



MAISA ROSA CASTELLI

**“CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE NANOCÁPSULAS DE LIDOCAÍNA E
PRILOCAÍNA E DESENVOLVIMENTO CLÍNICO DE PRODUTO
NANOANESTÉSICO”**

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MAISA ROSA CASTELLI

**“CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE NANOCÁPSULAS DE LIDOCAÍNA E
PRILOCAÍNA E DESENVOLVIMENTO CLÍNICO DE PRODUTO
NANOANESTÉSICO”**

Orientador: Prof. Dr. Gilberto De Nucci

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção de título de Mestra em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MAISA ROSA
CASTELLI E ORIENTADA PELO PROF. DR. GILBERTO DE
NUCCI

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R71c Rosa Castelli, Maisa, 1989-
Caracterização morfológica de nanocápsulas de lidocaína e prilocaína e desenvolvimento clínico de produto nanoanestésico / Maisa Rosa Castelli. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gilberto De Nucci.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lidocaína. 2. Prilocaína. 3. Nanocápsulas. 4. Farmacocinética. 5. Eficácia. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Morphological characterization of lidocaine and prilocaine nanocapsules and clinical development of nanoanesthetic product

Palavras-chave em inglês:

Lidocaine
Prilocaine
Nanocapsules
Pharmacokinetics
Efficacy

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto De Nucci [Orientador]
Silvia Stanisquaski Guterres
Daniela Zanchet

Data de defesa: 04-09-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MAÍSA ROSA CASTELLI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). GILBERTO DE NUCCI



2. PROF(A). DR(A). SÍLVIA STANISÇUASKI GUTERRES



3. PROF(A). DR(A). DANIELA ZANCHET



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 04 de setembro de 2014

*Aos meus pais, Angela e Anísio,
minha irmã, Marcela
e meu afilhado, Caio.*

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus, pelo presente da vida.

Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci, pela orientação, profissionalismo e pelo ensino diário do “olhar crítico e visionário”.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp), Galeno Research e da Biolab Farmacêutica, que auxiliaram de forma indiscutível na concretização deste trabalho.

Aos meus pais e demais familiares, meus amigos e ao Evaldo, pelo apoio, paciência e compreensão.

À todos que contribuíram, de forma direta e indireta.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

"...Quando essa vida se amplia, cria deveres muito maiores que os de antes; deveres que, por outra parte, criam por sua vez muitas satisfações, por estar atuando sempre a Lei da Compensação. Efetivamente, à culminação de um esforço aparece uma satisfação; à conclusão de um trabalho, a sensação imediata de um dever cumprido, que é sempre um fragmento de felicidade."

González Pecotche

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigo submetido à revista *Therapeutic Drug Monitoring* e aguardando parecer.

Pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation of a nanotechnological topical formulation of lidocaine/prilocaine (Nanorap) in healthy volunteers.

Thiago Gagliano-Jucá, Maísa R. Castelli, Fernanda C. de Moraes, Gustavo D. Mendes, André M.M. Arruda, Lu Shi Chen, Marcos Antônio de Oliveira, Anibal Gil Lopes, Gilberto De Nucci.

O referido artigo encontra-se no apêndice IV.

RESUMO

A anestesia tópica é uma das estratégias mais usadas para minimizar a ansiedade, dor e o desconforto no local da inserção da agulha ou de procedimentos cirúrgicos. As formulações tópicas têm como objetivo promover a permeação no local de aplicação e obter um rápido início de ação. Para tanto, é necessário que a permeação cutânea atravessasse de forma efetiva as camadas dérmicas, principalmente o estrato córneo. Os sistemas de liberação de fármacos representam uma parcela importante dentre as estratégias de otimização terapêutica, tendo como objetivo a manipulação racional do perfil farmacológico das drogas e, concomitantemente, seus índices terapêuticos. Os sistemas de liberação nanoestruturados, ou nanocarreadores, podem ser empregados para a melhora de distintas características: solubilidade, biodistribuição, biocompatibilidade, biodegradabilidade e liberação da droga. São estruturas com escala nanométrica, com tamanho variando de 1 a 100 nanômetros. O objetivo deste trabalho foi a caracterização morfológica das nanocápsulas poliméricas que compõem o nanoanestésico e o desenvolvimento clínico do nanoanestésico, compreendendo a avaliação de eficácia e de segurança do produto. O nanoanestésico é um hidrogel composto pela mistura eutética de 2.5% de lidocaína e 2.5% de prilocaína. Metade desta concentração está nanoencapsulada, enquanto que o restante do ativo encontra-se livre no gel, através dos respectivos sais cloridratos.

A suspensão de nanocápsulas foi analisada através de microscopia eletrônica de transmissão e foram identificadas estruturas correspondentes com as nanocápsulas poliméricas e com tamanhos condizentes ao esperado a partir dos dados de diâmetro médio proveniente do Espalhamento de Luz Dinâmico. O produto final, o nanoanestésico, foi analisado a partir da técnica de criofratura e também foram identificadas estruturas correspondentes as nanocápsulas em meio ao hidrogel.

Foi realizado o desenvolvimento clínico do nanoanestésico, compreendendo a avaliação do perfil farmacocinético (n=8 voluntários) e estudos de eficácia (n= 100 voluntários). O nanoanestésico atinge concentrações plasmáticas seguras de

lidocaína e prilocaína: $6,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ e $1,7 \text{ ng.mL}^{-1}$, respectivamente. Verificou-se também que o nanoanestésico possui eficácia não inferior ao EMLA® (AztraZeneca) quando comparado após 1 (uma) hora de permanência sobre a pele e submetido a estímulo doloroso de inserção de agulha de venopunção. Além disso, de forma controlada por placebo, os voluntários foram submetidos a um estímulo doloroso em tempos inferiores a 1 hora e verificou-se que o nanoanestésico apresenta eficácia significativa a partir de 10 minutos da aplicação.

Os resultados obtidos demonstram que o nanoanestésico pode ser uma alternativa dentre os anestésicos tópicos já estabelecidos no mercado e otimizar os procedimentos nos quais ele é necessário.

Palavras-chave: anestésicos locais, lidocaína, prilocaína, nanocápsulas poliméricas, perfil farmacocinético, eficácia clínica.

ABSTRACT

Topical anesthetic is the most used strategy to minimize anxiety, pain and local discomfort on the site of needle stick. The topical formulations aim to promote permeation on the application site and obtain a rapid onset of action. To achieve this, the skin permeation must cross the layers of skin, mainly the stratum corneum. Drug delivery systems are an important part of therapy optimization strategies, which target to improve the drug pharmacological profile and its therapeutic ratio. The nanostructured systems, like polymeric nanocapsules, may be used to improve a many features: solubility, biodistribution and drug release. They are nanoscale structures, with size ranging from 1 to 100 nanometers.

This present study comprised morphologic characterization of polymeric nanocapsules which compose the nanoanesthetic and its clinical development with evaluation of efficacy and safety. The nanoanesthetic is a hydrogel with 2.5% lidocaine and 2.5% prilocaine, which are 50% of the active products in polymeric nanocapsules. The remaining 50% of the drugs are in the form of their chloridrate salts.

The suspension of nanocapsules was examined by Transmission Electron Microscopy (TEM) and the identified structures correspond to the polymer nanocapsule and the size results matched the expected Dynamic Light Scattering data.

The finished product, the nanoanesthetic, was evaluated by cryofracture, and the polymeric nanocapsules were observed. The clinical development was performed with pharmacokinetics profile (n= 8 healthy volunteers) and efficacy study (n=100 healthy volunteers). The nanoanesthetic security reaches plasmatic concentrations of lidocaine and prilocaine: $6,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ e $1,7 \text{ ng.mL}^{-1}$, respectively. EMLA® (Astrazeneca) and the nanoanesthetic were left on the skin for one hour, and then exposed to needle insertion. It was observed that the nanoanesthetic efficacy is not lower than EMLA® product.

Beyond that, a placebo-controlled study was performed. The volunteers were submitted to a painful stimulus for periods shorter than one hour and it was verified that the nanoanesthetic has a significant efficacy after 10 minutes of application. The results showed that the nanoanesthetic can be an alternative as a topical anesthetics among the ones that have already been commercialized in the market and it can also optimize the procedures in which it is needed.

Key-words: local anesthetics, lidocaine, prilocaine, polymeric nanocapsules, pharmacokinetics perfil, clinical efficacy.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Representação esquemática do sistema de iontoforese	37
FIGURA 2: Representação esquemática do sistema de eletroporação	39
FIGURA 3. Representação da composição estrutural das nanocápsulas	41
FIGURA 4. Representação das estruturas químicas da lidocaína base e do cloridrato de lidocaína, A e B, respectivamente.	42
FIGURA 5. Representação das estruturas químicas da prilocaína base e do cloridrato de prilocaína, A e B, respectivamente.	44
FIGURA 6. Representação esquemática dos lipossomas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros e nanopartículas de carbono como exemplos de “Drug Delivery System”	48
FIGURA 7. Representação da estrutura química da ropivacaína – padrão interno utilizado no método analítico de análise de prilocaína e lidocaína.	60
FIGURA 8. Microscopia Eletrônica de Transmissão da suspensão de nanocápsulas de lidocaína e prilocaína. Imagens obtidas a partir de análise em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906, Zeiss) a 60kV no aumento de 167000x.	69
FIGURA 9. Microscopia Eletrônica de Transmissão da suspensão de nanocápsulas de lidocaína e prilocaína. Imagens obtidas a partir de análise em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906, Zeiss) a 60kV no aumento de 167000x.	70
FIGURA 10. Microscopia Eletrônica de Transmissão da suspensão de nanocápsulas de lidocaína e prilocaína. Imagens obtidas a partir de análise em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906, Zeiss) a 60kV no aumento de 167000x.	70
FIGURA 11. Criofratura associada à Microscopia Eletrônica de Transmissão aplicada em amostra de hidrogel do nanoanestésico. As setas vermelhas indicam as nanocápsulas da mistura eutética de lidocaína e prilocaína.	71
FIGURA 12. Curva da concentração plasmática pelo tempo de lidocaína do voluntário número 1.	74
FIGURA 13. Curva da concentração plasmática pelo tempo de prilocaína do voluntário número 1.	75
FIGURA 14. Curva da concentração plasmática pelo tempo de lidocaína do voluntário número 2.	76
FIGURA 15. Curva da concentração plasmática pelo tempo de prilocaína do voluntário número 2.	77
FIGURA 16. Curva da Concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 3.	78
FIGURA 17. Curva da concentração plasmática de prilocaína do voluntário número 3.	79
FIGURA 18. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 4	80
FIGURA 19. Curva da concentração plasmática de prilocaína do voluntário número 4.	81
FIGURA 20. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 5.	82

FIGURA 21. Curva da concentração plasmática de prilocaína do voluntário número 5.	83
FIGURA 22. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 6	84
FIGURA 23. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 6.	85
FIGURA 24. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 7.	86
FIGURA 25. Curva da concentração plasmática de prilocaína do voluntário número 7.	87
FIGURA 26. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 8.	88
FIGURA 27. Curva da concentração plasmática de prilocaína do voluntário número 8.	89
FIGURA 28. Curva de concentração plasmática contra o tempo do fármaco lidocaína, considerando todos os voluntários (n=8).	91
FIGURA 29. Curva de concentração plasmática contra o tempo do fármaco prilocaína, considerando todos os voluntários (n=8).	92
FIGURA 30. Concentrações plasmáticas de lidocaína e prilocaína em função do tempo após a aplicação tópica de EMLA®.	94
FIGURA 31. Concentração plasmática de lidocaína na circulação sistêmica após 2 horas da aplicação do EMLA 5% em uma área de 100 cm ² , com oclusão, na região da face e antebraço (valores médios $\pm$ erro padrão).	94
FIGURA 32. Concentração plasmática de lidocaína (○ ▽ ◇) e prilocaína (● ▲ ◆) na veia de drenagem após aplicação de EMLA 5% durante 1 hora em uma área de 25 cm ² do antebraço.	95
FIGURA 33. Escala Análoga Visual, com escala variando de 0, correspondente a menos dor já sentida, a 10, correspondendo a dor de maior intensidade da sentida pelo indivíduo	96

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Principais anestésicos locais de uso tópico comercializados no Brasil.	50
TABELA 2. Parâmetros analíticos do método utilizado para a análise do analito lidocaína.	61
TABELA 3. Descrição geral das condições cromatográficas.	62
TABELA 4. Descrição dos materiais utilizados.	62
TABELA 5. Descrição dos reagentes utilizados	63
TABELA 6. Parâmetros analíticos do método utilizado para a análise do analito prilocaína.	63
TABELA 7. Descrição Geral das Condições Cromatográficas	64
TABELA 8. Descrição dos materiais utilizados.	64
TABELA 9. Descrição dos reagentes utilizados.	65
TABELA 10. Tratamentos realizados por período em cada voluntário.	66
TABELA 11. Tabela de concentrações plasmáticas de lidocaína dos voluntários.	72
TABELA 12. Tabela de concentrações plasmáticas de prilocaína dos voluntários.	73
TABELA 13. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 1.	75
TABELA 14. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 1.	76
TABELA 15. Parâmetros farmacocinéticos de lidocaína do voluntário número 2.	77
TABELA 16. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 2.	78
TABELA 17. Parâmetros farmacocinéticos de lidocaína do voluntário número 3.	79
TABELA 18. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 3.	80
TABELA 19. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 4.	81
TABELA 20. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 4.	82
TABELA 21. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 5.	83
TABELA 22. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 5.	84

TABELA 23. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 6.	85
TABELA 24. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 6.	86
TABELA 25. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 7.	87
TABELA 26. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 7.	88
TABELA 27. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 8.	89
TABELA 28. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 8.	90
TABELA 29. Parâmetros farmacocinéticos do princípio ativo lidocaína considerando todos os voluntários (n=8).	91
TABELA 30. Parâmetros farmacocinéticos do princípio ativo lidocaína considerando todos os voluntários (n=8).	92
TABELA 31. Resultados da avaliação de cada voluntário referente ao tratamento com o nanoanestésico e o EMLA®.	98
TABELA 32. Teste de McNemer aplicado para a avaliação de não inferioridade entre o EMLA® e o nanoanestésico.	99
TABELA 33. Teste t não pareado comparando a redução (valor absoluto) em relação à quantificação da dor antes da aplicação dos produtos em todos os tempos (10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos), não considerando os dados do voluntário <i>drop-out</i> (n = 570).	100
TABELA 34. Teste t não pareado comparando a redução (valor absoluto) em relação à quantificação da dor antes da aplicação dos produtos em cada tempo, não considerando os dados do voluntário <i>drop-out</i> .	101
TABELA 35. Teste de McNemar aplicado a todos os tempos (10, 15, 20 25, 30 e 35 minutos).	102
TABELA 36. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 10 minutos.	102
TABELA 37. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 15 minutos.	102
TABELA 38. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 20 minutos	103
TABELA 39. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 25 minutos.	103
TABELA 40. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 30 minutos.	103
TABELA 41. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 35 minutos.	104

Sumário

RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO.....	35
1.1 Anestésicos Locais.....	41
1.1.1 Lidocaína	42
1.1.2 Prilocaina.....	44
1.2 Estudos Clínicos	45
1.3 A Nanotecnologia e os Sistemas de Liberação de Fármacos	47
1.2.1 Nanocápsulas poliméricas	48
1.3 Anestésicos Locais Tópicos e Sistemas de Liberação Modificada	49
1.4 Nanoanestésico	51
1.4.1 Parâmetros físico-químicos das nanocápsulas de lidocaína e prilocaina	52
1.4.2 Hidrogel	53
2. OBJETIVOS.....	55
2.1 Gerais.....	55
2.2 Específicos.....	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 Caracterização Morfológica da Suspensão de Nanocápsulas	57
3.2 Caracterização Morfológica Das Nanocápsulas Do Produto Acabado	57
3.3 Desenvolvimento Clínico Do Nanoanestésico.....	58
3.3.1 Avaliação do perfil farmacocinético	58
3.3.1.1 <i>Fase clínica</i>	58
3.3.1.2 <i>Avaliação bioanalítica</i>	60
3.3.2 Avaliação de eficácia.....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Caracterização morfológica da suspensão de nanocápsulas	69
4.2 Caracterização morfológica das nanocápsulas no nanoanestésico	71
4.3 Desenvolvimento clínico.....	72
4.3.1 Perfil farmacocinético	72

4.3.2 Avaliação de eficácia	96
5. CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXOS	117
APÊNDICES.....	131

1. INTRODUÇÃO

A anestesia tópica é uma das estratégias mais usadas para minimizar a ansiedade, dor e o desconforto no local da inserção da agulha ou de procedimentos cirúrgicos. Os anestésicos locais (AL) utilizados para a anestesia da pele são benzocaína (amino éster), prilocaína e lidocaína (amino amidas) que são comercializadas na forma de gel, pomadas, cremes (benzocaína e misturas eutéticas de lidocaína e prilocaína) ou bioadesivos com diferentes composições (veículos e excipiente) para uso adulto e pediátrico.¹

As formulações tópicas têm como objetivo promover a permeação no local de aplicação e obter um rápido início de ação, melhorando o efeito anestésico e reduzindo a dor nos procedimentos. Para tanto, é necessário que a permeação cutânea atravesse de forma efetiva as camadas dérmicas, principalmente o estrato córneo.

A pele é formada por 3 camadas distintas firmemente unidas entre si: a epiderme (camada mais externa), a derme (camada intermediária e a hipoderme (camada mais interna ou subcutânea)).²

A hipoderme é uma camada muito suprida de vasos sanguíneos, terminações nervosas, folículos pilosos e glândulas sudoríparas, além disso, possui o panículo adiposo, que tem importante papel na proteção contra choques físicos e também como isolante térmico. Acima desta camada, localiza-se a derme, composta por fibras elásticas importantes por garantir a elasticidade do tecido como um todo, sendo composta também por anexos cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações de neurônios sensoriais. De forma mais superficial, temos a epiderme, um epitélio multiestratificado e avascular, que tem como funções a proteção contra agressões ambientais, principalmente o sol, prevenção da perda excessiva de água pelo corpo e proteção contra infecções.^{2,3}

O estrato córneo, localizado na parte superior da epiderme, é composto por corneócitos, correspondendo a cerca de 85% da composição total do estrato; e lipídeos intercelulares (15%) dispostos em 15 a 20 camadas. No total, é

composto por aproximadamente 70% de proteínas, 15% de lipídeo e 15% de água. O transporte de substâncias exógenas ocorre através da movimentação intercelular, intracelular, transfolicular e transglandular, variando de acordo com as características físico químicas da molécula permeante⁴.

A fim de melhorar o desempenho terapêutico das formulações tópicas dos anestésicos locais, há alternativas tecnológicas abrangendo métodos físicos (eletroporação, iontoforese, ultrassom e sonoforese), agentes químicos promotores da permeação e sistemas carreadores, principalmente, lipossomas, nanopartículas, hidrogéis e *patches*.¹

A palavra iontoforese é derivada do grego “ionto”, que significa íon e “foresis”, que significa “carregar”. Há indícios da aplicação clínica desta técnica desde a “Era Dourada” da civilização grega e, provavelmente, foi iniciada por Varatti, em 1747.⁵

A iontoforese é definida como um processo de transferência de drogas ionizadas através de uma membrana, através do uso de uma diferença de potencial elétrico entre dois eletrodos. O transporte por iontoforese depende de uma força eletromotiva que repele íons de um eletrodo de mesma carga e os faz migrar para um eletrodo de carga oposta. A corrente elétrica envolvida é constante e de baixa voltagem, e quando aplicada, o campo elétrico direciona o movimento dos íons presentes de forma que cargas positivas no compartimento anodo movem-se em direção ao catodo, enquanto os ânions movem-se na direção oposta. A iontoforese anodal ocorre quando um eletrodo anodo (carga positiva) é colocado em uma solução contendo íons da droga carregados positivamente (cátions) e o catodo (carga negativa) é colocado em uma solução receptora em localização próxima. A iontoforese catodal é o contrário da anodal e envolve o movimento de um ânion (Figura 1). Os íons migram através do eletrodo de cargas opostas, promovendo o transporte pelo estrato córneo da pele. O perfil das moléculas que consegue melhores benefícios frente a esta técnica é alta hidrofiliabilidade e presença de grupos ionizáveis, como os peptídeos e as proteínas.^{6,7}

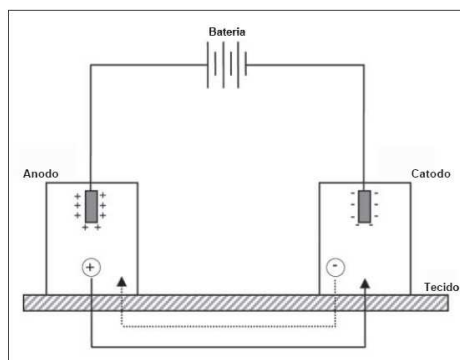


FIGURA 1. Representação esquemática do sistema de iontoforese. Fonte: Adaptado de FIALHO; CUNHA JÚNIOR, 2004.

No campo da anestesia tópica, a iontoforese tem sido utilizada para auxiliar a permeação de lidocaína (solução, 2%) a fim de reduzir a sensação cutânea tanto em adultos, como em crianças,^{8,9} e de anestésico associado a vasoconstritor.¹⁰ Na prática clínica, o tempo de tratamento e amplitude da corrente elétrica aplicada a partir dos aparelhos de iontoforese disponíveis variam de acordo com o *feedback* do desconforto sentido pelo paciente. Normalmente, as amplitudes dos aparelhos disponíveis comercialmente são bem toleradas pelos pacientes⁸. No geral, a aplicação desta técnica não traz desvantagens relevantes ao paciente, entretanto, há relatos de queimaduras químicas e pelo calor, irritação cutânea e indução de contração na musculatura.^{8,11}

A eletroporação foi originariamente utilizada para transferir células com macromoléculas como o DNA através da alteração reversível da permeação celular. Para tanto, é utilizado a aplicação de uma voltagem elevada (50 V) na forma de pulsos de curto tempo de duração, tipicamente fracionados em segundos (~1-100 ms) que tende a aumentar a permeabilidade da membrana celular através da abertura de poros aquosos transientes. Devido a grande resistência elétrica do estrato córneo, quando comparado a de tecidos mais profundos, a corrente elétrica a ser aplicada durante a eletroporação é inicialmente concentrada no

estrato córneo. Entretanto, após a eletroporação da bicamada lipídica do estrato córneo, a resistência desta camada é rapidamente reduzida e a corrente elétrica é distribuída em tecidos mais profundos, que contém neurônios sensoriais e motores (FIGURA 2).^{7,12,13} Apesar de também envolver uma corrente elétrica, semelhante à iontoforese, a eletroporação se diferencia, pois ao contrário da iontoforese que atua na própria molécula para impulsionar a passagem pela pele, a eletroporação age diretamente na pele, alterando sua permeabilidade favorecendo a passagem.¹³

Grande parte dos estudos envolvendo eletroporação compreendem a utilização desta técnica para melhorar a permeação de peptídeos, proteínas, vacinas, anti-inflamatórios e anti-virais.^{12,14,15,16} Estudos a partir da década de noventa e, principalmente, mais recentemente, apontam a eletroporação como alternativa para o transporte de quimioterápicos no tratamento do câncer.^{17,18,19,20,21}

Este método também é estudado para melhorar a permeação dos anestésicos locais sobre a pele. Hu e colaboradores verificaram o aumento da permeação *in vitro* de tetracaína através da utilização da eletroporação. A técnica também foi avaliada para lidocaína, apresentado resultados positivos nos parâmetros avaliados para anestesia da superfície da pele.²²

Os efeitos imediatos relacionados à eletroporação são marcas dos eletrodos na pele, que desaparecem depois de alguns minutos, e sensação desagradável devido à contração muscular.²³

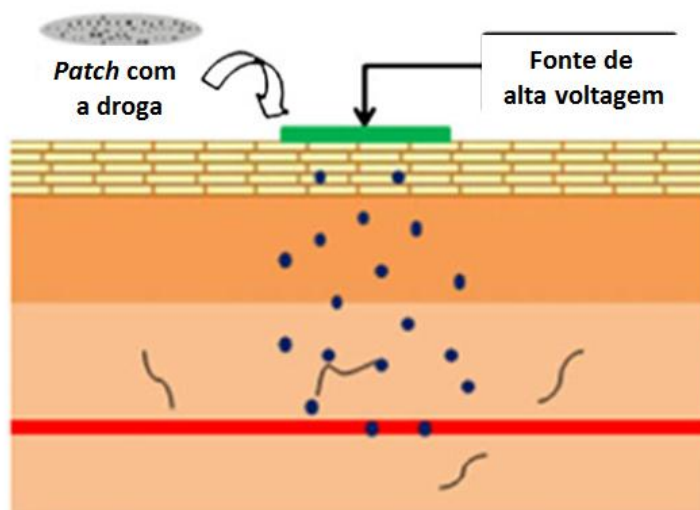


FIGURA 2. Representação esquemática do sistema de eletroporação – Adaptado de KALLURRI; BANGA, 2011.

A fim de melhorar a permeação dos anestésicos locais na pele, agentes promotores da permeação também podem ser utilizados. Estes agentes interagem com os lipídeos intercelulares aumentando o coeficiente de difusão dos fármacos no estrato córneo.⁴

Os promotores de permeação, também conhecidos como promotores de sorção, ou aceleradores, penetram na pele e reduzem a resistência desta barreira, facilitando a permeação de outras substâncias de interesse. Vários compostos são estudados por esta atividade, incluindo sulfóxidos (dimetilsulfóxido, DMSO), azonas (por exemplo, laurocapram, pirrolidonas (por exemplo, 2-pirrolidona, 2P), álcoois e alcanóis (etanol ou decanol), glicóis (por exemplo propileno glicol, PG, um comum excipiente utilizado topicamente), surfactantes e terpenos. O mecanismo pelo qual os promotores de permeação atua é variado, uma das formas de atuação é através da alteração da composição matriz lipídica, aumentando a partição do fármaco por se comportar como solvente de permeação através da membrana. Além disso, também pode agir nas conectinas desmossomais entre os corneócitos ou alterando a atividade metabólica da pele,

ou ainda exercer uma influência sobre a atividade termodinâmica / solubilidade do fármaco no seu veículo.²⁵

Os surfactantes são substâncias utilizadas como promotores de permeação devido a sua capacidade de solubilizar os lipídeos do estrato córneo. Em baixas concentrações, os surfactantes aumentam a permeabilidade de diversas substâncias na pele.²⁶ Distintos tipos de surfactantes foram testados quanto à melhora da promoção da permeação dos anestésicos tetrodotoxina e bupivacaína quando injetados no nervo ciático. Verificou-se um prolongamento do efeito anestésico da tetrodotoxina.²⁷

Estudos de relação estrutura atividade (REA) são utilizados para identificação de potenciais promotores de permeação. A partir de programas computacionais (por exemplo, desenho racional de drogas assistido por computador (*Computer Aided Molecular Desing* – CAMD), desenvolvem estratégias racionais para seleção de solventes, desenho de novas drogas e polímeros com propriedades físico químicas de interesse para a permeação dérmica.^{28,29,30}

Lipossomas são vesículas esféricas compostas por bicamadas (lamelas) de fosfolipídios, que, por sua vez, são moléculas presentes no organismo humano e com afinidade tanto pela água quanto por óleos e gorduras.³¹ São utilizados para melhorar a ação de medicamentos tópicos, incluindo anestésicos, por facilitar a taxa e extensão de absorção da droga e protegendo o fármaco de ser rapidamente metabolizado.³² Formulações contendo bupivacaína incorporada em lipossomas apresentaram um aumento na duração do efeito anestésico de forma dose-dependente quando avaliadas através de aplicação transdérmica em 6 voluntários.³³

As nanocápsulas nasceram no laboratório do francês F. Puisieux em Châtenay-Malabry na década de 80. Na verdade, suas estruturas foram demonstradas em 1986 por Rollot *et al* baseado nas partículas desenvolvidas por Al Khouri *et al*. As nanocápsulas são estruturas coloidais, com tamanho em escala nanométrica, que possuem uma organização vesicular semelhante aos

lipossomas, entretanto, possui um núcleo oleoso no interior envolto por uma rede polimérica, conferindo maior estabilidade a formulação (Figura 3).³⁴

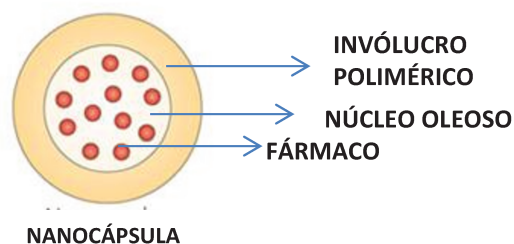


FIGURA 3. Representação da composição estrutural das nanocápsulas (Fonte: Adaptado de ORIVE *et al.*, 2009).

