

interação com a superfície da mucosa, como demonstrado anteriormente no ensaio de mucoadesão.

O ensaio de tempo de permanência foi realizado para complementar os testes de perfil de textura e mucoadesão na caracterização da formulação. Para aplicação clínica, a área de aplicação pode ser isolada, não sofrendo influência de um fluxo de saliva tão grande quando 1,0 mL/min. Além disso, a própria formulação pode ser acondicionada em um dispositivo mucoadesivo com um envoltório que sirva de barreira física para conter a lixiviação do núcleo, evitar a adesão nas bochechas e lábios e vetorizar o fluxo de fármaco no sentido da gengiva.

5.4. Permeação passiva e iontoforética do PCL e do LCL

5.4.1. Preparo das mucosas suínas

Experimentos de permeação de fármacos através de membrana mucosa bucal podem ser conduzidos utilizando-se tecidos de diferentes espécies animais, incluindo coelhos, hamsters, cães e suínos (PATEL *et al.*, 2012). A mucosa bucal suína e humana apresenta composição lipídica, propriedades de barreira e morfologia semelhantes, sendo um modelo efetivo validado para estudos de permeação bucal (HU *et al.*, 2011). Bochechas suínas são disponíveis a baixo custo, porém, é difícil a obtenção de grandes áreas de tecido sem danos devido à mastigação. Além disso, pela mucosa encontrar-se firmemente aderida ao tecido muscular subjacente, o processo de dissecação demanda muito mais tempo e esforço. A substituição da mucosa bucal pela mucosa do esôfago foi proposta por Del Consuelo e colaboradores (2005). Esses autores demonstraram que o epitélio das mucosas bucal e esofageal apresenta composição lipídica semelhante, qualitativa e quantitativamente e, baseado nas características estruturais e de permeabilidade, o tecido pode ser considerado um modelo válido e vantajoso para estudos de absorção bucal. Assim, pela maior facilidade de obtenção, manipulação, maior rendimento e menor variabilidade em termos de barreira à permeabilidade, o tecido utilizado para os estudos de permeação *in vitro* foi o epitélio esofageal suíno.

Optou-se por trabalhar com o epitélio, pois esta membrana é a principal barreira à penetração de fármacos administrados tópicamente na boca (DEL CONSUELO *et al.*, 2005). Kurlkarni e colaboradores (2010) demonstraram, através de estudos de permeação *in vitro* e análises histológicas, que o uso de tratamento

térmico para separação do epitélio do tecido conectivo não afeta suas propriedades de integridade e permeabilidade quando conduzido de maneira adequada.

Apesar do grande número de publicações relatando o uso de mucosa esofageal suína em estudos de permeação *in vitro*, a literatura referente ao estudo do impacto das condições de armazenamento (especialmente tempo e temperatura de congelamento) sob a manutenção da integridade e capacidade de barreira do epitélio é contraditória (DEL CONSUELO *et al.*, 2005; KULKARNI *et al.*, 2010; CAON *et al.*, 2012). Optou-se então por realizar os experimentos de permeação em no máximo 24 horas após o abate dos animais, utilizando apenas mucosas frescas e, ainda, avaliar a sua viabilidade por meio da medida de resistividade elétrica. A resistividade elétrica é um indicador rápido e preciso do estado estrutural da pele (POLAT *et al.*, 2011), mas não existem relatos de valores ótimos indicativos do estado estrutural de mucosas. Verificou-se que, de maneira geral, as mucosas frescas, aparentemente íntegras, apresentavam uma resistividade elétrica que variava de 2,84 a 12,7 K Ω /cm². Por outro lado, mucosas propositalmente danificadas e/ou inviáveis (cortadas e/ou furadas) apresentavam resistividade inferior a 1,5 K Ω /cm². Como não existem na literatura relatos sobre a resistência da mucosa esofageal suína e sua relação como a integridade da mucosa até o momento, foi padronizado o uso de mucosas com resistência superior ou igual a 3 K Ω /cm² para realizar os experimentos de permeação. Ensaios de permeação de LCL e PCL realizados com mucosas com resistividade entre 2,84 a 12,7 K Ω /cm² não apresentaram diferença significativa entre as quantidades de fármaco permeadas após o tempo máximo dos experimentos de permeação (60 min) ($R^2 < 0,3$) sugerindo que a faixa de resistência escolhida é adequada.

5.4.2. Estabilidade dos fármacos após aplicação da corrente elétrica

Nos estudos de permeação de PCL e LCL através da mucosa esofageal, os experimentos foram realizados na presença e ausência de corrente elétrica para verificar a influência da iontoforese na permeação dos fármacos a partir das formulações. Para verificar se a corrente elétrica causava a degradação dos fármacos nas condições utilizadas na iontoforese, soluções de PCL e LCL foram submetidas a aplicação de 0,6 mA por 1 hora e a quantidade de fármaco remanescente foi avaliada após este período. Foram encontrados $98,40 \pm 2,20\%$ de PCL e $93,95 \pm 6,87\%$ de LCL na solução a pH 7,0 e $93,77 \pm 1,03\%$ e LCL de $93,13 \pm$

1,14% nas soluções preparadas em pH 5,8. Assim, as soluções preparadas em pH 5,8 apresentaram uma variação de 0,85% antes e após a passagem de corrente, enquanto as soluções preparadas em pH 7,0 apresentaram variação de 1,91%. Desta forma, foi confirmada a estabilidade do PCL e LCL após a passagem de corrente elétrica, devido aos pequenos valores de variação, o que não deve influenciar na concentração de fármaco total utilizada nos estudos de iontoforese.

