

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SHEILA MARIA STOCO



**“LIBERAÇÃO DE ROPIVACAÍNA ATRAVÉS DA PELE:  
ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA INCORPORAÇÃO DE  
PROMOTORES DE ABSORÇÃO E DA ENCAPSULAÇÃO  
EM NANOPARTÍCULAS”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Sheila Maria Stoco  
Daniele Ribeiro de Araujo  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Funcional e  
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

St62L Stoco, Sheila Maria, 1981-  
Liberação de ropivacaína através da pele: aspectos  
biofarmacêuticos da incorporação de promotores de  
absorção e da encapsulação em nanopartículas / Sheila  
Maria Stoco. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Daniele Ribeiro de Araujo.  
Coorientador: Eneida de Paula.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ropivacaína. 2. Anestésicos. 3. Absorção  
cutânea. 4. Nanopartículas. I. Araujo, Daniele Ribeiro  
de. II. Paula, Eneida de, 1963-. III. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Ropivacaine released across the skin: biopharmaceutical aspects  
of the incorporation of permeation enhancers and encapsulation in nanoparticles

**Palavras-chave em Inglês:**

Ropivacaine

Anesthetics

Skin absorption

Nanoparticles

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Daniele Ribeiro de Araujo [Orientador]

Marcelo Lancellotti

Maria Helena Andrade Santana

**Data da defesa:** 29-07-2011

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Data da Defesa: 29/7/2011

Campinas, 29 de Julho 2011

**BANCA EXAMINADORA**


Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo (Orientadora)

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

  
Assinatura

Profa. Dra. Cíntia Maria Saia Cereda

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dr. Tiago Rodrigues

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*"A vida responde sempre às nossas indagações.  
Estudos e pesquisas são problemas de longo alcance que o Espírito  
formula à frente do Universo; invenções e descobertas constituem  
soluções que a Divina Sabedoria nos fornece pela escola do trabalho."*

*EMMANUEL*

*(psicografia de Francisco Cândido Xavier)*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de realizar este trabalho.*

*Ao meu pai Antonio (in memorian) e minha mãe Sonia por todo o amor, companheirismo, dedicação, conselhos e por despertar em mim o prazer de estudar desde a infância...minha eterna gratidão!*

*À Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo pela orientação, amizade, paciência, conselhos e por estar sempre disposta a ajudar em todos os momentos...muito obrigada!*

*À Profa. Dra. Eneida de Paula pela oportunidade, sugestões e colaboração.*

*Ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, Renato Grillo e Nathalie por toda a colaboração com as nanopartículas*

*Ao Prof. Dr. Marcelo Lancellotti pelas sugestões durante a qualificação, pela colaboração neste trabalho e por estar sempre disposto a ajudar todas as vezes que busquei auxílio.*

*À Profa. Dra. Luciana Maria de Hollanda por toda a paciência e auxílio com a cultura de células de melanoma.*

*À Profa. Dra. Cintia Maria Saia Cereda pela atenção, amizade, conselhos e sugestões neste trabalho.*

*À Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato e Prof. Dr. Tiago Rodrigues por todas as sugestões e esclarecimentos durante a qualificação.*

*À minha grande amiga Viviane Aparecida Queiroz por toda a amizade sincera, conselhos, apoio e ajuda...sempre presente nos momentos que mais precisei...muito obrigada!*

*A todos os amigos do Laboratório Biomembranas: Maribel, Marcio, Michelle, André Luis, Cleyton, Bruna, Allan, Vivi Guilherme, Vivi Vieira, Raquel, Lívia, Cintia, Ana Laís, Taccy e Diego pela amizade, companheirismo, ajuda e por todos os momentos bons que vivemos.*

# ÍNDICE

	Página
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	ix
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b><u>I. INTRODUÇÃO</u></b>	<b>1</b>
<b>1- A Pele</b>	<b>1</b>
<b>1.1- Caracterização Histológica e Bioquímica do Estrato Córneo</b>	<b>3</b>
<b>1.2- Vias de Penetração de Substâncias através da Pele</b>	<b>5</b>
<b>2- Modelos de Pele</b>	<b>7</b>
<b>3- Estudos de Permeação <i>In Vitro</i></b>	<b>8</b>
<b>4- Promotores de Absorção</b>	<b>10</b>
<b>4.1- Promotores Químicos</b>	<b>11</b>
<b>5- Anestésicos Locais</b>	<b>14</b>
<b>5.1- Ropivacaína administrada por via tópica: uma alternativa aos anestésicos tradicionais?</b>	<b>16</b>
<b><u>II. OBJETIVOS</u></b>	<b>24</b>
<b><u>III. MATERIAL E MÉTODO</u></b>	<b>25</b>
<b>1- Drogas, Sais, Solventes e Adjuvantes Farmacotécnicos</b>	<b>25</b>
<b>2- Equipamentos</b>	<b>25</b>
<b>3- Animais</b>	<b>26</b>
<b>4- Preparação da pele</b>	<b>26</b>

<b>5- Preparação dos diferentes Géis de Ropivacaína à base de Carbopol® Ultrez 10</b>	<b>27</b>
<b>5.1- Géis de Ropivacaína com Promotores de Absorção</b>	<b>27</b>
<b>5.2- Géis de Ropivacaína encapsulada em Nanopartículas de Alginato-Quitossana</b>	<b>29</b>
<b>6- Caracterização das Nanopartículas de Alginato-Quitossana</b>	<b>29</b>
<b>6.1- Determinação do diâmetro e índice de polidispersão</b>	<b>29</b>
<b>6.2- Determinação do potencial zeta</b>	<b>30</b>
<b>6.3- Eficiência de associação de RVC nas nanopartículas</b>	<b>30</b>
<b>7- Determinação do Título de Ropivacaína nas Formulações</b>	<b>31</b>
<b>8- Ensaio <i>in vitro</i> e Determinação da Cinética de Permeação</b>	<b>31</b>
<b>9- Quantificação da Ropivacaína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</b>	<b>33</b>
<b>10- Validação da metodologia analítica da Ropivacaína</b>	<b>33</b>
<b>11- Avaliação da Toxicidade <i>In Vitro</i></b>	<b>36</b>
<b>11.1- Cultura de Fibroblastos Balb/c 3T3 e Melanoma Murino B16F10</b>	<b>36</b>
<b>11.2- Avaliação da Viabilidade Celular</b>	<b>38</b>
<b>12- Avaliação da Atividade Antinoceptiva: teste <i>tail-flick</i></b>	<b>40</b>
<b><u>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b>	<b>42</b>
<b>1- Validação do Método Analítico para quantificação de RVC</b>	<b>42</b>
<b>1.1 – Especificidade</b>	<b>42</b>
<b>1.2 – Linearidade</b>	<b>45</b>
<b>1.3 – Precisão</b>	<b>46</b>
<b>1.4 – Exatidão</b>	<b>46</b>
<b>1.5 - Limite de Detecção e Limite de Quantificação</b>	<b>48</b>
<b>2- Determinação do Título de Ropivacaína nas formulações em gel</b>	<b>48</b>

<b>3- Ensaio de permeação <i>in vitro</i> em formulações com promotores de absorção</b>	<b>49</b>
<b>4 - Análise das formulações com Ropivacaína em nanopartículas de alginato- quitosana</b>	<b>53</b>
<b>4.1- Caracterização das nanoestruturas</b>	<b>53</b>
<b>4.2- Eficiência de encapsulação da Ropivacaína nas nanopartículas</b>	<b>54</b>
<b>4.3 - Análise dos resultados de permeação <i>in vitro</i> de formulações com Ropivacaína encapsulada em nanopartículas de alginato-quitosana</b>	<b>54</b>
<b>5 - Ensaio de citotoxicidade em cultura de fibroblastos 3T3</b>	<b>57</b>
<b>5.1- Efeitos da Ropivacaína livre</b>	<b>57</b>
<b>5.2- Efeito dos géis de Ropivacaína com promotores de absorção e respectivos géis-placebo</b>	<b>58</b>
<b>5.3 - Efeito dos géis de Ropivacaína encapsulada em nanopartículas de alginato-quitosana e respectivos géis-placebo</b>	<b>61</b>
<b>6 - Ensaio de citotoxicidade em cultura de células de melanoma B16F10</b>	<b>62</b>
<b>7- Avaliação da atividade farmacológica: teste <i>de tail-flick</i></b>	<b>64</b>
<b><u>V. CONCLUSÕES</u></b>	<b>67</b>
<b><u>VI. PERSPECTIVAS FUTURAS</u></b>	<b>68</b>
<b><u>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b>69</b>
<b><u>VIII. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS</u></b>	<b>80</b>
<b><u>IX. ANEXOS</u></b>	<b>81</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática das três camadas da pele humana	<b>2</b>
<b>Figura 2</b>	Micrografia da pele humana destacando o estrato córneo pertencente a estrutura epidermal.	<b>3</b>
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática das vias de penetração de solutos através da pele	<b>6</b>
<b>Figura 4</b>	Micrografia Eletrônica de Varredura mostrando a localização dos lipídios (L) no estrato córneo, preenchendo o espaço intercelular entre os corneócitos (C)	<b>6</b>
<b>Figura 5</b>	Modelos de células de Franz disponíveis comercialmente	<b>8</b>
<b>Figura 6</b>	Esquema representativo da célula de Franz mostrando os compartimentos doador e receptor.	<b>9</b>
<b>Figura 7</b>	Estrutura química dos principais anestésicos das classes amino-amida e amino-éster	<b>15</b>
<b>Figura 8</b>	Estrutura química da RVC	<b>16</b>
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática do preparo das formulações em gel de ropivacaína	<b>27</b>
<b>Figura 10</b>	Visualização das Células de Franz com gel anestésico no compartimento doador (A) e sob agitação constante e aquecimento (B)	<b>32</b>
<b>Figura 11</b>	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Varian®, Modelo ProStar 325	<b>33</b>
<b>Figura 12</b>	Representação do grupo I (controles positivo e negativo), bem como do grupo II, com as diferentes formulações de gel de RVC ou gel placebo em placas para cultura celular	<b>39</b>
<b>Figura 13</b>	Reação de redução do MTT a formazan	<b>39</b>
<b>Figura 14</b>	Aplicação do gel anestésico e proteção por fita Micropore™ (A) e aplicação do estímulo térmico focalizado durante o teste <i>tail-flick</i> (B)	<b>41</b>
<b>Figura 15</b>	Perfil Cromatográfico da Ropivacaína	<b>43</b>