A utilização de nanocápsulas em formulações tópicas confere a possibilidade de liberação controlada dos ativos encapsulados, através da passagem gradual do ativo por um da parede polimérica.^{36,37} Além disso, devido ao tamanho nanométrico e as propriedades anfifílicas, as nanopartículas podem melhorar a permeação transdérmica.⁷¹

A administração tópica de anestésicos locais é uma das vias mais desejadas e de maior adesão pelo paciente, almejando sempre um procedimento menos indolor e prático para o paciente e para o profissional de saúde. Para tanto, várias tecnologias são desenvolvidas e aperfeiçoadas: técnicas físicas como eletroporação e iontoforese; técnicas químicas (ex. promotores de permeação) e alterações abrangendo a própria formulação, como utilização de lipossomas, nanocápsulas poliméricas e hidrogéis. Entretanto, o desenvolvimento de formulações anestésicas de uso tópico ideais ainda é um desafio e, portanto, um campo rico para pesquisa dos grupos acadêmicos e da indústria farmacêutica.

1.1 Anestésicos Locais

1.1.1 Lidocaína

A lidocaína (2',6'-Acetoxilidino, 2-(dietilamino)), é um amino-éster descoberto por Lofgren em 1943. Entretanto, os estudos clínicos com esta nova molécula iniciaram-se em 1944 com Torsten Gordh e sua equipe, mediante o apoio da empresa farmacêutica Astra BD. A lidocaína representou um avanço no histórico nos anestésicos locais devido a sua superioridade farmacológica representada pela baixa toxicidade e elevada eficácia frente aos anestésicos até então descobertos.³⁸

1.1.1.1 Características físico-químicas

A lidocaína pode estar na forma de base livre ou na forma do sal cloridrato (FIGURA 4). A solubilidade é influenciada mediante os distintos solventes, sendo a base livre da lidocaína muito solúvel em álcool, clorofórmio, livremente solúvel em éter e benzeno e praticamente insolúvel em água. O sal cloridrato é muito solúvel em água, álcool e solúvel em clorofórmio.³⁹

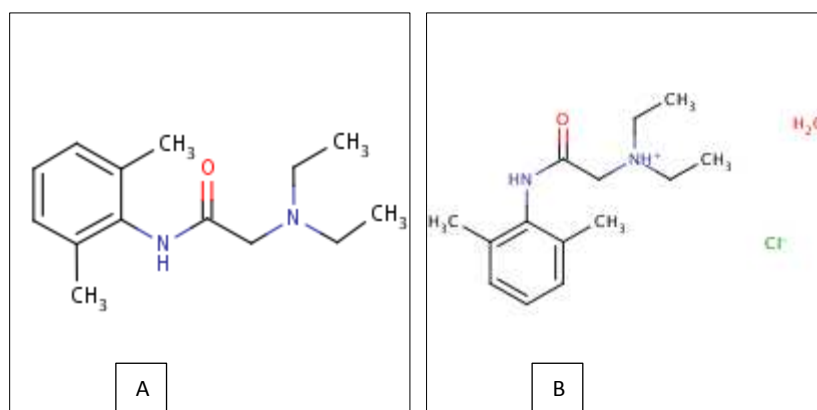


FIGURA 4. Representação das estruturas químicas da lidocaína base e do cloridrato de lidocaína, A e B, respectivamente.

1.1.1.2 Características farmacológicas

O mecanismo de ação consiste no bloqueio reversível de canais de sódio na membrana neuronal, tanto mielinizadas como não mielinizadas, impedindo a transmissão do impulso nervoso.⁴⁰ A ação dos anestésicos locais é modulada pelo receptor, já que possui maior afinidade pelo estado inativado ou em repouso que pelo estado aberto do canal de sódio.⁴¹

Durante a anestesia local, diferentes tipos de fibras do nervo periférico são bloqueados em diferentes momentos, em virtude de sua sensibilidade intrínseca ao bloqueio e ao gradiente de concentração do anestésico local dentro do nervo. A sequência geral de ocorrência de déficits funcionais é: primeira dor, segunda dor, temperatura, tato, propriocepção (pressão, posição ou estreitamento) e, por fim, tônus da musculatura esquelética e tensão voluntária.⁴²

Após aplicação tópica de 20 g de um creme contendo 5% da mistura de lidocaína e prilocaína, a média da concentração plasmática de lidocaína é 75 ng.mL⁻¹, sendo que o pico da concentração é atingindo 2-3 horas após a aplicação.⁴³ A absorção através da pele com dermatite atópica, psoríase e dermatite de contato é mais rápida comparada à pele normal.⁴⁴

Como a maioria das bases fracas, os anestésicos locais se ligam principalmente a alfa-1-glicoproteína ácida. A lidocaína se liga moderadamente as proteínas plasmáticas e possui alta taxa de extração hepática (70-75% por passagem).⁴⁵

Em relação a metabolização, a lidocaína é desalquilada no fígado pela CYP em monoetilglicina xilidida e glicina xilidida, que podem se metabolizadas adicionalmente em monoetilglicina e xilidida. A monoetilglicina xilidina e glicina conservam atividade anestésica local.^{46,47}

Nos seres humanos, cerca de 75% da xilidida são excretadas na urina sob a forma do metabólito subsequente 4-hidroxi-2,6-dimetilalanina.⁴⁷ O tempo de

meia-vida ($T_{1/2}$) da lidocaína, monoetilglicina e glicina xilidida são, respectivamente, 14 h, 28 h e 15 h.⁴⁸

1.1.2 Prilocaína

A prilocaína (o-Propionotoluidino, 2-(propilamino)), é um amino-éster descoberto por Lofgren e Tegnér em 1953, tendo sido descrita apenas em 1960.⁴⁹ Foi comercializado na década de 60 pela Astra BD.⁵⁰

1.1.2.1 Características físico-químicas

A prilocaína pode estar na forma de base livre ou na forma do sal cloridrato (FIGURA 5). A solubilidade é influenciada mediante os distintos solventes, sendo a base livre da prilocaína muito solúvel em álcool, acetona e fracamente insolúvel em água. O sal cloridrato é livremente solúvel em água, álcool e pouco solúvel em clorofórmio e acetona.³⁹

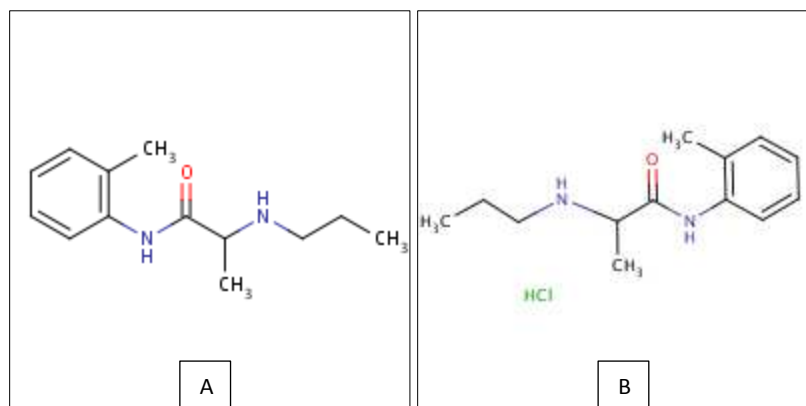


FIGURA 5. Representação das estruturas químicas da prilocaína base e do cloridrato de prilocaína, A e B, respectivamente.

1.1.2.2 Características farmacológicas

O mecanismo de ação dos anestésicos locais consiste no bloqueio reversível de canais de sódio na membrana neuronal, tanto mielinizadas como não mielinizadas, impedindo a transmissão do impulso.⁴⁰ A ação dos anestésicos locais é modulada pelo receptor, já que possui maior afinidade pelo estado inativado ou em repouso que pelo estado aberto do canal de sódio.⁴¹

Após aplicação tópica de 20 g de um creme contendo 5% da mistura de lidocaína e prilocaína, a média da concentração plasmática de prilocaína é 25 ng.mL⁻¹, sendo que o pico da concentração é atingindo 2-3 horas após a aplicação.⁴³ A absorção através da pele com dermatite atópica, psoríase e dermatite de contato é mais rápida comparada à pele normal.⁴⁴

Como a maioria das bases fracas, os anestésicos locais se ligam principalmente a alfa-1-glicoproteína ácida. A prilocaína se liga cerca de 55% a proteínas plasmáticas.⁵¹

O anel aromático da prilocaína é metabolizado no rim, pelas amidases, em o-toluidina, composto relacionado à metemoglobinemia. O o-toluidino tem se mostrado carcinogênico em modelos animais.⁵²

A prilocaína e seus metabólitos são excretados principalmente pelos rins. A depuração renal da prilocaína é mais rápida que a de outras amidas, resultando em sua remoção mais rápida da circulação.⁵³

1.2 Estudos Clínicos

Atualmente o desenvolvimento clínico de um novo composto tornou-se um processo altamente focalizado e gerenciado. O objetivo final após todo o processo de desenvolvimento é conseguir o registro por uma ou mais autoridades reguladoras (por exemplo, ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, EMEA - *European Medicines Agency*, FDA - *Food and Drug Administration*), a fim

de garantir que o composto, com a eficácia e a segurança asseguradas, possa ser comercializado em humanos.⁵⁴

O Código de Nuremberg foi um marco na história do desenvolvimento clínico e estabeleceu o conceito sobre a utilização de voluntários para a realização dos estudos clínicos e, por consequência, a necessidade de se criar os comitês de ética em pesquisa.⁵⁵

O desenvolvimento clínico é dividido em fase I, fase II, fase III, fase de aprovação e pós-aprovação. A fase I consiste na administração do novo composto em voluntários sadios – exceto no estudo de novos medicamentos oncológicos. O propósito desta fase é avaliação de segurança, tolerabilidade, farmacodinâmica e farmacocinética do composto em pequenos grupos, normalmente entre 20 a 80 voluntários sadios.^{54,56,57}

A fase II do desenvolvimento clínico consiste na avaliação do composto alvo na população específica que o composto tem como alvo tratar. Por exemplo, voluntários hipertensos no caso de um medicamento que almeja tratar esta patologia. O número de voluntários aumenta quando comparado à fase I, sendo normalmente mais de 100 voluntários.^{54,56}

Os estudos clínicos de fase III são estudos definitivos, aleatórios e duplos-cegos realizados comumente como ensaios multicêntricos com populações maiores que as testadas nas fases anteriores. A partir deste ponto, o produto segue para fase de aprovação da agência regulatória do país de interesse em comercialização. Posterior a este processo, que pode demorar um ano ou mais, de acordo com cada agência, temos a fase de pós-aprovação, na qual é iniciada o período designado como farmacovigilância, em que é destinado a detectar quaisquer efeitos adversos raros e a longo prazo que resultem do uso do composto em cenário clínico com milhares de pacientes.^{54,56}

1.3 A Nanotecnologia e os Sistemas de Liberação de Fármacos

Os sistemas de liberação de fármacos representam uma parcela importante dentre as estratégias de otimização terapêutica, tendo como objetivo a manipulação racional do perfil farmacológico das drogas e, concomitantemente, seus índices terapêuticos.^{58,59} A nanotecnologia é uma área recente da ciência que permite ferramentas para trabalhar em novos dispositivos e sistemas de liberação, com fundamentalmente novas propriedades e funções.⁶⁰ O desenvolvimento racional dos “nanofármacos” iniciou-se há meio século e mais de 40 produtos conseguiram completar a difícil jornada do laboratório para a rotina do uso clínico. A pesquisa e o desenvolvimento dos “nanofármacos” engloba um racional clínico/biológico, a partir da inovação da ciência dos materiais e das metodologias físico-químicas e biológicas de caracterização, a fim de otimizar as propriedades relevantes para a prática clínica. A parceria entre a academia, indústria e as agências regulatórias é de fundamental importância para o sucesso do desenvolvimento em resultados relevantes para a saúde mundial.⁶¹

Os sistemas de liberação nanoestruturados, ou nanocarreadores, podem ser empregados para a melhora de distintas aplicações: solubilidade, biodistribuição, biocompatibilidade, biodegradabilidade e liberação da droga.⁶² São estruturas com escala nanométrica, com tamanho variando de 1 a 100 nanômetros, podendo chegar, dependendo da referência, até 1000 nanômetros.^{59,60,63} A visão do órgão regulatório brasileiro, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁶⁴, durante a Reunião de Diretoria Colegiada da Anvisa, realizada, os nanocarreadores compreendem estruturas de 1 a 100 nanômetros. Devido à pequena dimensão, os nanocarreadores podem exibir propriedades biológicas e físico-químicas que os fazem materiais favoráveis para a aplicação biomédica, principalmente como sistemas de administração de medicamentos (“Drug Delivery System”). Para tanto, é necessário que sejam biocompatíveis, capazes de integrar os sistemas biológicos sem estimular uma resposta imune ou qualquer outro efeito negativo, além de não ser tóxico, ou seja,

seguro ao ser administrado ao sistema biológico. Alguns exemplos de nanocarreadores são: lipossomas (nano/micropartículas compostas de fosfolípídeos e esteroides, geralmente com tamanhos entre 80-300 nm), nanopartículas lipídicas sólidas (partículas entre 80 e 300 nm, compostas por lipídeos sólidos (ex. triglicerídeos altamente purificados)), dendrímeros (polímeros entre 1-10 nm, com estrutura bem definida), nanopartículas poliméricas (partículas entre 10-100 nm, compostas por polímeros biodegradáveis sintéticos ou naturais) e materiais de carbono (compostos por uma única ou múltipla camada de grafite e possui ótimas propriedades elétricas e térmicas) (FIGURA 6).^{59,60}

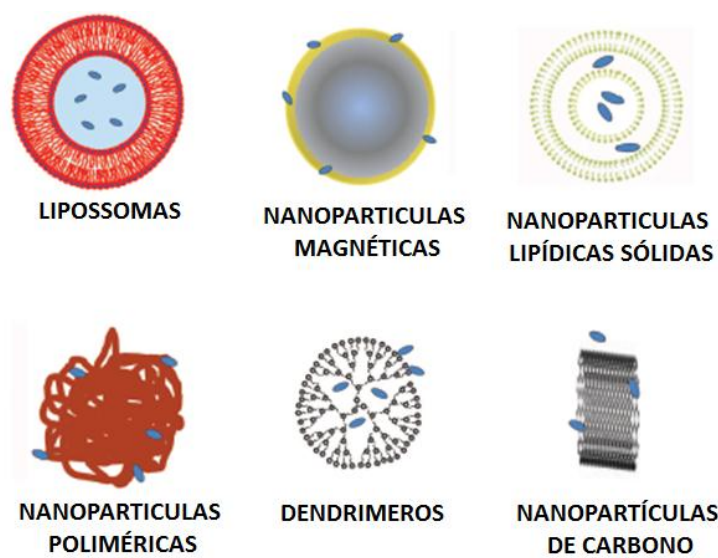


FIGURA 6. Representação esquemática de lipossomas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros e nanopartículas de carbono como exemplos de “Drug Delivery System”.

1.2.1 Nanocápsulas poliméricas

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas. As nanoesferas são sistemas em que o fármaco

está disperso de forma homogênea ou solubilizados no interior da matriz polimérica. De forma distinta, as nanocápsulas poliméricas são constituídas de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo lipídico ou adsorvido a parede polimérica.⁶⁵ Diversos componente lipídicos podem ser utilizados para a preparação das nanocápsulas, incluindo óleos vegetais ou minerais, assim como compostos puros como oleato de etila e benzoato de benzila. O critério de seleção dos óleos são ausência de toxicidade, ausência de risco de degradação do polímero e uma alta capacidade de dissolver o fármaco em questão. Os polímeros podem ser provenientes de distintas origens: natural (goma arábica, gelatina), hemisintético (etilcelulose, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose) ou, de forma mais comum, sintéticos, que inclui poli-ε-caprolactona e polialquilcianoacrilato,^{66,67}

Também é utilizado para a síntese das nanocápsulas poliméricas os surfactantes, que são importantes para aumentar a estabilidade da suspensão, de forma a prevenir a aglomeração das partículas durante o armazenamento. Podem ser de caráter lipofílico, como a lecitina, ou hidrofílicos, como o laurilsulfato (aniônico), amônia quaternária (catiônica), dentre outros.⁶⁸

As nanocapsulas polimericas são de interesse para administração tópica, pois são capazes de controlar a liberação dos princípios ativos, os quais necessitam difundir pela matriz polimérica para permear através da pele.^{36,59} A encapsulação de anestésicos locais demonstrou alterar o perfil de liberação da droga e, adicionalmente, melhorar as características toxicológicas e de estabilidade, quando comparado a droga livre^{37,69}. Apesar de terem dificuldades de escalonamento, limitada capacidade de encapsulação e ampla variedade de tamanho, as nanocapsulas possibilitam o transporte de compostos a tecido específicos, células e compartimentos celulares.⁷⁰

1.3 Anestésicos Locais Tópicos e Sistemas de Liberação Modificada

Atualmente no mercado brasileiro são comercializados diversas pomadas e cremes anestésicos, com variadas indicações: diminuição da dor para punções com agulhas, por exemplo, na instilação de cateteres intravenosos, coleta de amostras de sangue e em procedimentos cirúrgicos superficiais; diminuição de dor na mucosa genital para cirurgias superficiais ou, antes da injeção local de outros anestésicos locais e ainda redução da dor durante a manipulação de úlceras na perna para facilitar limpeza mecânica ou debridamento. Os princípios ativos e os respectivos produtos comercializados no Brasil estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Principais anestésicos locais de uso tópico comercializados no Brasil.

Princípio(s) ativo(s)/concentração	Forma farmacêutica	Sistema de liberação modificada	Nome comercial	Empresa
Lidocaína 2,5% + Prilocaína 2,5%	Creme	Não	EMLA®	Astrazeneca
Lidocaína, 4%	Creme	Sim*	Dermomax®	Biosintética
Lidocaína, 5%	Pomada	Não	Lidopass®	Cimed
Lidocaína, 5%	Pomada	Não	Xylocaina®	Astrazeneca

*O Dermomax® é similar ao Ela-Max®, comercializado nos Estados Unidos. O anestésico tópico ELA-Max®, composto por lidocaína 4% ou 5%, apresenta um sistema de distribuição lipossomal. O ELA-Max® 4% é encontrado no Brasil com o nome Dermomax®, entretanto a bula do Dermomax® não alega a presença de lipossomas na composição.

Como é possível verificar a Tabela 1, em relação aos sistemas de liberação controlada e anestésicos locais tópicos, há apenas o Dermomax®, entretanto, sem explorar de maneira clara a utilização de um sistema de liberação modificada. No mercado externo, exceto o próprio Ela-Max®, previamente citado, não foi identificado nenhum outro anestésico tópico que possuísse alguma tecnologia de liberação modificada agregada ao produto.

Na literatura, foi identificado em fase de avaliação pré-clínica por Gou e colaboradores⁷¹ o Nanolidogel®(20%), que demonstrou melhora no tempo do início de ação do anestésico local lidocaína quando nanoencapsulado. O Nanolidogel® é composto por nanopartículas de lidocaína carregadas em PCL-

PEG-PCL (poli- ϵ -caprolactona)-poli(etilenoglicol)-poli(- ϵ -caprolactona), com tamanho de partícula de 200 nm, incorporadas em um hidrogel. Este produto foi submetido a avaliação pré-clínica e 32 ratos foram divididos em 4 grupos: EMLA® (E), Nanolidogel® (N), EMLA® associado a pré-tratamento com ultrassom focal (EU) e Nanolidogel® associado a pré-tratamento com ultrassom focal (NU). A avaliação do efeito anestésico transdérmico foi realizada através do método de retirada de cauda (*tail-flick*). Os resultados demonstraram que o tempo para início do efeito anestésico em N foi 1,5 vezes inferior ao E e em NU foi 2,5 vezes inferior ao EU. Além disso, a taxa de eficiência anestésica em N foi 4 vezes superior ao E e em NU foi 1.6 vezes superior a EU.⁷¹

Outras formulações, compreendendo estruturas lipossomais de lidocaína foram avaliadas em humanos e demonstraram superioridade quando comparadas a placebo e equivalentes quando avaliadas contra ao EMLA®.^{72,73}

O mercado dos anestésicos locais tópicos carece de alternativas modernas que compreendam sistemas de liberação modificada a fim de obtermos melhorias nos aspectos de segurança, eficácia e desempenho clínico.

1.4 Nanoanestésico

O nanoanestésico compreende um hidrogel composto pela mistura eutética de 2.5% de lidocaína e 2.5% de prilocaína. Metade desta concentração está nanoencapsulada, enquanto que o restante do ativo encontra-se livre no gel, através dos respectivos sais cloridratos. O produto foi desenvolvido através de uma parceria entre a Universidade do Rio Grande do Sul e Biolab Sanus Farmacêutica. Este produto está protegido por patente, segundo o documento PI0700832-5. O nanoanestésico, produto utilizado neste trabalho, foi produzido e fornecido pela Biolab Sanus Farmacêutica. As informações apresentadas nos itens a seguir, 1.5.1 e 1.5.2, foram cedidas pela referida empresa.

A fabricação do produto consiste na produção de uma suspensão de nanopartículas de lidocaína e prilocaína, a partir do método de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizando como polímero formador de nanopartículas a poli(ϵ)-caprolactona.⁷⁴ A parte, os sais cloridratos de lidocaína e prilocaína são solubilizados em água e adicionados em gel de carbopol de forma a intumescê-lo. Na sequência, a suspensão de nanocápsulas é adicionada ao gel intumescido, constituindo o produto final.

1.4.1 Parâmetros físico-químicos das nanocápsulas de lidocaína e prilocaína

1.4.1.1 *Diâmetro médio*

A média do diâmetro médio de partícula da suspensão de nanocápsulas é 88 nm (intervalo = 50 a 120 nm) e foi medido através do equipamento DLS (Malvern), pela técnica de espalhamento de luz dinâmico.

1.4.1.2 *Índice polidispersão*

A média do índice de polidispersão da suspensão de nanocápsulas é 0,27 (intervalo = 0,22 a 0,43) e foi medido através do equipamento DLS (Malvern), pela técnica de espalhamento de luz dinâmico.

1.4.1.3 *Potencial Zeta*

A média do potencial zeta é -43 (intervalo: -53 a -36) e foi determinado a partir de um analisador eletroforético modelo Malvern ZetaSizer, aplicando a relação proposta por Smoluchowsky.

1.4.1.4 *Taxa de associação de lidocaína e prilocaína*

As taxas de associação de prilocaína são respectivamente: 92,5% (92 - 94%) e 89% (86,6 - 90%). Esses valores foram obtidos através da técnica de ultracentrifugação e ultrafiltração.

1.4.2 Hidrogel

O hidrogel do nanoanestésico possui aspecto leitoso e transparente, com textura não gordurosa e de fácil espalhabilidade. O pH da formulação é aproximadamente 8-9,5.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

- i. Caracterização morfológica das nanocápsulas que compreendem o nanoanestésico;
- ii. Desenvolvimento clínico do nanoanestésico, compreendendo a avaliação da eficácia e da segurança do produto.

2.2 Específicos

- i. Caracterização morfológica da suspensão de nanocápsulas de lidocaína e prilocaína através de Microscopia Eletrônica de Transmissão;
- ii. Caracterização morfológica das nanocápsulas que compõem o hidrogel do nanoanestésico através de Criofratura associada à Microscopia Eletrônica de Transmissão;
- iii. Avaliação do perfil farmacocinético do nanoanestésico;
- iv. Avaliação de segurança do nanoanestésico;
- v. Avaliação de não-inferioridade do nanoanestésico quando comparado ao EMLA®;
- vi. Avaliação da eficácia do nanoanestésico em distintos tempos inferiores a 1 hora

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização Morfológica da Suspensão de Nanocápsulas

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Transmissão.⁷⁵ A suspensão de nanocápsulas foi deixada decantando sobre uma grade de cobre recoberta com *formvar* 2.5% durante 10 minutos. Em sequência, as grades foram cobertas com uma solução de acetato de uranila 5% e deixadas em repouso por 10 minutos. O acetato de uranila foi removido com auxílio de papel de filtro e as grades foram deixadas secando por 48 horas. O material foi observado em um microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906, Zeiss) em distintos aumentos a 60kV. Os procedimentos de preparação das amostras de contrastação negativa foram realizados no Laboratório de Parasitologia e Biotecnologia/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba. As análises das amostras foram feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp. A realização desta análise contou com a coparticipação do pesquisador Marco Antonio de Oliveira.

3.2 Caracterização Morfológica Das Nanocápsulas Do Produto Acabado

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada através de microscopia eletrônica de transmissão associado à técnica de criofratura.⁷⁶ As amostras foram congeladas em Freon 22 e transferidas para nitrogênio líquido. Em sequência, foram colocadas no aparelho de criofratura Leica BAF060 e fraturadas a -140°C. As réplicas foram produzidas com a deposição de 6nm de platina a 45° de inclinação e estabilizadas com 20nm de carbono depositado a 90°. As réplicas foram colocadas em uma solução de 50% de ácido sulfúrico por 4 horas para remoção da amostra. Posteriormente, foram lavadas em água

destilada por 1 hora. O material foi observado ao MET (LEO 906, Zeiss) a diferentes aumentos com 60kV. As preparações das amostras de criofratura foram realizadas na Divisão de Metrologia Biológica - DIBIO do INMETRO em Xerém/RJ. As análises das amostras foram feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp. A realização desta análise contou com a coparticipação do pesquisador Marco Antonio de Oliveira.

3.3 Desenvolvimento Clínico Do Nanoanestésico

3.3.1 Avaliação do perfil farmacocinético

3.3.1.1 Fase clínica

Para a avaliação do perfil farmacocinético (fase I) foi realizado um estudo com 8 indivíduos (ambos os sexos, adultos e sadios) previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP - Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp (Campus Campinas) – vide anexo I). A idade dos voluntários variou entre 18 e 34 anos (mediana = 24.5 anos) os quais apresentaram um Índice de Massa Corpórea entre 19.65 e 28.01 (média= 22.47). O peso e a altura ficaram compreendidos entre 47.2 e 85.5 kg (média = 64.8 kg) e 1.55 e 1.85 m (média = 1.69 m). Os voluntários deram entrada no hospital a partir das 18 horas do dia anterior à administração da medicação do primeiro período do estudo. Após o registro junto ao hospital os mesmos foram encaminhados à ala de internação, onde se procedeu a guarda dos pertences individuais e foi oferecido jantar. Os voluntários permaneceram na ala de internação, observando-se as restrições quanto a exercícios físicos e cumprimento específico da programação alimentar

prevista no protocolo. Foram mantidos internados nos dois dias subsequentes, para a aplicação da medicação e demais procedimentos de segurança.

Os voluntários receberam 2 g do nanoanestésico, administrados via tópica, na região do antebraço, em dose única e sem bandagem oclusiva a partir das 7:00 h da manhã do dia subsequente ao confinamento. A coleta das amostras foi realizada através de cateter venoso introduzido em veia superficial do antebraço do voluntário e mantido desobstruído com o auxílio de injeção de 1 mL de solução de heparina. Os tempos de coleta foram 0 hora (pré-dose) e 0:10, 0:20, 0:30, 0:40, 0:50, 1:00, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 2:00, 2:20, 2:40, 3:00, 3:30, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00, 8:00, 10:00, 12:00, 15:00, 24:00 horas após a aplicação da medicação. Para proceder a coleta, cerca de 1 mL de sangue foi retirado e desprezado para eliminar a heparina e, após, foi coletado a amostra de sangue pertinente em tubos com EDTA. Por fim, o acesso venoso era novamente heparinizado com a injeção de 1 mL da solução de heparina a fim de conservá-lo. Foi coletada uma amostra de sangue de 40 mL para controle individual do método; para as demais ocasiões foram coletadas amostras de sangue de 7 mL, com o emprego de seringas descartáveis, sendo a matriz biológica imediatamente transferida para tubos previamente identificados.

Após as coletas, as amostras de sangue foram encaminhadas à sala de processamento e armazenamento, onde foram centrifugadas a uma rotação correspondente a 2000 g por 10 minutos. Após a centrifugação para separação do plasma, o mesmo foi transferido para um tubo criogênico, igualmente identificado.

O controle quanto à transferência para o tubo correto foi realizado através de um sistema de controle e identificação dos tubos por meio de códigos-de-barras. Uma vez concluída a conferência dos procedimentos de transferência, os tubos criogênicos foram armazenados em freezer específico para armazenagem de amostras biológicas, localizado na Unidade de Internação e mantido à temperatura de cerca de -20°C, monitorada através de termômetro calibrado.

3.3.1.2 Avaliação bioanalítica

As matrizes biológicas, plasma humano, coletadas durante a Fase Clínica do estudo foram avaliadas quanto aos analitos lidocaína e prilocaína, princípios ativos que compõem o nanoanestésico. O padrão interno utilizado para ambas as análises foi a ropivacaína, cuja estrutura química está representada na Figura 7.

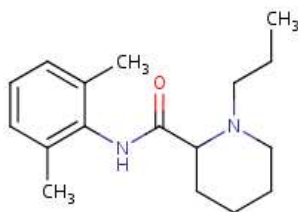


FIGURA 7. Representação da estrutura química da ropivacaína – padrão interno utilizado no método analítico de análise de prilocaína e lidocaína.

3.3.1.2.1 Lidocaína

O método analítico utilizado estava previamente validado quanto aos parâmetros expostos na Tabela 2 .

TABELA 2. Parâmetros analíticos do método utilizado para a análise do analito lidocaína.