5.4.3. Ensaios de permeação passiva e iontoforética

Os experimentos de iontoforese foram realizados aplicando-se uma corrente elétrica de 0,64 mA numa área de 0,64 cm² de mucosa, totalizando 1 mA/cm². Densidades maiores que 2 mA/cm² podem causar dano tecidual (GIANNOLA *et al.*, 2007; MOSCICKA-STUDZINSKA *et al.*, 2009). A Figura 18 mostra o perfil de permeação passiva e iontoforética do PCL isolado e associado ao LCL e a figura 19, o perfil de permeação passiva e iontoforética do LCL isolado e associado ao PCL (gel pH 7,0 contendo 2,5% de PCL e/ou de LCL). Os valores de fluxo estão apresentados na tabela 12.

Figura 18. Perfil de permeação passiva e iontoforética do PCL isolado e combinado com LCL a partir do gel de HPMC pH 7,0 contendo os fármacos incorporados na concentração de 2,5% cada. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

Figura 19. Perfil de permeação passiva e iontoforética do LCL isolado e combinado com PCL, a partir do gel de HPMC pH 7,0 contendo os fármacos incorporados na concentração de 2,5% cada. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

Tabela 12. Fluxos do PCL e do LCL em pH 7,0.

Formulação	J Passivo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$)	J Iontoforese ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$)
PCL isolado	1,5 ($\pm 0,1$)	6,9 ($\pm 1,8$)* ^a
PCL associado	1,6 ($\pm 0,3$)	18,8 ($\pm 2,2$)* ^b
LCL isolado	4,0 ($\pm 0,7$)* ^c	5,4 ($\pm 1,2$)
LCL associado	1,6 ($\pm 0,3$)	1,9 ($\pm 0,2$)

Fluxo Passivo (J Passivo) e iontoforético (J Iontoforese) a partir do gel de HPMC pH 7,0 contendo os fármacos incorporados isoladamente ou em associação (combinados), na concentração de 2,5% cada. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). * $p < 0,05$ (a, c: quando comparado ao PCL isolado passivo; b: quando comparado ao PCL associado passivo) (Teste Tukey).

Pode-se observar nas Figuras 18 e 19 que o perfil de permeação dos fármacos, isolados ou associados, é semelhante na ausência e presença da iontoforese. A quantidade de fármaco permeada, no entanto, varia dependendo da formulação e da corrente elétrica. Mais especificamente, analisando primeiramente a permeação passiva dos fármacos isolados, pode-se observar na Tabela 12 que o

LCL permeia a mucosa mais facilmente do que o PCL, com um fluxo aproximadamente 2,6 vezes maior, devido provavelmente ao maior Log P da lidocaína (2,196) comparado ao da prilocaína (2,029), o que faz com que ela atravesse melhor a mucosa.

No entanto, quando as substâncias são associadas na mesma formulação, o fluxo passivo do LCL diminui, ficando semelhante ao do PCL. O estudo do coeficiente de distribuição (item 5.3.2., figura 14) mostra que em pH 7,0 o PCL se distribui mais na mucosa do que o LCL, mesmo quando associado. Essa maior distribuição do PCL na mucosa pode ter aumentado seu acúmulo na mucosa, dificultando, por competição, a permeação do LCL. De fato, a recuperação dos fármacos na mucosa foi maior quando associados, sendo que 2 vezes mais PCL foi recuperado deste tecido do que LCL (Figura 20).

Figura 20. Quantidade total de PCL e LCL recuperados da mucosa após 60 min ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), a partir do gel de HPMC pH 7,0 contendo os fármacos incorporados isoladamente ou combinados, na concentração de 2,5% cada. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

A iontoforese foi capaz de aumentar significativamente a quantidade de PCL permeada (tabela 12), cerca de 4,5 vezes, porém tal aumento não foi observado para LCL, possivelmente devido, novamente, a maior lipofilicidade da lidocaína que faz com que ela apresente uma boa permeação passiva e não sofra influência da corrente elétrica. Hu e colaboradores (2011) encontraram um fluxo de 0,745

$\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$ para LCL, após permeação passiva em mucosa a partir de um hidrogel de carboximetilcelulose a 2,5%. Esse baixo fluxo comparado ao obtidos em nosso trabalho pode estar relacionado ao fato de que a carboximetilcelulose é um polímero aniônico, ou seja, possui cargas negativas que podem estar interagindo com a carga positiva do LCL, dificultando sua liberação do gel. Os autores obtiveram um fluxo de $4,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$ para LCL após iontoforese anódica ($0,47 \text{ mA}/\text{cm}^2$), sendo semelhante ao fluxo encontrado no presente estudo, o que sugere que a iontoforese seja capaz de vencer a interação entre o polímero e o fármaco.

Quando as moléculas são associadas na mesma formulação, a quantidade de PCL permeada com iontoforese foi significativamente maior do que a passiva, cerca de 12 vezes (tabela 12); porém o LCL não foi beneficiado pela iontoforese. Ao analisarmos os resultados de coeficiente de distribuição mucosa/formulação (figura 14) é possível observar que a combinação dos fármacos aumentou significativamente o caráter hidrofílico do PCL, sugerindo uma maior ionização da substância quando associada, portanto, o PCL possui mais íons para transportar a corrente elétrica e, conseqüentemente, apresenta maior permeação quando associado ao LCL na mesma formulação. Além disso, o fluxo eletromigratório de cada íon está relacionado com sua mobilidade elétrica e concentração (GRATIERI *et al.*, 2008). A concentração de PCL e LCL na formulação é a mesma, então o fator determinante para sua permeação iontoforética é a mobilidade elétrica. De maneira geral, a mobilidade elétrica de uma molécula é inversamente proporcional ao seu tamanho (GRATIERI *et al.*, 2008). Lai e Roberts (1998) observaram, em estudo de iontoforese em pele, que o PCL apresenta uma mobilidade elétrica maior do que o LCL, o que estaria relacionado ao seu menor tamanho molecular. Kokate e colaboradores (2009), em estudo *in silico* para a predição da permeabilidade de fármacos através da mucosa bucal de suínos, também demonstraram 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. Desta forma, a associação do PCL com o LCL aumentou a mobilidade elétrica do PCL e, conseqüentemente, sua permeação. Apesar deste aumento, o coeficiente de distribuição mucosa/formulação em pH 7,0 do PCL ainda é maior do que o do LCL, o que levou também a uma maior retenção deste fármaco na mucosa (figura 18). A altíssima quantidade de PCL encontrada na mucosa após 1 hora de experimento é reflexo, portanto, de sua alta

permeação iontoforética quando associado ao LCL e de seu maior coeficiente de distribuição para a mucosa quando comparado ao LCL.