<b>Figura 16</b>	Cromatograma de pele	<b>43</b>
<b>Figura 17</b>	Cromatograma do gel-placebo com promotores de absorção	<b>44</b>
<b>Figura 18</b>	Cromatograma do gel-placebo de nanopartículas	<b>44</b>
<b>Figura 19</b>	Curva analítica da RVC (n=9)	<b>45</b>
<b>Figura 20</b>	Perfis de permeação (dose infinita) da ropivacaína a partir de diferentes formulações de géis à base de Carbopol®	<b>50</b>
<b>Figura 21</b>	Perfis de permeação (dose infinita) da ropivacaína ( 1 e 2%) encapsulada em nanopartículas de alginato-quitosana dispersas em géis à base de Carbopol®	<b>55</b>
<b>Figura 22</b>	Viabilidade celular da RVC livre	<b>58</b>
<b>Figura 23</b>	Porcentagem de fibroblastos viáveis após tratamento com as formulações F1, F2 e F3 (A) e após tratamento com as formulações F4, F5 e F6 (B)	<b>59</b>
<b>Figura 24</b>	Porcentagem de fibroblastos viáveis após tratamento com as formulações PL1, PL2 e PL3 (A) e após tratamento com as formulações PL4, PL5 e PL6 (B)	<b>60</b>
<b>Figura 25</b>	Porcentagem de fibroblastos viáveis após tratamento com a formulação 7	<b>61</b>
<b>Figura 26</b>	Porcentagem de fibroblastos viáveis após tratamento com as formulações placebo de nanopartículas (Nano-Gel), F <sub>NANO 1%</sub> e F <sub>NANO 2%</sub> (n=6)	<b>62</b>
<b>Figura 27</b>	Porcentagem de células de melanoma viáveis após tratamento com as formulações F1, F5, F <sub>NANO 2%</sub> e F6	<b>63</b>
<b>Figura 28</b>	Relação entre a quantidade de ropivacaína permeada através da pele em 6 horas e a ASCE <sub>0-680</sub> obtida	<b>65</b>
<b>Figura 29</b>	Eficácia anestésica evidenciada pela porcentagem de animais com analgesia em função do tempo	<b>66</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Principais classes de promotores de absorção	<b>13</b>
<b>Tabela 2</b>	Principais anestésicos locais disponíveis por via tópica	<b>18</b>
<b>Tabela 3</b>	Características físico-químicas da RVC em relação aos outros agentes AL	<b>23</b>
<b>Tabela 4</b>	Composição das formulações contendo RVC (w/w %)	<b>28</b>
<b>Tabela 5</b>	Composição e função dos elementos presentes nos géis	<b>28</b>
<b>Tabela 6</b>	Formulações avaliadas em culturas de fibroblastos Balb/c da linhagem 3T3 e células de melanoma murino B16F10	<b>37</b>
<b>Tabela 7</b>	Concentrações de gel (mg/mL) utilizadas nos testes de citotoxicidade e respectivas quantidades de RVC presentes. Concentrações do fármaco expressas em mg/mL e mM.	<b>37</b>
<b>Tabela 8</b>	Condições cromatográficas para a determinação de RVC em amostras de gel	<b>42</b>
<b>Tabela 9</b>	Valores DPR das concentrações de RVC (n=6) expressos em porcentagem para avaliação da precisão	<b>46</b>
<b>Tabela 10</b>	Valores das concentrações de RPV (n=6) determinados em µg/mL para avaliação da exatidão	<b>47</b>
<b>Tabela 11</b>	Valores de porcentagem de recuperação de RVC ( n=6) determinados para avaliação da exatidão	<b>47</b>
<b>Tabela 12</b>	Quantidade total de RVC presente em diferentes formulações de géis à base de Carbopol®	<b>49</b>
<b>Tabela 13</b>	Parâmetros de permeação dos diferentes géis de RVC através da pele de orelha de suínos (intervalo: 3-6 h)	<b>51</b>
<b>Tabela 14</b>	Valores de diâmetro médio, polidispersão e potencial zeta para as nanopartículas de alginato-quitosana (n=3)	<b>53</b>
<b>Tabela 15</b>	Parâmetros de permeação $F_{NANO\ 1\%}$ e $F_{NANO\ 2\%}$ através da pele de orelha de suínos (intervalo: 2-6 h)	<b>56</b>
<b>Tabela 16</b>	Duração da analgesia ( $T_{analgesia}$ ) e Área Sobre a Curva de Efeito em função do tempo (ASCE) para as diferentes formulações de ropivacaína em gel	<b>64</b>

## LISTA DE ABREVIACÕES

**AL:** Anestésico(s) Local (is)

**ASCE:** Área Sobre a Curva de Efeito x Tempo

**CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio

**Nano:** nanopartículas

**PPG:** Propilenoglicol

**PEG:** Polietilenoglicol

**RVC:** Ropivacaína

**F<sub>MENTOL</sub>:** Formulação com o promotor de absorção mentol

**F<sub>NANO 1%</sub>:** Ropivacaína 1% encapsulada em nanopartículas

**F<sub>NANO 2%</sub>:** Ropivacaína 2% encapsulada em nanopartículas

## RESUMO

Durante muito tempo, acreditou-se que a função primordial da pele era comportar-se como barreira a agentes químicos, físicos e microbiológicos. Hoje, entretanto, esta concepção mudou e verifica-se que a pele apresenta-se como uma estratégia para a administração cutânea de fármacos, possibilitando a utilização de formas farmacêuticas auto-administráveis, o que facilita a adesão ao tratamento quando se necessita de administrações repetidas. A ropivacaína (RVC), objeto desse estudo, é um anestésico local que além de induzir menor toxicidade ao sistema nervoso central e cardiovascular, não apresenta inconvenientes quanto aos efeitos adversos como metemoglobinemia e potencial alergênico causados pela benzocaína e lidocaína. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo desenvolver formulações contendo o anestésico local RVC para uso tópico, uma vez que não há forma comercial disponível. Sendo assim, a RVC foi associada a diferentes promotores de absorção ou a carreadores como nanopartículas de alginato-quitosana. Fatores como baixo potencial tóxico, alta permeabilidade através da pele, rápido início de ação e efeito prolongado do bloqueio anestésico foram avaliados para possível aplicação clínica.

Os resultados de permeação *in vitro* mostraram que as formulações de RVC com promotores de absorção (mentol, polietilenoglicol-PEG 600, polietilenoglicol-PEG 400 e PEG 600 associado a Span<sup>®</sup> 20) apresentaram rápido início de ação. A duração do bloqueio sensorial (*tail flick*) induzido por essas formulações foi significativo, com tempo de analgesia superior a 400 minutos, o que reflete um período desejável e satisfatório para aplicação tópica. No entanto, em termos de potencial citotóxico, as formulações com PEG 600 e PEG 600 associado a Span<sup>®</sup> 20 evidenciaram viabilidade celular inferior a 50 % tanto em cultura de fibroblastos quanto em cultura celular de melanoma. Esses dados de citotoxicidade mostram potencial irritativo para a pele e podendo inviabilizar essas formulações em termos de aplicação na prática clínica. A formulação com mentol não foi avaliada em termos de citotoxicidade em decorrência da insolubilidade do mentol nos meios de cultura DMEM (fibroblastos) e RPMI 1640 (células de melanoma). A RVC (2%) encapsulada em nanopartículas de alginato-quitosana mostrou o melhor perfil de permeação dentre todas as formulações desenvolvidas neste trabalho tanto em relação à velocidade de permeação e tempo para início de ação. Com referência ao potencial tóxico, a RVC 2% encapsulada em nanopartículas apresentou valores de viabilidade celular que assinalam citotoxicidade inferior a 50% tanto em fibroblastos quanto em células de melanoma. Esses dados indicam baixo potencial irritativo na pele e possibilidade de aplicação clínica. Além disso, a avaliação farmacológica mostrou que o tempo de analgesia foi superior a 600 minutos, o qual confirma a efetividade anestésica da formulação desenvolvida para anestesia tópica. Dessa forma, os resultados demonstram que a incorporação de RVC em nanopartículas de alginato-quitosana apresenta viabilidade para aplicação clínica devido aos excelentes resultados observados, os quais evidenciam boa penetração através da pele, rápido início de ação, toxicidade dérmica reduzida e tempo de analgesia prolongado.

## **ABSTRACT**

For a long time, the main function of the skin was acting as a barrier to chemical, physical and microbiological agents. However, nowadays, this concept has changed and the skin is presented as an important strategy as route of administration for several drugs, allowing the use of self-administered dosage forms, which enhances the compliance to the treatment, specially when frequent administrations are necessary. Ropivacaine (RVC), object of this study, is a local anesthetic able to induce less toxicity effects to the cardiovascular and to the central nervous system without inducing adverse effects such as methemoglobinemia neither allergenic potential similar to those of benzocaine and lidocaine. Thus, this work aimed to develop local anesthetic formulations containing the RVC, since there is no topical formulation commercially available for this drug. Therefore, RVC was associated with different permeation enhancers or nanocarriers such as alginate-chitosan nanoparticles. Factors such as low toxic potential, high permeability across the skin, fast onset of action and prolonged effect of anesthesia were evaluated for possible clinical application.

Results from *in vitro* permeation showed that RVC formulations with absorption enhancers (menthol, polyethylene glycol-PEG 400, PEG 600 and PEG 600 associated with Span<sup>®</sup> 20) showed fast onset of action. The duration of sensory block (*tail flick*) induced by these formulations was significant, with a time of analgesia than 400 minutes, a period which reflects desirable and suitable for topical application. However, in terms of cytotoxic potential, the formulations with PEG 600 and PEG 600 associated with Span<sup>®</sup> 20 showed cell viability below 50% both in culture of fibroblasts and melanoma cells. These data show cytotoxicity to skin irritant and can derail these formulations in terms of application in clinical practice. The menthol formulation was not evaluated in terms of cytotoxicity due to the insolubility of menthol in the DMEM culture medium (fibroblasts) and RPMI 1640 (melanoma cells). RVC 2% encapsulated in alginate-chitosan nanocapsules showed the best permeation profile of all the formulations developed in this work in terms of permeation rate and time to onset of action. Regarding to the toxic potential, RVC 2% encapsulated in nanoparticles showed values of cell viability lower than 50% cytotoxicity in melanoma cells and fibroblasts cultures. These data indicate low toxic potential to the skin and possible advantages on clinical application. In addition, the tail-flick test showed that the duration of analgesia was greater than 600 minutes, which confirms the effectivity of this anesthetic formulation for topical anesthesia. Our results demonstrated that RVC encapsulated in alginate-chitosan nanoparticles presented potential for clinical application due to the excellent results regarding to penetration through the skin, fast onset of action, reduced dermal toxicity and prolonged duration of analgesia.

## **I. INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas, várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de explorar e/ou inserir as vias de administração tópica, transdérmica e transmucosa como alternativas às vias parenteral e oral. As principais motivações residem nos fatos de i) serem vias não invasivas e convenientes para o acesso de fármacos ao organismo (tanto local quanto sistêmico); ii) apresentam vascularização adequada; iii) evitam a biotransformação de primeira passagem e, finalmente, iv) possibilitam a utilização de formas farmacêuticas auto-administráveis, o que permite a adesão ao tratamento quando se necessita de administrações repetidas (Song et al., 2004).