Técnica analítica	LC-MS/MS
Tipo de Extração	Líquido-líquido
Matriz Biológica	Plasma humano
Tipo de Ionização	Electrospray positivo
Método de Detecção	Monitoramento de Reação Múltipla (MRM)
Limite de quantificação (LIQ)	0,05 ng/ML
Faixa de linearidade	0,05—10 ng/mL
Tipo de equação	$y = a + bx$ ($1/x^2$ ponderado)
Controle de qualidade baixa concentração (CQB)	0,15 ng/mL
Controle de qualidade de média concentração (CQM)	0,8 ng/mL
Concentração de Qualidade de alta concentração (CQA)	8 ng/mL
Estabilidade de Pós-processamento	64 horas e 30 minutos
Estabilidade de congelamento e descongelamento	4 ciclos
Estabilidade a curto	08 horas e 20 minutos
Estabilidade a longo prazo	56 dias

As descrições das condições cromatográficas, equipamentos e reagentes utilizados estão nas Tabelas 3, 4 e 5.

TABELA 3. Descrição geral das condições cromatográficas.

Fase móvel	Metanol/Acetonitrila/Água (40/30/30; v/v/v) + 2 mM Acetato de Amônio
Coluna analítica	Genesis Lightn C18, 4µm, 100 x 2.1 mm GRU2009-005 SN; 0903227537208019
Temperatura do auto-injetor	8°C
Fluxo	220 µL/min
Pressão contrária	100 bar
Temperatura da Coluna	Ambiente
Volume de injeção	15 µL

TABELA 4. Descrição dos materiais utilizados.

Materiais	Fabricante, País
Pipetas Ajustáveis (P200, P1000 e P10000)	Gilson, França
Ponteiras Plásticas para Pipetas Ajustáveis – Ponteira Amarela (capacidade 5-200 µL) e Ponteira Azul (capacidade 200 – 1000 µL)	Gilson, França
Tubos de ensaio de vidro 120 x 12 mm	Laborglass, Brasil
Eppendorf repeating pipette	Eppendorf, USA
Tubos Plasticos com capacidade de 15 e 50 mL	Costar, Brasil
Tubos teste de vidro descartáveis 75 x 12 mm	Costar, Brasil
Placa de PCR	Axygen, Brasil
Vortex mixer	Fischer, USA
Balança Analítica	AND, Japão

TABELA 5. Descrição dos reagentes utilizados.

Reagente	Descrição
Acetonitrila	Grau HPLC
Metanol	Grau HPLC
Hexano	Grau Análise
Éter etílico	Grau análise
Água Mili-Q	Grau análise
Acetato de amônio	Grau análise

3.3.1.2.2 Prilocaina

O método analítico utilizado estava previamente validado quanto aos parâmetros expostos na Tabela 6.

TABELA 6. Parâmetros analíticos do método utilizado para a análise do analito prilocaina.

Técnica analítica	LC-MS/MS
Tipo de Extração	Líquido-líquido
Matriz Biológica	Plasma humano
Tipo de Ionização	Electrospray positivo
Método de Detecção	Monitoramento de Reação Múltipla (MRM)
Limite de quantificação (LIQ)	0,05 ng/mL
Faixa de linearidade	0,05—10 ng/mL
Tipo de equação	$y = a + bx$ (1/x ² ponderado)
Controle de qualidade baixa concentração (CQB)	0,15 ng/mL
Controle de qualidade de média concentração (CQM)	0,8 ng/mL
Concentração de Qualidade de alta concentração (CQA)	8 ng/mL
Estabilidade de Pós-processamento	67 horas e 26 minutos
Estabilidade de congelamento e descongelamento	4 ciclos
Estabilidade a curto	08 horas
Estabilidade a longo prazo	62 dias

As descrições das condições cromatográficas, equipamentos e reagentes utilizados estão nas Tabelas 7, 8 e 9.

TABELA 7. Descrição Geral das Condições Cromatográficas.

Fase móvel	Metanol/Acetonitrila/Água (40/30/30; v/v/v) + 2 mM Acetato de Amônio
Coluna analítica	Genesis Lightn C18, 4µm, 100 x 2.1 mm GRU2009-007 SN: 0990325537208009
Temperatura do auto-injetor	8°C
Fluxo	300 µL/min
Pressão contrária	75 bar
Temperatura da Coluna	Ambiente
Volume de injeção	10 µL

TABELA 8. Descrição dos materiais utilizados.

Materiais	Fabrica, País
Pipetas Ajustáveis (P200, P1000 e P10000)	Gilson, França
Ponteiras Plásticas para Pipetas Ajustáveis – Ponteira Amarela (capacidade 5-200 µL) e Ponteira Azul (capacidade 200 – 1000 µL)	Gilson, França
Tubos de ensaio de vidro 120 x 12 mm	Laborglass, Brasil
Eppendorf repeating pipette	Eppendorf, USA
Tubos Plásticos com capacidade de 15 e 50 mL	Costar, Brasil
Tubos teste de vidro descartáveis 75 x 12 mm	Costar, Brasil
Placa de PCR	Axygen, Brasil
Vortex mixer	Fischer, USA
Balança Analítica	AND, Japão

TABELA 9. Descrição dos reagentes utilizados.

Reagente	Descrição
Acetonitrila	Grau HPLC
Metanol	Grau HPLC
Hexano	Grau Análise
Éter etílico	Grau análise
Água Mili-Q	Grau análise
Acetato de amônio	Grau análise

3.3.2 Avaliação de eficácia

3.3.2.1 Avaliação de eficácia: versus EMLA®

Para a avaliação de eficácia do nanoanestésico (estudo clínico fase I) foi realizado um estudo com o produto referência no mercado, o EMLA®, que compreende os mesmos ativos e concentrações que o nanoanestésico, 2.5% de lidocaína e 2.5% de prilocaína. Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP - Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp (Campus Campinas) – vide anexo II). O estímulo doloroso aplicado foi a picada da agulha na região inferior do antebraço, simulando uma perfuração para venopunção e a avaliação da sensação dolorosa experimentada pelo voluntário foi efetuada com o auxílio da escala análoga visual (EAV).

Dezesseis voluntários (ambos os sexos, adultos e sadios) foram aleatoriamente separados pra receber o nanoanestésico ou o EMLA® no período I e o mesmo ocorreu para o período II (intervalo entre os períodos (período de *wash-out*): 14 dias – TABELA 10). Antes da aplicação dos produtos, foi realizado um estímulo doloroso no antebraço do voluntário e solicitado que ele atribuisse, através da visualização da EAV, o valor de 0 a 10 correspondente intensidade da

dor sentida. O estímulo doloroso escolhido foi a perfuração com agulha semelhante a picada necessária para um procedimento convencional de venopunção. Posteriormente, foram aplicados 2 g de cada produto, cobertos com bandagem oclusiva e retirados após 1 hora. Na sequência, foi realizado o mesmo estímulo doloroso e novamente solicitado ao voluntário que avaliasse, através da visualização da EAV, o valor correspondente a dor sentida (sem dor à pior dor já sentida, respectivamente). A metodologia descrita foi aplicada para ambos os períodos, entretanto, diferindo apenas no cruzamento dos braços e as formulações aplicadas a eles. Para a avaliação de eficácia foi empregado o Teste t pareado comparando a média do grau de dor mencionado antes da aplicação do produto contra aquele mencionado após a aplicação do produto. Os programas utilizados foram Microsoft Excel 2007, Graph Pad Prism. Version 3.02.

TABELA 10. Tratamentos realizados por período em cada voluntário.

Número do Voluntário	Sexo	Sequência	Período I	Período II
1	M	2	T	R
2	M	1	R	T
3	M	1	R	T
4	M	2	T	R
5	M	2	T	R
6	M	1	R	T
7	M	2	T	R
8	F	1	R	T
9	F	2	T	R
10	F	1	R	T
11	F	1	R	T
12	F	2	T	R
13	F	1	R	T
14	F	2	T	R
15	F	2	T	R
16	F	1	R	T

M: masculino, F: feminino, R: EMLA (2.5% + 2.5%creme) – AstraZeneca, T: Nanoanestésico (2.5% + 2.5%gel) – Biolab Sanus Farmacêutica Ltda

3.3.2.2 Avaliação de Eficácia: versus placebo

Para a avaliação de eficácia do nanoanestésico (Estudo clínico fase III) em tempos inferiores a 1 hora, foi realizado um estudo controlado por placebo (gel de carbopol), avaliando os tempos de 10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos. Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP - Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp (Campus Campinas) – vide anexo III). O estímulo doloroso aplicado foi a picada da agulha na região inferior do antebraço, simulando uma perfuração para venopunção e a avaliação da sensação dolorosa experimentada pelo voluntário foi efetuada com o auxílio da escala análoga visual (EAV). Para viabilizar a avaliação de todos os tempos no mesmo voluntário, foram utilizados três períodos (intervalo entre os períodos (período de *wash-out*): 2 dias), sendo que em cada período foram avaliados dois tempos (10 e 15 minutos; 20 e 25 minutos; 30 e 35 minutos) em cada voluntário.

Noventa e seis voluntários (ambos os sexos, adultos e sadios) receberam duas aplicações de 2 gramas do nanoanestésico (2 x 2g) em uma mesma região de um dos antebraços e duas aplicações do placebo (2 x 2g) na mesma região contralateral. O estímulo doloroso e a quantificação da dor foram semelhantes aos utilizados no estudo anterior (item 3.2.2.2). Desta forma, os produtos (nanoanestésico e placebo) foram aplicados e retirados nos respectivos tempos e a quantificação da dor foi realizada antes e depois à aplicação.

Os voluntários foram monitorados durante todo o estudo. As pressões sistólica e diastólica e a frequência cardíaca foram determinadas previamente à administração do medicamento e após a conclusão dos procedimentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica da suspensão de nanocápsulas

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) são extensamente empregadas na avaliação do tamanho e estrutura das nanopartículas. A diferenciação de nanocápsulas e nanoesferas é possível através da MET, possibilitando ainda o estudo da espessura das paredes das nanocápsulas.⁷⁷

As amostras da suspensão de nanocápsulas que compreende parte da formulação do nanoanestésico foram avaliadas através da MET (FIGURA 8, 9 e 10). A figura 10 sugere a presença do invólucro polimérico das nanocápsulas.

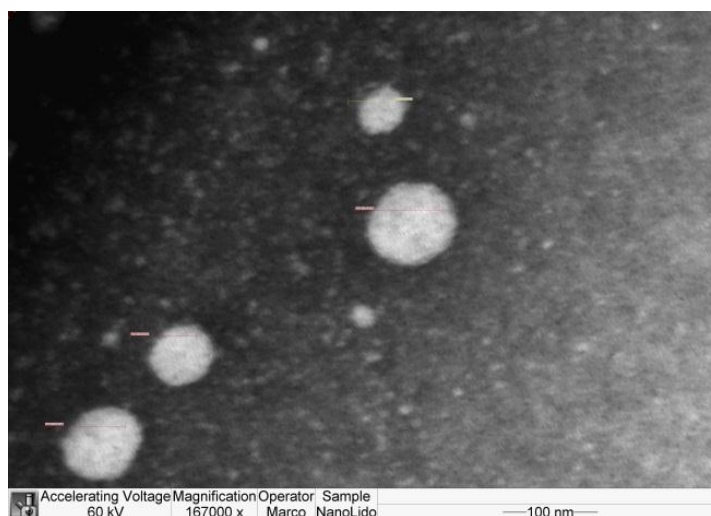


FIGURA 8. Microscopia Eletrônica de Transmissão da suspensão de nanocápsulas de lidocaína e prilocaína. Imagens obtidas a partir de análise em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906, Zeiss) a 60kV no aumento de 167000x.

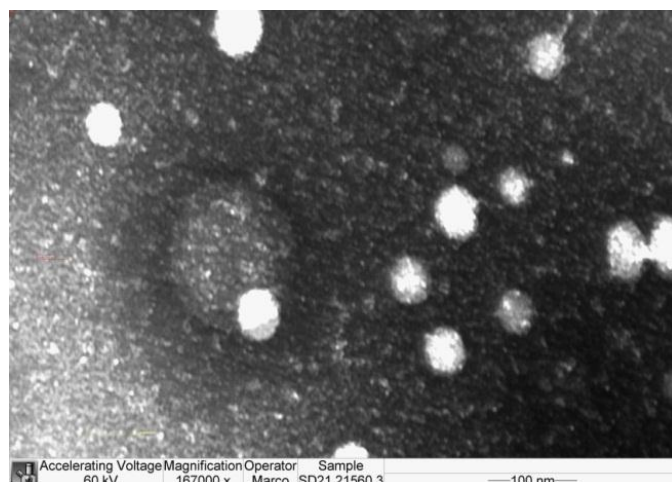


FIGURA 9. Microscopia Eletrônica de Transmissão da suspensão de nanocápsulas de lidocaína e prilocaína. Imagens obtidas a partir de análise em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906, Zeiss) a 60kV no aumento de 167000x.

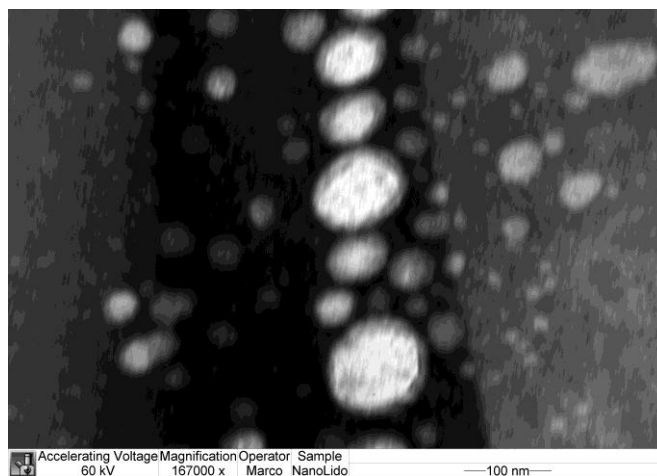


FIGURA 10. Microscopia Eletrônica de Transmissão da suspensão de nanocápsulas de lidocaína e prilocaína. Imagens obtidas a partir de análise em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906, Zeiss) a 60kV no aumento de 167000x.

4.2 Caracterização morfológica das nanocápsulas no nanoanestésico

A técnica de criofratura iniciou em 1961 com a criação do equipamento de criofratura por Hans Moor e representou um grande avanço no cenário da Microscopia Eletrônica. Principalmente no campo das membranas plasmáticas, em que permitiu o estabelecimento do Modelo de Mosaico Fluido, bicamada lipídica com proteína inseridas no fluido viscoso, ao invés da Unidade de Membrana Estrutura Trilamelar com as proteínas expostas apenas externamente a bicamada lipídica.⁷⁸

Atualmente, além da aplicação para estudo de membrana celular, a técnica de criofratura, associada à Microscopia Eletrônica, é utilizada para a análise morfológica de nanopartículas.^{77,79,80} Conhecendo o potencial desta associação de técnicas e conforme com o item 3.2, foi avaliada a morfologia das nanocápsulas presentes no hidrogel do nanoanestésico (FIGURA 11). Através do destaque pelas setas em vermelho, é possível observar as nanocapsulas que compõe o nanoanestésico.

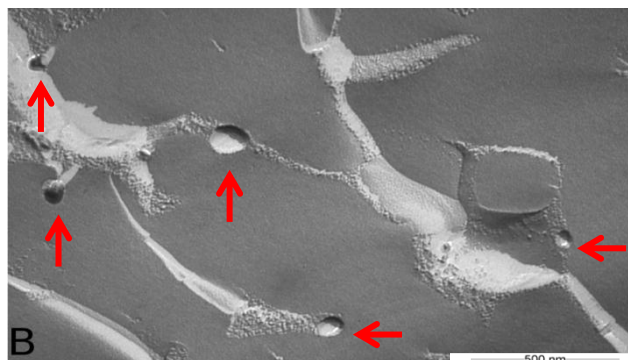


FIGURA 11. Criofratura associada à Microscopia Eletrônica de Transmissão aplicada em amostra de hidrogel do nanoanestésico. As setas vermelhas indicam as nanocápsulas da mistura eutética de lidocaína e prilocaína.

4.3 Desenvolvimento clínico

4.3.1 Perfil farmacocinético

As concentrações plasmáticas de lidocaína e prilocaína dos voluntários foram analisadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.1.1. Os valores das concentrações plasmáticas de lidocaína e prilocaína individuais dos voluntários estão descritas na Tabela 11 e 12, respectivamente.

TABELA 11. Tabela de concentrações plasmáticas de lidocaína dos voluntários.

Tempo (hr)	Voluntários							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0:00	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ
0:10	BLIQ	BLIQ	0,119	BLIQ	BLIQ	0,063	BLIQ	BLIQ
0:20	BLIQ	0,133	0,054	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ
0:30	0,47	BLIQ	0,077	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ
0:40	BLIQ	0,053	0,171	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ
0:50	BLIQ	BLIQ	0,098	BLIQ	BLIQ	0,155	0,05	BLIQ
1:00	BLIQ	0,105	0,159	BLIQ	BLIQ	0,091	BLIQ	BLIQ
1:10	BLIQ	BLIQ	0,389	BLIQ	0,212	BLIQ	BLIQ	BLIQ
1:20	BLIQ	BLIQ	0,436	BLIQ	BLIQ	0,081	BLIQ	BLIQ
1:30	0,075	BLIQ	0,646	BLIQ	BLIQ	0,126	BLIQ	0,087
1:40	0,05	0,063	0,922	BLIQ	BLIQ	0,171	BLIQ	BLIQ
1:50	0,114	0,169	0,823	BLIQ	BLIQ	0,236	BLIQ	BLIQ
2:00	0,158	0,103	1,21	BLIQ	0,098	0,364	BLIQ	BLIQ
2:20	0,299	0,168	1,49	0,076	1,35	0,35	0,073	0,223
2:40	0,664	0,693	1,29	0,078	2,1	0,77	0,082	0,17
3:00	0,932	0,234	2,58	0,117	2,72	0,667	0,143	0,243
3:30	1,93	0,588	1,78	0,195	2,62	1,38	0,132	0,576
4:00	1,5	0,68	2,51	0,418	2,39	1,78	0,248	0,576
5:00	2,18	1,17	1,71	0,929	3	1,5	0,323	1,46
6:00	1,87	0,748	1,5	1,56	2,68	1,18	0,32	1,24
7:00	1,56	0,953	1,33	1,99	2,97	1,46	0,472	1,75
8:00	1,51	0,846	1,17	2,47	3,42	1,74	0,448	1,81
10:00	1,28	0,925	1,01	1,52	4,31	1,72	32	1,49
12:00	1,34	0,851	0,761	1,69	3,24	1,16	36,5	1,85

15:00	1,04	0,83	0,701	1,84	3,65	1,42	12,5	1,96
24:00	0,575	0,54	0,233	1,27	2,12	0,795	3,13	1,02

BLIQ: Abaixo do Limite de Quantificação.

TABELA 12. Tabela de concentrações plasmáticas de prilocaína dos voluntários.

Tempo (hr)	Voluntários							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0:00	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	0,0878
0:10	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ
0:20	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ
0:30	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	0,0676	BLIQ	BLIQ
0:40	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ
0:50	BLIQ	0,318	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	0,0527	BLIQ
1:00	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	0,123	BLIQ
1:10	BLIQ	BLIQ	0,0651	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ
1:20	BLIQ	BLIQ	0,175	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ	BLIQ
1:30	BLIQ	0,274	0,28	BLIQ	BLIQ	0,0536	BLIQ	0,991
1:40	BLIQ	BLIQ	0,448	BLIQ	BLIQ	0,0576	BLIQ	0,167
1:50	BLIQ	BLIQ	0,439	BLIQ	BLIQ	0,228	BLIQ	0,135
2:00	BLIQ	BLIQ	0,622	BLIQ	BLIQ	0,0902	BLIQ	BLIQ
2:20	BLIQ	BLIQ	0,689	BLIQ	0,552	0,221	BLIQ	BLIQ
2:40	0,131	0,0747	0,605	BLIQ	0,534	0,145	BLIQ	BLIQ
3:00	0,539	BLIQ	1,17	BLIQ	0,513	0,155	BLIQ	BLIQ
3:30	0,317	0,125	0,65	BLIQ	0,451	0,31	BLIQ	BLIQ
4:00	0,216	0,148	1,05	BLIQ	0,431	0,408	0,18	0,0543
5:00	0,348	0,274	0,617	0,0894	0,56	0,374	BLIQ	0,245
6:00	0,279	0,188	0,442	0,19	0,385	0,248	BLIQ	0,155
7:00	0,243	0,173	0,405	0,264	0,402	0,333	0,0797	0,207
8:00	0,254	0,182	0,32	0,322	0,509	0,455	BLIQ	0,225
10:00	0,195	0,225	0,322	0,278	0,487	0,487	7,46	0,263
12:00	0,247	0,223	0,435	0,267	0,414	0,301	9,23	0,355
15:00	0,23	0,179	0,249	0,463	0,59	0,482	3,38	0,324
24:00	0,117	0,128	0,0892	0,305	0,321	0,247	1,1	0,219

BLIQ: Abaixo do Limite de Quantificação.

A partir das concentrações plasmáticas obtidas na fase bioanalítica foram calculados os parâmetros farmacocinéticos. A análise destes parâmetros foi realizada usando modelo não compartimental adequado para concentrações de

lidocaína em plasma, para via extravascular. Os parâmetros foram determinados diretamente dos valores de concentração (3 dígitos significativos – Tabela 11 e 12) reportados para cada tratamento e o tempo de amostra real foi usado para cálculo (TABELAS 13 a 28). Para o cálculo da área sob a curva foi realizado o método trapezoidal linear. Para cada voluntário os valores obtidos das concentrações de lidocaína e prilocaína foram plotados em um gráfico e foram calculados os parâmetros $ASC_{\text{último}}$, ASC_{inf} , % $ASC_{0-\text{inf}}$ extrapolated, C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, $t_{\text{último}}$ e K_e (FIGURAS 12 a 26).

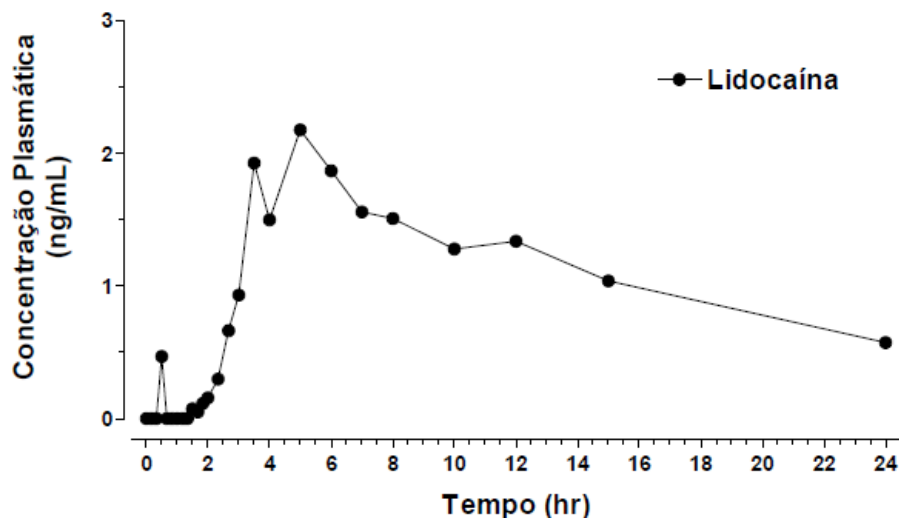


FIGURA 12. Curva da concentração plasmática pelo tempo de lidocaína do voluntário número 1.

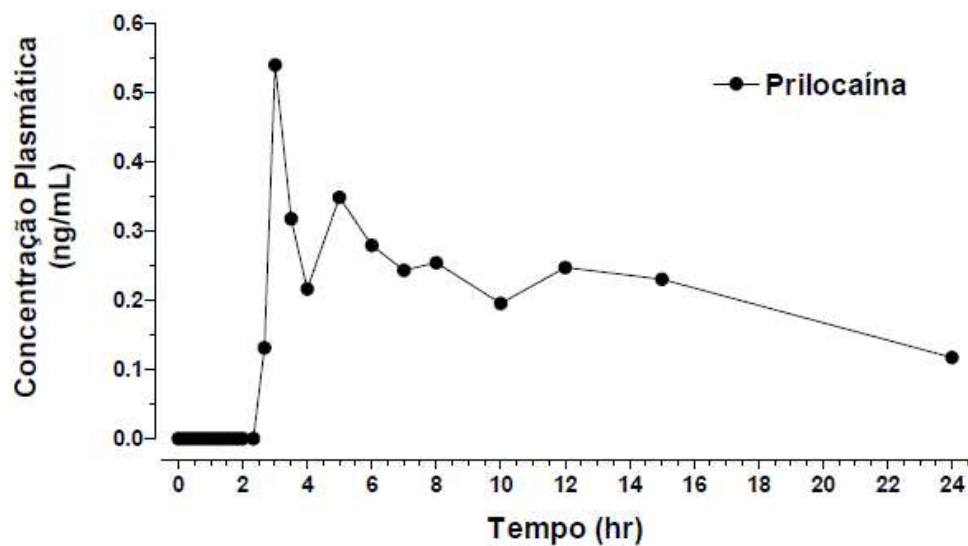


FIGURA 13. Curva da concentração plasmática pelo tempo de prilocaína do voluntário número 1.

TABELA 13. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 1.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	25,57
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	33,85
ASC_{0-inf} extrapolado	%	24,46
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	2,18
$C_{\text{último}}$	ng/mL	0,58
$T_{\text{máx}}$	H	5,00
$T_{1/2}$	H	9,98
k_e	1/h	0,07

TABELA 14. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 1.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Prilocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	4,75
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	6,55
ASC_{0-inf} extrapolado	%	27,40
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	0,54
$C_{\text{último}}$	ng/mL	0,12
$T_{\text{máx}}$	H	3,00
$T_{1/2}$	H	10,63
k_e	1/h	0,07

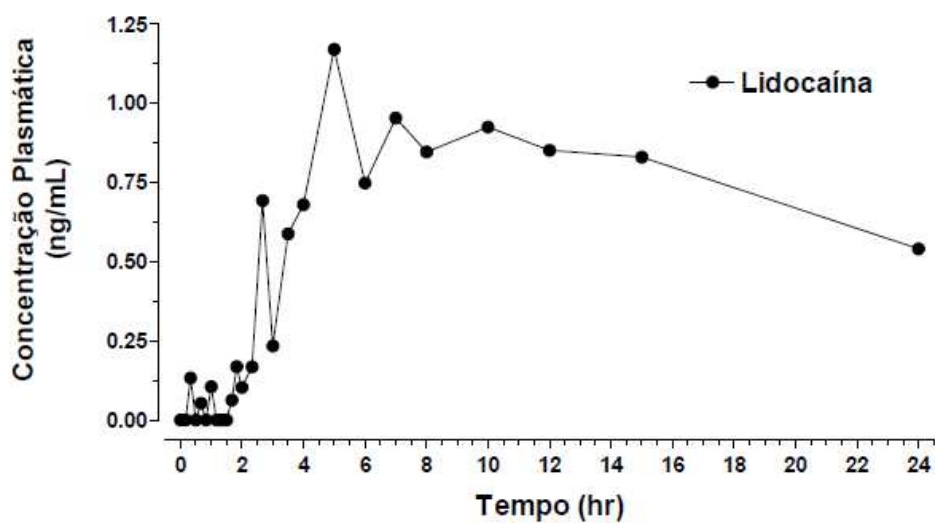


FIGURA 14: Curva da concentração plasmática pelo tempo de lidocaína do voluntário número 2.

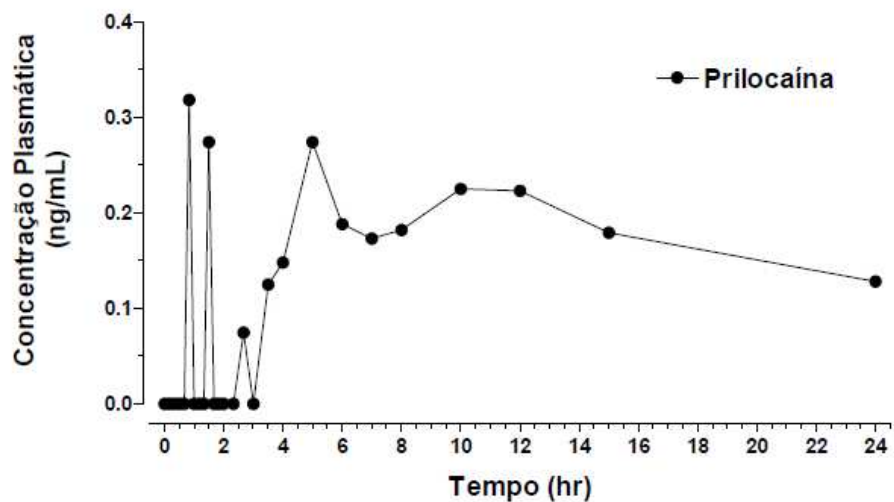


FIGURA 15. Curva da concentração plasmática pelo tempo de prilocaína do voluntário número 2.