O acúmulo de anestésico na mucosa é desejável, pois pode exercer 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.

5.5.5. Avaliação da influência do pH

A variação do pH de uma formulação doadora de fármaco pode modificar a contribuição eletrosmótica e eletromigratória no transporte de uma molécula através da mucosa, além de determinar o grau de ionização da própria molécula de fármaco. Ao se aumentar o pH de uma formulação contendo uma base fraca, por exemplo, a fração ionizada da base diminui, diminuindo o potencial eletromigratório. No entanto, em valores mais altos de pH, a eletrosmose do ânodo para o cátodo passa a contribuir de maneira mais significativa, uma vez que a mucosa se encontra negativamente ionizada. O impacto dessas forças na permeação iontoforética dependerá das propriedades físico-químicas de cada substância a ser estudada.

Lidocaína e prilocaína são bases fracas, com pKa 7,8 e 7,9, respectivamente (CARVALHO, 1994). Em pH 7,0, cerca de 88,6% de prilocaína estaria carregada positivamente contra 87,9% de lidocaína. Em pH 5,8 a porcentagem de fármaco ionizada aumenta; 99,2% para a prilocaína e 99,1% para a lidocaína. Desta forma, espera-se que o transporte eletromigratório dessas substâncias seja favorecido quando dispersas em formulações com pHs mais baixos, pois estarão mais carregados positivamente. Sendo assim, foi estudada esta hipótese nas mesmas formulações descritas anteriormente, contendo PCL e LCL a 2,5% isolados ou associados, mas em pH 5,8. O perfil de permeação de cada fármaco, isolado ou associado, bem como seus fluxos estão representados nas figuras 21 e 22 e na tabela 13, respectivamente.

Figura 21. Perfil de permeação passiva e iontoforética do PCL a partir do gel de HPMC pH 5,8 contendo os fármacos incorporados isoladamente e em combinação com o LCL na concentração de 2,5% cada. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

Figura 22. Perfil de permeação passiva e iontoforética do LCL a partir do gel de HPMC pH 5,8 contendo os fármacos incorporados isoladamente e em combinação com o PCL na concentração de 2,5% cada. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

Tabela 13. Fluxos do PCL e do LCL em pH 5,8.

Formulação	<i>J</i> Passivo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$)	<i>J</i> Iontoforese ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$)
PCL isolado	1,0 ($\pm 0,3$)	8,5 ($\pm 2,6$) ^{*a}
PCL associado	0,6 ($\pm 0,09$)	0,6 ($\pm 0,09$)
LCL isolado	0,6 ($\pm 0,09$)	2,5 ($\pm 0,09$) ^{*b}
LCL associado	0,6 ($\pm 0,09$)	0,6 ($\pm 0,09$)

Fluxo Passivo (*J* Passivo) e iontoforético (*J* Iontoforese) a partir do gel de HPMC pH 5,8 contendo os fármacos incorporados isoladamente ou em associação (combinados), na concentração de 2,5% cada. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *p<0,05 (a: quando comparado ao PCL isolado passiva e ao PCL associado iontoforese; b: quando comparado ao LCL isolado passiva) (Teste Tukey).

Pode-se observar nas figuras 21 e 22 e na tabela 13 que a velocidade de permeação passiva dos fármacos foi reduzida em relação aos experimentos realizados em pH 7,0 (tabela 12). Este resultado já era esperado devido ao aumento da ionização das bases fracas em pH mais ácido e a permeação de substâncias não-ionizadas é favorecida frente às ionizadas.

A aplicação da iontoforese aumentou cerca de 9 e 4 vezes o fluxo do PCL e do LCL, respectivamente, a partir das formulações nas quais foram incorporados isoladamente (tabela 13). Este aumento foi maior que o observado para os fármacos isolados em pH 7,0 (cerca de 4,5 vezes para PCL e sem influência para LCL – tabela 12), corroborando com o aumento de ionização dos fármacos em pH 5,8. No entanto, como o fluxo passivo foi menor em pH 5,8, o maior aumento de fluxo proporcionado pela iontoforese neste pH não acarretou em maiores quantidades de fármaco permeadas em relação ao experimento realizado em pH 7.

Já a iontoforese dos fármacos combinados não aumentou significativamente seus fluxos em pH 5,8. Este resultado pode estar relacionado às mudanças físico-químicas ocorridas em ambas as substâncias quando elas são dispersas na mesma formulação. Em pH 5,8, o coeficiente de distribuição mucosa/formulação do PCL foi 11 vezes menor do que em pH 7,0 (2,47 em pH 7,0 para 0,04 em pH 5,8), o que é coerente com a maior ionização desta molécula neste pH, mas aumentou 3 vezes quando associado ao LCL (de 0,04 para 0,14). Este aumento no coeficiente de distribuição do PCL associado resultou em um valor muito semelhante ao do LCL (0,12), que não sofreu alteração com a associação. PCL e LCL associados na

mesma formulação, em pH 5,8 competem, portanto, em condições semelhantes pela corrente elétrica e pela mucosa, não resultando em aumento de transporte dos fármacos através da mucosa na presença de iontoforese.