Os anestésicos locais (AL) são fármacos que possuem grande aplicação clínica em Medicina e Odontologia, sendo utilizados em bloqueios regionais, na indução de analgesia operatória e/ou pós-operatória, no tratamento da dor aguda e crônica e, até para tratar arritmias ventriculares (Carpenter e Dickenson, 2002; Krenzischek et al., 2008). No entanto, um dos inconvenientes mais relatados pelos pacientes é o efeito analgésico inadequado no local da injeção e/ou dos procedimentos cirúrgicos. Por isso, para contornar esses problemas são utilizados anestésicos tópicos no local específico do procedimento. Embora as sensações associadas à penetração da agulha não sejam completamente eliminadas, a administração tópica de um anestésico local reduz a dor e a ansiedade associados a procedimentos invasivos (Martin et al., 1994).

### **1 - A Pele**

A pele é o maior órgão do corpo humano, pesa aproximadamente 5 kg e apresenta cerca de 2 m<sup>2</sup> de área superficial em humanos adultos. Além disso, é um dos órgãos mais complexos, pois pelo menos cinco tipos diferentes de células contribuem para a formação de sua estrutura (Menon, 2002). As funções da pele, são atribuídas especialmente a formação de uma barreira seletiva que atua contra a permeação de moléculas exógenas (Menon, 2002; Godin e Touitou, 2007; Proksch et al, 2008). Por isso, para entender tais funções, é necessária uma descrição básica das três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1).

A epiderme é a camada mais externa da pele e apresenta espessura variável de acordo com a região do corpo, chegando a 0,6 mm nas plantas dos pés (Lacaz, 1973). Aproximadamente 95% da epiderme é constituída por células diferenciadas ricas em queratina, denominadas queratinócitos, onde aqueles localizados nas camadas inferiores encontram-se ancorados à membrana basal através de junções celulares chamadas de

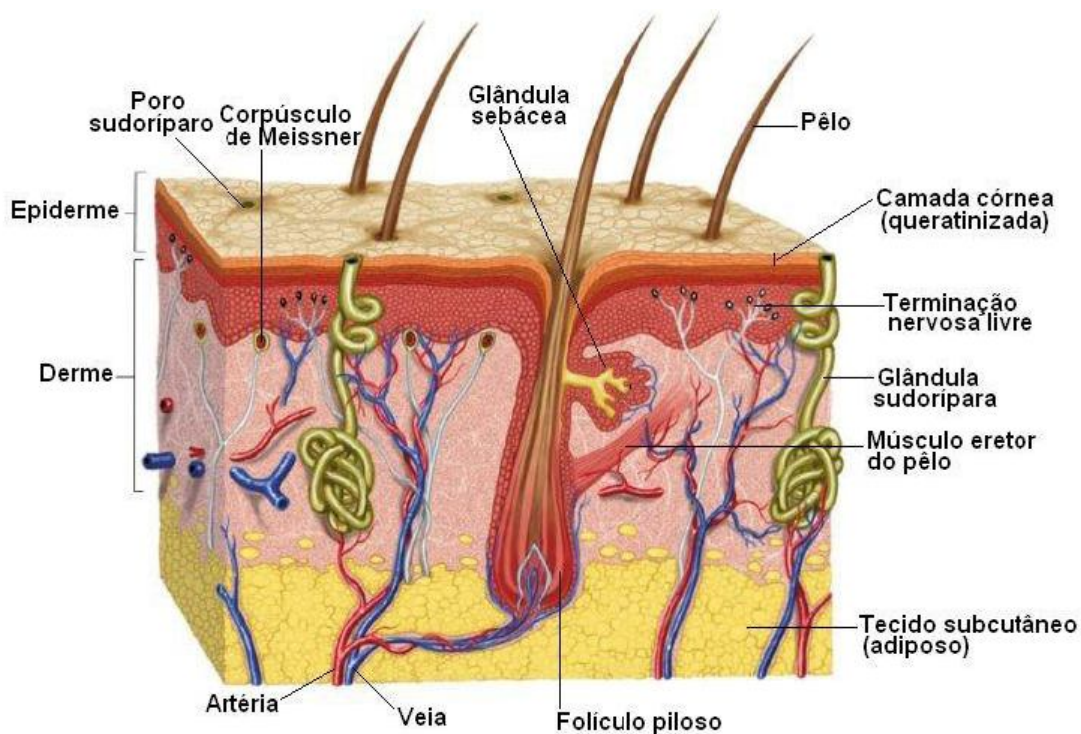
hemidesmossomos. As outras células que compõem a epiderme estão representadas pelos melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (mecanorreceptores).

A região superficial da pele, chamada de estrato córneo, está localizada na epiderme, apresenta 10 a 20  $\mu\text{m}$  de espessura e é responsável pela função de barreira primária à absorção percutânea de compostos e à perda de água (Jager et al., 2006). Essa estrutura córnea atua ainda como principal reguladora da penetração percutânea de diferentes compostos e é um marcador da integridade e função da pele (Karan et al, 2009).

A propriedade de barreira física à difusão de substâncias, característica do estrato córneo, é decorrente da presença de células ricas em queratina e domínios de lipídicos intercelulares (Jager et al, 2006; Groen et al, 2008; Proksch et al, 2008).

Abaixo do estrato córneo, situa-se a epiderme viável, que possui de 50 a 100  $\mu\text{m}$  de espessura e é responsável pela produção das células que, diferenciadas, originam o estrato córneo. A epiderme viável está subdividida em quatro camadas: *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* e *stratum germinativum* (Bouwstra et al., 2003).

A próxima camada, denominada derme, é formada por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas. Já a hipoderme, também conhecida como tecido celular subcutâneo é constituída por lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos (Azulay e Azulay, 1999).

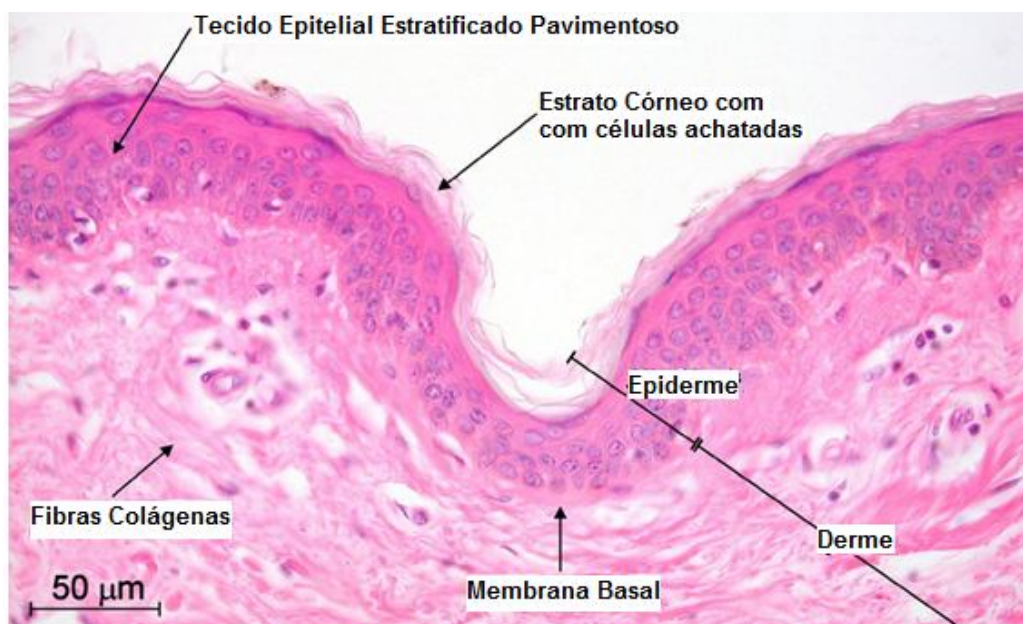


**Figura 1** - Representação esquemática das três camadas da pele humana: epiderme, derme e hipoderme. (<http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>. Acessado em 02 de dezembro de 2010)



## **1.1 - Caracterização Histológica e Bioquímica do Estrato Córneo**

Ao deixarem a camada basal, os queratinócitos começam a se diferenciar e, durante a migração através do estrato espinhoso e granuloso, sofrem uma série de mudanças tanto na estrutura quanto na composição. Os queratinócitos sintetizam e expressam diferentes proteínas estruturais e lipídios durante a sua maturação. A última seqüência da diferenciação dessas células está associada a profundas alterações em sua estrutura resultando em células planas, achatadas e anucleadas que caracterizam as escamas cornificadas resistentes do estrato córneo (Figura 2). Esta camada, altamente hidrofóbica, consiste portanto, de células diferenciadas chamadas cornéocitos que apresentam um envelope celular composto por proteínas (loricrina, involucrina e pequenas proteínas ricas em prolina) e lipídios (hidroxiceramidas) (Bouwstra et al., 2003).



**Figura 2** - Micrografia da pele humana destacando o estrato córneo pertencente a estrutura epidermal. (Adaptado de <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artaug02/gohisto.html>. Acessado em 03 de janeiro de 2011).

O estrato córneo é composto ainda por elementos do citoesqueleto, domínios intercelulares enriquecidos de lipídios (Godin e Touitou, 2007; Proksch et al., 2008; Sapra et al., 2008) e junções intercelulares chamadas desmossomos que interconectam os corneócitos. Esta camada de células não-viáveis atua, portanto, como principal obstáculo à permeação percutânea de substâncias químicas e microorganismos, além de resistir contra

forças mecânicas e estar envolvida na regulação da liberação de água do organismo para a atmosfera, conhecida como perda de água transepidermal (Bouwstra et al., 2003; Proksch et al., 2008).

Durante a diferenciação epidermal, os lipídios são sintetizados dentro dos queratinócitos e exportados para os domínios extracelulares, onde formam as camadas extracelulares enriquecidas de lipídios. As ceramidas A e B estão covalentemente ligadas às proteínas do envelope cornificado e formam a base para a subsequente adição de ceramidas livres, ácidos graxos livres e colesterol no estrato córneo. Atuam, portanto na estruturação e manutenção do estrato córneo (Kessner et al., 2008; Proksch et al., 2008).

Durante os estágios finais da diferenciação, a queratina é alinhada em uma variedade de interações altamente organizada e condensada com uma proteína da matriz: a filagrina. Esta proteína agrega os filamentos de queratina em feixes firmes. Isso promove o colapso da célula para a forma achatada que é característica dos corneócitos da camada cornificada. Juntas, queratina e filagrina constituem 80 a 90% da massa protéica da epiderme dos mamíferos. A importância da filagrina para a homeostasia da barreira epidermal é indicada por aberrações da expressão desta proteína em doenças como ictiose e dermatite atópica (Proksch et al., 2008).