TABELA 15. Parâmetros farmacocinéticos de lidocaína do voluntário número 2.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	16,83
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	30,88
ASC_{0-inf} extrapolado	%	45,49
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	1,17
$C_{\text{último}}$	ng/mL	0,54
$T_{\text{máx}}$	H	5,00
$T_{1/2}$	H	18,03
k_e	1/h	0,04

TABELA 16. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 2.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	3,86
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	6,89
ASC_{0-inf} extrapolado	%	43,95
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	0,32
$C_{\text{último}}$	ng/mL	0,13
$T_{\text{máx}}$	H	0,83
$T_{1/2}$	H	16,40
k_e	1/h	0,04

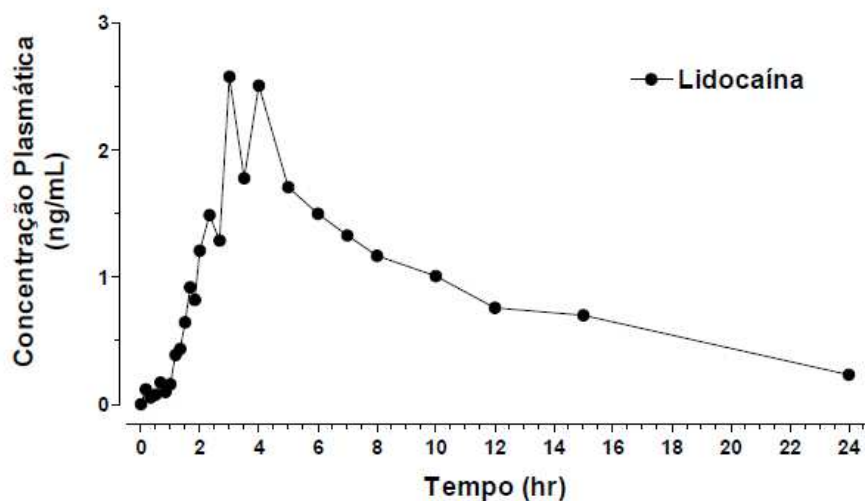


FIGURA 16. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 3.

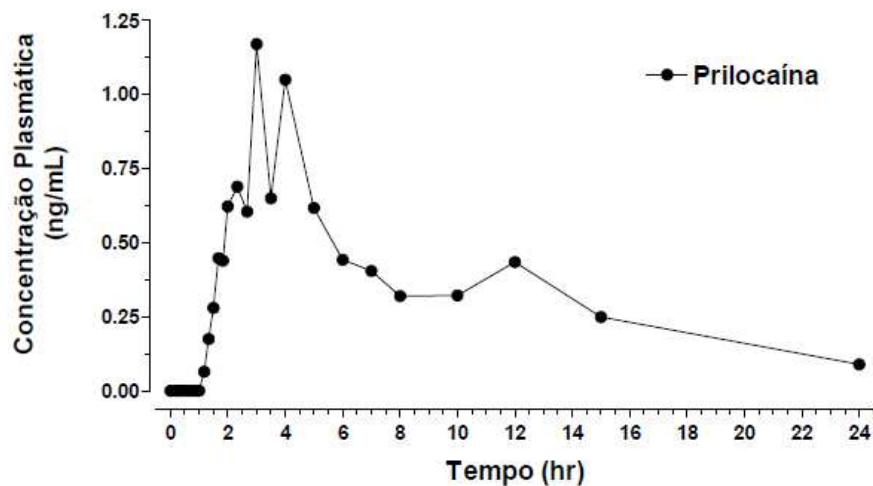


FIGURA 17. Curva da concentração plasmática de prilocaína do voluntário número 3.

TABELA 17. Parâmetros farmacocinéticos de lidocaína do voluntário número 3.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
T _{último}	H	24,00
ASC _{0-Túltimo}	[ng*h]/mL	21,20
ASC _{0-inf}	[ng*h]/mL	23,50
ASC _{0-inf} extrapolado	%	9,81
C _{máx}	ng/mL	2,58
C _{último}	ng/mL	0,23
T _{máx}	H	3,00
T _{1/2}	H	6,86
k _e	1/h	0,10

TABELA 18. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 3.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	7,99
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	8,69
ASC_{0-inf} extrapolado	%	8,03
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	1,17
$C_{\text{último}}$	ng/mL	0,09
$T_{\text{máx}}$	H	3,00
$T_{1/2}$	H	5,42
k_e	1/h	0,13

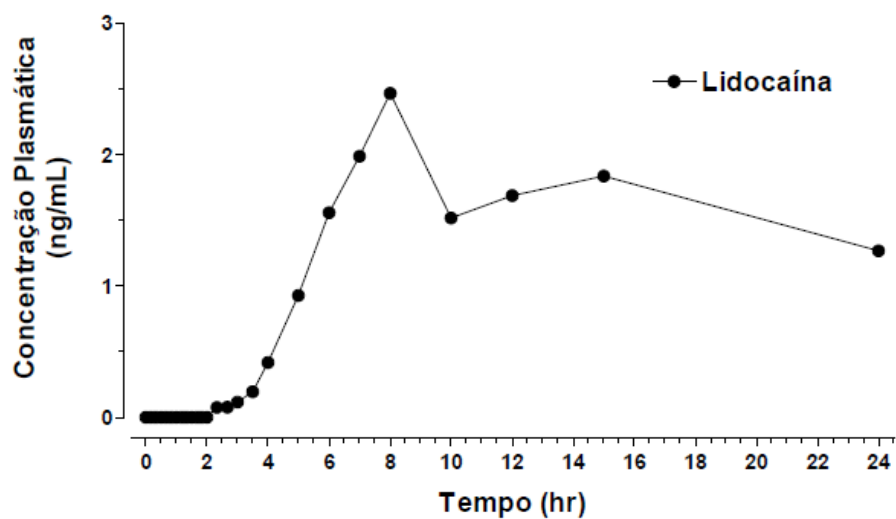


FIGURA 18. Curva da concentração plasmática pelo tempo de lidocaína do voluntário número 4.

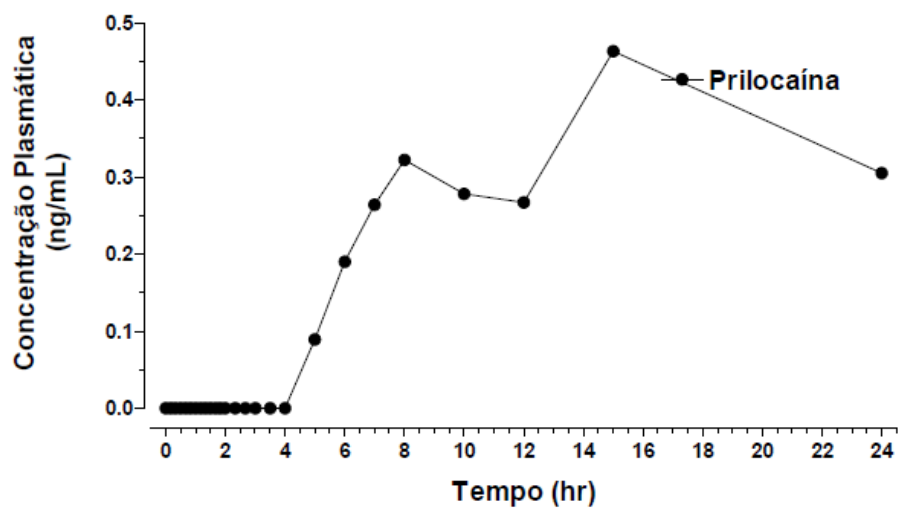


FIGURA 19. Curva da concentração plasmática de prilocaína do voluntário número 4.

TABELA 19. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 4.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	32,72
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	78,36
ASC_{0-inf} extrapolado	%	58,25
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	2,47
$C_{\text{último}}$	ng/mL	1,27
$T_{\text{máx}}$	H	8,00
$T_{1/2}$	H	24,91
k_e	1/h	0,03

TABELA 20. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 4.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	6,40
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	-
ASC_{0-inf} extrapolado	%	-
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	0,46
$C_{\text{último}}$	ng/mL	0,31
$T_{\text{máx}}$	H	15,00
$T_{1/2}$	H	-
k_e	1/h	-

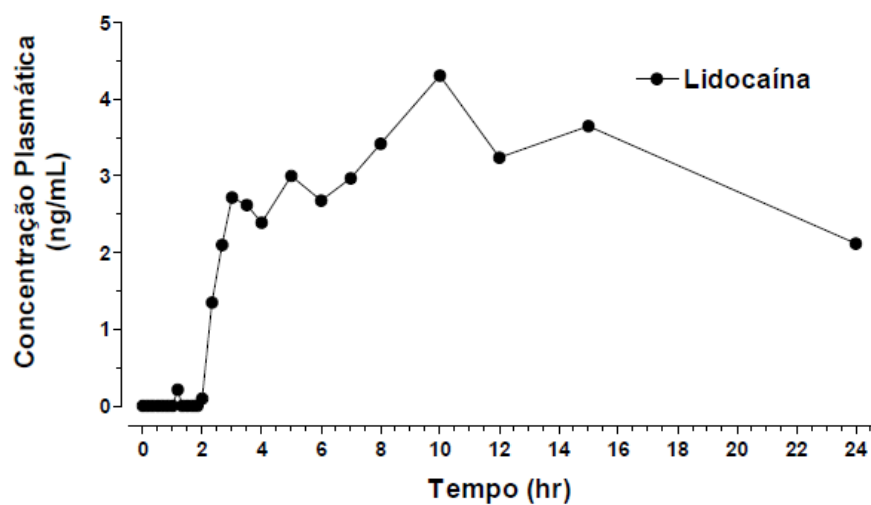


FIGURA 20. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 5.

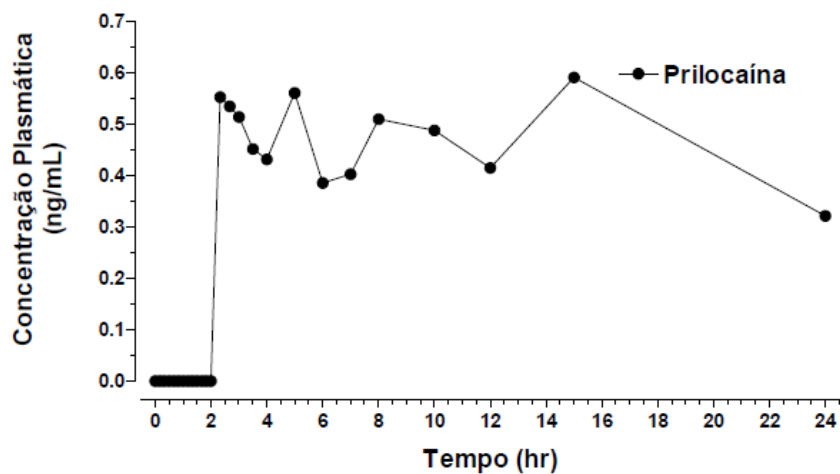


FIGURA 21. Curva da concentração plasmática de prilocaína do voluntário número 5.

TABELA 21. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 5.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	67,39
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	113,82
ASC_{0-inf} extrapolado	%	40,79
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	4,31
$C_{\text{último}}$	ng/mL	2,12
$T_{\text{máx}}$	H	10,00
$T_{1/2}$	H	15,18
k_e	1/h	0,05

TABELA 22. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 5.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
T _{último}	H	24,00
ASC _{0-T_{último}}	[ng*h]/mL	10,23
ASC _{0-inf}	[ng*h]/mL	-
ASC _{0-inf} extrapolado	%	-
C _{máx}	ng/mL	0,59
C _{último}	ng/mL	0,32
T _{máx}	H	15,00
T _{1/2}	H	-
k _e	1/h	-

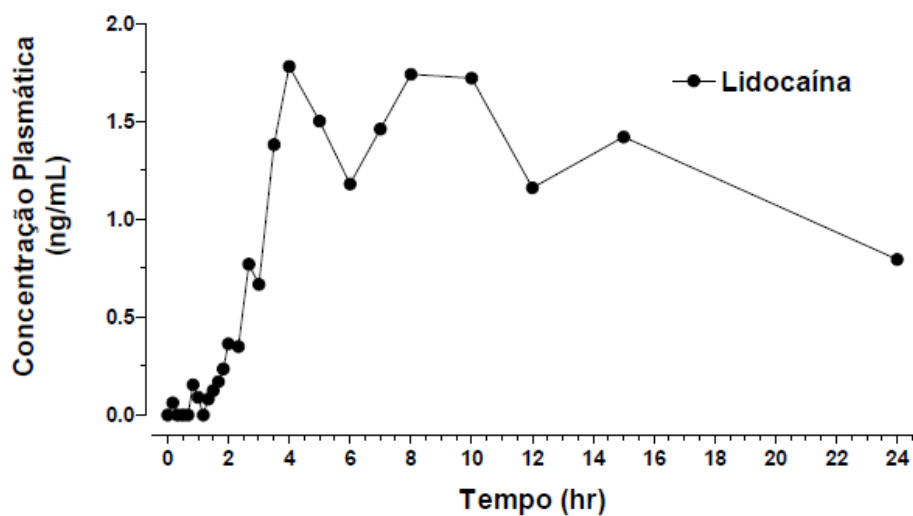


FIGURA 22. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 6.

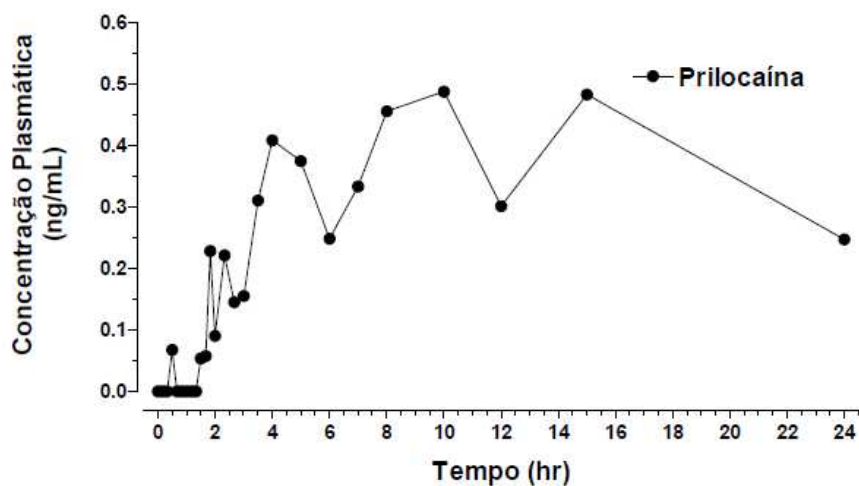


FIGURA 23. Curva da concentração plasmática de prilocaína do voluntário número 6.

TABELA 23. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 6.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	28,11
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	44,82
ASC_{0-inf} extrapolado	%	37,28
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	1,78
$C_{\text{último}}$	ng/mL	0,80
$T_{\text{máx}}$	H	4,00
$T_{1/2}$	H	14,57
k_e	1/h	0,05

TABELA 24. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 6.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	8,11
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	14,59
ASC_{0-inf} extrapolado	%	44,43
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	0,49
$C_{\text{último}}$	ng/mL	0,25
$T_{\text{máx}}$	H	10,00
$T_{1/2}$	H	18,19
k_e	1/h	0,04

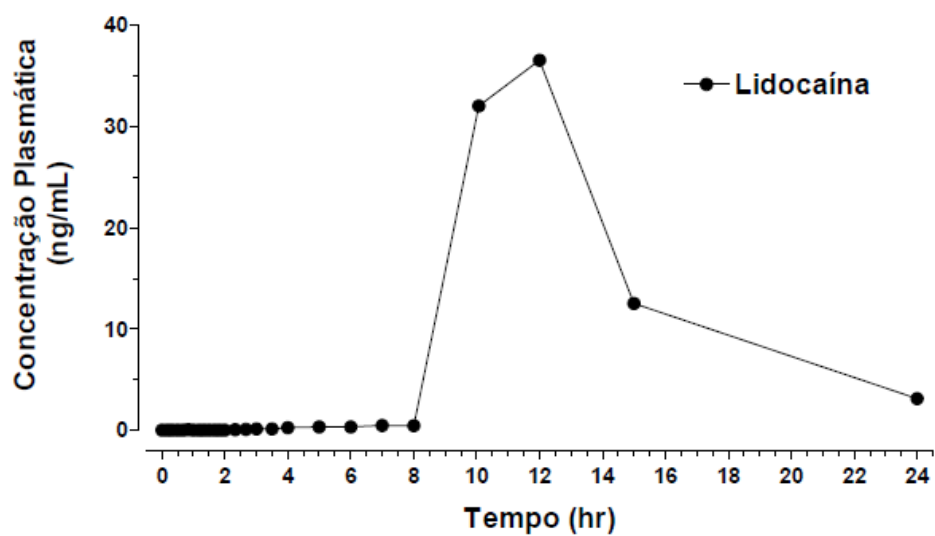


FIGURA 24. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 7.

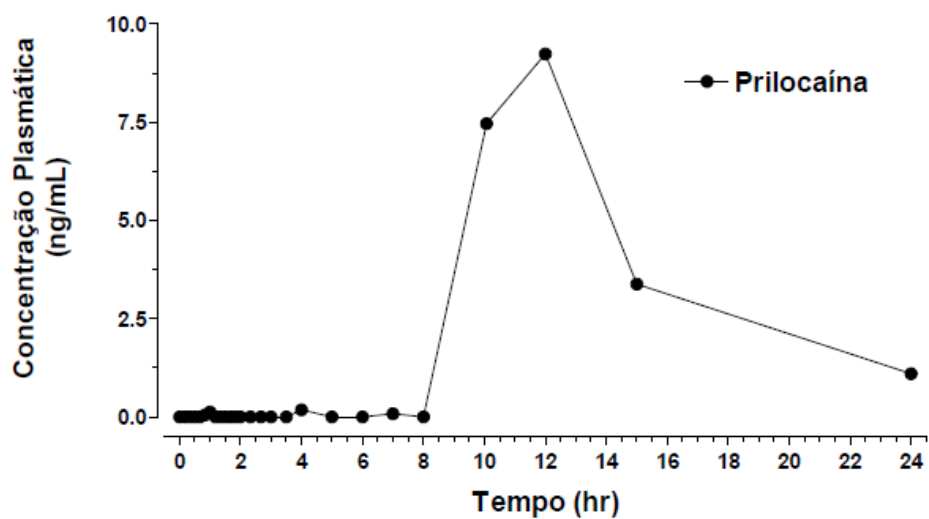


FIGURA 25. Curva da concentração plasmática de prilocaína do voluntário número 7.

TABELA 25. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 7.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
T _{último}	H	24,00
ASC _{0-Túltimo}	[ng*h]/mL	245,23
ASC _{0-inf}	[ng*h]/mL	261,45
ASC _{0-inf} extrapolado	%	6,20
C _{máx}	ng/mL	36,50
C _{último}	ng/mL	3,13
T _{máx}	H	12,00
T _{1/2}	H	3,59
k _e	1/h	0,19

TABELA 26. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 7.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	63,15
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	69,81
ASC_{0-inf} extrapolado	%	9,54
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	9,23
$C_{\text{último}}$	ng/mL	1,10
$T_{\text{máx}}$	H	12,00
$T_{1/2}$	H	4,20
k_e	1/h	0,17

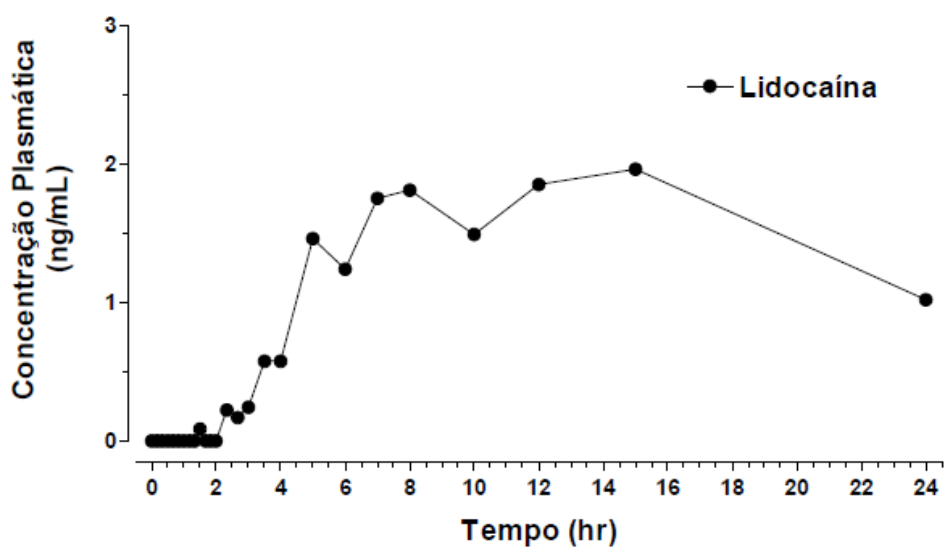


FIGURA 26. Curva da concentração plasmática de lidocaína do voluntário número 8.

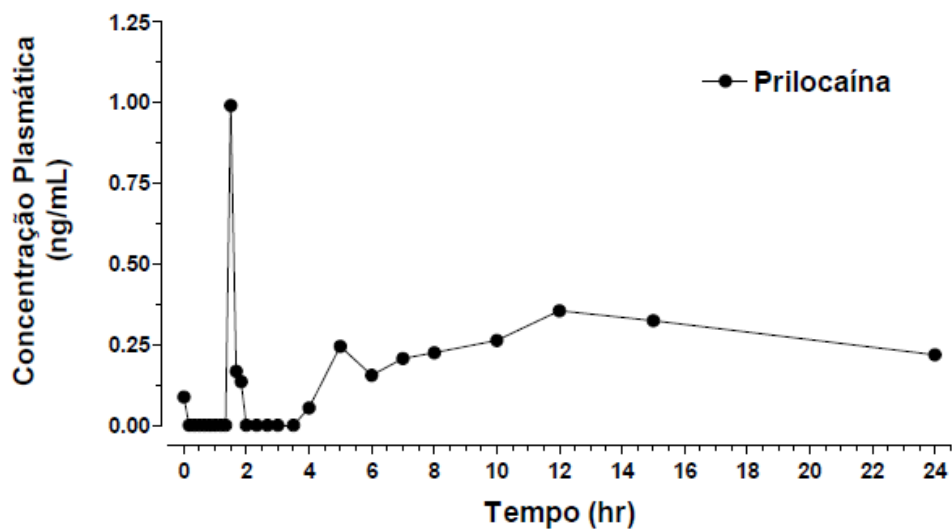


FIGURA 27. Concentrações plasmáticas de prilocaína do voluntário número 8.

TABELA 27. Parâmetros farmacocinéticos da lidocaína do voluntário número 8.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
$T_{\text{último}}$	H	24,00
$ASC_{0-T_{\text{último}}}$	[ng*h]/mL	32,09
ASC_{0-inf}	[ng*h]/mL	-
ASC_{0-inf} extrapolado	%	-
$C_{\text{máx}}$	ng/mL	1,96
$C_{\text{último}}$	ng/mL	1,02
$T_{\text{máx}}$	H	15,00
$T_{1/2}$	H	-
k_e	1/h	-

TABELA 28. Parâmetros farmacocinéticos da prilocaína do voluntário número 8.

Parâmetros farmacocinéticos	Unidade	Lidocaína
T _{último}	H	24,00
ASC _{0-T_{último}}	[ng*h]/mL	5,55
ASC _{0-inf}	[ng*h]/mL	10,89
ASC _{0-inf extrapolado}	%	49,02
C _{máx}	ng/mL	0,99
C _{último}	ng/mL	0,22
T _{máx}	H	1,50
T _{1/2}	H	16,90
k _e	1/h	0,04

Considerando todos voluntários, foram elaborados os gráficos das concentrações plasmáticas pelo tempo da lidocaína e da prilocaína (FIGURAS 29 e 30). Além disso, os dados dos parâmetros farmacocinéticos também foram calculados (TABELA 29 e 30).

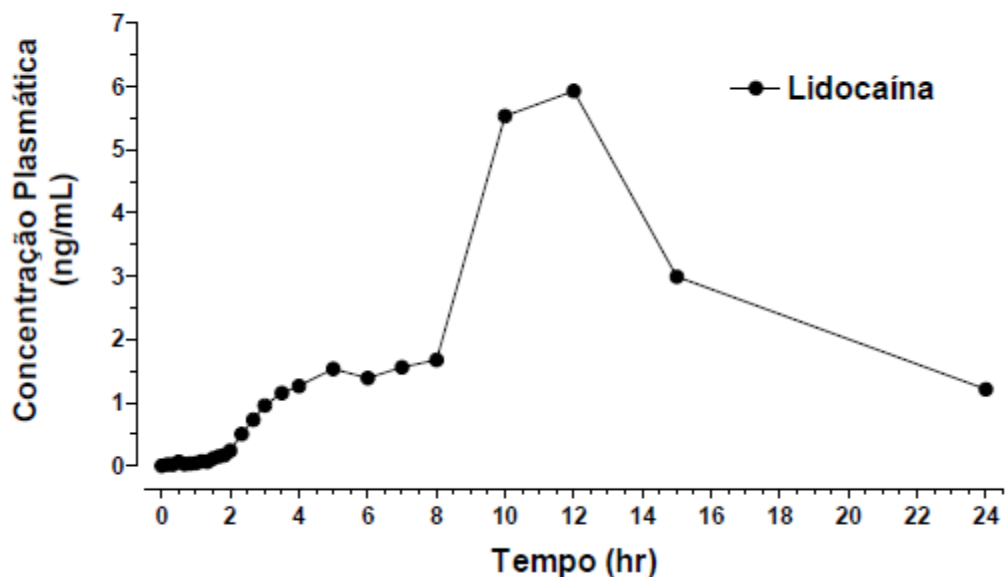


FIGURA 28. Curva de concentração plasmática contra o tempo do fármaco lidocaína, considerando todos os voluntários (n=8).

TABELA 29. Parâmetros farmacocinéticos do princípio ativo lidocaína considerando todos os voluntários (n=8).

	1	2	3	4	5	6	7	8
Túltimo	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00
ASCúltimo	25,57	16,83	21,20	32,72	67,39	28,11	245,23	32,09
ASCtudo	25,57	16,83	21,20	32,72	67,39	28,11	245,23	32,09
ASCinf	33,85	30,88	23,50	78,36	113,82	44,82	261,45	-
% ASCinf	24,46	45,49	9,81	58,25	40,79	37,28	6,20	-
Cmax	2,18	1,17	2,58	2,47	4,31	1,78	36,50	1,96
Cúltimo	0,58	0,54	0,23	1,27	2,12	0,80	3,13	1,02
Tmax	5,00	5,00	3,00	8,00	10,00	4,00	12,00	15,00
T1/2	9,98	18,03	6,86	24,91	15,18	14,57	3,59	-
Ke	0,07	0,04	0,10	0,03	0,05	0,05	0,19	-

FIGURA 29. Curva de concentração plasmática contra o tempo do fármaco prilocaína, considerando todos os voluntários (n=8).

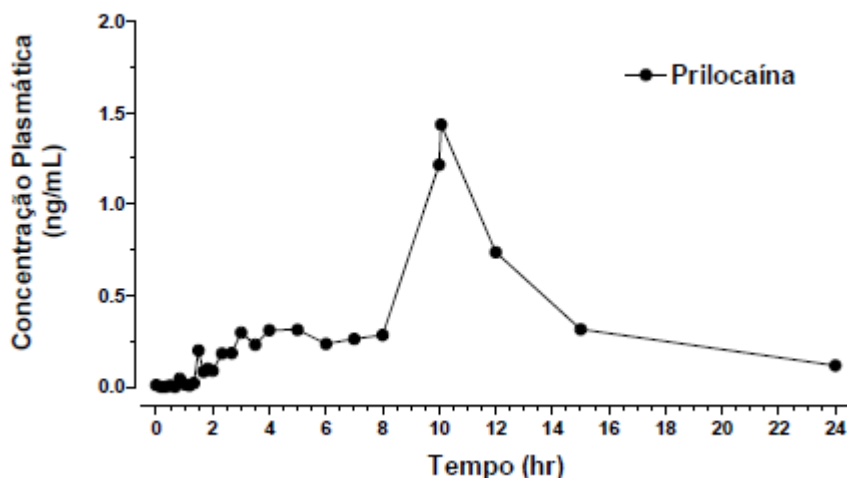


TABELA 30. Parâmetros farmacocinéticos do fármaco prilocaína considerando todos os voluntários (n=8).