As quantidades de fármaco recuperadas da mucosa após 1 hora de permeação passiva ou por iontoforese quando os mesmos foram administrados em combinação, em pH 5,8, também foi semelhante (figura 23), sendo este resultado coerente com o coeficiente de distribuição semelhante dessas moléculas nessas condições.

Figura 23. Quantidade total ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de PCL e LCL recuperados da mucosa após 1 hora ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir do gel de HPMC pH 5,8 contendo os fármacos incorporados isoladamente ou combinados, na concentração de 2,5% cada. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

Comparando as quantidades acumuladas das substâncias na mucosa a partir dos experimentos feitos nos dois pHs, para as substâncias isoladas, o aumento do fluxo iontoforético quando o pH foi alterado de 7 para 5,8 causou também um aumento proporcional da quantidade recuperada da mucosa para o LCL (aproximadamente 4 vezes), mas menor para o PCL. Neste caso o fluxo aumentou 9 vezes, enquanto a retenção aumentou apenas 4 vezes, possivelmente devido à maior característica hidrofílica do PCL neste pH e menor interação com a mucosa. Sendo assim, o aumento da ionização do PCL causado pela alteração do pH de 7,0 para 5,8 parece não ter proporcionado nem um aumento na quantidade de fármaco

transportada (devido ao menor fluxo passivo), nem um aumento de sua interação com a mucosa.

A combinação dos fármacos em formulações com pH 7,0 aumentou significativamente a quantidade permeada e fluxo do PCL além da quantidade retida na mucosa de PCL e de LCL. Assim, é interessante utilizar a combinação dos dois em formulações com pH 7,0, pois além de aliar início de ação mais rápido (LCL) e potência (PCL) (PAIVA & CAVALCANTI, 2005) alcançaram-se maiores quantidades permeadas e retidas na mucosa para ambos os fármacos.

Nossos resultados podem ser relacionados àqueles apresentados por um dispositivo comercial contendo lidocaína, o Dentipatch®. Este dispositivo contém 46,1 mg de lidocaína em um *patch* de 2 cm² (concentração de 20%) e libera um total de 1,55 (± 0,77) mg, o que fornece uma concentração plasmática máxima de 16,5 (± 7,9) ng/mL (DENTIPATCH, 2011). Em nossos estudos, a quantidade de LCL recuperada da mucosa foi de 6,4 mg/cm², além de 114 ug/cm² encontrados no receptor (que atravessaram a mucosa). Como o gel desenvolvido em nosso trabalho possui também PCL e liberou 64,8 mg/cm² deste anestésico na mucosa além de 1,13 mg/cm² no receptor, a quantidade total de anestésico disponível nos sítios onde a anestesia é requerida foi bem maior do que a apresentada pelo dispositivo comercial. Assim, a combinação de PCL e LCL em pH 7,0, associada ao uso de iontoforese, pode ser considerada uma estratégia valiosa no desenvolvimento de uma formulação para anestesia tópica em procedimentos odontológicos.

5.5.6. Avaliação da LCL como promotor de permeação do PCL

Welin-Berger e colaboradores (2002) demonstraram que anestésicos locais podem atuar como seus próprios promotores de permeação, aumentando o grau de fluidez das cadeias de hidrocarbonetos dos lipídios intercelulares da pele. Os autores avaliaram os efeitos de uma variedade de anestésicos tópicos na morfologia de diversos modelos de sistemas lipídicos (como monoleato de glicerina, esfingomielina e lipídeos extraídos do estrato córneo humano) através de técnicas como difração de raio-x a baixo ângulo e calorimetria diferencial exploratória, além de estudos de partição e permeação no estrato córneo humano. Verificou-se que as interações entre os lipídios e os anestésicos induzem estruturas líquido-cristalinas no estrato córneo, facilitando a mobilidade dos fármacos. Apesar da similaridade das propriedades físico-químicas dos anestésicos locais, esse efeito promotor de

permeação variou bastante, sendo maior para a lidocaína do que para a prilocaína.

Assim, para investigar se o mesmo ocorre na mucosa bucal e, assim, se o LCL estaria atuando como um promotor da permeação para o PCL, foi realizado um pré-tratamento da mucosa com LCL. O fluxo do PCL através da mucosa pré-tratada com o LCL, na presença e ausência de iontoforese, pode ser observado na figura 24. O PCL recuperada da mucosa ao final destes experimentos está representado na figura 25.

Figura 24. Fluxo de PCL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{minuto}$) através da mucosa pré-tratada ou não com solução de LCL a 2,5% por 1 hora, a partir do gel de HPMC pH 7,0 contendo 2,5% de PCL, na ausência e presença de corrente elétrica. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5) (Teste-t Student).

Figura 25. Quantidade de PCL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) recuperada da mucosa após 1 hora de permeação a partir do gel de HPMC pH 7,0 contendo 2,5% de PCL, pela mucosa pré-tratada ou não com solução de LCL 2,5% por 1 h, na ausência e presença de corrente elétrica. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). * $p<0,05$ (quando comparado à iontoforese sem pré-tratamento) (Teste-t Student).

Como é possível observar nas figuras 24 e 25, nos experimentos realizados na ausência de iontoforese, o pré-tratamento aumentou ligeiramente o fluxo de PCL, porém sem significância estatística. Esse ligeiro aumento pode estar relacionado com alguma desorganização da mucosa causada pelo LCL, corroborando com os estudos de Welin-Berger e colaboradores (2002) que observaram este efeito na pele. No entanto, quando a iontoforese foi aplicada, tanto o fluxo (figura 24) quanto o acúmulo na mucosa (figura 25) diminuíram após o pré-tratamento. Esses resultados sugerem que eventuais alterações na mucosa causadas pelo tratamento com LCL ou a própria presença anterior dele na mucosa acaba por dificultar a penetração de altas concentrações de PCL propiciada pela iontoforese, possivelmente por uma competição com o LCL já presente por sítios de permeação. A associação das duas substâncias numa mesma formulação, ao invés do pré-tratamento com uma delas seguido da administração da outra, parece ser uma estratégia mais promissora para a anestesia local, profunda e não invasiva da mucosa bucal para procedimentos odontológicos.