Em condições normais, o estrato córneo é relativamente um tecido seco, apresentando 15 a 20% de água em relação ao peso seco. Aproximadamente 25% a 35% da água presente no estrato córneo está interagindo com a queratina. O restante está livre e disponível para agir como solvente para permeantes polares. Em razão disso, a hidratação desempenha um papel importante, principalmente no que se refere ao aumento da permeação de solutos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos (Williams e Barry, 2004).

Devido a especificidade da composição lipídica do estrato córneo, com a longa cadeia de ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol como principais classes, o comportamento da fase lipídica é diferente de outras membranas biológicas. No estrato córneo, fases cristalinas estão predominantemente presentes. Entretanto, uma subpopulação de lipídios forma uma fase líquida. Tanto a natureza cristalina quanto a presença de uma fase de 13 nm lamelar são consideradas fundamentais para a função de barreira da pele (Bouwstra et al., 2003).

Os fatores que determinam as quantidades de solutos, especialmente fármacos, permeadas pela pele incluem a concentração, o veículo, a solubilidade relativa do composto no veículo e a permeabilidade da barreira apresentada pelo estrato córneo (Morgan et al., 2003), como veremos a seguir.

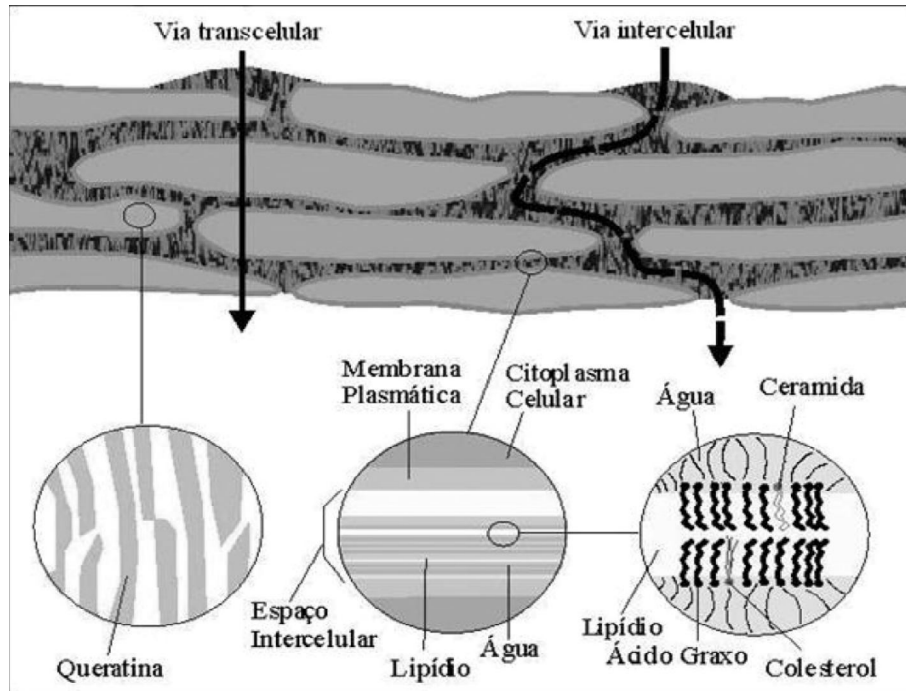
## **1.2 - Vias de Penetração de Substâncias através da Pele**

A maioria dos fármacos é administrada oralmente. Entretanto, devido a biotransformação de primeira passagem, esta via de administração torna-se limitada para uma série de compostos. Em vista disso, observa-se que recentemente, tem ocorrido um interesse crescente na administração de fármacos através da pele, tanto para o tratamento de doenças locais (via dérmica), bem como no nível sistêmico (via transdérmica) (Jager et al., 2006). Nesse sentido, a via dérmica apresenta-se como uma alternativa para a administração de princípios ativos, tendo atividade metabólica limitada (se comparada com a atividade metabólica hepática) e possibilitando um perfil de liberação contínuo do fármaco administrado (Bouwstra et al., 2003; Tanner e Marks, 2008).

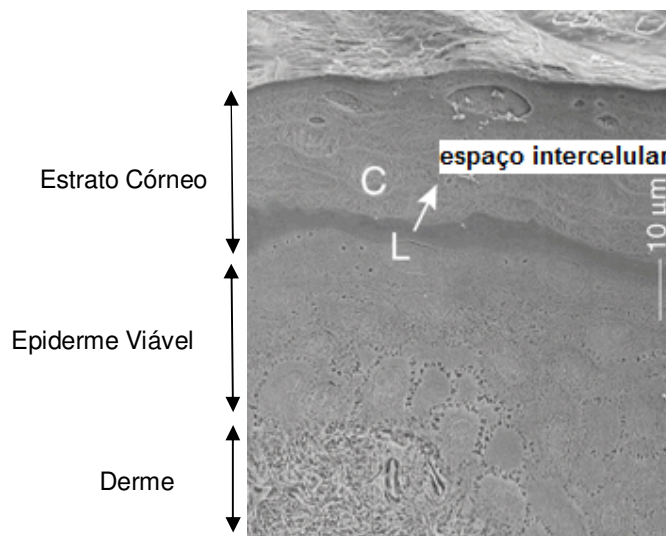
Desde a introdução de um sistema de liberação transdérmico para a escopolamina, em 1981, novas moléculas foram sugeridas para esse método de administração, tais como: fentanil, lidocaína, prilocaína, nitroglicerina, estradiol, etinilestradiol, acetato de testosterona, clonidina, nicotina etc. Entretanto, algumas características importantes devem ser observadas para liberação e permeabilidade adequadas de solutos (especialmente fármacos) como: lipofilicidade suficiente para se difundir no estrato córneo e hidrofiliabilidade suficiente para atingir a epiderme viável e a circulação sistêmica, quando desejável; carga elétrica, massa molecular, ponto de fusão, dose e frequência de administrações diárias (Matsuda e Arima, 1999; Thong et al., 2007).

Considerando essas características, os compostos químicos podem se difundir utilizando as seguintes vias (Figuras 3 e 4):

- Via intercelular: através dos domínios lipídicos intercelulares presentes no estrato córneo (Godin e Touitou, 2007);
- Via transanexal: através dos apêndices da pele, ou seja, folículos pilosos associados a glândulas sebáceas. Esta via foi considerada recentemente uma rota importante para a penetração de ativos (Jacobi et al., 2007) e um reservatório intracutâneo de formulações lipossomais (Thong et al., 2007);
- Via transcelular: através das células do estrato córneo, mais precisamente através dos feixes de queratina localizados dentro dos corneócitos (Godin e Touitou, 2007; Morrow et al., 2007).



**Figura 3** – Representação esquemática das vias de penetração de solutos através da pele (Gratieri et al., 2008)



**Figura 4** – Micrografia Eletrônica de Varredura mostrando a localização dos lipídios (L) no estrato córneo, preenchendo o espaço intercelular entre os corneócitos (C) (adaptado de Prausnitz e Langer, 2008).

A maioria das moléculas aplicadas à pele é permeada ao longo dos domínios lipídicos do estrato córneo. Sendo assim, a organização dessa região é muito importante para a função de barreira da pele (Godin e Touitou, 2007; Bouwstra et al., 2003).

Kanikkannan et al., (2000) classifica as vias para a penetração de fármacos através da pele levando em consideração a polaridade, sendo: via polar e via não-polar. Admite ainda que os solutos possam ser permeados por qualquer uma dessas vias ou até mesmo por ambas. Na via polar, o mecanismo de penetração dos fármacos consiste em causar uma mudança conformacional na proteína ou intensificação da ação solvente. Já na via não-polar, a permeação está baseada na alteração da rigidez da estrutura lipídica e sua consequente fluidização.

As substâncias promotoras de absorção, capazes de aumentar a velocidade de penetração de alguns compostos, podem ainda utilizar as vias polar e não-polar para carrear moléculas por meio da desnaturação das proteínas e dos lipídios presentes na pele (Thong et al., 2007).

## **2 - Modelos de Pele**

Diferentes modelos têm sido sugeridos como substitutos adequados para a pele humana e utilizados para avaliar a permeação cutânea de diversos tipos de moléculas. Estes modelos incluem peles de primatas, suínos, ratos e cobras.

O modelo atualmente mais aceito e utilizado é a pele de suínos devido à grande similaridade com a pele humana, em termos de propriedades bioquímicas e de organização histológica. Por isso, o modelo de pele de orelha de suínos é descrito como o mais adequado para estudos de permeação e fornece resultados comparáveis à pele humana (Herkenne et al., 2006; Jacobi et al., 2007; ).

Em relação aos aspectos bioquímicos a semelhança é observada no arranjo das fibras colágenas na derme, bem como no conteúdo de glicoesfingolipídios e ceramidas no estrato córneo (Godin e Touitou, 2007).

Estudos realizados por Simon e Maibach (2000) demonstraram também que o estrato córneo de suínos apresenta de 21 a 26  $\mu\text{m}$  de espessura, o qual é comparável à pele humana. Além disso, a epiderme viável da orelha de suínos possui de 66 a 72  $\mu\text{m}$  de espessura, muito semelhante à espessura epidérmica humana (70  $\mu\text{m}$ ). Por último, destaca-se a semelhança em termos de densidade de folículos pilosos, em que se observa uma média de 20 pêlos a cada  $\text{cm}^2$  de pele de orelha de porco, enquanto em humanos são

encontrados de 14 a 32 pêlos a cada  $\text{cm}^2$  de pele, exceto a área da testa (Godin e Touitou, 2007).

Em termos experimentais, a viabilidade de aquisição, a facilidade de dissecação e a separação do tecido subcutâneo, da pele de suínos foram os fatores decisivos para a escolha deste modelo pele como membrana para os estudos de permeação (Sato et al., 2007).

### **3 - Estudos de Permeação *In Vitro***

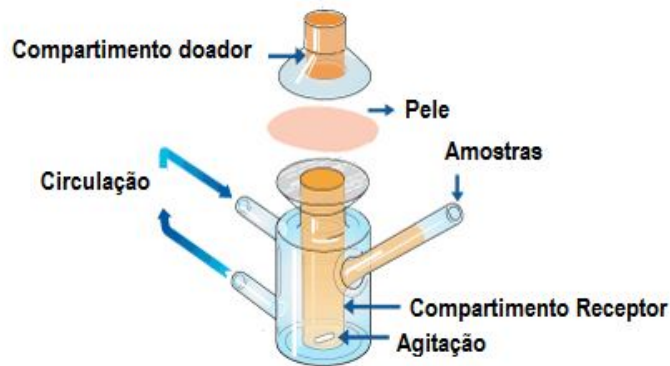
A base dos experimentos *in vitro* de permeação cutânea é determinar as pequenas quantidades de fármaco que atravessam as membranas ou ficam retidos nas mesmas. Sendo assim, a utilização de um método analítico sensível para determinar essas concentrações é extremamente importante (Sato et al., 2007).