	1	2	3	4	5	6	7	8
Túltimo	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00
ASCúltimo	4,75	3,86	7,99	6,40	10,23	8,11	63,15	5,55
ASCtudo	4,75	3,86	7,99	6,40	10,23	8,11	63,15	5,55
ASCinf	6,55	6,89	8,69	-	-	14,59	69,81	10,89
% ASCinf	27,40	43,95	8,03	-	-	44,43	9,54	49,02
Cmax	0,54	0,32	1,17	0,46	0,59	0,49	9,23	0,99
Cúltimo	0,12	0,13	0,09	0,31	0,32	0,25	1,10	0,22
Tmax	3,00	0,83	3,00	15,00	15,00	10,00	12,00	1,50
T1/2	10,63	16,40	5,42	-	-	18,19	4,20	16,90
Ke	0,07	0,04	0,13	-	-	0,04	0,17	0,04

Em relação à literatura sobre o estudo do perfil farmacocinético dos anestésico lidocaína e prilocaína em formulações tópicas, foi identificado que Juhlin e colaboradores⁸¹ avaliaram em 10 voluntários sadios (ambos os sexos) os parâmetros farmacocinéticos da aplicação de 10g de EMLA 5% (com bandagem

oclusiva) em uma área de 100 cm² do antebraço durante 2 horas. Também avaliaram (n=3) quando aplicado 4-6g de EMLA 5% (com bandagem oclusiva), em uma área de 25 cm² no antebraço por 1 hora. Após a aplicação no antebraço (área de 100 cm²), o nível máximo de lidocaína foi identificado em 5 horas (média 18 ng.mL⁻¹), enquanto que os níveis de prilocaína estavam abaixo do limite de detecção. Quando o EMLA 5% foi aplicado na região de 25 cm² do antebraço, nenhuma das substâncias foi detectada na circulação sistêmica (< 10 ng.mL⁻¹) em 3 horas. A absorção na área da face também foi avaliada a partir da administração de 10g de EMLA 5% (com bandagem oclusiva), em uma área de 100 cm² da face durante 2 horas. A concentração plasmática máxima na circulação sistêmica foi de 150 ng.mL⁻¹ de lidocaína e 58 ng.mL⁻¹ de prilocaína, atingidos após 2-2,5 horas da aplicação (FIGURA 30 e 31). Como é possível verificar, na região da face houve uma significativa maior absorção de lidocaína e prilocaína, atentando para futuros estudos com o nanoanestésico que envolvam esta região.

Em estudo realizado com 20 voluntários avaliou o perfil farmacocinético após a aplicação de 20g de EMLA® (correspondente a 500 mg de cada lidocaína e 500 mg de prilocaína) , mantidos sob bandagem oclusiva durante 1 hora. Os C_{máx} de lidocaína e prilocaína obtidos foram, respectivamente, 75 ng.mL⁻¹ (T_{máx} = 180 minutos) e 25 ng.mL⁻¹ (T_{máx} = 180 minutos) (FIGURA 29)⁴³. Quando comparamos estes dados com os obtidos no estudo do perfil farmacocinético do nanoanestésico, é possível verificar que utilizando nanoanestésico em uma quantidade 10 vezes inferior à utilizada de EMLA®, são alcançados níveis plasmáticos proporcionais de lidocaína e prilocaína. Entretanto, acredita-se que as estimativas de C_{máx} e T_{máx} do autor tenham sido prematuras, pois, conforme é possível verificar na figuras 30, há um pequeno declínio da concentração plasmática nas primeiras 4-6 horas, o que pode ter gerado uma falha no desenho metodológico do estudo e finalização antes do real tempo de ocorrência da concentração máxima.

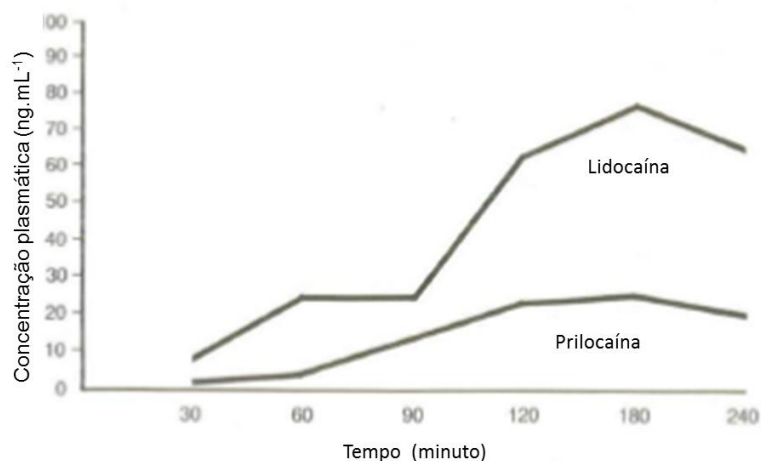


FIGURA 30. Concentrações plasmáticas de lidocaína e prilocaína em função do tempo após a aplicação tópica de EMLA®. Fonte: Adaptado de EVERS et al., 1985.

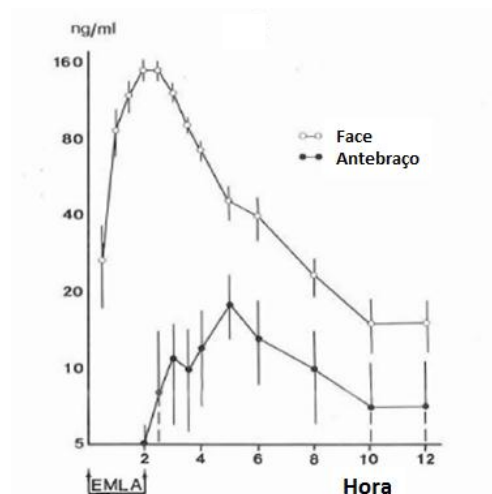


FIGURA 31. Concentração plasmática de lidocaína na circulação sistêmica após 2 horas da aplicação do EMLA 5% em uma área de 100 cm², com oclusão, na

região da face e antebraço (valores médios $\pm$ erro padrão). Fonte: Adaptado de JUHLIN, *et al.*, 1989.

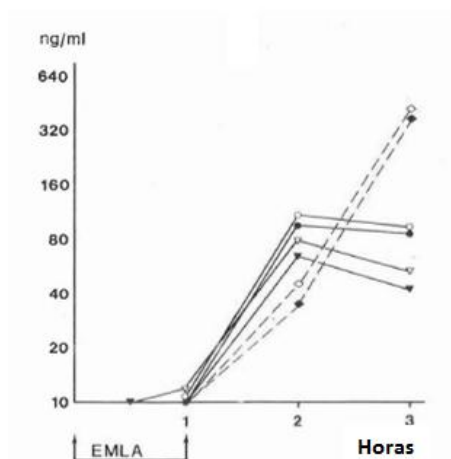


FIGURA 32. Concentração plasmática de lidocaína (○ ▽ ◇) e prilocaína (● ▲ ◆) na veia de drenagem após aplicação de EMLA 5% durante 1 hora em uma área de 25 cm² do antebraço. Fonte: JUHLIN, *et al.*, 1989.

De acordo com a literatura,⁸² a absorção sistêmica de doses elevadas de lidocaína e prilocaína, a partir de 5000 ng.mL⁻¹ e 7000 ng.mL⁻¹, respectivamente; podem resultar na depressão do Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Periférico, culminando em crises convulsivas, podendo chegar a coma, parada respiratória e colapso cardiovascular.^{83,84}

Avaliando o perfil farmacocinético do nanoantestésico, verificamos que as concentrações máximas de lidocaína e prilocaína (lidocaína- C_{máx}= 6.6 ng.mL⁻¹ e prilocaína- C_{máx}= 1,7 ng.mL⁻¹) são abaixo das identificadas como tóxicas na literatura, ou seja, é seguro e, depois de aplicado por 1 hora sobre a pele, alcança concentrações plasmáticas de lidocaína e prilocaína cerca de 750 vezes e 4000 vezes, respectivamente, inferior à considerada tóxica. Desta forma, pode-se inferir

que é passível fazer a aplicação do nanoanestésico em áreas sadias maiores do que as previamente testadas.

4.3.2 Avaliação de eficácia

A Escala Visual Analógica – EVA (FIGURA 33) tem como objetivo auxiliar na aferição da intensidade da dor no paciente, sendo um instrumento importante para verificarmos a evolução do paciente durante o tratamento e mesmo a cada atendimento, de maneira mais fidedigna. Também pode ser uma técnica utilizada para auxiliar na fase clínica de estudo de eficácia para o desenvolvimento de novos anestésicos^{85,86,87,88} como Gahalaut et al⁸⁵ que comparou a eficácia de um creme composto pela mistura eutética de 2.5% de lidocaína e 2.5% de prilocaína com um creme composto por 7% de tetracaína e 7% de lidocaína.



FIGURA 33. Escala Análoga Visual, com escala variando de 0, correspondente a menos dor já sentida, a 10, correspondendo a dor de maior intensidade da sentida pelo indivíduo.

No estudo de avaliação de eficácia versus o EMLA® ocorreram dois *drop-outs*, ou seja, dois pacientes não concluíram o estudo por motivos pessoais e não atrelados ao estudo.

Após a avaliação dos 14 voluntários quanto a diferença de dor experimentada com o estímulo doloroso da picada da agulha, antes e após a aplicação o nanoanestésico e do EMLA®, durante o período de 1 hora, foi obtido que para o EMLA® a mediana do escore antes da aplicação foi igual a 4, após, 0.

A média e intervalos de confiança foram, respectivamente, 3.962 IC_{95%} (3.139-4.784) antes da aplicação e 0.8077 IC_{95%} (0.1150 – 1.500) ($p < 0.0001$) após a aplicação. Para o nanoanestésico, a mediana do escore antes da aplicação foi igual a 4 e, após, 1. A média e intervalos de confiança foram respectivamente 3,846 IC_{95%} (3,072 – 4,620) antes da aplicação e 1.308 IC_{95%} (0,5127 – 2,103) ($p < 0,0001$) após a aplicação. Os resultados demonstram que ambos os tratamentos foram eficazes na redução do percentual da dor sentida pelos pacientes. Todos os dados dos valores avaliados pelos pacientes e os respectivos trabalhos estatísticos encontram-se na TABELA 31.

Na avaliação de não inferioridade, a média e o IC_{95%} para o nanoanestésico e para O EMLA®, no que tange a diferença de dor experimentada antes e após a administração de cada produto, foi, respectivamente, 3,154 IC_{95%} (2,195 – 4,112) e 2,538 IC_{95%} (1,814 – 3,263). O Teste t não pareado não foi capaz de identificar diferença significativa entre as médias ($p = 0,2754$). Desta forma, considerando o tempo de 1 hora de permanência do nanoanestésico e do EMLA®, não há diferença estatisticamente significativa entre a eficácia de ambos.

Os dados do estudo *versus* EMLA® também foram avaliados de forma não paramétrica, através do teste de McNemar. Este teste é usado para analisar frequências de duas amostras relacionadas, ou seja, tem como objetivo avaliar a eficiência de situações “antes” e “depois”, em que cada indivíduo é utilizado como o seu próprio controle. De acordo com a análise de não inferioridade, e congruente com os resultados acima, o valor de p foi estatisticamente não significativo ($p = 1,0$) (TABELA 32). O critério adotado como suficiente foi uma redução superior a 30% da dor inicial (pré-aplicação dos produtos) relatada pelo paciente e não suficiente como uma redução da dor igual ou inferior a 30% da dor inicial.

TABELA 31. Resultados da avaliação de cada voluntário referente ao tratamento com o nanoanestésico e o EMLA®.

	EMLA®					Nanoanestésico				
Voluntário	Período	Antes	1h após	≠	% redução	Período	Antes	1h após	≠	% redução
1	2	3	0	2	100%	1	4	2	2	50%
2	1	1	0	1	100%	2	1	0	1	100%
3	1	3.5	0	3.5	100%	2	5	2	3	60%
4	2	5	2	3	60%	1	5	2	3	60%
5	2	4	3	1	25%	1	4	3	1	25%
6	1	5	0	5	100%	2	3	0	3	100%
8	1	4	2	2	50%	2	2	0	2	100%
9	2	3	1	2	67%	1	5	4	1	20%
10	1	4	0	4	100%	2	4	1	3	75%
11	1	6	0	6	100%	2	3	0	3	100%
12	2	5	0	5	100%	1	5	0	5	100%
13	1	5	2.5	2.5	50%	2	4	2	2	50%
14	2	4	0	4	100%	1	5	2	3	60%

N	13	13	13	13		13	13	13	13
Min	1.00	0.00	1.00	25.00		1.000	0.0000	1.000	20.00
Mediana	4.00	0	3.00	100.00		4.000	1.000	3.000	75.00
Max	6.00	3	6.00	100.00		5.000	2.000	3.000	100.0
Média	3.962	0.8077	3.154	80.92		3.846	1.308	2.538	70.77
DP	1.361	1,146	1.586	26.74		1.281	1.316	1.198	29.07
EP	0.3775	0,3179	0.4399	7.417		0.3553	0.3649	0.3323	8.063
CV%	34.36%	141.93%	50.29%	33.05%		33.31%	100.60%	47.21%	41.08%
IC 95% inf	3139%	0.1150	2.195	64.76		3.072	0.5127	1.814	53.20
IC 95%	4784%	1.500	4.112	97.08		4.620	2.103	3.263	88.34

TABELA 32. Teste de McNemer aplicado para a avaliação de não inferioridade entre o EMLA® e o nanoanestésico.

		EMLA®		
		Suficiente	Não suficiente	Total
Nanoanestésico	Suficiente	12	0	12
	Não suficiente	1	1	2
	Total	13	1	14

Considerando os resultados do estudo de eficácia do nanoanestésico versus o EMLA®, em que foi avaliado a eficácia do nanoanestésico mediante permanência de 1 hora sobre a pele dos voluntários, o estudo subsequente contemplou a avaliação de tempos inferiores a 1 (uma) hora, com objetivo de verificar uma eficácia suficiente para poder ser empregado na clínica médica em tempos inferiores a uma hora, conforme recomendado pela maioria dos anestésicos locais tópicos presentes no mercado brasileiro.

Este estudo foi controlado por placebo, pois, de acordo com a bula do medicamento referência composto pela mistura eutética de lidocaína e prilocaína, o EMLA®, é preconizado a administração por aproximadamente 1 hora nos casos de procedimentos de venopunção. Desta forma, não sendo correto a condução de um estudo com o produto referência, haja vista a infração do preconizado na posologia do produto, foi realizado um estudo controlado por placebo.

A voluntária 95 participou somente do primeiro período por indisponibilidade nas datas dos segundo e terceiro períodos do estudo. Desta forma, os dados desta voluntária não foram computados para a avaliação do resultado.

Os valores referentes ao grau de dor experimentado antes e após a aplicação do nanoanestésico e do placebo, nos três períodos avaliados, estão relacionados nos apêndices I, II e III.

Considerando-se todos os tempos de aplicação dos produtos (10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos), a aplicação do nanoanestésico reduziu em cerca de 36% a dor descrita após perfuração do antebraço, enquanto o produto placebo reduziu em cerca de 16%. Aplicando-se o teste t de student não-pareado ao efeito analgésico do nanonestésico comparado ao do placebo encontrou-se um valor $p \leq 0,001$ (altamente significativo) quando analisado todos os tempos e valores de $p < 0,05$ quando analisados os tempos em separado (exceto em 20 minutos) (TABELAS. 33 e 34). Acredita-se que essa discrepância de valor encontrado para a avaliação de 20 minutos esteja correlacionada com a subjetividade da quantificação da dor.

TABELA 33. Teste t não pareado comparando a redução (valor absoluto) em relação à quantificação da dor antes da aplicação dos produtos em todos os tempos (10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos), não considerando os dados do voluntário *drop-out* (n = 570).

Tempo	Redução da dor com placebo (média em cm)	Redução da dor com placebo (%)	Redução da dor com nanoanestésico (média em cm)	Redução da dor com nanoanestésico (%)	P valor (teste t)
10 a 35	0,54	0,16	1,268	0,36	$P \leq 0,001$

TABELA 34. Teste t não pareado comparando a redução (valor absoluto) em relação à quantificação da dor antes da aplicação dos produtos em cada tempo, não considerando os dados do voluntário drop-out.

Tempo de aplicação	Redução da dor com placebo (média %)	Redução da dor com nanoanestésico (média %)	P valor (teste t)*
10 min	0,20	0,47	P = 0,033
15 min	0,21	0,76	P ≤ 0,001
20 min	0,14	0,34	P = 0,080
25 min	0,22	0,58	P = 0,019
30 min	0,13	0,65	P = 0,001
35 min	0,23	0,65	P = 0,017

Os resultados também foram avaliados através da análise não-paramétrica, aplicando-se o teste de McNemar. O critério adotado como suficiente foi uma redução superior a 30% da dor inicial (pré-aplicação dos produtos) relatada pelo paciente e não suficiente como uma redução da dor igual ou inferior a 30% da dor inicial. Considerando todos os tempos, encontrou-se um valor $p \leq 0.0001$, altamente significativo (TAB. 35). Quando os tempos foram analisados separadamente para os tempos de 10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos, os valores de p identificados foram 0,0171; 0,0011; 0,1360; 0,0015; 0,0009; e 0,0311; respectivamente (TAB. 36, TAB. 37, TAB. 38, TAB. 39, TAB. 40, TAB. 41). O tempo que apresentou o melhor efeito anestésico foi o de 15 minutos, com uma redução média de 76% ($p \leq 0,001$ – teste t; $p = 0,0011$ – teste de McNemar).

TABELA 35. Teste de McNemar aplicado para todos os tempos (10, 15, 20 25, 30 e 35 minutos).

		Placebo		Total
		Suficiente	Não suficiente	
Nanoanestésico	Suficiente	149	171	320
	Não suficiente	68	182	250
	Total	217	353	570

P<0,0001

TABELA 36. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 10 minutos.

		Placebo		Total
		Suficiente	Não suficiente	
Nanoanestésico	Suficiente	21	31	52
	Não suficiente	14	29	43
	Total	35	60	95

P=0,0171

TABELA 37. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 15 minutos.

		Placebo		Total
		Suficiente	Não suficiente	
Nanoanestésico	Suficiente	31	27	58
	Não suficiente	7	30	37
	Total	38	57	95

P=0,0011

TABELA 38. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 20 minutos.

		Placebo		Total
		Suficiente	Não suficiente	
Nanoanestésico	Suficiente	18	28	46
	Não suficiente	17	32	49
	Total	35	60	95

P=0,1360

TABELA 39. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 25 minutos.

		Placebo		Total
		Suficiente	Não suficiente	
Nanoanestésico	Suficiente	22	33	55
	Não suficiente	11	29	40
	Total	33	62	95

P=0,0015

TABELA 40. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 30 minutos.

		Placebo		Total
		Suficiente	Não suficiente	
Nanoanestésico	Suficiente	26	31	57
	Não suficiente	9	29	38
	Total	35	60	95

P=0,0009

TABELA 41. Teste de McNemar aplicado aos tempos de 35 minutos.

		Placebo		Total
		Suficiente	Não suficiente	
Nanoanestésico	Suficiente	31	22	53
	Não suficiente	9	33	42
	Total	40	55	95

P=0,0311

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho forneceu informações importantes referentes à caracterização e avaliação clínica de uma formulação nanoanestésica, composta por nanocápsulas de lidocaína e prilocaína e os respectivos sais cloridratos dispersos no hidrogel. Foi avaliada a morfologia das nanocápsulas que compõem o hidrogel, e verificaram-se tamanhos e estruturas condizentes com o esperado a partir dos dados de caracterização físico-química pré-existentes, tanto para a suspensão de nanocápsulas quanto para o produto final, o nanoanestésico (hidrogel).

Também foi realizado o desenvolvimento clínico do nanoanestésico, com o objetivo de fornecer informações acerca do seu desempenho terapêutico. Verificou-se que o nanoanestésico possui eficácia não inferior ao EMLA® (AztraZeneca) quando comparado após 1 (uma) hora de permanência sobre a pele. De forma controlada por placebo, noventa e seis voluntários foram submetidos a um estímulo doloroso em tempos inferiores a 1 hora e verificou-se que o nanoanestésico apresenta eficácia significativa a partir de 10 minutos da aplicação, desta forma, podendo otimizar a realização dos procedimentos de venopunção. Além disso, estudos do perfil farmacocinético do nanoanestésico indicam que o produto é seguro, atingindo concentrações plasmáticas de $6,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ de lidocaína e $1,7 \text{ ng.mL}^{-1}$ de prilocaína, ou seja, abaixo das estabelecidas na literatura como tóxicas.

Os resultados apresentados neste trabalho são referentes a etapas avançadas do desenvolvimento de novas formulações nanotecnológicas e fornecem perspectivas para o delineamento de novos estudos clínicos que abranjam novas indicações de uso do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Araújo, D. R. *et al.* Strategies for delivering local anesthetics to the skin: focus on liposomes, solid lipid nanoparticles, hydrogels and patches. *Expert Opin. Drug Delivery*, v. 10, p. 1-13, 2013.
2. Gartner LP, HIATT JL. Tegumento. In: Tratado de histologia em cores. 3ª edição. São Paulo: Elsevier; p333-350, 2007.
3. Montanari, T. Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 2. ed. Porto Alegre. 2013, p 147- 152. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodehisto>
4. Nino, M. *et al.* Topical delivery of active principles: the field of dermatological research. *Dermatology Online Journal*, v. 16, p. [1-7], 2010
5. Dhote, V. *et al.* Iontophoresis: a potential emergence of a transdermal drug delivery system. *Sci. Pharm.*, v. 80, p. 1-28, 2012.
6. Fialho, S. L.; Cunha Júnior, A. S. Iontoforese no transporte ocular de drogas. *Arq. Bras. Oftamol.*, v.67, p. 839-845, 2004.
7. Shipton, E. A. New delivery systems for local anaesthetics: part 2. *Anesthesiology Research and Practice*, v. 2012, p. 1-6, 2012.
8. Saliba, S. A., *et al.* Effect of duration and amplitude of direct current when lidocaine is delivered by iontophoresis. *Pharmaceutics*, v. 3, p. 923-931, 2011.
9. Zempsky, W. T. Pharmacology approaches for reducing venous access pain in children. *Pediatrics*, v. 122, p. S140-S153, 2008.
10. Draper, D. O. *et al.* Absorption of iontophoresis-driven 2% lidocaine with epinephrine in the tissues at 5 mm below the surface of the skin. *Journal of Athletic Training*, v. 46, p. 277-281, 2011.

11. Jorge, L. L. *et al.* Topical preparations for pain relief: efficacy and patient adherence. *Journal of Pain Research*, v. 4, p. 11-24, 2011.
12. Prausnitz, M. R.; Langer, R. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.*, v. 26, p. 1261-1268, 2008.
13. Kallurri, H.; Banga, A. K. Transdermal delivery of proteins. *AAPS PharmSciTech*, v. 12, p. 431-441, 2011.
14. Murthy, A. N.; Zhang, S. Electroporation and transcutaneous sampling (ETS) of acyclovir. *J. Dermatol. Sci.*, v. 49, p. 249-251, 2008.
15. Mori, K. *et al.* Design and feasibility assessment of topically applied drug formulations for electroporation. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 51, p. 617-619, 2003.
16. SARDESAI, N.; WEINER, D. B. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 23, p. 421-429, 2011.
17. NIESSEN, C. *et al.* Irreversible electroporation of a hepatocellular carcinoma lesion adjacent to a tranjugular intrahepatic portosystemic shunt stent graft. *Korean J. Radiol.*, v. 14, p. 797-800, 2013.
18. DONATI, M.; BASILE, F. New trends in the multidisciplinary treatment of liver tumors. *Future Oncol.*, v. 8, p. 1093-1096, 2013.
19. ARENA, C. B. *et al.* A three-dimensional *in vitro* tumor platform for modeling therapeutic irreversible electroporation. *Biophysical Journal*, v. 103, p. 2033-2042, 2012.
20. CHA, E.; DAUD, A. Plasmid IL-12 electroporation in melanoma. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 8, p. 1734-1738, 2012.
21. KAMBE, M. *et al.* Enhancing the effect of cancer drugs against the colorectal cancer cell line with electroporation. *Tohoku J. Exp. Med.*, v. 180, p. 161-171, 1990.
22. WALLACE, M. S. *et al.* Topical delivery of lidocaine in healthy volunteers by electroporation, electroincorporation, or iontophoresis: an evaluation of skin anesthesia. *Reg. Anesth. Pain Med.*, v. 26, p. 229-238, 2001.

23. DENET, A. R. *et al.* Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 659-674, 2004.
24. KALLURRI, H.; BANGA, A. K. Transdermal delivery of proteins. *AAPS PharmSciTech*, v. 12, p. 431-441, 2011
25. WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 603-618, 2004.
26. SOM, I. *et al.* Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. *J. Pharm. Bioallied Sci.*, v.4, p. 2-9, 2012.
27. Simons, E. J. *et al.* Effect of chemical permeation enhancers on nerve blockade. *Mol. Pharm.*, v. 6, p. 265-273, 2009.
28. Chantasart, D.; LI, S. K. Structure enhancement relationship of chemical penetration enhancers in drug transport across the stratum corneum. *Pharmaceutics*, v. 4, p. 71-92, 2012.
29. Golla, S. *et al.* Virtual design of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Chem. Biol. Drug Des.*, v. 79, p. 478-487, 2012.
30. Simon, L.; ABDELMALEK, B. Design of skin penetration enhancers using replacement methods for the selection of the molecular descriptors. *Pharmaceutics*, v.4, p. 343-353, 2012.
31. Poletto, FS; Pohlmann AR; Guterres SS. Uma pequena grande revolução. *Ciência Hoje*. v. 43, p. 26-31, 2008.
32. Eichenfield, L. F. *et al.* A clinical study to evaluate the efficacy of ELA-Max (4% liposomal lidocaine) as compared with eutetic mixture of local anesthetics cream for pain reduction of venipuncture in children. *Pediatrics*, v. 109, p. 1093-1099, 2002.
33. Grant, G. J. *et al.* A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiology*, v. 101, p. 133-137, 2004.
34. Legrand, P. *et al.* Polymeric nanocapsules as drug delivery system: a review. *S. T.P. Pharma Sciences*, v. 9, p. 411-418, 1999.

35. Orive G, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(9):682-92.
36. Gupta, S. *et al.* Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. *Indian Dermatology Online Journal*, v. 4, p. p. 267-272, 2013.
37. De Melo, N. F. *et al.* Poly(Lactide-co-Glycolide) Nanocapsules Containing Benzocaine: Influence of the Composition of the Oily Nucleus on Physico-Chemical Properties and Anesthetic Activity. *Pharm Res*, v. 28, p.1984–1994, 2011.
38. Gordh , T; Gordh TE; Lindqvist K. Lidocaine: The Origin of a Modern Local Anesthetic. *Anesthesiology* 2010; 113:1433–7.
39. M.J. O'Neil. The merck Index. An encyclopedia of chemicals, dug, and biologicals. Fifteenth edition. In: RSC Publishing. Cambridge, 2013.
40. Strichartz, Gary R. 1981 Current Concepts of the Mechanism of Action of Local Anesthetics. *Journal of Dental Research*, v. 60, p. 1460-1467, 1981.
41. Ragsdale, DS. Mcphee JC. Scheuer, T. Catterall, WA. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 1996; vol. 93, pp. 9270-9275
42. Golan, D. E. *Princípios de Farmacologia - a Base Fisiopatológica da Farmacoterapia.* Capítulo 10. 2ª Guanabara Koogan, 2009. p131-145.
43. Evers H, von Dardel O, Juhlin L, Ohlsén L, Vinnars E. Dermal effects of compositions based on the eutectic mixture of lignocaine and prilocaine (EMLA). Studies in volunteers. *Br J Anaesth.* 1985 Oct;57(10):997-1005.

44. Evers, H. et al. Absorption of lidocaine and prilocaine after application of a eutectic mixture of local anesthetics (EMLA) on normal and diseased skin. *Acta Derm Venereol.* v.69, p.18-22, 1989.
45. Shipton, E. A. New formulations of local anaesthetics: part II. *Anesthesiol. Res. Pract.*, v. 2012, p. 1-11, 2012.
46. Cascorbi, H. F. Biotransformation of drugs used in anesthesia. *Anesthesiology*, v. 39, p. 115-125, 1973.
47. Catterall, W. Mackie, K. Anestésicos locais. In: BRUNTON, L.L. et al. (ed.). *Goodman & Gilman's: as bases farmacológicas da terapêutica*. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 331-346.
48. Adjepon-Yamoah, K. K.; Prescott, L. F. Lignocaine metabolism in man. *Br. J. Pharmacol.*, v.47, p. 672P-673P, 1973.
49. Paiva, LCA Calvalcanti, AL. Local anesthetics in dentistry: a literature review. *UEPG Biol. Health Sci.*, Ponta Grossa. 2005; 11 (2): 35-42.
50. <http://www.astrazeneca.com.br/2011/Historico.asp>, acessado em 4 abril de 2014.
51. Yagiela, JA. Local Local Anesthetics. *Anesth Prog.* 1991; 38:128-141.
52. Duan JD, Jeffrey AM, Williams GM. Assessment of the Medicines Lidocaine, Prilocaine, and Their Metabolites, 2,6-Dimethylaniline and 2-Methylaniline, for DNA Adduct Formation in Rat Tissues. *Drug metabolism and disposition*. 2008; 36:1470–1475.
53. Malamed S. What's new in local anaesthesia? *SAAD Digest*. 2009; (25) 4-14.
54. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacologia*. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. 784p.
55. Calixto JB, Siqueira Jr. JM. The Drug Development in Brazil: Challenges. *Gazeta Médica da Bahia*. 2008;78 (Suplemento 1):98-106.