6. CONCLUSÃO

O método analítico proposto para quantificação do PCL e LCL por CLAE mostrou-se adequado, apresentando valores satisfatórios de seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão e robustez. Os parâmetros avaliados no teste de adequabilidade do sistema e a recuperação dos fármacos a partir da mucosa esofageal suína apresentaram resultados aceitáveis aos níveis recomendados pela literatura.

A formulação desenvolvida apresentou uniformidade de conteúdo e propriedades mecânicas e mucoadesivas adequadas para a aplicação bucal. Conforme verificado por estudos de DSC, a combinação dos fármacos não ocasionou a formação de uma mistura eutética.

O coeficiente de distribuição mucosa/formulação do PCL foi alterado pela combinação com LCL. Em pH 7,0, houve aumento de seu caráter hidrofílico, com maior distribuição na formulação; em pH 5,8, o PCL se distribuiu mais na mucosa, tendo seu caráter hidrofóbico aumentado.

Com relação aos estudos de permeação *in vitro* através de mucosa esofageal suína, a iontoforese a partir da formulação pH 7,0 foi capaz de aumentar cerca de 4,5 vezes a quantidade de PCL permeada e 2 vezes a quantidade de PCL recuperada da mucosa quando isolada. Quando combinado, o PCL permeado foi 12 vezes maior e o recuperado da mucosa 10 vezes maior. A iontoforese aumentou apenas o LCL recuperado da mucosa quando associado, cerca de 2 vezes.

A aplicação da iontoforese a partir da formulação contendo os fármacos isolados em pH 5,8 (com o intuito de promover maior ionização dos fármacos), aumentou cerca de 9 e 4 vezes o fluxo do PCL e do LCL. No entanto, o fluxo passivo foi menor em pH 5,8 e o maior aumento de fluxo proporcionado pela iontoforese neste pH não acarretou em maiores quantidades permeadas. Para os fármacos combinados, a iontoforese não aumentou significativamente seus fluxos em pH 5,8.

O pré-tratamento da mucosa com LCL aumentou ligeiramente o fluxo passivo da PCL. No entanto, quando a iontoforese foi aplicada, tanto o fluxo quanto o acúmulo da PCL na mucosa diminuíram após o pré-tratamento.

Assim, a combinação de PCL e LCL em pH 7,0 em uma mesma formulação associada a iontoforese parece ser uma alternativa promissora para a anestesia não invasiva em procedimentos odontológicos, pois além de aliar início de ação mais rápido (LCL) e potência (PCL), resultou em maiores quantidades permeadas e

retidas na mucosa dos fármacos quando comparada ao dispositivo comercial utilizado para anestesia tópica.

7. REFERÊNCIAS

- AGDAL, M.L.; RAADAL, M.; SKARET, E.; KVALE, G. 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, p.1-6, 2008.
- AGUIAR, F. A.; GAITANI, C. M.; BORGES, K. B. Capillary electrophoresis method for the determination of isradipine enantiomers: Stability studies and pharmaceutical formulation analysis. *Electrophoresis* v. 32, p. 2673–2682, 2011.
- AL-MELH, M.A.; 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, p.16-20, 2007.
- AMASYA, G.; KARAVANA, S. Y.; SÖZEN, T.; BALOGÖZLU, E.; TARIMCI, N. Bioadhesive and mechanical properties of triamcinolone acetonide buccal gels. *Turk J. Pharm. Sci.*; v.9, p.1-12, 2012.
- American Dental Association. *Guideline for the use of sedation and general anesthesia by dentists (2007)*. Disponível online em http://ada.org/sections/about/pdfs/anesthesia_guidelines.pdf. Acesso em 13/06/2011.
- ARAÚJO, D.R.D.; PINTO, L.D.M.A.; BRAGA, A.D.F.D.A.; PAULA, E.D. Formulações anestésicas de liberação controlada: aplicações terapêuticas. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.53, p.663-671, 2003.
- ARMFIELD, J.M. Australian population norms for the Index of Dental Anxiety and Fear. *Australian Dental Journal*, v.56, p.16-22, 2011.
- BANSAL ,K.; RAWAT, M.K.; JAIN, A.; RAJPUT, A.; CHATURVEDI, T.P.; SINGH, S. Development of Satranidazole Mucoadhesive Gel for the Treatment of Periodontitis. *AAPS PharmSciTech*, v.10, p.716-723, 2009.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Editora da Unicamp, Campinas, SP, 2001.
- BATHEJA, P.; THAKUR, R.; MICHNIAK, B. Basic Biopharmaceutics of buccal and sublingual absorption (Chapter 9). In: *Enhancement in Drug Delivery*, TOUITOU, E; BARRY, B.W. (Ed.) CRC Press 2006.
- BHAL, S.K.; KASSAM, K.; PEIRSON, I.G.; PEARL, G.M. The Rule of Five Revisited: Applying Log D in Place of Log P in Drug-Likeness Filters. *Molecular Pharmaceutics* v.4, p.556-560, 2007.
- CANNON, J.B. Transmucosal and Ocular Drug Delivery (Chapter 7). In: *Drug Delivery Systems*, p.373–450, CRC Press 2011.