Tais ensaios são executados em um sistema com dois compartimentos, separado por uma membrana, denominado célula de Franz (Figura 5). A membrana modelo é alocada entre os dois compartimentos, onde um deles contém a formulação em estudo (solução doadora) e o outro, a solução receptora (Figura 6). A pele preparada é posicionada entre os dois compartimentos de modo que o estrato córneo permaneça voltado para o compartimento receptor. O sistema deve possibilitar agitação constante, temperatura controlada e facilidade de amostragens da solução receptora (Franz, 1975).



**Figura 5** – Modelos de células de Franz disponíveis comercialmente.

(Extraído de <http://permegear.com/franzpics.htm>. Acessado em 11 de janeiro de 2011).



**Figura 6** - Esquema representativo da célula de Franz mostrando os compartimentos doador e receptor (Adaptado de <http://permegear.com/franz.htm>. Acessado em 29 de junho de 2009)

Os dados dos estudos de permeação são analisados de acordo com a lei de difusão de Fick, que descreve o transporte de permeantes através da pele. De acordo com esta lei, a difusão é entendida como a transferência de massa de solutos individuais, impulsionado pelo movimento molecular ao acaso (Touitou et al., 2002). Sendo assim, a razão de transporte pode ser expressa pela equação 1:

$$J = \frac{A \cdot D \cdot Kp (c1-c2)}{h} \quad (1)$$

onde **A** é a área de contato, **D** é o coeficiente de difusão, **Kp** é o coeficiente de partição, **c1-c2** é a diferença de concentração, **h** é a espessura da membrana e o fluxo (**J**) é a taxa de passagem da substância em função do tempo. Dessa forma, observa-se que a velocidade de permeação de um fármaco está relacionada com a concentração, o coeficiente de difusão, o coeficiente de partição da substância aplicada e com a área da membrana (Hadgraft, 2001).

É importante destacar ainda que a primeira lei de Fick, mencionada anteriormente, é aplicável somente para membranas homogêneas, ou seja, membranas que não apresentem variação no coeficiente de permeabilidade ao longo de sua espessura e cujo fluxo seja constante desde o início. No entanto, verifica-se que esta situação não é observada em membranas biológicas, como o estrato córneo. O que se observa experimentalmente é uma pequena curvatura nos primeiros tempos de fluxo, indicando que o mesmo não é constante com a variação do tempo. Tal curvatura é explicada pelo fato de que a velocidade de absorção das moléculas é marcada por um tempo de latência, ou seja, um período de tempo necessário para que seja estabelecido o gradiente de concentração.

Posteriormente, em tempos maiores de permeação, verifica-se que o gráfico da quantidade de soluto permeado por área em relação ao tempo aproxima-se de uma linha reta. Nesse período, o equilíbrio é alcançado e a velocidade de penetração das moléculas na derme é igual à velocidade de penetração no nível da epiderme (Lira, 2003; Aulton, 2005).

#### **4 - Promotores de Absorção**

Durante muito tempo, acreditou-se que a função primordial da pele era comportar-se como barreira a agentes químicos, físicos e microbiológicos (Proksch et al., 2008). Hoje, entretanto, esta concepção mudou e verifica-se que o estrato córneo, apesar da baixa permeabilidade, apresenta-se como uma estratégia para a administração cutânea de fármacos para ação local e sistêmica.

Para minimizar a dificuldade na absorção cutânea de fármacos, vários estudos vêm sendo realizados com o propósito de encontrar métodos eficientes e seguros que aumentem a penetração das substâncias através da pele (Cornélio e Mayorga, 2007), uma vez que o principal obstáculo à permeação de solutos reside na camada não-viável do estrato córneo (Godin e Touitou, 2007; Sapra et al., 2008). Por isso, é importante ressaltar que a eficácia de um sistema para liberação tópica/transdérmica de fármacos depende da disponibilidade de concentrações suficientes do fármaco para se obter o efeito terapêutico.

Dentre os métodos utilizados para facilitar a permeação de solutos através da pele destacam-se aqueles *ativos* (como iontoforese e eletroporação, por exemplo) e os métodos *passivos* (como o uso de compostos químicos promotores de absorção), os quais serão enfatizados a seguir.

As substâncias químicas denominadas de promotores de absorção têm sido utilizadas com a finalidade de aumentar a penetração de produtos químicos em todo o estrato córneo. Para tanto, são conhecidas mais de 360 moléculas dotadas de tal propriedade, pertencentes principalmente às classes de ácidos graxos, terpenos, tensoativos e solventes (Ibrahim e Li, 2009; Sapra et al., 2008). Esses promotores de absorção atuam aumentando a penetração das drogas por diminuir reversivelmente a barreira de resistência oferecida pelo estrato córneo (Williams e Barry, 2004; Sapra et al., 2008).



#### **4.1 - Promotores Químicos**

Muitos promotores de absorção têm sido estudados na tentativa de superar a função de barreira imposta pelo tecido cutâneo. Entre os mais difundidos, destacam-se os promotores químicos cuja ação está baseada na alteração das propriedades de barreira da pele (Ibrahim e Li, 2009; Cornélio e Mayorga, 2007; Sapra et al., 2008), desregulando ou fluidizando os domínios lipídicos e dessa forma, aumentando a solubilidade do fármaco no estrato córneo (Bouwstra et al., 2003).

Embora uma parte significativa de produtos tenha sido classificada como promotores químicos, somente um número limitado destes compostos são incorporados em produtos tópicos ou transdérmicos, possivelmente devido ao pouco conhecimento dos mecanismos de ação desses promotores ou dos efeitos indesejáveis como irritação da pele (Ibrahim e Li, 2009). Sendo assim, as propriedades desejáveis para um promotor de absorção são (Williams e Barry, 2004; Thong et al., 2007):

- Não apresentar toxicidade, irritação e ser não-alergênico.
- Não se ligar a receptores.
- Quando removido da pele, as propriedades de barreira devem ser restabelecidas rapidamente e em sua totalidade.
- Deve ser compatível com excipientes e com a droga a ser carregada.

Basicamente, pode-se afirmar que a ação dos promotores químicos ocorre com o aumento da perturbação ou fluidização da estrutura lipídica do estrato córneo. Os promotores químicos podem ainda desnaturar proteínas, desmontando a estrutura dos desmossomos ou desnaturar a queratina, alterando a estrutura dos corneócitos no estrato córneo (Ibrahim e Li, 2009).

Sabe-se também que o mecanismo de aumento da permeação realizado pelos promotores está relacionado à melhoria da partição do composto permeante dentro do domínio lipídico do estrato córneo, alterando a atividade termodinâmica ou a solubilidade do fármaco. Portanto, os promotores ocupam um papel de destaque, uma vez que o aumento da absorção de um fármaco na pele pode ser facilitado pela ação desses compostos (Sapra et al., 2008; Ibrahim & Li, 2009).

Apesar do desempenho bastante satisfatório, os promotores químicos são vistos com cautela, principalmente em preparações transdérmicas devido ao seu potencial irritativo, quando utilizados em concentrações necessárias para se obter níveis adequados ou mais altos de permeação (Sapra et al., 2008).

A maioria dos promotores químicos presentes em produtos de liberação transdérmica são altamente lipofílicos (Ibrahim & Li, 2009). Touitou et al. (1988) testaram a permeação de tetrahydrocannabinol através de um promotor contendo 10% da mistura de ácido oléico, propilenoglicol, polietilenoglicol 4000 e etanol. Nesse estudo, realizado em pele de roedores, os resultados mostraram que a permeabilidade foi aproximadamente 12,8 vezes maior que a da pele humana. Além disso, diferentes tempos para início da permeação (*time lag*) foram observados (sendo 11,5 h para a pele de roedor e 8,5 h para a pele humana), mostrando a possibilidade de diferentes vias de difusão das drogas na pele das duas espécies.

A tabela abaixo (Tabela 1) reúne informações sobre os principais promotores de absorção descritos.

**Tabela 1** – Principais classes de promotores de absorção

Promotores de absorção	Representantes da classe	Mecanismo de ação	Referências
Alfa-Hidroxiácidos	Ácido Glicólico Ácido Lático Ácido Málico Ácido Tartárico Ácido Cítrico	Perda da coesão dos corneócitos; Descamação e diminuição da espessura do estrato córneo.	Copoví et al., 2006; Fartasch et al., 1997; Berardesca et al., 1997
Polióis	Poli-etilenoglicol Propilenoglicol Etilenoglicol Dietilenoglicol Dipropilenoglicol Glicerol	Solubilizantes do princípio ativo no veículo; aumentam a disponibilidade para permeação	Williams e Barry, 2004; Herkenne et al., 2006
Terpenos	D-limoneno, β-careno, α-terpinol, Piperitona, 1,8-cineol, Mentol, Óleo de ylang-ylang ( <i>Cananga odorata</i> )	Interagem com os domínios lipídicos do estrato córneo, fluidizando-os, ou extraíndo-os para a permeação do fármaco	Thong et al., 2007; Sapa et al., 2008; Morrow et al., 2007
Laurocapram	Azone <sup>®</sup>	Altera a camada lamelar do estrato córneo promovendo seu rompimento e facilitando o particionamento da droga a ser carregada	Nicolazzo et al., 2004; Williams e Barry, 2004; Thong et., 2007; Sapa et al., 2008
Ácidos Graxos	Ácido oléico, Ácido linoléico, Ácido heptanóico, Ácido capríco, Ácido cáprico, Ácido esteárico	Atuam nas camadas lipídicas intercelulares, através da perturbação das cadeias fosfolipídicas	Valenta e Auner, 2004; Morrow et al., 2007
Álcoois	Etanol, Butanol, Propanol, Pentanol, Álcool benzílico	Agentes solubilizantes que extraem os lipídios do estrato córneo facilitando a difusão do fármaco	Fang et al., 2008 Morrow et al., 2007

## **5 - Anestésicos Locais**

Atualmente, propõe-se que os AL atuam na proteína-canal de sódio, podendo ligar-se a uma ou mais regiões diferentes do mesmo e bloquear o transporte desse íon (Ragsdale et al., 1994, 1996; Ragsdale e Avoli, 1998; Li et al., 1999). Além disso, a correlação direta entre hidrofobicidade e potência anestésica indica que a presença de grandes quantidades do AL na bicamada lipídica é importante para a inativação do canal de sódio (Butterworth e Strichartz, 1991; de Paula e Schreier, 1996), enquanto a inserção preferencial de diferentes AL no interior da bicamada lipídica indica a formação de um sítio transiente, facilitando o acesso da molécula ao(s) sítio(s) de ligação no canal de sódio voltagem-dependente (Fraceto et al., 2002, 2005, 2006; de Paula et al., 2008).