56. Tamimi NAM, Ellis P. Drug Development: From Concept to Marketing! Nephron Clin Pract 2009;113:c125–c131
57. Mahipal A, Nguyen D. Risks and benefits of phase 1 clinical trial participation. Cancer Control. 2014, vol. 21, n 3, 193-199.
58. Prokop A, Davidson JM, Nanovehicular Intravellular Delivery Systems. J Pharm Sci. 2008 September. 2013; 97(9): 3518–3590.
59. Wilczewska A, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. Pharmacological Reports. 2012; 64, 1020.1037.
60. Rawat M, Singh D, Saraf S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. Biol. Pharm. Bull. 2006; 29(9) 1790—1798.
61. Duncan R, Gaspar R Nanomedicine(s) under the Microscope. Mol Pharm. 2011; 8(6):2101-41.
62. Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. 2007; J Biomater Sci Polym 18(3): 241–268.
63. Soppimath, KS; Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. Journal of Controlled Release 70 (2001) 1–20.
64. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Pedro Binsfeld. *Diagnóstico institucional de nanotecnologia*. Brasília. 25 mar. 2014. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/fb117d80436c3cacb1b5b72a042b41f5/Diagn%C3%B3stico+Institucional+de+Nanotecnologia+-+CIN+2014+-+Dicol.pdf?MOD=AJPERES>>.
Acesso em: 4 jun. 2014.
65. Bei D, Meng J, Youan BC. Engineering Nanomedicines for Improved Melanoma Therapy: Progress and Promises. Nanomedicine. 2010; 5(9):1385-1399.
66. Singh, S. Nanomedicine-nanoscale drugs and delivery systems. Nanoscience and nanotechnology. 2010; vol. 10, 7906-7918.

67. Kothamasu P, Kanumur H, Ravur N, Maddu C, Parasuramrajam R. Nanocapsules: The Weapons for Novel Drug Delivery Systems. *BiolImpacts*. 2012, 2(2), 71-81.
68. Legrand P, Barratt G, Mosqueira V, Fessj H, Devissaguet JP Polymeric nanocapsules as drug delivery systems - A review. *S.T.P. Pharma Sciences*. 1999, 9 (5) 411-418.
69. Melo NF, et al. Development of hydrophilic nanocarriers for the charged form of the local anesthetic articaine. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Jun 2;121C:66-73.
70. Nitta SK, Numata K. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci*. 2013, 14, 1629-1654.
71. Gou, M. *et al.* Transdermal anaesthesia with lidocaine nano-formulation pretreated with low-frequency ultrasound in rats model. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v. 9, p.6360-6365, 2009.
72. Bucalo, B. D. *et al.* Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine, and EMLA using 30-minute application time. *Dermatol. Surg.*, v.24, p. 537-541, 1998.
73. Friedman, P. M. *et al.* Comparative study of the efficacy of four topical anesthetics. *Dermatol. Surg.*, v. 25, p. 950-954, 1999.
74. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-P; Ammouy, N.; Benita, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, p. r1-r4, 1989.
75. Harris J B, Horner, R W. Negative Staining: A Brief Assessment of Current Technical Benefits, Limitations and Future Possibilities. *Micron*, Vol. 25, No. 1, pp. 5-13, 1994.
76. Angelov, B. Protein-Containing PEGylated Cubosomic Particles: Freeze-Fracture Electron Microscopy and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Study. *J. Phys. Chem. B* 2012, 116, 7676–7686.
77. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*. 2003; Vol. 26, No. 5, 726-737.

78. Heuser, JE. The origins and evolution of freeze-etch electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 60(Supplement 1). 2011; S3–S29.
79. Takahaschi M, Inafuku K, Miyagi T, Oku H, Wada K, Imura T, et al. Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. *J Oleo Sct.* 2007; 56, (1) 35-42.
80. Isa, L. Lucas F., Wepf R. Reimhult, E. Measuring single-nanoparticle wetting properties by freeze-fracture shadow-casting cryo-scanning electron microscopy. *Nature.* 2011; 2:438.
81. Juhlin L, Hägglund G, Evers H. Absorption of lidocaine and prilocaine after application of a eutectic mixture of local anesthetics (EMLA) on normal and diseased skin. *Acta Derm Venereol.* 1989;69(1):18-22.
82. Stow, P. *et al.* EMLA cream in the treatment of post-herpetic neuralgia: efficacy and pharmacokinetic profile. *Pain*, v. 39, p. 301-305, 1989.
83. Becker, D. E. Adverse drug interactions. *Anesth. Prog.*, v.58, p. 31-41, 2011.
84. Mehra, P. *et al.* Lidocaine toxicity. *Anesth. Prog.*, v.45, p. 38-41, 1998.
85. Gahalaut P, Mishra N, Chauhan S, Rastogi MK. Comparison of Topical Anesthetics for Radiofrequency Ablation of Achrocordons: Eutectic Mixture of Lignocaine/Prilocaine versus Lidocaine/Tetracaine. *ISRN Dermatology.* 2014.
86. Darshan D D, Vijay Kumar C N, Manoj Kumar A D, Manikantan N S, Balakrishnan D, Uthkal M P Clinical study to know the efficacy of Amlexanox 5% with other topical antiseptic, analgesic and anesthetic agents in treating minor RAS. *Journal of International Oral Health.* 2014; 6(1):5-11.
87. Çelik G, Özbek O, Yılmaz M, Duma I, Özbek S, Apiliogullari S. Vapocoolant Spray vs Lidocaine/Prilocaine Cream for Reducing the Pain of Venipuncture in Hemodialysis Patients: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Study. *Int J Med Sci.* 2011; 8(7):623-627.

88. Sawyer J, Febbraro, S. Masud S, Ashburn MA, Campbell JC. Heated lidocaine/tetracaine patch (Synera™, Rapydan™) compared with lidocaine/prilocaine cream (EMLA™) for topical anaesthesia before vascular access. *British Journal of Anaesthesia*. 2009; 102 (2): 210–15.

ANEXOS

ANEXO I

PROJETO DE PESQUISA

Título: GDN 031/12 - Estudo clínico de avaliação do perfil farmacocinético de uma formulação de lidocaína, 2.5% + prilocaína, 2.5% (nanoanestésico em gel para uso tópico; Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.) em voluntários sadios de ambos os sexos.

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06556712.8.0000.5404

Pesquisador: GILBERTO DE NUCCI

Instituição: Galeno Desenvolvimento de Pesquisas Ltda

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 83953

Data da Relatoria: 28/08/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo clínico em fase 4, monocêntrico, aberto, 1 período, 1 sequência, dose única por via tópica, cujos objetivos estão descritos no quadro abaixo (CID10: Z00.6 + Z52.0 doador sangue).

O gel contendo lidocaína e prilocaína é uma mistura eutética na proporção de 1:1. Esta preparação proporciona anestesia da pele. Embora a aplicação seja conhecida, há poucos trabalhos publicados no que se refere à absorção dos compostos (lidocaína e prilocaína) relacionados à aplicação tópica. Esta informação é importante para a avaliação de segurança deste produto.

Para tanto, serão avaliadas os dados de concentração plasmática dos medicamentos em estudo, em amostras de sangue (7ml cada), coletadas em vários momentos: na pré-aplicação; a cada 10 minutos após a aplicação, até 3 hs; posteriormente a cada 1 hora, até 10 hs horas após aplicação; posteriormente após 12, 15 e 24 horas após a aplicação do produto.

As concentrações serão medidas por método analítico já validado, LC-MS/MS.

Critérios de Inclusão: 8 sujeitos que atendam aos seguintes critérios:

Inclusão:

1. Sexo masculino ou feminino com idade igual ou superior a 18 anos; 2. Voluntário tem seu índice de massa corpórea maior ou igual a 19 e menor ou igual a 30; 3. Boas condições de saúde ou sem doenças significativas, a juízo médico, de acordo com as regras definidas no protocolo, e avaliações a que foi submetido: história clínica, medidas de pressão e pulso, exame físico e psicológico, ECG, e exames laboratoriais complementares; 4. Capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo, inclusive os riscos e efeitos adversos e com intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critério de Exclusão:

1. O sujeito de pesquisa tem sabidamente uma hipersensibilidade aos fármacos estudados (lidocaína e prilocaína) ou a compostos quimicamente relacionados; história de reações adversas sérias ou hipersensibilidade a qualquer fármaco; 2. História ou presença de doenças ou outra condição que possa interferir com a absorção tópica, distribuição, excreção ou metabolismo dos fármacos em estudo; 3. Uso tópico ou sistêmico de esteroides, exceto anticoncepcionais, ou terapia de manutenção com qualquer fármaco, especialmente, aqueles que possam induzir a metahemoglobinemia; 4. Tem história de doença hepática, renal, pulmonar, gastrointestinal, epilética, hematológica ou psiquiátrica; ou hipo ou hipertensão ou qualquer outra comorbidade que requeira tratamento imediato prioritário ou que, a juízo do pesquisador principal, possa interferir na participação do estudo e/ou exponha o sujeito de pesquisa a risco adicional do que normalmente previsto; 5. Tem história ou teve infarto do miocárdio,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

angina e/ou insuficiência cardíaca e/ou achados eletrocardiográficos não recomendados a critério do pesquisador para participação no estudo; 6. Os resultados dos exames laboratoriais do recrutamento apresentam desvios considerados clinicamente relevantes que em função de possíveis riscos impedem a participação no estudo, a juízo do pesquisador. 7 Voluntário é fumante; 8 Tem história de abuso de álcool ou drogas ou consumo expressivo de álcool (> 35g/dia); 9. Fez uso de medicação dentro de 7 dias antes do início do tratamento que, com base na classe terapêutica, na meia-vida do fármaco e/ou metabólitos ativos, possa ser assumida interferência com o estudo; 10. Tratamento dentro dos 3 meses prévios ao estudo com qualquer fármaco conhecido de ter um potencial tóxico bem definido nos grandes órgãos; 11. O sujeito de pesquisa participou de qualquer estudo experimental ou ingeriu qualquer fármaco experimental dentro dos seis meses que antecedem o início deste estudo; 12. O sujeito de pesquisa doou ou perdeu 450 mL ou mais de sangue durante os três meses que antecederam ao estudo ou efetuou 3 doações (mulheres) / 4 doações (homens) dentro dos 12 meses que precederam o estudo; 13. O sujeito de pesquisa tem qualquer condição que o impede de participar do estudo, segundo julgamento do investigador. 14. Teste positivo de gravidez, parto ou aborto nas 12 semanas anteriores a data prevista para o início do tratamento.

Análise dos dados:

Os parâmetros farmacocinéticos serão obtidos das curvas de concentração plasmática do fármaco versus tempo. A análise farmacocinética será realizada com o apoio dos seguintes software: Microsoft Excel, WinNonLin Professional Edition. As análises estatísticas resumir-se-ão à estatística descritiva dos parâmetros farmacocinéticos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliação do perfil farmacocinético dos princípios ativos da lidocaína (50 mg) e prilocaína (50 mg), após a aplicação tópica de na pele do antebraço.

Objetivo Secundário:

Avaliação de segurança e tolerabilidade das drogas mencionadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos de:

- 1-Reações locais passageiras no local da aplicação, como palidez, eritema (vermelhidão) e edema.
- 2- Reações imprevisíveis, como em qualquer outro medicamento.
- 3- A retirada de sangue é um procedimento seguro e pode causar um leve desconforto, além de uma mancha roxa no local da picada que frequentemente desaparece sem maiores problemas.

Benefícios:

A participação no estudo não tem o objetivo de submeter o voluntário a um tratamento terapêutico. Conseqüentemente, não se espera que a sua participação no estudo traga qualquer benefício em função do tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante sobre segurança e tolerabilidade de medicamento de uso tópico.

Todos os itens adequados ao estudo proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: pesquisador principal assinou também como responsável pela instituição (Galeno Des. Pesq. Ltda). Pela patrocinadora Biolab, há a assinatura de uma pesquisadora especialista, não acompanhada de carimbo ou esclarecimento de sua função neste laboratório.

TCLE: Adequado em todos os seus itens.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a declarar

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPINAS, 28 de Agosto de 2012

Assinado por:
Carlos Eduardo Steiner

ANEXO II

CEP. 22/05/12.
(PARECER CEP: Nº 1317/2011)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE COMPARATIVA E DE AVALIAÇÃO EFICÁCIA DE UMA FORMULAÇÃO TESTE (NANOANESTÉSICO (2.5% LIDOCAÍNA + 2.5% PRILOCAÍNA) GEL; BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA LTDA.) VERSUS UMA FORMULAÇÃO DE REFERÊNCIA (EMLA (2.5% LIDOCAÍNA + 2.5% PRILOCAÍNA) CREME; ASTRAZENECA) EM VOLUNTÁRIOS SADIOS DE AMBOS OS SEXOS” (GDN035/11).

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gilberto de Nucci

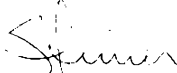
II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova a modificação do procedimento de coleta de exames laboratoriais pós-estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Complementar (versão final emenda 02 de 24/04/12), referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de maio de 2012.



Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO III

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: GDN 022/13 - Estudo clínico de avaliação de eficácia de uma formulação de lidocaína, 2.5% + prilocaína, 2.5% (nanoanestésico em gel para uso tópico; Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.) em voluntários sadios de ambos os sexos.

Pesquisador: GILBERTO DE NUCCI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06579812.0.0000.5404

Instituição Proponente: Galeno Desenvolvimento de Pesquisas Ltda

Patrocinador Principal: BIOLAB SANUS FARMACEUTICA LTDA.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 258.635

Data da Relatoria: 23/04/2013

Apresentação do Projeto:

Apresentação de emenda ao protocolo original, solicitando extensão de protocolo do Projeto de Pesquisa 06579812.0.0000.5404, ¿GDN 032/12 - Estudo clínico de avaliação de eficácia de uma formulação de lidocaína, 2.5% + prilocaína, 2.5%(nanoanestésico em gel para uso tópico; Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.) em voluntários sadios de ambos os sexos¿, originalmente aprovado por este CEP- Parecer Nº 87.200, emitido em 31/08/2012.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliação do perfil farmacodinâmico (eficácia) após aplicação tópica por diferentes períodos de tempo, da formulação teste.

Objetivo Secundário:

Avaliação de segurança e tolerabilidade da formulação sob estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mencionados no projeto e no parecer do projeto original.

Não alterados na presente emenda.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisadores enviaram : relatório clínico e relatório final do estudo, acusando término do estudo em 01.12.2012.

Entretanto, no momento solicitam extensão de projeto para garantir poder adequado para análise estatística. Neste sentido foram modificados no projeto original: o número de voluntários (originalmente 28, ampliado para 90), além dos tempos para avaliação do efeito anestésico (modificado para 10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados para esta emenda:vcarta explicativa da emenda com a respectiva justificativa, TCLE e projeto de pesquisa, brochura do investigados e folha de rosto atualizados. Todos adequados.

Os autores enfatizam que a extensão passa a ser referenciada pelo código interno GDN 022/13, de modo a diferenciá-la dos demais documentos.

Recomendações:

em,bora ospesquisadores tenham apresentado os relatórios comentados acima, sinalizando finalização do estudo, os pesquisadores consideraram prudente ampliar o número de sujeitos e investigar algumas condições específicas do estudo, segundo justificativa já relatada. Justificativa pertinente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



CAMPINAS, 29 de Abril de 2013

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

APÊNDICES

APÊNDICE I

Grau de dor observado antes e após a aplicação das formulações no 1º período (10 e 15 minutos) e redução percentual da dor em relação ao valor inicial.

	PLACEBO					NANOANESTÉSICO				
Voluntário	ANTES	10 Min*	%**	15 Min*	%**	ANTES	10 Min*	%**	15 Min*	%**
1	3,7	1,9	0,49	2,3	0,38	2,2	2,8	-0,27	2,7	-0,23
2	2,3	4,9	-1,13	3,6	-0,57	3,7	0,8	0,78	1,2	0,68
3	2	3,4	-0,70	1,8	0,10	2,2	0,5	0,77	0,4	0,82
4	7,8	0,2	0,97	0,3	0,96	7,7	0,7	0,91	0,6	0,92
5	4,4	7,6	-0,73	7,3	-0,66	4,3	3	0,30	2,7	0,37
6	5,8	6,3	-0,09	6,3	-0,09	6	3,5	0,42	1,3	0,78
7	1,7	1,6	0,06	2,5	-0,47	1,6	1	0,38	0,6	0,63
8	9,5	8,8	0,07	7,3	0,23	7,7	6,7	0,13	7,1	0,08
9	2	1,7	0,15	0,9	0,55	2,9	1,2	0,59	1,2	0,59
10	2,5	0,6	0,76	0,3	0,88	7,2	3	0,58	2,5	0,65
11	2,3	2,1	0,09	3,1	-0,35	2,6	2,1	0,19	2,9	-0,12
12	1,9	1,4	0,26	1,1	0,42	3,7	3,4	0,08	1,2	0,68
13	1,2	1,8	-0,50	3,6	-2,00	2	4,4	-1,20	1,7	0,15
14	1	0,1	0,90	0,1	0,90	0,9	1,7	-0,89	1,1	-0,22
15	2	0,9	0,55	0,9	0,55	2,8	1,5	0,46	0,9	0,68
16	2	3,8	-0,90	3,4	-0,70	1,6	1,8	-0,13	1,7	-0,06
17	6,4	1,6	0,75	1,8	0,72	4,6	2,5	0,46	2,3	0,50
18	5,7	1,6	0,72	1,6	0,72	5,6	3	0,46	0,7	0,88
19	2,1	1,1	0,48	1,4	0,33	1,2	0,4	0,67	0,3	0,75
20	2	0,7	0,65	1	0,50	3,2	0,2	0,94	0,4	0,88
21	0,3	2,8	-8,33	2,6	-7,67	2	0,3	0,85	0,2	0,90
22	7,1	8,2	-0,15	5,4	0,24	3,7	8	-1,16	7	-0,89
23	1,5	0,7	0,53	1,6	-0,07	2,3	1,1	0,52	1	0,57
24	2,2	0,6	0,73	0,4	0,82	2,1	0,8	0,62	0,5	0,76
25	5,5	0,4	0,93	2,7	0,51	2,2	3,4	-0,55	0,8	0,64
26	1,7	1,9	-0,12	2,7	-0,59	3,9	3,5	0,10	1,4	0,64
27	1,2	0,8	0,33	0,9	0,25	2,1	1	0,52	0,9	0,57
28	6,7	5,5	0,18	5,9	0,12	5,4	5,1	0,06	3,9	0,28
29	3	2,7	0,10	1,6	0,47	3	2,2	0,27	1	0,67
30	2,7	2	0,26	1,3	0,52	4,3	1	0,77	0,4	0,91
31	6,9	5,2	0,25	2,2	0,68	4,4	2,6	0,41	1,5	0,66
32	3,5	3,2	0,09	1,8	0,49	3	0,9	0,70	0,5	0,83
33	0,1	0,7	-6,00	1	-9,00	0,1	1,6	-15,00	1,9	-18,00

34	1,2	2,4	-1,00	3,2	-1,67	1,7	1,4	0,18	2,7	-0,59
35	4,2	2,5	0,40	1	0,76	3,2	2,2	0,31	1,8	0,44
36	4,4	3,9	0,11	7,4	-0,68	6,2	6,1	0,02	6,3	-0,02
37	4,1	7,5	-0,83	2,5	0,39	1,7	0,4	0,76	2,5	-0,47
38	3,8	1,4	0,63	0,6	0,84	5,1	2,3	0,55	1,2	0,76
39	6,3	2,2	0,65	3,4	0,46	8,1	6,9	0,15	7,2	0,11
40	6,6	2,9	0,56	5,9	0,11	2,8	5,8	-1,07	2,2	0,21
41	6,5	6,3	0,03	5,5	0,15	4,7	3,5	0,26	2,4	0,49
42	0,5	2	-3,00	2,2	-3,40	1,3	0,7	0,46	0,5	0,62
43	8,6	3,6	0,58	3,6	0,58	8,6	4,5	0,48	4,2	0,51
44	3,1	3	0,03	2,2	0,29	3,3	1,2	0,64	3,7	-0,12
45	0,4	0,1	0,75	0,1	0,75	5,4	0,1	0,98	2,2	0,59
46	6,4	1,1	0,83	0,7	0,89	7	3,3	0,53	3,5	0,50
47	3,7	5,5	-0,49	6,8	-0,84	5,8	3,4	0,41	4,3	0,26
48	4,3	2,6	0,40	3,7	0,14	4	3,6	0,10	1	0,75
49	5	4,6	0,08	4,6	0,08	5,1	4,9	0,04	5	0,02
50	0,8	0,6	0,25	0,7	0,13	2,2	0,7	0,68	0,7	0,68
51	9	3,6	0,60	2,2	0,76	9	2,5	0,72	3,2	0,64
52	4,2	4,8	-0,14	4	0,05	4,6	3,7	0,20	3,5	0,24
53	4,7	2	0,57	2	0,57	4,4	2,2	0,50	1,9	0,57
54	3,4	4,6	-0,35	4	-0,18	5,4	2,9	0,46	4,6	0,15
55	4,8	3,4	0,29	4,7	0,02	0,7	0,9	-0,29	1,1	-0,57
56	0,5	0,5	0,00	0,6	-0,20	1	0,3	0,70	0,3	0,70
57	1,6	1,6	0,00	1,1	0,31	1,6	0,6	0,63	0,4	0,75
58	0,2	0,3	-0,50	0,4	-1,00	0,2	0,3	-0,50	0,3	-0,50
59	4,4	2,5	0,43	1,6	0,64	4,4	3,2	0,27	1,8	0,59
60	7,7	3,3	0,57	2,6	0,66	7,8	6,6	0,15	6,9	0,12
61	7,3	7,2	0,01	7,5	-0,03	6,1	6,5	-0,07	6,3	-0,03
62	0,5	0,6	-0,20	0,6	-0,20	0,3	0,3	0,00	0,3	0,00
63	0,2	1,7	-7,50	1,2	-5,00	0,1	0,2	-1,00	0,3	-2,00
64	1,4	0,7	0,50	1,7	-0,21	2	1,1	0,45	1,6	0,20
65	7,4	3,9	0,47	3,9	0,47	6,9	5,3	0,23	2,6	0,62
66	2	0,8	0,60	0,6	0,70	1,2	1,7	-0,42	2,1	-0,75
67	4,6	3,4	0,26	3,5	0,24	4,2	2,9	0,31	2,6	0,38
68	5,4	2,1	0,61	4,2	0,22	4,3	3,8	0,12	1,3	0,70
69	4,4	6	-0,36	6,8	-0,55	6,1	3,9	0,36	1,8	0,70
70	0,5	0,3	0,40	0,2	0,60	0,4	0,9	-1,25	0,2	0,50
71	7,3	6,8	0,07	7,2	0,01	7,9	6	0,24	5,3	0,33
72	2,9	8	-1,76	7	-1,41	7,2	2,7	0,63	2,3	0,68
73	1,3	1,1	0,15	1,5	-0,15	1,5	1,8	-0,20	1,2	0,20
74	0,6	6,7	-10,17	3,7	-5,17	0,5	2,8	-4,60	1,5	-2,00

75	3,6	4,3	-0,19	4,7	-0,31	3,1	2,5	0,19	2,5	0,19
76	5,1	5,2	-0,02	4,5	0,12	5,2	2,5	0,52	1,7	0,67
77	1,3	1,1	0,15	1	0,23	1,2	0,1	0,92	0,2	0,83
78	2,9	3,5	-0,21	3,7	-0,28	4,5	2,4	0,47	2,1	0,53
79	2,8	1,2	0,57	1,8	0,36	2,5	0,6	0,76	0,5	0,80
80	9,4	3,8	0,60	2,2	0,77	9,5	6,8	0,28	2,8	0,71
81	3,8	1,1	0,71	0,7	0,82	3,8	1,7	0,55	0,1	0,97
82	0,5	0,1	0,80	0,8	-0,60	0,3	0,2	0,33	0	1,00
83	3,5	8,1	-1,31	8,2	-1,34	6,4	5	0,22	2,1	0,67
84	2,3	2,4	-0,04	1,6	0,30	2,2	1,3	0,41	1,2	0,45
85	0,7	1,6	-1,29	0,5	0,29	1,5	0,8	0,47	1,4	0,07
86	6,1	7,5	-0,23	6,2	-0,02	7	6	0,14	6,2	0,11
87	2,8	4,4	-0,57	2,4	0,14	8,2	4,4	0,46	1	0,88
88	2,9	2,7	0,07	6,2	-1,14	3,5	4,6	-0,31	3,7	-0,06
89	0,3	0,5	-0,67	0,2	0,33	0,4	0,3	0,25	0,4	0,00
90	2,6	2,9	-0,12	3,9	-0,50	6,1	2,6	0,57	4	0,34
91	3	3	0,00	2,1	0,30	3,9	1,7	0,56	1,1	0,72
92	6,5	6	0,08	7,5	-0,15	4,6	4,9	-0,07	3,8	0,17
93	7,3	2,2	0,70	5,2	0,29	2,7	7,3	-1,70	2,7	0,00
94	4,5	8,4	-0,87	8,8	-0,96	8,2	5	0,39	6,4	0,22
95	9,2	6,7	x	7,9	x	9,2	2,1	x	7,9	x
96	7,2	6,6	0,08	5,4	0,25	7,7	3,3	0,57	2,8	0,64

* Medida de 0 a 10 (cm), segundo marcação na escala análoga visual

** Redução percentual em relação ao valor inicial

APÊNDICE II

Grau de dor observado antes e após a aplicação das formulações no 2º período (20 e 25 minutos) e redução percentual da dor em relação ao valor inicial.