- CAON, T.; SIMÕES, C.M.O. Effect of freezing and type of mucosa on ex vivo drug permeability parameters. *AAPS PharmSciTech.* v.12, p.587–92, 2012.
- CARR, M.P.; HORTON, J.E. Evaluation of a transoral delivery system for topical anesthesia. *Journal of the American Dental Association*, v.132, p.1714-1719, 2002.
- CARVALHO, J.C.A. Farmacologia dos anestésicos locais. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.44, p.75-82, 1994.
- CATTERALL, W.A.; MACKIE, K. Local Anesthetics, In: Goodman & Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics (Cap. 14). Ed. Guabanara Koogan, 2006.
- CEREDA, C.M.S.; BRUNETTO, G.B.; DE ARAÚJO, D.R.; DE PAULA, E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. *Canadian Journal of Anesthesia*, v.53, p.1092-1097, 2006.
- CHUNG, J.; KOH,S.; KIM, T.; SEOL, Y.; LEE, Y.; KU, Y.; RHYU, I.; CHUNG, C.; KOO, K. Effect of eutectic mixture of local anesthetics on pain perception during scaling by ultrasonic or hand instruments: a masked randomized controlled trial. *J Periodontol*, v.82, p.259-266, 2011.
- CIACH, T.; MOSCICKA-STUDZINSKA, M. Buccal iontophoresis: an opportunity for drug delivery and metabolite monitoring. *Drug Delivery Today*, v. 16, n.7/8, p.361-366, 2011.
- CLARK, T.M.; YAGIELA, J.A. Advanced Techniques and Armamentarium for Dental Local Anesthesia. *Dental Clinics of North America*, v.54, p.757-768, 2010.
- DEL CONSUELO, I.; JACQUES, Y.; PIZZOLATO, G.; GUY, R.H.; FALSON, F. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Archives of Oral Biology* v.50, p.981-987, 2005.
- DE MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; GUILHERME, V.A.; DE ARAUJO, D.R.; DE PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Poly(Lactide-co-Glycolide) Nanocapsules Containing Benzocaine: Influence of the Composition of the Oily Nucleus on Physico-Chemical Properties and Anesthetic Activity. *Pharmaceutical Research*, p.1-11, 2011.
- Dentipatch - product information. *Daily med : current medication information*. Disponível online em: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=1b5826d4-5177-42b9-8ac2-d35071b4bccb>. Acesso em 11/06/2011.
- DE PAULA, E.; SCHREIER, S. Use of a novel method for determination of partition coefficient to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. *Biochim Biophys Acta* v.240, p. 25–33, 1995.
- EITNER, S.; WICHMANN, M.; PAULSEN, A.; HOLST, S. Dental anxiety - An epidemiological study on its clinical correlation and effects on oral health. *Journal of Oral Rehabilitation*, v.33, p.588-593, 2006.

EMLA[®] clinical trials. *Clinical Trial Database*. Disponível online: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=EMLA>. Acesso em: 18/06/2011.

EMLA Creme. *Astrazeneca*. Disponível online: <http://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/emlacreme.pdf>. Acesso em: 18/06/2011.

FDA Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, 1994.

FERNANDEZ, G.; MANTELLE, J.; LUCKING, D.; KANIOS, D. *Oral Transmucosal Systems for Local Anesthetics*, in *Drug Delivery to the Oral Cavity*. Informa Healthcare. p. 233-259, 2005.

FERREIRA, S.L.; BRUNS, R.E.; DA SILVA, E.G.; DOS SANTOS, W.N.; QUINTELLA, C.M.; DAVID, J.M.; DE ANDRADE, J.B.; BREITKREITZ, M.C.; JARDIM, I.C.; NETO, B.B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, v.1158, p.2-14, 2007.

FINI, A.; BERGAMANTE, V.; CESCHEL, G.C. Mucoadhesive Gels Designed for the Controlled Release of Chlorhexidine in the Oral Cavity. *Pharmaceutics*, v.3, p.665-679, 2011.

FRANZ-MONTAN, M.; SILVA, A.L.R.; COGO, K.; BERGAMASCHI, C.D.C.; VOLPATO, M.C.; RANALI, J.; DE PAULA, E.; GROppo, F.C. Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. *Anesthesia and Analgesia*, v.104, p.1528-1531, 2007.

FRIEDMAN, P.M.; MAFONG, E.A.; FRIEDMAN, E.S.; GERONEMUS, R.G. Topical anesthetics update: Emla and beyond. *Dermatol Surg* v.27, p.1019-1025, 2001.

FRISKOPP, J.; ISACSSON, N.M. The anesthetic onset and duration of a new lidocaine/prilocaine gel intra-pocket anesthetic (Oraqix) for periodontal scaling/ root planing. *J Clin Periodontol* v. 28 p. 453-458, 2001.

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

GAJRAJ, N.M.; PENNANT, J.H.; FRCA, WATCH, M.F. Eutetic Mixture of Local Anesthetics (EMLA) Cream. *Anesth Analg*, v. 78, p. 574-583, 1994.

GARCHA, V.; SHETIYA, S.H.; KAKODKAR, P. Barriers to oral health care amongst different social classes in India. *Community Dental Health*, v.27, p.158-162, 2010.

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

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; ROCHA, E.M.; SARMENTO, V.H.; FREITAS, O.; LOPES, R.V. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 75, p. 186-193, 2010.

GRATIERI, T. Sistemas de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção, caracterização e liberação passiva e iontoforética in vitro e in vivo. Tese de doutorado, Ribeirão Preto, 2010.

GIANNOLA, L. I.; DE CARO, V.; GIANDALIA, G.; SIRAGUSA, M. G.; CAMPISI, G.; FLORENA, A. D.; CIACH, T. Diffusion of naltrexone across reconstituted human oral epithelium and histomorphological features. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, p.238–246, 2007.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B*, v.910, p.2–13, 2012.

HIGGINS, M. Dental anesthesiology - An access to care issue. *Alpha Omegan*, v.99, p.56-63, 2006.