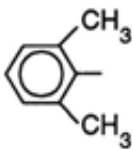
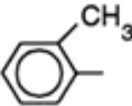
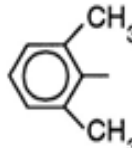
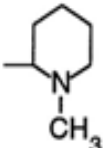
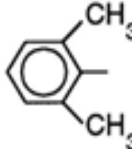
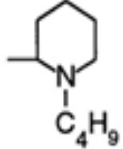
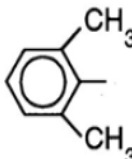
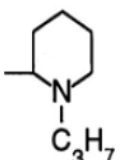

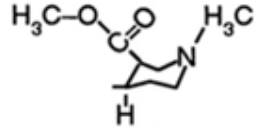
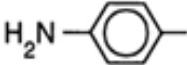
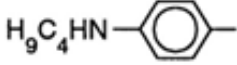
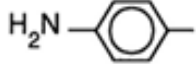
Quimicamente, os AL são constituídos por uma região lipofílica representada por um anel aromático e outra região hidrofílica representada por uma amina terciária. Estas regiões podem ser ligadas por um grupo éster (-CO-) ou amida (-NHC-), determinando a classificação dessas moléculas em amino-amidas ou amino-ésteres (Friedman et al., 1999; Golembieswsky, 2007), descritos a seguir.

Os AL mais comumente usados em clínica médica e odontológica são pertencentes à classe das amino-amidas: bupivacaína, ropivacaína, lidocaína, mepivacaína e prilocaína (Koehler e Kirch, 2005) (Figura 7). Esses fármacos são biotransformados por via hepática e apresentam estabilidade química superior aos AL do tipo amino-éster (Covino, 1986; Malamed, 2001).

No entanto, o uso desses fármacos não exclui a possibilidade de efeitos tóxicos, como metemoglobinemia - mais comum após a administração de benzocaína, prilocaína e lidocaína - cardio e neurotoxicidade frequentemente relatadas após o uso de bupivacaína, embora atualmente seja atribuída ao seu isômero levógiro (levobupivacaína) a redução da toxicidade sistêmica (Mather, 2010).

Já os AL do tipo amino-éster incluem principalmente a cocaína, procaína, tetracaína e benzocaína e são hidrolisados pela colinesterase plasmática ocasionando uma redução na estabilidade em relação aos agentes amino-amidas (Malamed, 2001).

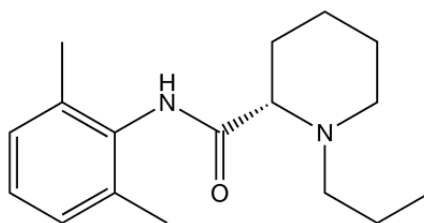
Quanto à toxicidade, a tetracaína está mais relacionada com a incidência de reações alérgicas em comparação com outros AL como prilocaína e lidocaína. Já a benzocaína, outro representante da classe, durante a absorção percutânea em formulações tópicas sofre hidrólise enzimática pelas esterases da pele levando à formação do ácido p-aminobenzóico (PABA). Este subproduto do metabolismo anestésico já é conhecido pelo seu elevado potencial alergênico, podendo causar até mesmo choque anafilático (Queiroz et al., 2008; Kravitz, 2007).

<u>AMIDAS</u>	Grupo Aromático	Cadeia Intermediária	Grupo Amino-terminal
Lidocaína		$\text{-NH-C(=O)-CH}_2\text{-}$	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
Prilocaina		$\text{-NH-C(=O)-CH(CH}_3\text{)-}$	$\text{-N(C}_3\text{H}_7)_2$
Mepivacaína		$\text{-NH-C(=O)-}$	
Bupivacaína		$\text{-NH-C(=O)-}$	
Ropivacaína		$\text{-NH-C(=O)-}$	
<u>ÉSTERES</u>			
Cocaína		$\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	
Procaína		$\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	$\text{-N(C}_2\text{H}_5)_2$
Tetracaína		$\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	$\text{-N(CH}_3)_2$
Benzocaína		$\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$	

**Figura 7** – Estrutura química dos principais anestésicos das classes amino-amida e amino-éster. (adaptado de Butterworth, 2002)

## **5.1 - Ropivacaína administrada por via tópica: uma alternativa aos anestésicos tradicionais?**

A ropivacaína (RVC) (Figura 8) é um AL amino-amida, que apresenta em sua estrutura química um grupamento propil ligado ao nitrogênio piperidínico da molécula. Foi introduzida na prática clínica em 1996 sob a forma de um isômero levógiro puro, diferenciando-se dos outros AL tradicionalmente disponíveis como misturas enantioméricas (Simonetti, 1995; McLure e Rubin, 2005).



**Figura 8** - Estrutura química da RVC

Quanto às características físico-químicas, a RVC apresenta um menor valor de coeficiente de partição octanol/água ( $P=132$ ) que a bupivacaína ( $P=136$ ) sendo menos lipofílica e 40-50% menos potente que a bupivacaína (Tabela 2) (de Araujo et al., 2004, 2008; McLure e Rubin, 2005). Como reflexo da lipossolubilidade, a porcentagem de interação da RVC com proteínas plasmáticas é alta (94%), permitindo que a duração da ação anestésica seja mais prolongada que o efeito obtido com a lidocaína, a qual dispõe de apenas 55% de ligação com as proteínas plasmáticas (Golembieswsky, 2007).

Com relação à farmacocinética, a RVC é biotransformada no fígado por diferentes isoenzimas do citocromo P-450, originando como metabólitos encontrados em análises de urina humana, 3-hidroxi-ropivacaína, 4-hidroxi-ropivacaína, e 2-hidroximetilropivacaina, entre outros (Reif et al., 1998).

A ampla utilização da RVC na prática clínica deve-se ao seu perfil farmacológico semelhante à bupivacaína, porém associado à baixa toxicidade sistêmica. A administração de RVC favorece o predomínio do bloqueio sensorial em relação ao motor, sendo um dos motivos de sua utilização na anestesia epidural e no alívio da dor pós-operatória (Leone et al., 2008).

A RVC é menos tóxica para o sistema cardiovascular e para o sistema nervoso central (Reif et al., 1998; Zuo et al., 2004). Estudos mostram que a dose cumulativa de RVC para produzir parada cardíaca em ratos é de  $108 \pm 27$  mg/kg, enquanto para levobupivacaína é de  $57 \pm 8$  mg/kg e bupivacaína racêmica  $39 \pm 9$  mg/kg. Além disso, após

injeções intravasculares de RVC em voluntários saudáveis não foram relatados acidentes vasculares cerebrais, alterações eletrocardiográficas (como alargamento do complexo QRS) e nem na frequência cardíaca (Leone et al., 2008). Ainda em relação à toxicidade, um outro ponto importante é que não há relatos na literatura de ocorrência de metemoglobinemia, complicação esta muito comum após o uso de outros AL, como lidocaína, prilocaína, procaína e benzocaína (Brisman et al., 1998; Alster, 2007; Moore et al., 2004; Chung et al., 2010).

Historicamente, deve-se ao oftalmologista Karl Köller em 1884, a descoberta da anestesia tópica com a utilização da cocaína, um alcalóide isolado por Albert Niemann, em 1859, proveniente das folhas de *Erithroxylon coca*. Em seu trabalho, Köller descreveu que a cocaína em solução promoveu a anestesia da córnea durante procedimentos cirúrgicos oftálmicos. No entanto, os efeitos tóxicos (dependência física e psíquica) causados pela cocaína fizeram com que a mesma fosse substituída por novos agentes AL como procaína, prilocaína, lidocaína entre outros (Malamed, 2001; França, 2010).

A anestesia tópica é utilizada para minimizar a ansiedade, a dor e o desconforto no local da inserção da agulha antes da anestesia local (Martin et al., 1994; Hersh et al., 1996; Fukayama et al., 2002; Musawi e Andersson, 2010) em procedimentos cirúrgicos dermatológicos (Friedman et al., 1999), oftálmicos, como por exemplo, em cirurgias de catarata (Fernández et al., 2009; Caccavale et al., 2010), na mucosa oral para procedimentos odontológicos (Tadicherla e Berman, 2006) e em tratamentos à laser (Kawesky, 2008). As principais formulações encontram-se disponíveis na forma de cremes e géis.

As formas farmacêuticas contendo AL em géis e cremes são úteis na tentativa de reduzir a dor e o edema associados à introdução da agulha no local de aplicação (Arnold, 2006). Porém, os problemas relacionados ao uso desses anestésicos referem-se à baixa adesão na mucosa oral ou na pele e à diluição na saliva, reduzindo a quantidade de formulação disponível, a área de permeação e a intensidade do efeito anestésico (Bagesund e Tabrizi, 2008).

A tabela abaixo (Tabela 2) reúne as principais informações composição, duração e efeitos dos principais anestésicos destinados a utilização por via tópica

**Tabela 2 – Principais anestésicos locais disponíveis por via tópica**

<b>Formulação</b>	<b>Agente Farmacológico</b>	<b>Aplicações Terapêuticas</b>	<b>Efeitos Adversos</b>	<b>Referências</b>
<b>TAC</b>  Primeira mistura anestésica tópica.  Uso proibido	Gel  0,5% Tetracaína 0,05% Epinefrina 11,8% Cocaína	Feridas da face e couro cabeludo, exceto mucosas, pele queimada e feridas extensas	Toxicidade severa, ataques cardíacos e morte súbita	Kundu & Achar, 2002; Tadicherla & Berman, 2006; Alster 2007; Kravitz, 2007
<b>LET</b>  Componente de alguma formulação líquida ou gel  Não disponível comercialmente Géis	Gel  4% Lidocaína 0,05% Epinefrina 0,5% Tetracaína	Lacerações da pele, exceto mucosas e feridas superiores a 6 cm de comprimento	Nenhum efeito de toxicidade foi relatado	Kundu & Achar, 2002; Kravitz, 2007; Kaweski, 2008
<b>PROFOUND e PROFOUND PET</b>	Géis  10% Lidocaína 10% Prilocaína 4% Tetracaína 2% Fenilefrina (somente PROFOUND PET)	Cirurgias a laser de tecidos moles e tratamentos dentários	Alergias	Kravitz, 2007