Voluntário	PLACEBO					NANOANESTÉSICO				
	ANTES	20 Min*	%**	25 Min*	%**	ANTES	20 Min*	%**	25 Min*	%**
1	1,7	3	-0,76	1,8	-0,06	2,6	2,1	1,25	2,7	-0,04
2	2,8	0,5	0,82	0,8	0,71	3,1	5,7	0,67	2,9	0,06
3	2,7	1,6	0,41	2,6	0,04	3,4	2,7	1,30	1,1	0,68
4	5,7	2,8	0,51	1,3	0,77	3,4	2	-0,93	0,8	0,76
5	5,4	5,9	-0,09	4,3	0,20	4,3	1,5	2,08	7,3	-0,70
6	7,5	5,3	0,29	4,4	0,41	7	7,1	15,00	7,5	-0,07
7	2,9	1,7	0,41	0,4	0,86	3,1	1,9	3,89	1,7	0,45
8	8	5,4	0,33	6,5	0,19	7,6	4,4	-11,43	3,6	0,53
9	4,1	1,5	0,63	0,5	0,88	4,3	1	4,74	1	0,77
10	1,7	0,8	0,53	2,7	-0,59	2,4	1	100,00	2,6	-0,08
11	1,6	2,9	-0,81	2,8	-0,75	1,6	2	-27,50	2,15	-0,34
12	1,1	1,9	-0,73	1,4	-0,27	2,3	2,5	120,00	2,5	-0,09
13	2,5	1,7	0,32	3,1	-0,24	3,8	4,1	6,84	5,3	-0,39
14	1,4	1,5	-0,07	0,5	0,64	0,9	0,6	70,00	0,3	0,67
15	1,6	1,3	0,19	1,2	0,25	0,9	0,7	37,50	0,5	0,44
16	1,7	1,6	0,06	2,2	-0,29	2,7	3,2	-32,00	1,4	0,48
17	2,3	1,2	0,48	1,6	0,30	3,8	2,6	6,80	0,8	0,79
18	3,4	1,3	0,62	1,2	0,65	3,5	0,7	16,36	1,4	0,60
19	0,8	0,7	0,13	0,7	0,13	1	0,9	190,00	0,8	0,20
20	1,3	0,2	0,85	0,7	0,46	1,7	0,5	20,00	0,8	0,53
21	0,2	1,7	-7,50	2	-9,00	2	0,6	70,00	0,1	0,95
22	5,5	3,1	0,44	2,8	0,49	8,8	6,4	3,55	8	0,09
23	1,6	2,8	-0,75	2,2	-0,38	2	1	-25,56	1,2	0,40
24	0,8	0,5	0,38	1,2	-0,50	1,4	1,4	0,00	0,6	0,57
25	1,5	1,9	-0,27	1,4	0,07	0,2	0,3	16,67	0,4	-1,00
26	4,7	1,4	0,70	2,3	0,51	2	3	21,67	2,9	-0,45
27	0,3	0,8	-1,67	0,5	-0,67	0,3	0,4	33,75	0,4	-0,33
28	2,9	5	-0,72	5,2	-0,79	2	3,8	-11,20	3	-0,50
29	2,2	2,7	-0,23	1,6	0,27	2,9	1,7	-58,00	0,6	0,79
30	2,6	2,3	0,12	2,1	0,19	3	0,9	50,00	0,6	0,80
31	3,3	3,5	-0,06	3,3	0,00	5,8	4,2	-7,56	2,8	0,52
32	2,2	2,2	0,00	2	0,09	1,9	0,3	24,62	0,6	0,68
33	0,9	0,8	0,11	1,1	-0,22	0,3	0,5	-82,50	0,9	-2,00

34	1,1	1,4	-0,27	1,3	-0,18	1,7	1,8	42,50	1,9	-0,12
35	3,3	1,4	0,58	0,6	0,82	2	2	87,50	0,8	0,60
36	4,4	3,7	0,16	4,3	0,02	2,7	4,5	60,00	2,3	0,15
37	2,2	8,3	-2,77	1,3	0,41	2,9	0,5	37,00	0,6	0,79
38	4,1	2,2	0,46	1,3	0,68	3	1,1	15,20	0,3	0,90
39	7,7	7,2	0,06	7,4	0,04	6,8	3,7	-195,00	3,7	0,46
40	5,7	2,8	0,51	2,9	0,49	2,9	5,5	13,79	5,6	-0,93
41	3,7	6,4	-0,73	6,2	-0,68	6	3,6	205,00	2	0,67
42	1,5	0,6	0,60	0,9	0,40	0,5	0,2	-70,00	0,2	0,60
43	5,1	5,3	-0,04	1,3	0,75	4,8	1,9	15,93	1,7	0,65
44	3,4	3,3	0,03	4,8	-0,41	2,5	4,6	36,67	2,9	-0,16
45	3,5	4,7	-0,34	2,1	0,40	4,1	0,2	30,00	0,1	0,98
46	4,8	3,1	0,35	6,2	-0,29	4,7	2,4	13,53	1,7	0,64
47	3	3,2	-0,07	3,1	-0,03	5,2	6,1	36,15	4	0,23
48	5,2	1,4	0,73	1,4	0,73	4,8	4,6	240,00	5,4	-0,13
49	4,7	4,8	-0,02	4,9	-0,04	4,8	4,4	245,00	5	-0,04
50	1	0,3	0,70	0,3	0,70	0,6	0,1	83,33	0,7	-0,17
51	5,5	3,9	0,29	5	0,09	5,5	6,7	102,00	2,9	0,47
52	4,5	3,8	0,16	4,8	-0,07	4	5,2	-0,30	4,5	-0,13
53	3	1,7	0,43	1,6	0,47	2,5	1,8	-530,00	1,3	0,48
54	4	2,9	0,28	3	0,25	2,4	2,7	-54,00	2,3	0,04
55	1	2	-1,00	3,1	-2,10	4,8	1	-42,31	1,7	0,65
56	0,7	0,1	0,86	0,2	0,71	0,7	1	280,00	0,3	0,57
57	1,7	0,7	0,59	0,9	0,47	1,7	0,4	285,00	0,4	0,76
58	0,1	0,3	-2,00	0,3	-2,00	0,2	0,3	580,00	0,1	0,50
59	4,7	3,8	0,19	2	0,57	5,1	0,7	196,67	0,3	0,94
60	7,9	7,4	0,06	7	0,11	7,9	4,2	600,00	2,7	0,66
61	6,2	8,1	-0,31	9	-0,45	9,1	7,3	30,50	7,1	0,22
62	0,4	0,6	-0,50	0,8	-1,00	0,7	0,3	206,67	0,4	0,43
63	0,6	1,1	-0,83	1,6	-1,67	0,9	0,1	315,00	0,3	0,67
64	4,6	2,7	0,41	1,8	0,61	2,6	1,5	160,00	1	0,62
65	8,7	7,2	0,17	6,5	0,25	8,6	2,4	21,67	0,4	0,95
66	0,9	1,7	-0,89	2,1	-1,33	1,2	1	-73,33	1	0,17
67	2,1	2,6	-0,24	2,7	-0,29	3,5	2,6	55,83	2,8	0,20
68	4,7	4,7	0,00	5,4	-0,15	5,5	1	97,14	0,9	0,84
69	4,8	7,9	-0,65	7,3	-0,52	7,1	3,5	-17,25	1,7	0,76
70	1	0,9	0,10	0,7	0,30	0,4	0,3	-140,00	0,3	0,25
71	7,4	6,6	0,11	6,3	0,15	7,3	5,1	118,33	5,3	0,27
72	6,7	6,8	-0,01	7,1	-0,06	1,9	2,1	-102,86	2,4	-0,26
73	1,2	0,6	0,50	0,9	0,25	1,3	1,1	-91,25	1,2	0,08

74	0,7	4,9	-6,00	1,7	-1,43	0,8	1,8	-19,47	0,8	0,00
75	2,6	5	-0,92	4	-0,54	3,2	2,1	-17,86	2,1	0,34
76	5,7	5,3	0,07	5,2	0,09	5,4	2,2	760,00	1,5	0,72
77	1,2	0,2	0,83	0,5	0,58	1,4	0,5	128,33	0,1	0,93
78	1,4	3	-1,14	2,9	-1,07	3,2	2,1	39,00	1,8	0,44
79	2,7	2,4	0,11	1,9	0,30	3,1	0,5	131,67	0,4	0,87
80	9,2	3,8	0,59	3	0,67	9,3	3	12,50	2,2	0,76
81	2,3	1,6	0,30	0,6	0,74	3,5	0,9	23,14	0,1	0,97
82	0,1	0	1,00	0,2	-1,00	0,1	0	820,00	0,5	-4,00
83	8,4	5,5	0,35	4,6	0,45	8,3	7,9	36,09	8,9	-0,07
84	2,6	2	0,23	2,7	-0,04	2,1	1,4	140,00	1,2	0,43
85	1,5	1,4	0,07	1,6	-0,07	0,7	0,5	-85,00	0,7	0,00
86	7,3	8,8	-0,21	1,9	0,74	3,6	6,6	-30,71	7,1	-0,97
87	2,2	2,3	-0,05	6	-1,73	6,6	4,9	-290,00	2,8	0,58
88	8,4	6,2	0,26	6,3	0,25	7,3	4	20,00	1,4	0,81
89	0,2	0,4	-1,00	0,2	0,00	0,5	0,2	-296,67	0,3	0,40
90	2,3	4,5	-0,96	3,4	-0,48	4,1	4,3	47,37	2,4	0,41
91	3,3	2,2	0,33	1,3	0,61	1,7	1,3	-91,00	0,8	0,53
92	2,2	3,7	-0,68	2,6	-0,18	6,5	6,2	-27,88	6,4	0,02
93	6,3	2,9	0,54	3	0,52	2,7	7,9	186,00	7,2	-1,67
94	9,2	4,2	0,54	9	0,02	6,8	8,5	-32,41	2,6	0,62
95	Drop-out									
96	6,7	2,6	0,61	3,4	0,49	7,5	7,2	-24,62	7,2	0,04

* Medida de 0 a 10 (cm), segundo marcação na escala análoga visual

** Redução percentual em relação ao valor inicial

APÊNDICE III

Grau de dor observado antes e após a aplicação das formulações no 3º período (30 e 35 minutos) e redução percentual da dor em relação ao valor inicial.

Grau de dor observado antes e após a aplicação das formulações no 3º período (30 e 35 minutos) e redução percentual da dor em relação ao valor inicial.

Voluntário	PLACEBO					NANOANESTÉSICO				
	ANTES	30 Min*	%**	35 Min*	%**	ANTES	30 Min*	%**	35 Min*	%**
1	3,3	2,5	0,24	2,2	0,33	3,5	3,6	0,05	2,9	0,17
2	4,6	1,6	0,65	0,9	0,80	1,2	1,1	0,31	5,4	-3,50
3	4,2	1,9	0,55	1,6	0,62	4,3	2,5	0,03	1	0,77
4	1,1	5,4	-3,91	1,3	-0,18	7,1	4	0,27	1,8	0,75
5	2,9	0,5	0,83	0,2	0,93	2,9	0,1	-0,41	0,7	0,76
6	8	7,6	0,05	7,9	0,01	7,3	2,3	0,19	1	0,86
7	3	1,2	0,60	2,3	0,23	1	0,7	0,72	2	-1,00
8	7,4	8,1	-0,09	4,9	0,34	5,2	4,4	0,07	4	0,23
9	2,9	1	0,66	0,6	0,79	3,2	1,5	0,34	0,6	0,81
10	0,9	1	-0,11	1,1	-0,22	1,1	1	-0,65	0,6	0,45
11	2,5	2,9	-0,16	1,7	0,32	2,2	2,7	0,58	1,5	0,32
12	1,4	1,5	-0,07	2,6	-0,86	2,7	1,5	0,34	2,1	0,22
13	7,4	5,5	0,26	6,8	0,08	7,3	3,1	-0,30	6,9	0,05
14	0,3	0,1	0,67	0,2	0,33	0,3	0,2	-6,43	0,3	0,00
15	1,1	0,7	0,36	0,7	0,36	1,2	0,4	0,83	0,3	0,75
16	1,9	2,4	-0,26	3	-0,58	0,9	1,4	-2,94	1,1	-0,22
17	2,7	0,2	0,93	0,7	0,74	3,2	0,4	0,28	0,3	0,91
18	2,7	1,6	0,41	0,8	0,70	2,6	1,3	0,31	0,9	0,65
19	0,9	0,8	0,11	0,8	0,11	0,7	0,8	1,25	0,7	0,00
20	1,2	0,2	0,83	0,3	0,75	1,1	0,4	0,42	0,4	0,64
21	3,1	2,8	0,10	3,2	-0,03	0,9	0,3	6,00	0,4	0,56
22	7,7	1,5	0,81	2,5	0,68	7,5	2,9	0,20	7,8	-0,04
23	1,5	2,4	-0,60	2,9	-0,93	2	1,1	0,31	1,5	0,25
24	0,9	0,9	0,00	1	-0,11	0,4	0,5	-1,67	0,5	-0,25
25	1,7	0,2	0,88	0,5	0,71	0,2	0,2	-0,17	0,2	0,00
26	3,2	2	0,38	3,2	0,00	3,5	1,3	0,15	2,7	0,23
27	1	0,2	0,80	0,5	0,50	1,2	0,1	1,33	0,5	0,58
28	2,3	4,8	-1,09	5,1	-1,22	3	2,4	0,38	1,5	0,50
29	1,3	1,8	-0,38	0,6	0,54	1,8	0,8	-0,55	0,4	0,78

30	3,1	2,5	0,19	2,9	0,06	2,5	0,5	0,64	1	0,60
31	2,6	6,7	-1,58	3,1	-0,19	2,3	3,5	0,00	3	-0,30
32	2,3	1	0,57	0,4	0,83	3,3	1	0,70	0,5	0,85
33	0,4	0,8	-1,00	0,8	-1,00	0,2	0,1	-2,22	0,2	0,00
34	1,5	0,7	0,53	0,7	0,53	1,6	0,7	0,61	0,4	0,75
35	1,5	1,1	0,27	0,8	0,47	0,9	0,8	0,43	0,3	0,67
36	4,7	4,1	0,13	2,8	0,40	3,5	2,5	0,03	1,9	0,46
37	3,3	2,3	0,30	1,4	0,58	3,5	0,5	-0,07	0,7	0,80
38	4,4	1,9	0,57	2,7	0,39	2,9	1,2	0,36	1,9	0,34
39	5,2	5,4	-0,04	6,2	-0,19	5,2	5,5	0,08	6	-0,15
40	4,8	1,9	0,60	2,7	0,44	1,9	4,1	0,17	5,1	-1,68
41	6,2	6	0,03	6	0,03	3,5	3,1	0,25	3	0,14
42	0,3	0,9	-2,00	0,9	-2,00	1	0,2	0,44	0,1	0,90
43	4,1	1,4	0,66	0,4	0,90	4,2	3	-3,73	2,6	0,38
44	4,8	3,6	0,25	2,6	0,46	5,1	2,3	-4,12	3,9	0,24
45	4,8	3,3	0,31	1	0,79	3,6	0,7	-0,33	0,1	0,97
46	5,6	2,2	0,61	1,7	0,70	5,5	3,7	-0,17	3	0,45
47	3,2	1,9	0,41	1,7	0,47	6	2,9	0,17	3	0,50
48	4,5	4,3	0,04	3,7	0,18	4,9	1	0,19	1	0,80
49	4,8	4,6	0,04	4,4	0,08	4,5	4	0,43	4,6	-0,02
50	1,2	0,6	0,50	0,8	0,33	1,3	0,7	1,00	0,7	0,46
51	4,2	3,7	0,12	3,3	0,21	5,1	6	0,06	4,9	0,04
52	3,9	3,9	0,00	4,4	-0,13	4,8	4,3	-0,10	4,4	0,08
53	2,4	2,5	-0,04	2	0,17	3,1	2,3	0,36	1,6	0,48
54	2,5	3,5	-0,40	4,5	-0,80	3,2	2,2	0,23	3,1	0,03
55	0,7	2	-1,86	2,4	-2,43	1,6	0,7	2,10	1,5	0,06
56	0,3	0,1	0,67	0,2	0,33	0,3	0,5	1,19	0,3	0,00
57	1,5	1,3	0,13	1	0,33	1,4	0,6	0,47	0,9	0,36
58	0,3	0,2	0,33	0,3	0,00	0,2	0,3	10,00	0,4	-1,00
59	2,3	2	0,13	1,6	0,30	2	0,2	0,64	0	1,00
60	8,1	8	0,01	8	0,01	8,3	2,8	0,23	2,5	0,70
61	8,3	6,3	0,24	6,2	0,25	9,2	9,3	0,24	9,2	0,00
62	0,7	0,4	0,43	0,7	0,00	0,4	0,3	5,00	0,3	0,25
63	0,8	0,6	0,25	0,6	0,25	0,9	0,1	3,33	0,4	0,56
64	2,5	2,1	0,16	2,8	-0,12	2,1	1,1	0,32	0,9	0,57
65	8,3	5,3	0,36	4,7	0,43	6	0,1	0,17	0,1	0,98
66	1,2	2,1	-0,75	1,2	0,00	0,7	0,6	1,67	0,7	0,00
67	3,1	1,9	0,39	2,6	0,16	2,3	1,6	0,57	2,6	-0,13
68	5,4	4,7	0,13	4,5	0,17	4,2	1,4	#DIV/0!	1,3	0,69
69	4	8	-1,00	6	-0,50	7,4	1	0,17	3,1	0,58
70	1	1,5	-0,50	0,9	0,10	0,1	0,4	3,00	1,5	-14,00

71	6,6	6	0,09	6,2	0,06	7	5,3	0,19	5,6	0,20
72	6,6	7,3	-0,11	6,8	-0,03	3,1	3	0,60	3,5	-0,13
73	0,8	1,6	-1,00	0,9	-0,13	1,6	0,6	0,42	1,6	0,00
74	0,6	4,4	-6,33	2,5	-3,17	0,7	1,2	0,34	1	-0,43
75	3	7,2	-1,40	5,1	-0,70	2,3	4,2	0,22	2	0,13
76	5	4,9	0,02	5,4	-0,08	5,6	3	0,22	2,8	0,50
77	0,8	0,2	0,75	0,3	0,63	0,8	0,5	0,58	0,1	0,88
78	3	1	0,67	2,1	0,30	1,5	2,9	0,67	1,6	-0,07
79	1,7	1,1	0,35	1,2	0,29	1,6	0,3	0,99	0,4	0,75
80	9,2	2,8	0,70	2,5	0,73	9,3	3,3	0,12	2,8	0,70
81	3,9	0,4	0,90	0,2	0,95	2	0,7	1,06	0,5	0,75
82	0,3	0,2	0,33	0,1	0,67	0,9	0,2	-10,00	0,1	0,89
83	8,1	5,8	0,28	7,6	0,06	8,3	7	0,16	6,3	0,24
84	2,4	1,8	0,25	2	0,17	2,5	1,9	-0,06	1,6	0,36
85	0,5	1,5	-2,00	1,5	-2,00	1,4	0,8	-0,67	0,6	0,57
86	4,3	7,1	-0,65	3	0,30	6,6	7,6	-0,49	2,2	0,67
87	4,4	4,7	-0,07	4,7	-0,07	2,8	1,7	17,27	1,9	0,32
88	8,2	3,8	0,54	3,2	0,61	8,2	3,8	0,11	1,6	0,80
89	0,2	0,5	-1,50	0,3	-0,50	0,3	0,9	0,00	0,5	-0,67
90	3,8	1,9	0,50	2,1	0,45	2,5	1,4	0,22	1,7	0,32
91	1,4	2,4	-0,71	1,5	-0,07	2,7	1,8	0,55	2,1	0,22
92	2,8	6,1	-1,18	5,9	-1,11	5,3	2,2	0,12	2,4	0,55
93	2,9	2,4	0,17	4,1	-0,41	5,3	2,6	0,15	3,4	0,36
94	6,5	9,4	-0,45	8,7	-0,34	9,2	2,8	0,00	1,3	0,86
95	Drop-out									
96	1,9	5,8	-2,05	5,8	-2,05	1,6	2,9	0,12	3,1	-0,94

* Medida de 0 a 10 (cm), segundo marcação na escala análoga visual

** Redução percentual em relação ao valor inicial

APÊNDICE IV

Therapeutic Drug Monitoring

Pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation of a nanotechnological topical formulation of lidocaine/prilocaine (Nanorap) in healthy volunteers --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation of a nanotechnological topical formulation of lidocaine/prilocaine (Nanorap) in healthy volunteers
Article Type:	Original Manuscript
Section/Category:	Europe
Keywords:	HPLC-MS/MS; ropivacaine; plasma; local anesthetic.
Corresponding Author:	Thiago Gagliano-Jucá, M.D. Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho/UFRJ Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho/UFRJ
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Thiago Gagliano-Jucá, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Thiago Gagliano-Jucá, M.D. Gustavo Duarte Mendes, DDS, PhD Maísa R Castelli, BPahrm. MPhil Fernanda C de Moraes, BPharm, MPhil André M. M. Arruda, BPharm Lu Shi Chen, Chem, PhD Marcos Antônio de Oliveira, Biol, PhD Anibal Gil Lopes, MD, PhD Gilberto De Nucci, MD, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Nanorap is a new nanotechnological formulation for topical anesthesia composed of lidocaine (2.5%) and prilocaine (2.5%). The pharmacokinetics of Nanorap was evaluated after topical application of 2g to healthy volunteers. For this evaluation a new simple, selective and sensitive method for the determination of lidocaine and prilocaine in human plasma was developed. The method was based on high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using ropivacaine as internal standard. The drugs were extracted from plasma by liquid-liquid extraction with ether/hexane (80/20, v/v). The chromatography separation was performed on a Genesis C18 analytical column 4 µm (100 x 2.1 mm i.d.) with a mobile phase of methanol/acetonitrile/water (40/30/30, for lidocaine, and 50/30/20, for prilocaine, v/v/v) + 2 mM of ammonium acetate. The method had a chromatography run time of 5.5 min for lidocaine and 3.3 min for prilocaine and a linear calibration curve over the range 0.05 - 10 ng/mL for both drugs. The lower limit of quantification (LLOQ) was 0.05 ng/mL for both drugs. The precision and accuracy values of the assays were within ±10%. The stability tests indicate no significant degradation under conditions of experiment. The drugs were quantified using a mass spectrometer with an electrospray source in the ESI positive mode (ES+) configured for multiple reaction monitoring

	(MRM). Mean Cmax for lidocaine was 6.62 ng/mL. Mean Cmax for prilocaine was 1.72 ng/mL. Median Tmax was 6.5 hours for both drugs. Nanocapsule suspension was evaluated and Nanorap was characterized by cryofracture, showing a mean drug association of 92.5% and 89% for lidocaine and prilocaine, respectively. Nanocapsules had a mean size of 88nm. The pharmacodynamics (PD) of Nanorap was evaluated with the use of a visual analogue scale. The PD study showed that Nanorap has a sufficient analgesic effect (>30% reduction in pain) after 10 minutes of application.
Suggested Reviewers:	Thomas H Karnes htkarnes@vcu.edu Dr. Karnes has experience with the methods used in this manuscripts.
	Henning Blume henning.blume@socratec-pharma.de
	Atholl Johnston Atholl.johnston@bioanalytics.co.uk Professor Johnston is well experienced in clinical research.
	Silvia S Guterres, PhD Professor, Federal University of Rio Grande do Sul silvia.guterres@ufrgs.br Professor Guterres has experience with drug development.
Opposed Reviewers:	

24 May 2014

To the editor

Therapeutic Drug Monitoring Journal

Dear Sir/Madam,

Please find attached the following files for your appreciation:

- Manuscript "Pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation of a nanotechnological topical formulation of lidocaine/prilocaine (Nanorap) in healthy volunteers"
- Figure 1
- Figure 2
- Figure 3
- Figure 4

The manuscript is original in all its content and has the following authors:

Thiago Gagliano-Jucá, Gustavo D. Mendes, Máisa R. Castelli, Fernanda C. de Moraes, André M.M. Arruda, Lu Shi Chen, Marcos Antônio de Oliveira, Anibal Gil Lopes and Gilberto De Nucci.

There are no conflicts of interest. All procedures performed in the study were approved by the local research ethics committee.

We hope you find the manuscript suitable for publication in the above-mentioned journal.

Sincerely,

Thiago Gagliano-Jucá, MD

E-mail: thiagogagliano@gmail.com

Pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation of a nanotechnological topical formulation of lidocaine/prilocaine (Nanorap) in healthy volunteers

Thiago Gagliano-Jucá^{a*} (MD), Gustavo D. Mendes^{b,c,d} (DDS, PhD), Maísa R. Castelli^e (BPahrm. MPhil), Fernanda C. de Moraes^{b,d} (BPharm, MPhil), André M.M. Arruda^b (BPharm), Lu Shi Chen^b (Chem, PhD), Marco Antônio de Oliveira^e (Biol, PhD), Anibal G. Lopes^a (MD, PhD), Gilberto De Nucci^{b,e,f} (MD, PhD)

^a Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho/UFRJ, CCS-Bloco G, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^b Galeno Research Unit, Latino Coelho St., 1301, Parque Taquaral, 13087-010, Campinas, SP, Brazil.

^c Department of Surgery, Faculty of Odontology, University of Sao Francisco (USF), Braganca Paulista, SP, Brazil .

^d Department of Surgery, Faculty of Odontology, University Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), São Paulo, SP, Brazil.

^e Departament of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

^f Departament of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.

* Author for correspondence

Running Title: Characterization of Nanorap in healthy volunteers

Author for correspondence:

Thiago Gagliano-Jucá
294 Cardoso Junior St – Rio de Janeiro, RJ - Brazil
Postal Code: 22245-000
Phone/Fax (19): +55 19 3252-1516
E-mail: thiagogagliano@gmail.com

The work described in this manuscript was paid by Biolab Indústria Farmacêutica Ltda.

ABSTRACT

Nanorap is a new nanotechnological formulation for topical anesthesia composed of lidocaine (2.5%) and prilocaine (2.5%). The pharmacokinetics of Nanorap were evaluated after topical application of 2g to healthy volunteers. For this evaluation a new simple, selective and sensitive method for the determination of lidocaine and prilocaine in human plasma was developed. The method was based on high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using ropivacaine as internal standard. The drugs were extracted from plasma by liquid-liquid extraction with ether/hexane (80/20, v/v). The chromatography separation was performed on a Genesis C₁₈ analytical column 4 μ m (100 x 2.1 mm i.d.) with a mobile phase of methanol/acetonitrile/water (40/30/30, for lidocaine, and 50/30/20, for prilocaine, v/v/v) + 2 mM of ammonium acetate. The method had a chromatography run time of 5.5 min for lidocaine and 3.3 min for prilocaine and a linear calibration curve over the range 0.05 – 10 ng/mL for both drugs. The lower limit of quantification (LLOQ) was 0.05 ng/mL for both drugs. The precision and accuracy values of the assays were within $\pm 10\%$. The stability tests indicate no significant degradation under conditions of experiment. The drugs were quantified using a mass spectrometer with an electrospray source in the ESI positive mode (ES+) configured for multiple reaction monitoring (MRM). Mean C_{max} for lidocaine was 6.62 ng/mL. Mean C_{max} for prilocaine was 1.72 ng/mL. Median T_{max} was 6.5 hours for both drugs. Nanocapsule suspension was evaluated and Nanorap was characterized by cryofracture, showing a mean drug association of 92.5% and 89% for lidocaine and prilocaine, respectively. Nanocapsules had a mean size of 88nm. The pharmacodynamics (PD) of Nanorap was evaluated with the use of a visual analogue scale. The PD study showed that Nanorap has a sufficient analgesic effect (>30% reduction in pain) after 10 minutes of application.

Key words: HPLC-MS/MS; ropivacaine; plasma; local anesthetic.

1. Introduction

The eutectic mixture of lidocaine and prilocaine was an advance for topical anesthesia, since eutectic mixtures concentrations of up to 80% became possible [1]. In order to obtain faster and more effective penetration of the active compounds alternatives to conventional anesthetic creams are being developed, such as iontophoresis, electroporation, electroincorporation, patches and nanotechnology [2-4]. Although iontophoresis, electroporation, and electroincorporation are well established methods for improving in skin penetration of topical products, their application in every day practice is limited by the need of additional equipment and complexity of the application procedure. Additionally, studies evaluating topical anesthetic patches have shown long time to maximum analgesic effect or increased number of side effects compared to commonly used creams or placebo application [3, 5, 6].

Nanotechnology is one of the promising techniques that may aid in the development of better topical anesthetic formulations. Nanocapsules are composed by a polymeric container disposed around an oily nucleus. Formulations using this technology may have the drug dissolved in the nucleus and/or adsorbed to the polymeric wall [7, 8].

Nanorap is a hydrogel with 2.5% lidocaine and 2.5% prilocaine, with 50% of the active products in nanocapsules. The remaining 50% of the drugs are in the form of their chloridrate salts.

The present study describes the morphologic evaluation of Nanorap as well as its pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) in healthy volunteers. It also briefly describes new methodologies for quantification of both lidocaine and prilocaine in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

2. Materials and Methods

2.1 Characterization of Nanorap

Chemicals and reagents for characterization of Nanorap were purchased from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA).

Nanocapsule suspension

The nanocapsule suspension was analyzed as previously described [9]. Briefly, the suspension was left decanting over a copper grid lined with formvar 2.5% for 10 minutes. After decantation, grids were covered with a 5% uranyl acetate solution and left for 10 minutes. Uranyl acetate was then removed with the aid of paper filter and grids were left to dry for 48 hours in room air. The material was then observed on a transmission electron microscope (TEM) LEO 906 (Zeiss, Oberkochen, Germany), at different magnifications at 60 keV.

Nanorap

Nanorap was evaluated by cryofracture as previously described [10]. Briefly, samples were frozen in Freon 22 and transferred to liquid nitrogen. Samples were then inserted in the cryofracture system BAF060 (Leica Microsystems, Vienna, Austria) and exposed to a temperature of -140°C. Replicas were produced with deposition of 6nm of platinum at 45° inclination and stabilized with 20nm of carbon deposited at 90°. Replicas were then submerged in 50% sulfuric acid solution for 4 hours for sample removal and then washed in distilled water for 1 hour. The material was then observed at different magnifications at 60 keV.

2.2 Quantification of lidocaine/prilocaine

Chemicals and reagents

Lidocaine, prilocaine and ropivacaine were purchased from the United States Pharmacopeia (Rockville, MD, USA). Acetonitrile and methanol (HPLC grade) were purchased from J.T Baker, USA; ammonium acetate and hexane (analysis grade) from J.T Baker, Mexico; ethyl ether (analysis grade) from Mallinckrodt, USA. Milli-Q water was obtained from a Millipore system. Blank human plasma samples were prepared from venous blood collected from healthy volunteers. Plasma was obtained by centrifugation of this blood and samples were pooled and stored at -20 ° C until use.

Calibration standards and quality controls

Stock solutions of lidocaine, prilocaine and ropivacaine (internal standard) were prepared in methanol/water (50/50, v/v). Calibration curves for lidocaine and prilocaine were prepared by adding each compound to blank plasma to yield final concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10 ng/mL. The calibration curves were performed in duplicate for each day's assays. The quality control (QC) samples were prepared in blank plasma at concentrations of 0.05, 0.15, 0.8 and 8.0 ng/mL.

Sample preparation

Plasma aliquots of 0.2 mL (for lidocaine) or 0.1 mL (for prilocaine) of each plasma sample were added to different glass tubes for the extraction procedure of lidocaine and prilocaine, followed by 0.05 mL of internal standard (ropivacaine 10 ng/mL) to each tube. The tubes were vortexed for 5 seconds. The samples were

vortexed for 5 seconds again. Four mL of ether/hexane (80/20, v/v), were added and the samples were vortexed for 40 seconds. The samples were frozen and the organic phase transferred to another tube in which the organic solvents were evaporated under N₂ flow at 45 °C. Finally, the dry residues were dissolved in 0.15 mL of methanol/acetonitrile/water (40/30/30, v/v/v) + ammonium acetate (2 mM) for lidocaine quantification and 0.3 mL of methanol/acetonitrile/water (50/30/20, v/v/v) + ammonium acetate (2 mM) for prilocaine quantification. Samples were then vortexed for 10 seconds and transferred to microvials for analysis.

Liquid chromatography

Aliquots of extracted plasma (0.15 mL for lidocaine and 0.10 mL for prilocaine) were injected into a Genesis[®] C18 analytical column 4 µm (100 x 2.1 mm i.d.) coupled to a Phenomenex[®], Security Guard Cartridges C₁₈, 4 x 3 mm i.d. The temperature of the column was kept at environmental conditions. The mobile phase used was methanol/acetonitrile/water (40/30/30, v/v/v) + 2 mM of ammonium acetate at a flow rate of 0.220 mL/min for lidocaine. For prilocaine, the mobile phase used was methanol/acetonitrile/water (50/30/20, v/v/v) + 2 mM of ammonium acetate with a flow rate of 0.3 mL/min. The temperature of the auto-sampler was maintained at 8 °C.