HILL, K.B., CHADWICK, B., FREEMAN, R. Adult Dental Health Survey 2009: relationships between dental attendance patterns, oral health behaviours and the current barriers to dental care. *Br Dent J*, v.214, p.25-32, 2013.

HU, L.; SILVA, S.M.C.; DAMAJ, B.B.; MARTIN, R.; MICHNIAK-KOHN, B.B. Transdermal and transbuccal drug delivery systems: Enhancement using iontophoretic and chemical approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, v.421, p.53-62, 2011.

HUND, E.; VANDER, H.Y.; HAUSTEIN, M.; MASSART, D.L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Robustness testing of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay: comparison of fractional and asymmetrical factorial designs. *Journal of Chromatography A*, v.874, p.167–185, 2000.

International Conference on Harmonization (ICH). Guidance for industry Q2B: Validation of Analytical Procedures. Methodology. 1996.

JEPSON, G.W.; HOOVER, D.K.; BLACK, R.K.; MCCAFFERTY, J.D.; MAHLE, D.A.; GEARHART, J.M. A partition coefficient determination method for nonvolatile chemicals in biological tissues. *Fundamental and applied toxicology*, v.22, p.519-524, 1994.

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; DJONIC, J. Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: mechanical characterization and investigation of interactions between formulation component. *J Appl Polymer Sci*, v.61, p.2229 – 2234, 1996.

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A.F. Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels. *Pharmaceutical Research*, v.14, p.450-457, 1997.

JONES, D.S.; IRWIN, C.R.; WOOLFSON, A.D.; DJOKIC, J.; ADAMS, V. Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis, *J Pharm Sci* v.88, p.592–598, 1999.

JUNIOR, E.R.; BENTLEY, M.V.L.B.; MARCHETTI, J.M. HPLC assay of lidocaine in in vitro dissolution test of the Poloxamer 407 gels. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, 2002.

KAH, M.; BROWN, C. D. LogD: Lipophilicity for ionisable compounds. *Chemosphere* v. 72, p.1401–1408, 2008.

KARAVANA, S.Y.; GÜNERI, P.; ERTAN, G. Benzydamine hydrochloride buccal bioadhesive gels designed for oral ulcers: Preparation, rheological, textural, mucoadhesive and release properties. *Pharmaceutical Development and Technology*, v.14, p.623–631, 2009.

KELLAWAY, I.W.; WARREN, S.J. Mucoadhesive Hydrogels for Buccal Delivery (Cap. 10). In: *Oral Mucosal Drug Delivery*, RATHBONE, M.J. (Ed.), Marcel Dekker Inc, 1996.

KHUTORYANSKIY, V.V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromolecular Bioscience*, v.11, p.748–764, 2011.

KOKATE, A.; LI, X.; JASTI, B. HPLC detection of marker compounds during buccal permeation enhancement studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* v.47, p.190–194, 2008.

KOKATE, A.; LI, X.; WILLIAMS, P. J.; SINGH, P.; JASTI, B. R. In Silico Prediction of Drug Permeability Across Buccal Mucosa. *Pharmaceutical Research*, V. 26, p. 1130-1139, 2009.

Kovacaine Nasal mist - Company announcement. *St. Renatus Website*. Disponível online em: <http://www.st-renatus.com/>. Acesso em 18/06/2011.

KULKARNI, U.; MAHALINGAM, R.; PATHER, I.; LI, X.; JASTI, B. Porcine Buccal Mucosa as *In Vitro* Model: Effect of Biological and Experimental Variables. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.99, p.1265-1277, 2010.

LAGAN, G.; MCLURE, H.A. Review of local anaesthetic agents. *Current Anaesthesia & Critical Care*, v.15, p.247–254, 2004.

LAI, P.M.; ROBERTS, M.S. Epidermal Iontophoresis: II. Application of the Ionic Mobility - Pore Model to the Transport of Local Anesthetics. *Pharmaceutical Research*, v.15, 1998.

LOPEZ, R.F.; COLLETT, J.H.; BENTLEY, M.V. Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone. *Int J Pharm.* v.200, p.127-132, 2000.

LOPEZ, R.F.V., BENTLEY, M.V.L.B., DELGADO-CHARRO, M.B., SALOMON, D., VAN DEN BERGH, H., LANGE, N., GUY, R.H. Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis *in vitro*. *Photochem. Photobiol*, v.77, p.304-308, 2003-B.

- MANOHAR, S.D.; SRIDHAR, D.A.; MALLIKARJUNA, S.C. Drug Delivery from the Oral Cavity: a focus on mucoadhesive buccal drug delivery systems. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v.66, p.466-500, 2012.
- MASHRU, R.C; SUTARIYA, V.B.; SANKALIA, M.G.; PARIKH, P.P. Development and Evaluation of Fast-Dissolving Film of Salbutamol Sulphate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.31, 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, p.67-72, 2004.
- MOHAMMAD, M.A. LC Determination of Lidocaine and Prilocaine Containing Potential Risky Impurities and Application to Pharmaceuticals. *Chromatographia*, v.70, p.563-568, 2009.
- MOORE, P.A.; HERSH, E.V. Local Anesthetics: Pharmacology and Toxicity. *Dental Clinics of North America*, v.54, p.587-599, 2010.
- MORAES, C.M.; DE MATOS, A.P.; DE PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Benzocaine loaded biodegradable poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. *Materials Science and Engineering: B*, v.165, p.243-246, 2009.
- MOSCICKA-STUDZINSKA, A.E.; KIJÉŃSKA, 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.
- MORTAZAVI, S.A.; SMART, J.D. An in-vitro method for assessing the duration of mucoadhesion. *Journal of Controlled Release* v.31, p.207-212, 1994.
- NEEDLEMAN, I.G.; SMALES, F.C. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery. *Biomaterials*, v.16, p.617-624, 1995.
- NICOLAZZO, J.A.; REED, B.L.; FINNIN, B.C. Buccal penetration enhancers—How do they really work? *Journal of Controlled Release*, v.105, p.1–15, 2005.
- NUNES, K.M. Desenvolvimento de sistemas precursores de fase cristalina para administração intrabolsa periodontal. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 2012.
- PADERNI, C.; COMPILATO, D.; GIANNOLA, L.I.; CAMPISI, G. Oral local drug delivery and new perspectives in oral drug formulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, v. 114, p.25-34, 2012.
- PAIVA, L.C. A.; CAVALCANTI, A.L. Local anesthetics in dentistry: a literature review. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa*, v. 11, p. 35-42, 2005.
- PATEL, V.F.; LIU, F.; BROWN, M.B. Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v.153, p.106-116, 2011.