Tabela 2 – Continuação

Formulação	Agente Farmacológico	Aplicações Terapêuticas	Efeitos Adversos	Referências
* <b>EMLA®</b> Aprovado pela FDA	Creme 2,5% Lidocaína 2,5% Prilocaína	Anestesia antes de injeções intramusculares, punções intravenosas, curetagem, biópsia, circuncisão, tratamentos a laser e cirurgias dérmicas. É usado sobre a pele intacta, exceto em mucosa e com oclusão	Dermatite de contato, Metemoglobinemia, inchaço, vermelhidão ou branqueamento no local da aplicação e potencial lesivo quando aplicado próximo a região ocular	Eichenfield et al., 2002; AstraZeneca, 2004; Koh et al., 2004; Al-Melh e Andersson, 2007; Ohzeki et al., 2008; Timmermans, 2008
<b>BENZOCAÍNA</b> * <b>Benzotop</b>	Gel 20% Benzocaína	Utilizada na pele e mucosa oral antes de injeções para reduzir a dor no momento da inserção da agulha	Alergias	Shin et al., 2003; Al-Melh e Andersson, 2007; Queiroz et al., 2008; Chung et al., 2010
<b>BETACAÍNA-LA</b> Não aprovada pelo FDA Não está disponível no Brasil	Pomada Lidocaína Prilocaína Dibucaína Vasoconstritor As concentrações não foram reveladas pelo fabricante	Usada sem oclusão para analgesia dérmica em áreas inferiores a 300cm <sup>2</sup>	Não foram relatados	Friedman et al., 1999

Tabela 2 – Continuação

Formulação	Agente Farmacológico	Aplicações Terapêuticas	Efeitos Adversos	Referências
<b>LIDOCAÍNA</b>				
<b>ELA-Max 4%</b> <b>* Dermomax®</b>	Creme 4% Lidocaína lipossomal	<b>ELA-Max 4%</b> Atua na pele intacta sem a necessidade de oclusão. Age no alívio de dores temporárias de pequenos cortes, antes de <i>peelings</i> químicos e de injeções.	Não foram relatados efeitos adversos de ELA-MAX 4 ou 5%	Friedman et al., 1999; Eichenfield et al., 2002; Kundu & Achar, 2002; Koh et al., 2004; Luhmann et al., 2004; Alster, 2007
<b>ELA-Max 5%</b> Não está disponível no Brasil	Creme 5% Lidocaína lipossomal	<b>ELA-Max 5%</b> Destina-se a uso anorretal		
<b>* Xylocaina®</b>	Spray a 10% Pomada a 5%	Utilizada antes da remoção de tatuagens; procedimentos endoscópicos e cirurgias oculares	Poucos casos de alergias. Efeitos mais comuns: edema e eritema transitórios	Fernández et al., 2009; Railan e Alster, 2007; kaweski, 2008; Jussi e Lammintausta, 2009
<b>Dentipatch®</b>	<i>Patch</i> 20% Lidocaína	Anestesia tópica intraoral	Não foram relatados efeitos adversos	Leopold et al., 2002; Tadicherla e Berman, 2006; Bagesund & Tabrizi, 2008

Tabela 2 – Continuação

Formulação	Agente Farmacológico	Aplicações Terapêuticas	Efeitos Adversos	Referências
<b>S-CAINE PEEL</b> Aprovado pelo FDA	Creme 7% Lidocaína 7% Tetracaína	Analgesia em procedimento dermatológico, crioterapia, injeções de colágeno e tratamentos a laser. Não necessita de oclusão. Forma-se uma película a qual é removida antes do procedimento	Eritema leve e transitório	Bryan e Alster, 2002; Tadicherla e Berman, 2006; Alster, 2007; Kawesky, 2008 Morrow et al., 2007
<b>S-CAINE PATCH</b> <b>Synera™</b>	<i>Patch</i> 70mg Lidocaína 70mg Tetracaína	Analgesia antes de punção venosa. O aumento da temperatura do <i>patch</i> em 5°C facilita a liberação dos anestésicos	Eritema	Cada et al., 2006; Tadicherla e Berman, 2006; Sawyer et al., 2009
<b>AMETOCAINA</b> Não foi aprovada pelo FDA Não está disponível no Brasil	Gel 4% Tetracaína	Alívio da dor durante punção venosa e canulação. Usada sob oclusão	Não foram relatados efeitos adversos	Friedman et al., 1999; Dennis et al., 2004; O' Brien et al., 2004

\* Formulações comercialmente disponíveis no Brasil

A benzocaína e a lidocaína são os AL mais frequentemente utilizados por via tópica tanto para administração na pele quanto em mucosas. No entanto, a utilização desses anestésicos apresenta inconvenientes quanto aos efeitos adversos como metemoglobinemia e potencial alergênico quando usados em concentrações elevadas e anestesia insuficiente relacionadas ao tipo de formulação veiculada.

A maioria dos estudos relatando efeitos farmacológicos, eficácia clínica e toxicidade sistêmica, relacionados à RVC referem-se às vias de administração infiltrativas ou a bloqueios regionais. No entanto, pouco se sabe sobre a aplicação tópica desse AL.

No trabalho de Caccavale et al., (2010) foi verificado que o uso da solução de ropivacaína 1% para instilação em mucosa ocular (em cirurgia de pterígio) foi eficiente, uma vez que os pacientes não necessitaram de anestesia ou sedação complementar além de reduzir a dor durante todo o procedimento cirúrgico.

Os estudos de Franz-Montan et al., (2007) mostraram que a ropivacaína em gel a 1% apresentou eficácia anestésica similar à formulação comercial de benzocaína 20% na redução da dor associada à inserção da agulha na mucosa oral. Também foi verificado em testes clínicos envolvendo 40 voluntários saudáveis, o efeito da ropivacaína lipossomal 2% aplicada na mucosa oral. A formulação em estudo também possibilitou redução da dor associada à inserção da agulha, entretanto não foi capaz de induzir anestesia pulpar (Franz-Montan et al., 2010).

Dessa forma, as investigações sobre os efeitos anestésicos de formulações contendo RVC, administradas por via tópica em mucosas permanecem controversos associados ao fato de que são poucos os relatos na literatura de estudos para esclarecer os fatores interferentes na permeação desses AL através de barreiras biológicas como a pele. Sendo assim, propõe-se o uso de novas formulações com AL que apresentem características físico-químicas favoráveis, como lipofilicidade, além de baixo potencial tóxico, como a RVC. Além disso, considerando-se as propriedades particulares dos compostos promotores de absorção (solubilizantes e promotores do aumento da permeabilidade dos fármacos), a utilização desses em formulações contendo AL favoreceria um rápido início de ação, uma duração de ação prolongada associada à maior permanência do fármaco no local de administração promovendo sua liberação em regiões restritas da pele.

**Tabela 3** – Características físico-químicas da RVC em relação aos outros agentes AL

<b>Classes de Anestésicos</b>	<b>Massa Molar</b>	<b>pKa (25°C)</b>	<b>Velocidade de início de ação</b>	<b>Coefficiente de partição</b>	<b>Potência</b>	<b>Interação Proteínas Plasmáticas (%)</b>
<b>Amino-Amidas</b>						
Lidocaína	234	7,7	Rápido	114**	Intermediária	64
Prilocaína	220	7,9	Rápido	57**	Intermediária	55
Mepivacaína	246	7,9	Lento	93**	Intermediária	77
Bupivacaína	288	8,1	Lento	136**	Alta	95
Ropivacaína	274	8,1	Lento	132**	Intermediária	94
<b>Amino-Ésteres</b>						
Cocaína	303	8,7	Lento	-	Alta	98
Procaína	236	9,0	Lento	1,7*	Baixa	6
Tetracaína	264	8,6	Lento	221*	Intermediária	76
Benzocaína	165	3,5	Lento	-	Intermediária	-

\* Coeficiente de Partição octanol/água (McLure e Rubin, 2005)

\*\* Coeficiente de partição lipídio/água (de Araujo et al., 2004; de Araujo et al., 2008)

## **II. OBJETIVOS**

Este trabalho teve por objetivo desenvolver formulações contendo o anestésico local RVC em uma base-gel associada a diferentes promotores de absorção ou a carreadores como nanopartículas de alginato-quitosana. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

- Preparação de formulações de RVC em gel à base de polímero de ácido acrílico (Carbopol<sup>®</sup>) contendo promotores de absorção de diferentes classes como tensoativos (Span<sup>®</sup>20), polióis (propilenoglicol, polietilenoglicol 400 e 600) e terpenos (mentol) ou nanopartículas de alginato-quitosana;
- Caracterização das formulações preparadas quanto ao conteúdo de fármaco em função do tempo;
- Realização de ensaios de permeação *in vitro*, utilizando como barreira pele de orelha de suínos, para determinação dos parâmetros de permeação (tempo para início de liberação ou *time lag* e fluxo);
- Realização de ensaios de citotoxicidade *in vitro* para avaliar o efeito das diferentes formulações em cultura de células de linhagens específicas como fibroblastos 3T3 e melanoma murino B16F10;
- Avaliação da atividade farmacológica *in vivo* comparando a duração e a intensidade da analgesia induzidas pela administração tópica de cada formulação.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **1- Drogas, Sais, Solventes e Adjuvantes Farmacotécnicos**

- Anestésico local: cloridrato de RVC (Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda, Lote 03718/09).
- Fosfato de Sódio Monobásico 1M e Fosfato de Sódio dibásico diidratado 0,5 M ajustado para pH 8,0.
- Solvente: Acetonitrila grau HPLC (Tedia, USA)
- Polímero Carboxivinílico: Carbopol<sup>®</sup> Ultrez 10 (Lubrizol Advanced Materials, USA)
- Solubilizantes e Promotores de Absorção: polietilenoglicol 400 (ULTRAPEG 400<sup>®</sup>, Oxiteno Ind. Prod. Quim.), polietilenoglicol 600 (ULTRAPEG 600<sup>®</sup>, Oxiteno Ind. Prod. Quim), monolaurato de Sorbitan (Span<sup>®</sup> 20, Oxiteno Ind. Prod. Quim), mentol, propilenoglicol (Galena Quím. e Farm.) e glicerina (Galena Quím. e Farm).
- Conservante: metilparabeno (Nipagin<sup>®</sup>, Galena Quím. e Farm).
- Agente gelificante: trietanolamina (Labsynth Ltda)
- Membrana Biológica: pele de orelha de porco obtida do Abatedouro Frigar Ltda – ME
- Membranas de nylon para filtração Millipore<sup>®</sup> de 0,22 µm (Belford, USA)
- Alginato de sódio MM = 50 kDa (Sigma Chem. Co)
- Quitosana MM = 190.000 KDa (Sigma Chem. Co)
- Dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose de 30 kDa (Microcon – Millipore<sup>®</sup>)
- Outros: solução de NaCl 0,9%, álcool etílico, DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Nutricell), Meio RPMI 1640 (Nutricell), soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina, MTT (Sigma-Aldrich, USA), solução de tripsina (Cultilab).