Mass spectrometry

The mass spectrometer used for lidocaine quantification was a Micromass Quattro Micro API, Waters Corporation, Milford, MA, USA equipped with an electrospray source in the ESI positive mode (ES+) and configured for multiple reactions monitoring (MRM) to monitor the transitions 235.3 > 86.1 for lidocaine and 275.0 > 126.0 for ropivacaine. The optimized values of cone, and collision energy (CE)

were respectively 23 (V) and 12 (eV) for lidocaine and 18 (V) and 18 (eV) for ropivacaine. Data acquisition and analysis were performed using the software Masslynx (4.0, Waters Corporation, Milford, MA, USA).

For quantification of prilocaine a Micromass model API 4000, Sciex/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA equipped with an electrospray source in the ESI positive mode (ES+) and configured for multiple reaction monitoring (MRM) to monitor the transitions 221.0 > 86.0 for prilocaine and 275.0 > 126.0 for ropivacaine. The optimized values of declustering potential (DP), collision energy (CE) and collision cell exit potential (CXP) were respectively 51 (V), 19 (eV) and 14 (V) for both prilocaine and ropivacaine. Data acquisition and analysis were performed using the software Analyst (1.4.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Method Validation

The method validation was carried out according to the United States Food and Drug Administration (FDA) bioanalytical method validation guidance [11] and the Brazilian National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA) [12].

Selectivity

To evaluate the specificity of the methods proposed, eight different blank plasma lots were investigated by comparing the chromatograms. Each blank plasma sample was prepared by using the extraction procedures described above.

Linearity

Calibration curves were prepared by assaying standard plasma samples at eight concentrations of lidocaine (0.05-10 ng/mL) and prilocaine (0.05-10 ng/mL). The

linearity of each calibration curve was determined by plotting the peak area ratio (y) of lidocaine / ropivacaine or prilocaine /ropivacaine standard vs. nominal concentration of analyte. The calibration curves were constructed by weighted (1/X) least squares linear regression.

Accuracy and Precision

The precision and accuracy of each assay was determined at three concentration levels of QC plasma samples (0.15, 0.8 and 8 ng/mL) by running three validation batches on three different days. Inter and intra-day precisions were determined as the relative standard deviation, $RSD(\%) = 100(SD/M)$, and the accuracy as the percentage relative error, $RE(\%) = (E-T)(100/T)$, where M is the mean, SD is the standard deviation of M, E is the experimentally determined concentration and T is the theoretical concentration.

Extraction recovery and matrix effect

The recovery for each extraction method described above was calculated at each standard concentration (0.15, 0.8 and 8 ng/mL) as the ratio between the peak area for extracted blank plasma with lidocaine or prilocaine added before extraction and the peak area of the equivalent blank plasma samples with lidocaine or prilocaine added after the extraction. The matrix effect experiments were performed using the ratio between mobile phase solutions with added lidocaine/prilocaine and non-extracted samples, with lidocaine/prilocaine added to plasma residues.

Stability

Plasma QC samples at three levels (0.15, 0.8 and 8 ng/mL) were pre-analyzed to determine the nominal concentrations. Then, aliquots of these plasma samples were subjected to short-term storage at room temperature, three freeze-thaw cycles (-20°C to 25°C), storage in the auto-sampler (8°C) and long term incubation (174 days at -20°C). Stability was assessed by measuring lidocaine and prilocaine nominal concentrations in the aliquots after the respective procedures.

2.3 Pharmacokinetics study

Eight healthy adult volunteers (4 males, 4 females) participated in this study. Their median age was 24.5 years (range 18 – 34 years); mean body weight was 67.7 kg (47.2 – 85.5 kg), mean body height was 1.69 m (1.55 – 1.85 m) and mean body mass index of 22.47 kg/m² (19.65 – 28.01 kg/m²).

The volunteers did not have any significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal or hematological diseases, as determined by their medical history, physical examination, and routine laboratory tests (hematology, blood biochemistry, and urine analysis). All subjects had negative for hepatitis B and C, except for serologic scar, and were instructed to abstain from taking any drug including over the counter (OTC) for 2 weeks prior to and during the study period. They were informed about the aim and risks of the study by the clinical investigator, based on which they signed a written informed consent statement before entering the study. The study was performed according to the revised Declaration of Helsinki for bio-medical research involving human subjects and the rules of Good Clinical Practices. Before the start of the study the protocol was approved by the Committee of Research Ethics of the

Sate University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil (approval number 83.953).

The study was designed as a single-dose single-treatment with topical administration study. In the morning after an overnight fasting (10 h) volunteers received a 2g topical application of a 2.5% lidocaine (50mg) plus 2.5% prilocaine (50mg) hydrogel (Nanorap) over a 2 x 2 cm² area on the forearm. The remaining product was removed 1 h after application. Water intake was allowed after 2 h of dose; water, lunch and dinner were given to all volunteers according to a time schedule. The volunteers were continuously monitored throughout the confinement period of study. They were not permitted to lie down or sleep for the first 5 h after the dose. Approximately 7 ml of blood samples for assay were drawn into heparinized tubes through indwelling cannula before (0:00 h) and at 0:10, 0:20, 0:30, 0:40, 0:50, 1:00, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 2:00, 2:20, 2:40, 3:00, 3:30, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00, 8:00, 10:00, 12:00, 15:00, 24:00 after dosing. Blood samples were centrifuged at 2000 g for 10 minutes, plasma was separated and kept frozen at -20°C until assayed.

2.4 Pharmacodynamics study

Ninety-six healthy volunteers (28 men) enrolled in this study. Their median age was 24.5 (range 18 – 51); mean body weight was 67.6 kg (49.0 – 97.0 kg), mean body height was 1.66 m (1.48 – 1.93 m) and mean body mass index of 24.53 kg/m² (19.13 – 28.79 kg/m²).

Similarly to the PK study, volunteers underwent clinical and laboratorial examination before enrolment. The study protocol was approved by the Committee of Research Ethics of the Sate University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil (approval number 258.635).

The study had a double-blind, two-treatments (placebo cream and Nanorap), three-period design. Treatments were performed on 3 different days, with a minimum interval of 2 days between treatments. On treatment days, before application of the products, volunteers were tested for skin sensibility. In this evaluation, volunteers underwent a simultaneous venous puncture on each forearm and quantified the pain generated by the procedures with the aid of a visual analogous scale (VAS), a 10 cm ruler with no numbers or gradation marks [13]. Treatments were performed by topical administration of 4g of Nanorap (100 mg of lidocaine and 100 mg of prilocaine) on a fixed area (4x4 cm²) on the forearm. Concomitantly with treatments on one forearm, volunteers received 4g of the placebo cream on an equivalent area on the contralateral arm. The forearm that would receive Nanorap was randomized (right or left). On the first day of treatment, ten minutes after application 50% of the area covered with the products was cleaned and volunteers were reevaluated (simultaneous venous puncture and VAS). Five minutes later (15 minutes of product application) the remaining products were removed and the pain induced by the procedure was assessed again. On the second day of treatment the times of evaluations were 20 and 25 minutes, and on the third day of treatment times were 30 and 35 minutes. On the 3 days, an electrocardiogram (ECG) was performed before and 8 hours after application of the products to assess cardiac safety. The reduction in pain scores with each application time were calculated by subtracting the values marked on the VAS prior to application from the values in the 2 post product application scores of each day of treatment. Together, these evaluations allowed the characterization of the PD of Nanorap (percentage of analgesia and time of onset of analgesia). Statistical analysis was performed as similar previous studies [14, 15]. A $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 Characterization of Nanorap

The analyzed samples showed nanocapsules with a mean size of 88nm (range 50 – 120nm). An image of Nanorap cryofracture is displayed in Figure 1. A mean drug association of 92.5% (92 - 94%) and 89% (86.6 - 90%) was observed for lidocaine and prilocaine, respectively.

3.2 HPLC-MS/MS analysis

The spectrum for compounds showed base peak ions ($[M+H]^+$) at mass-to-charge ratio (m/z) of 235.3 for lidocaine, 221.0 for prilocaine and 275.0 for ropivacaine. The product ion scan showed that the most abundant product ions for lidocaine and prolocaine were m/z 86.0, and 126.0 for ropivacaine. The total run time was 5.5 min for lidocaine and 3.3 min for prilocaine.

The retention times for lidocaine and ropivacaine were 3.40 ± 0.3 min and 3.5 ± 0.3 min, respectively (Figure 2). For prilocaine and ropivacaine the retention times were 1.53 ± 0.3 min and 1.72 ± 0.3 min, respectively (Figure 3). No endogenous peaks were observed in this area of the chromatogram of blank plasma. Thus, for all eight different blank plasma samples, the retention time regions were free from endogenous interfering peaks.

The calibration curves were linear for concentrations of 0.05-10 ng/mL for both lidocaine and prilocaine and the representative regression equation for the calibration curves was $y = 0.112754x + 0.00337169$ ($r = 0.9942$) and $y = 0.455 x + 0.000464$ ($r = 0.9981$), respectively.

The extraction recoveries of lidocaine from human plasma was $67.0 \pm 4.4\%$, $81.2 \pm 1.2\%$ and $84.6 \pm 1.6\%$ ($n=5$ for each concentration) at concentrations of 0.15, 0.8 and 8.0 ng/mL, respectively. For ropivacaine at 10 ng/mL the recovery was $99.6\% \pm 0.5$.

For prilocaine, the extraction recoveries from human plasma were $76.6 \pm 1.8\%$, $62.7 \pm 5.9\%$ and $71.2 \pm 2.0\%$ ($n=5$ for each concentration) at concentrations of 0.15, 0.8 and 8.0 ng/mL, respectively. For ropivacaine at 10 ng/mL the recovery was $92.1 \pm 3.3\%$.

The results of the stability studies did not reveal any significant degradation under the conditions of the experiment.

3.3 Pharmacokinetics

A total of 416 blood samples were collected from the 8 volunteers for the pharmacokinetic evaluation. The formulation was well tolerated by all participants. Biochemical parameters were unchanged after the study in all subjects, except in volunteer 7 (female), which presented low plasma hemoglobin (11.5 g/dL) 8 days after treatment. This adverse event was classified as possibly related to the study procedure (blood sampling) or to individual circumstances (menstrual period close to the study).

The mean maximum plasma concentration ($C_{\max}$) for lidocaine was 6.62 ng/mL (range 1.17 – 36.5 ng/mL) which was achieved after 6.5 hours (median $T_{\max}$) (range 3.0 – 15.0 hours) of product administration. Mean $C_{\max}$ for prilocaine was 1.72 ng/mL (0.32 – 9.23 ng/mL) and median $T_{\max}$ was 6.5 hours (0.83 – 15 hours). Plasma lidocaine and prilocaine time x concentration curve is shown in Figure 4.

3.4 Pharmacodynamics

Of the 96 volunteers that enrolled in this study, 95 completed all 3 periods of tests. Volunteer 95 dropped-out after conclusion of the first period for personal reasons. Table 1 illustrates the results of VAS scores of volunteers 1 to 7 in the first period (10 and 15 minutes of product application). Table 2 summarizes the mean reduction of pain and their percentage after application of Nanorap and placebo, compared to basal values. Mean QTc did not significantly change after application of 4g of Nanorap (mean QTc before and 8 hours after application was 410ms). One volunteer had hypertriglyceridemia (334 mg/dL), which was not considered related to therapy.

4. Discussion

This is the first study evaluating a topical anesthetic formulation using nanotechnology. As with most topical products, skin absorption of the active components of the cream was expected to be relatively low compared to other forms of administration. Previous methods for quantification of plasma lidocaine and prilocaine had relatively high LLOQ. Thus, a new methodology with very low limit of quantification was developed for the evaluation of Nanorap pharmacokinetics.

Lidocaine has been determined in human plasma (LLOQ 0.2 ng/mL, RT 3.35-min, run-time 5 min, liquid extraction) [20-22] and in dog, horse and mouse plasma (LLOQ 2.5 ng/mL, RT 5.88 min, run-time 5 min, liquid extraction) [23, 24] by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Prilocaine has been determined in human serum (LLOQ 1 ng/mL, liquid extraction) [25] and mouse plasma (LLOQ 20 ng/mL, liquid extraction) [24] by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Due to their relatively high LLOQ, studies evaluating topical

application of these anesthetics in humans needed to use high doses (up to 500mg of each) of creams so that a detectable plasma level could be found [17]. Our method has good sensitivity (LLOQ of 0.05 ng/mL) for both lidocaine and prilocaine, and can be carried out in a short time (run time 1.53 and 3.4 min prilocaine and lidocaine, respectively), permitting a high throughput. Furthermore, this method involves a very simple liquid-liquid extraction.

Our pharmacokinetic study showed that 2 g of Nanorap applied for 1 hour to the skin of the forearm of healthy volunteers generates $C_{\max}$ considered safe for both lidocaine and prilocaine. Another study evaluating EMLA[®] 5% found maximum plasma concentrations (18 ng/mL) of lidocaine 5 hours after application of 4 to 6g of the product to a 25 cm² area on the forearm [16]. Another study with EMLA[®] 5% found maximum plasma concentration of prilocaine (24.7 ng/mL) and lidocaine (74.5 ng/mL) around 3 hours after application of 20g of the product to a 300 cm² area on the lateral side of the thigh of healthy volunteers [17]. In the latter work, however, blood samples were collected only up to 4 hours after EMLA[®] application. As we displayed in Figure 4, for the first 5 to 6 hours there is a slow increase in plasma concentration of these local anesthetics. There is the possibility that the latter study did not find the $T_{\max}$ for lidocaine and prilocaine because of its methodological design.

The plasma levels of both drugs after topical application of 2g of Nanorap (50 mg lidocaine and 50 mg prilocaine) to forearm skin were found to be inside a safe range ($< 5 \mu\text{g/mL}$).

Our PD study showed that Nanorap has a sufficient analgesic effect ($>30\%$ reduction in pain) after 10 minutes of application. This is the fastest time of analgesic effect onset reported by studies evaluating topical anesthetics in normal skin [4, 18, 19].

The ECGs performed 8 hours after Nanorap application (4g) did not show any clinically significant changes from ECGs performed before Nanorap.

5. Conclusion

The method described in the manuscript is simple and has a very low limit of quantification for both lidocaine and prilocaine in human plasma, making it useful in studies evaluating skin absorption of topical anesthetics containing these drugs.

6. Acknowledgements

The work described in this manuscript was paid by Biolab Indústria Farmacêutica Ltda.

References

- [1] Ehrenström Reiz GM, Reiz SL. EMLA--a eutectic mixture of local anaesthetics for topical anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1982 Dec;26(6):596-8.
- [2] Wallace MS, Ridgeway B, Jun E, et al. Topical delivery of lidocaine in healthy volunteers by electroporation, electroincorporation, or iontophoresis: an evaluation of skin anesthesia. *Reg Anesth Pain Med*. 2001 May-Jun;26(3):229-38.
- [3] Sawyer J, Febbraro S, Masud S, et al. Heated lidocaine/tetracaine patch (Synera, Rapydan) compared with lidocaine/prilocaine cream (EMLA) for topical anaesthesia before vascular access. *Br J Anaesth*. 2009 Feb;102(2):210-5.
- [4] Gou M, Wu L, Yin Q, et al. Transdermal anaesthesia with lidocaine nano-formulation pretreated with low-frequency ultrasound in rats model. *J Nanosci Nanotechnol*. 2009 Nov;9(11):6360-5.
- [5] Curry SE, Finkel JC. Use of the Synera patch for local anesthesia before vascular access procedures: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Pain Med*. 2007 Sep;8(6):497-502.
- [6] Kim WO, Song BM, Kil HK. Efficacy and safety of a lidocaine/tetracaine medicated patch or peel for dermatologic procedures: a meta-analysis. *Korean J Anesthesiol*. 2012 May;62(5):435-40.
- [7] Allémann E, Gurny R, Doelker E. Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1993 39:173-191.
- [8] Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*. 2001 Jan 29;70(1-2):1-20.

- [09] Harris J B, Hornet, R W. Negative Staining: A Brief Assessment of Current Technical Benefits, Limitations and Future Possibilities. *Micron*, Vol. 25, No. 1, pp. 5-13, 1994.
- [10] Angelov, B. Protein-Containing PEGylated Cubosomic Particles: Freeze-Fracture Electron Microscopy and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Study. *J. Phys. Chem. B* 2012, 116, 7676–7686.
- [11] US- FDA, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2001.
- [12] ANVISA-RE 899. 2003. Available at: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.
- [13] Scott J, Huskisson EC. Graphic representation of pain. *Pain*. 1976 Jun;2(2):175-84.
- [14] Wagner RF Jr, Flores CA, Argo LF. A double-blind placebo controlled study of a 5% lidocaine/prilocaine cream (EMLA) for topical anesthesia during thermolysis. *J Dermatol Surg Oncol*. 1994 Feb;20(2):148-50.
- [15] Dexter F, Chestnut DH. Analysis of statistical tests to compare visual analog scale measurements among groups. *Anesthesiology*. 1995 Apr;82(4):896-902.
- [16] Juhlin L, Hägglund G, Evers H. Absorption of lidocaine and prilocaine after application of a eutectic mixture of local anesthetics (EMLA) on normal and diseased skin. *Acta Derm Venereol*. 1989;69(1):18-22.
- [17] Evers H, von Dardel O, Juhlin L, et al. Dermal effects of compositions based on the eutectic mixture of lignocaine and prilocaine (EMLA). Studies in volunteers. *Br J Anaesth*. 1985 Oct;57(10):997-1005.
- [18] Bjerring P, Arendt-Nielsen L. Depth and duration of skin analgesia to needle insertion after topical application of EMLA cream. *Br J Anaesth*. 1990 Feb;64(2):173-7.
- [19] Egekvist H, Bjerring P. Comparison of the analgesic effect of EMLA cream and EMLA patch on normal skin evaluated with laser-induced pain stimuli. *Acta Derm Venereol*. 1997 May;77(3):214-6.

- [20] Abdel-Rehim M, Bielenstein M, Askemark Y, Tyrefors N, Arvidsson T. High-performance liquid chromatography-tandem electrospray mass spectrometry for the determination of lidocaine and its metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000, 741,175-188.
- [21] ter Weijden E, van den Broek MP, Ververs FF. Easy and fast LC-MS/MS determination of lidocaine and MEGX in plasma for therapeutic drug monitoring in neonates with seizures. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012, 881-882,111-114.
- [22] Bo LD, Mazzucchelli P, Marzo A. Highly sensitive bioassay of lidocaine in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1999, 854, 3-11.
- [23] Maes A, Weiland L, Sandersen C, Gasthuys F, De Backer P, Croubels S. Determination of lidocaine and its two N-desethylated metabolites in dog and horse plasma by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007, 852, 180-187.
- [24] Al-Musawi A, Matar K, Kombian SB, Andersson L. A pharmacokinetic study of a topical anesthetic (EMLA®) in mouse soft tissue laceration. *Dent Traumatol.* 2012, 28, 483-487.
- [25] Koehler A, Oertel R, Kirch W. Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacain, prilocaine and ropivacain in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2005 Sep 23;1088(1-2):126-30.

Legends

Figure 1: Cryofracture of Nanorap.

Figure 2: MRM chromatograms of double blank normal pooled human plasma and lower limit of quantification (LLOQ - 0.05 ng/mL) for lidocaine.

Figure 3: MRM chromatograms of double blank normal pooled human plasma and lower limit of quantification (LLOQ - 0.05 ng/mL) for prilocaine.

Figure 4: Time concentration curves for lidocaine and prilocaine in healthy volunteers.

Table 1: VAS scores and percentage reduction (analgesic effect) of placebo and Nanorap for volunteers 1 to 7 in the first period (10 and 15 minutes). * Measure from 0 to 10 (cm), according to the measurement in the visual analogous scale. ** Percentage reduction compared to the value found in VAS before products application.

Table 2: Mean reduction, p value after paired t-test comparing Nanorap reduction to placebo reduction, and percentage of reduction (analgesic effect) of placebo and Nanorap for times 10, 15, 20, 25, 30 and 35 minutes.

Table 1

Volunteer number	Forearm with placebo					Forearm with Nanorap				
	Before (cm)	10 min (cm)*	%**	15 min (cm)*	%**	Before (cm)	10 min (cm)*	%**	15 min (cm)*	%**
1	3.7	1.9	0.49	2.3	0.38	2.2	2.8	-0.27	2.7	-0.23
2	2.3	4.9	-1.13	3.6	-0.57	3.7	0.8	0.78	1.2	0.68
3	2	3.4	-0.70	1.8	0.10	2.2	0.5	0.77	0.4	0.82
4	7.8	0.2	0.97	0.3	0.96	7.7	0.7	0.91	0.6	0.92
5	4.4	7.6	-0.73	7.3	-0.66	4.3	3	0.30	2.7	0.37
6	5.8	6.3	-0.09	6.3	-0.09	6	3.5	0.42	1.3	0.78
7	1.7	1.6	0.06	2.5	-0.47	1.6	1	0.38	0.6	0.63

Table 2

Time (min)	Reduction with placebo (cm)	Reduction with Nanorap (cm)	p value	Mean percentage reduction with placebo	Mean percentage reduction with Nanorap
10	0.57	1.20	0.029	0.20	0.47
15	0.64	1.71	≤0.001	0.21	0.76
20	0.41	0.88	0.084	0.14	0.34
25	0.60	1.27	0.020	0.22	0.58
30	0.37	1.26	≤0.001	0.13	0.65
35	0.60	1.26	0.007	0.23	0.65
Total	0.54	1.26	≤0.001	0.16	0.36

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)



Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

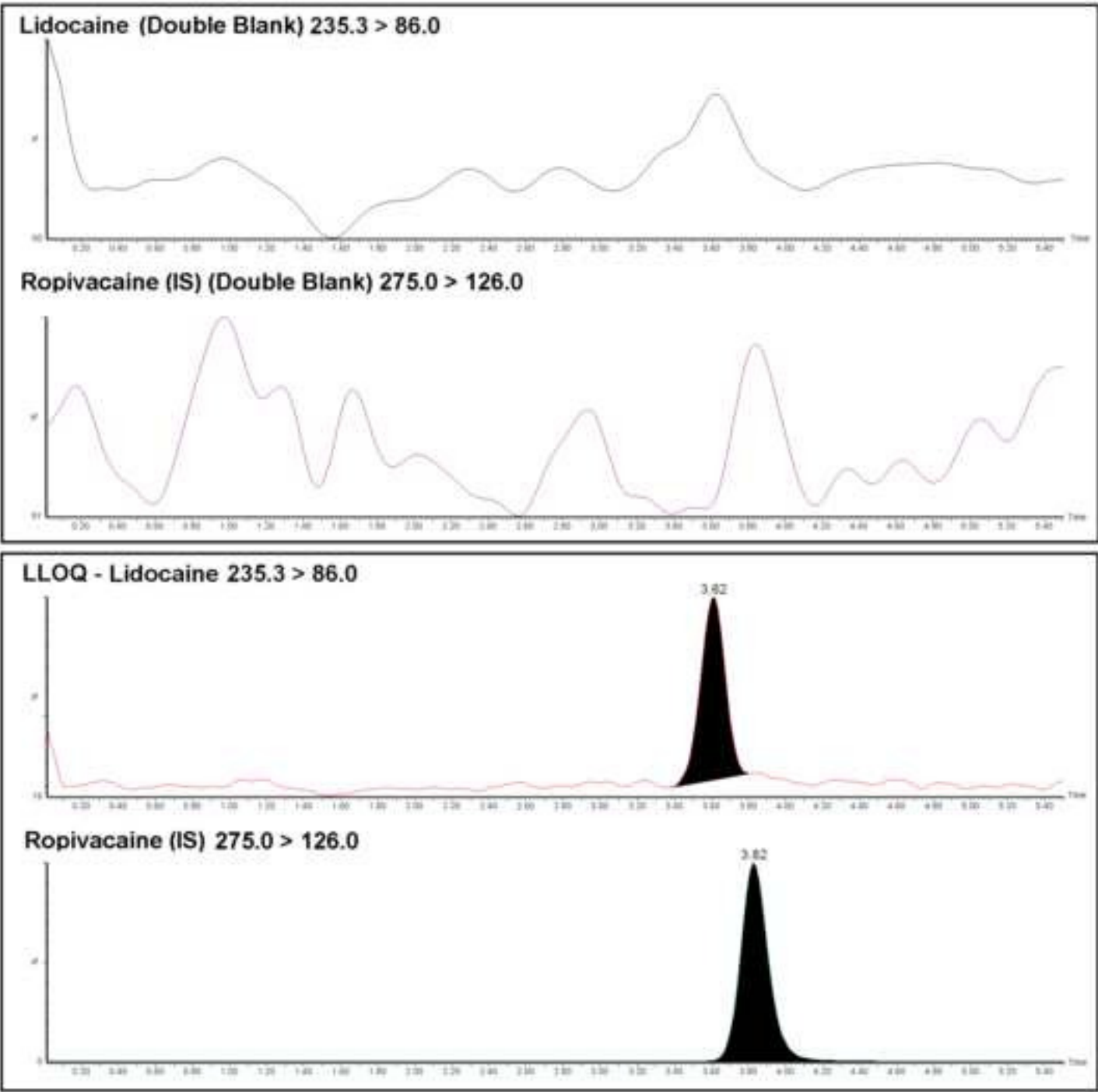


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

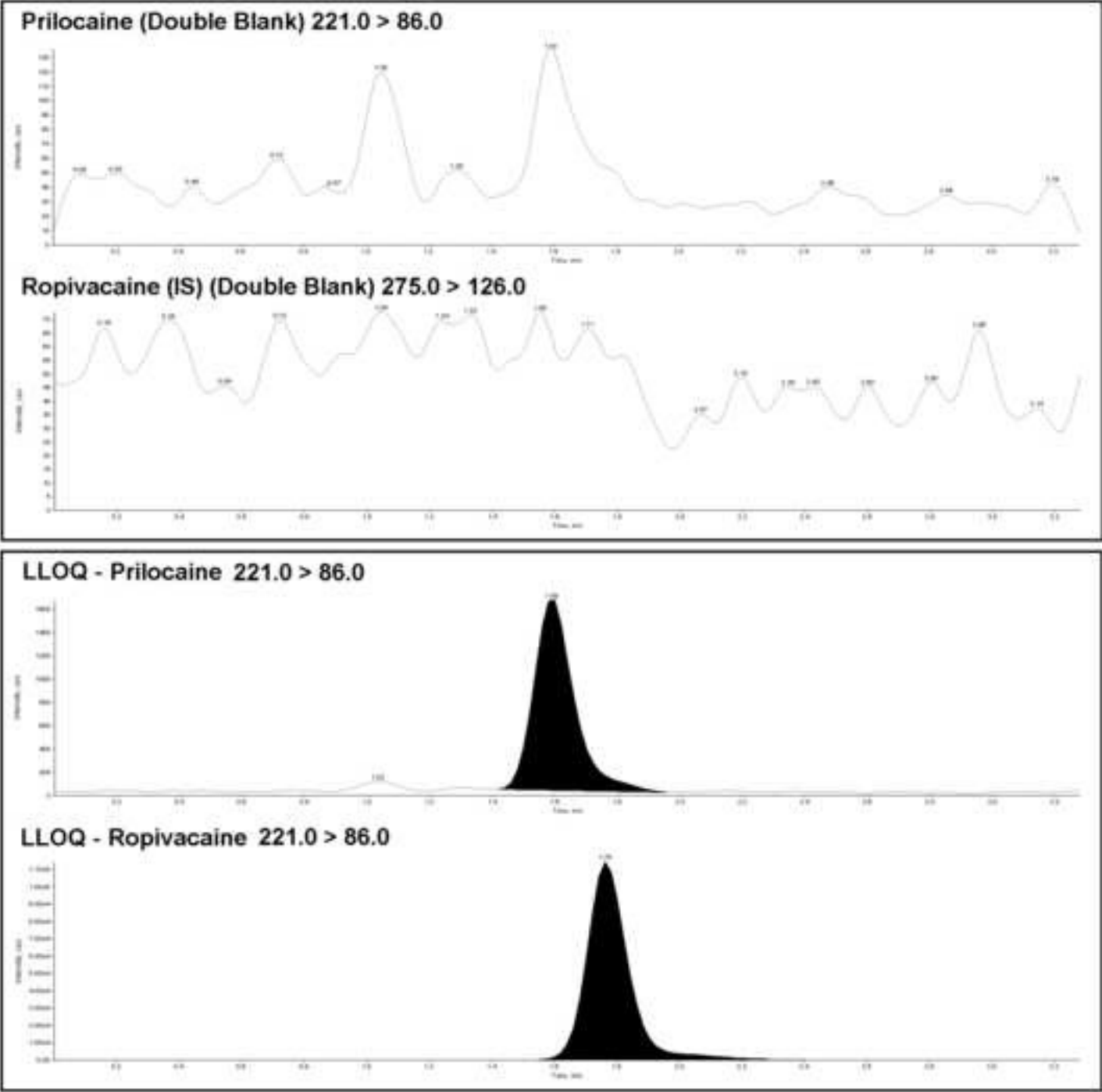


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