PHIPPS, J.B.; GYORY, J.R. Transdermal ion migration, *Adv. Drug Delivery Rev.*, v.9, p. 137 – 176, 1992.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova*, v.19, 1996.

POHJOLA, V.; LAHTI, S.; SUOMINEN-TAIPALE, L.; HAUSEN, H. Dental fear and subjective oral impacts among adults in Finland. *European Journal of Oral Sciences*, v.117, p.268-272, 2009.

POLAT, B.M.; FIGUEROA, P.L.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. 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, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M. Local anaesthetics and other drugs affecting sodium channels. In: Rang, H.P.; Dale, M.M., *Pharmacology (Cap.44)*, 6ª edição, p. 638–42, 2007.

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.A; GUTTA, K.; PRODDUTURI, S.; MUNJAL, M.; STODGHILL, S.P. Characterization of cellulosic hot-melt extruded films containing lidocaine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.59, p.189–196, 2005.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; DA SILVA, L.R.; SHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim. Nova*, v.31, p.164-171, 2008.

RICHARDSON, J.; ILLUM, L. Routes of delivery: case studies, the vaginal route of peptide and protein drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* v.8, p.341–366, 1992.

SACHDEVA, S.; GUPTA, R.; GUPTA, G. Iontophoresis and Dentistry. *JIDA*, v.5, 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.

SHOJAEI, A.H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharmaceut Sci* v.1, p.15-30, 1998.

SIMONETTI, D.D. Obtenção e caracterização de formulações contendo cisplatina para a quimioterapia tópica do câncer de pele: iontoforese versus promotor de absorção. Dissertação de Mestrado, Ribeirão Preto, 2004.

SISK, A.L. Long-Acting Local Anesthetics in Dentistry. *Anesth Prog* v.39, p.53-60, 1992.

SMITH, T.A.; HEATOM, L.J. Fear of dental care: Are we making any progress? *Journal of the American Dental Association*, v.134, p.1101-1108, 2003.

SMART, J.D. Drug delivery using buccal-adhesive systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.11, p.253-270, 1993.

SMART, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv. Drug Deliv.* v.57, p.1556-1568, 2005.

SOKOLOWSKI, C.J.; GIOVANNITTI, J.A.; BOYNES, S.G. Needle Phobia: Etiology, Adverse Consequences, and Patient Management. *Dental Clinics of North America*, v.54, 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, p.123-6, 1991.

SROKA-MARKOVIC, J.; JOHANSSON L.; MAGNUS, B. O. A.; GRANELLI, I. Development of an HPLC Method for Determination of Related Impurities in Prilocaine Substance, *Chromatographia* v.75, p. 329-336, 2012.

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.

SURAPANENI, M.S.; DAS, S.K.; DAS, N.G. Effect of Excipient and Processing Variables on Adhesive Properties and Release Profile of Pentoxifylline From Mucoadhesive Tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.32, p.377-387, 2006.

TAN, Y.T.F.; PEH, K.K.; AL-HANBALI, O. Effect of carbopol and polyvinylpyrrolidone on the mechanical, reological and release properties of bioadhesive polyethylene glycol gels. *AAPS Pharm Sci Tech* v.1, p.1-10, 2000.

TAVEIRA, S.F. Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos: estudo in vitro em cultura de células tumorais. Dissertação de Mestrado, Ribeirão Preto, 2007.

U.S. Pharmacopeial Convention. Medicines Compendium. Disponível online em: <https://mc.usp.org/homepage?destination=homepage>. Acesso em 12/01/2014.

USP XXX. United States Pharmacopeia, 30 ed., United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, 2007.

VICKERS, E.R.; PUNNIA-MOORTHY, A. Pulpal anesthesia from an application of a eutectic topical anesthetic. *Quintessence International*, v.24, p.547-551, 1993.

VICKERS, E.R.; MARZBANI, N.; GERZINA, T.M.; MCLEAN, C.; PUNNIA-MOORTHY, A.; MATHER, L. Pharmacokinetics of EMLA Cream 5% application to oral mucosa. *Anesth Prog* v.44, p.32-37, 1997.

WEI, R.; SIMON, L.; HU, L.; MICHNIAK-KOHN, B. Effects of Iontophoresis and Chemical Enhancers on the Transport of Lidocaine and Nicotine Across the Oral Mucosa. *Pharmacy Research*, v.4, p. 961-71, 2011.

WELIN-BERGER, K.; NEELISSEN, J.A.M.; ENGBLOM, J. Physicochemical interaction of local anesthetics with lipid model systems - correlation with in vitro permeation and in vivo efficacy. *Journal of controlled release*, v.81, p.33-43, 2002.

WILSON, C.G; WASHINGTON, N.; WASHINGTON, C. Physiological Pharmaceutics Barriers to Drug Absorption (Cap 3). p.37-58. In: *Drug Delivery to Oral Cavity or Mouth*, *Informa Healthcare*, 2001.