#### **2- Equipamentos**

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), Varian<sup>®</sup>, Modelo ProStar equipado com uma bomba PS 210, um detector PS 325 UV-VIS e injetor eletrônico
- Coluna Merck<sup>®</sup> Lichrospher 100, C18, 125mm x 4mm, RP 18e (5µm), Lote L 5610 5333, no. 719800
- Agitador magnetico Tecnal<sup>®</sup> TE 0851
- Agitador Marconi<sup>®</sup>
- Agitador de tubos Phoenix<sup>®</sup> AP56
- Vórtex
- Termostato

- Células de Franz adaptadas com área de permeação de 0,6cm<sup>2</sup>
- Aparelho para teste de *tail-flick* com lâmpada projetora de 150W (Onda Científica Ltda.)
- Analisador de partículas modelo Zetasizer HSA 3000 (Malvern®)

### **3- Animais**

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos com peso variando entre 30-35g. Estes animais, provenientes do CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica), foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada a 22 ± 3°C. Permaneceram alojados coletivamente (5 animais por gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por 7 dias.

Todos os experimentos realizados estiveram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp (protocolo no. 2241-1, ver anexo).

### **4- Preparação da Pele**

A pele de orelhas de suínos, obtidas do Abatedouro Frigar Ltda-ME registrado no Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Estado de São Paulo (SISP) sob o no. 1015 e foram preparadas para os experimentos nos mesmos dias em que houve o abate dos animais.

Inicialmente, as orelhas foram higienizadas e a pele foi removida da cartilagem sendo extraído também o tecido subcutâneo para a obtenção de uma estrutura mais homogênea com aproximadamente 2 mm de espessura. Em seguida, as peles limpas foram colocadas em papel filtro umedecido com solução de NaCl 0,9%, sendo acondicionadas em envelopes de papel alumínio e mantidas congeladas a -20°C até a utilização nos experimentos. No momento da utilização, as peles foram descongeladas em solução de NaCl 0,9% e alocadas cada uma em uma célula de Franz com área de permeação de 0,6 cm<sup>2</sup> (Sekkat et al., 2004; Cornélio e Mayorga, 2007; Sato et al., 2007).

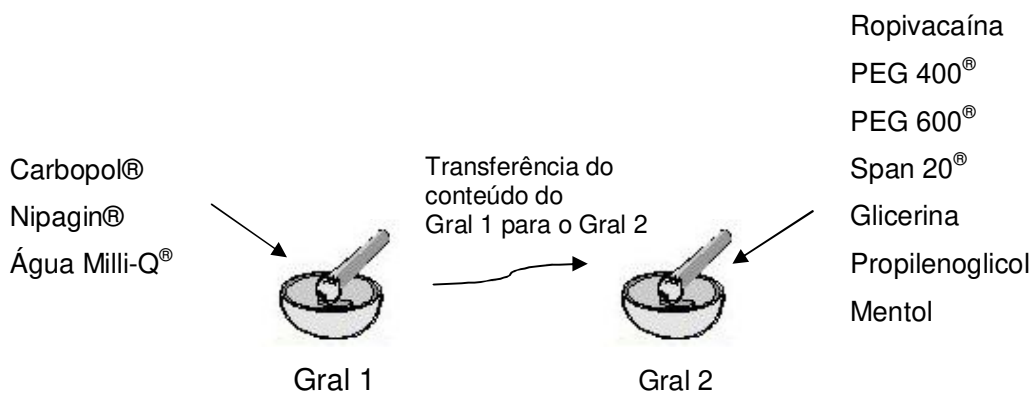


## **5- Preparação dos diferentes Géis de RVC à base de Carbopol® Ultrez 10**

### **5.1- Géis de Ropivacaína com Promotores de Absorção**

Para o preparo das formulações foram utilizados dois grals de porcelana. No primeiro gral (Gral 1) o conservante Nipagin® foi incorporado ao Carbopol® Ultrez 10 disperso em água ultrapura. Após agitação vigorosa por aproximadamente 2 minutos, essa mistura foi transferida para o Gral 2 (Figura 9).

No Gral 2, a RVC foi solubilizada inicialmente em propilenoglicol (PPG) e glicerina. Posteriormente, seguiu-se a adição dos outros agentes, também promotores de absorção, PEG® 400, PEG® 600, Span® 20 ou mentol de acordo com as quantidades estabelecidas para as respectivas formulações (Tabela 4). Finalmente, procedeu-se a adição do agente alcalinizante trietanolamina para a correção do pH, com o objetivo de que este permanecesse entre 5,5 e 6,0 em todas as formulações.



**Figura 9** - Representação esquemática do preparo das formulações em gel de ropivacaína

**Tabela 4** – Composição das formulações contendo RVC (w/w %)

Elementos	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F <sub>mentol</sub>	F <sub>nano 2%</sub>	F <sub>nano 1%</sub>
RVC	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	1%
Carbopol®	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%
PEG 400	15%	15%	30%	30%	-	-	-	15%	-	-
PEG 600	15%	15%	-	-	30%	30%	-	15%	-	-
SPAN® 20	-	0,5%	-	0,5%	-	0,5	-	-	-	-
Mentol	-	-	-	-	-	-	-	5%	-	-
PPG	1%	1%	1%	1%	1%	1%	-	1%	-	-
Glicerina	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	-	0,5%	-	-
Nipagin®	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Nano	-	-	-	-	-	-	-	-	35%	36%

A tabela abaixo (Tabela 5) descreve a função dos componentes dos géis.

**Tabela 5** - Composição e função dos elementos presentes nos géis

Componentes	Funções
Carbopol® Ultrez 10	Agente dispersante
Água Millipore Milli-Q®	Solvente
SPAN 20®	Promotor de absorção, tensoativo com atividade emulsionante
Mentol	Promotor de absorção com atividade solubilizante
Propilenoglicol	Promotor de absorção com atividade solubilizante
Glicerina	Promotor de absorção com atividade umectante
Nipagin®	Agente bactericida e fungicida
PEG 400 PEG 600	Promotores de absorção, agentes umectantes e solubilizantes

## **5.2- Géis de Ropivacaína encapsulada em Nanopartículas de Alginato-Quitossana**

As nanopartículas de alginato-quitossana contendo RVC, utilizadas neste trabalho, foram desenvolvidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, no Depto de Engenharia Ambiental da Unesp-Sorocaba, com base no método descrito por Sarmiento et al., (2005). Para isso, soluções de 7,5 mL de cloreto de cálcio 18 mM foram adicionadas a soluções de alginato de sódio (0,063% p/v) com RVC nas proporções de 1 e 2%. As adições foram realizadas lentamente durante 60 minutos e sob agitação mecânica constante, utilizando um Agitador Marconi<sup>®</sup> com velocidade de 1000 rpm. Em seguida, 25 mL de uma solução de quitossana (0,07%) foi incorporada a essa mistura durante 90 minutos. Para o preparo da solução de quitossana (0,07%) foi utilizado ácido acético (1 Mol L<sup>-1</sup>) sob agitação durante um período de 12h devido à dificuldade na sua dissolução. Posteriormente, as nanopartículas foram armazenadas em frascos âmbar para caracterização em termos de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta.

Dessa forma, foram obtidas as seguintes formulações de RVC associada a nanopartículas:

- Nanopartículas com Ropivacaína a 2% (F<sub>NANO 2%</sub>)
- Nanopartículas com Ropivacaína a 1% (F<sub>NANO 1%</sub>)

Para a preparação dos géis de nanopartículas com RVC, foi utilizado apenas um gral, onde o Nipagin<sup>®</sup> foi incorporado ao Carbopol<sup>®</sup> Ultrez 10 disperso em água ultrapura. Em seguida, seguiu-se a adição da suspensão de RVC 1 ou 2% encapsulada em nanopartículas. Essa mistura foi agitada manualmente com auxílio de um pistilo para que houvesse a solubilização total desses componentes. A correção do pH foi efetuada com a adição de trietanolamina, com o objetivo de que os géis obtivessem um valor de pH entre 5,5 e 6,0.

## **6 - Caracterização das Nanopartículas de Alginato-Quitossana**

### **6.1 - Determinação do diâmetro e índice de polidispersão**

A polidispersão é uma medida que indica a homogeneidade de distribuição de partículas (em relação ao tamanho) em um dado sistema. Idealmente, este valor deve ser

inferior a 0,3, pois caracteriza um meio homogêneo no que se refere ao tamanho dessas nanoestruturas (Pathak e Nagarsenker et al., 2009).

Em nossos estudos, a determinação do tamanho (diâmetro médio) e da polidispersão foi realizada a partir de um analisador de partículas modelo Zetasizer HSA 3000 (Malvern®) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25°C. Os valores obtidos foram expressos como média de três resultados (Govender et al., 1999; Venkatraman et al., 2005).

## **6.2 - Determinação do potencial zeta**

O potencial zeta pode ser definido como o potencial de superfície das nanoestruturas. Este parâmetro físico-químico sofre influência do meio dispersante em decorrência da adsorção de íons ou da dissociação de grupos funcionais da superfície da partícula.

As cargas de superfície das nanopartículas foram avaliadas utilizando-se um analisador de partículas modelo Zetasizer HSA 3000 (Malvern®). As análises foram realizadas diluindo-se (1/10 v/v) as suspensões de nanopartículas em água. Os valores foram expressos como média de três determinações.

## **6.3 Eficiência de encapsulação de Ropivacaína nas nanopartículas**

O total (100%) de RVC presente nas suspensões de nanopartículas de alginato-chitosana foi determinado a partir da diluição da dispersão coloidal em metanol. A finalidade da utilização do metanol é desestabilizar o sistema, favorecendo a liberação total do fármaco. Posteriormente, essa suspensão de nanopartículas foi filtrada em membrana Millipore® de 0,22 µm e quantificada por CLAE.

A determinação de RVC 1 ou 2% associada às nanopartículas, foi realizada pelo método de ultrafiltração associado à centrifugação, o qual consiste em submeter a suspensão de nanopartículas à centrifugação em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose de 30 kDa (Microcon – Millipore®) e quantificar o ultrafiltrado em CLAE. Somente o fármaco livre é capaz de atravessar a membrana de 30 kDa. Dessa forma, a partir da diferença entre os valores totais de RVC e os valores de concentração de RVC não encapsulada, foi determinada a taxa de encapsulação do fármaco às nanopartículas (Gamisans et al., 1999; Schaffazick et al., 2003; Kilic et al., 2005).

Todas as análises para determinação da eficiência de encapsulação de RVC em nanopartículas de alginato-quitosana foram realizadas em triplicata e de acordo com a equação abaixo (equação 2).

$$EE (\%) = \frac{M_s}{M_{total}} \times 100 \quad (2)$$

onde:

EE = eficiência de encapsulação

$M_s$  = massa de RVC nas nanoesferas de alginato-quitosana

$M_{total}$  = massa de RVC usada na formulação

## **7- Determinação do Título de Ropivacaína nas Formulações**

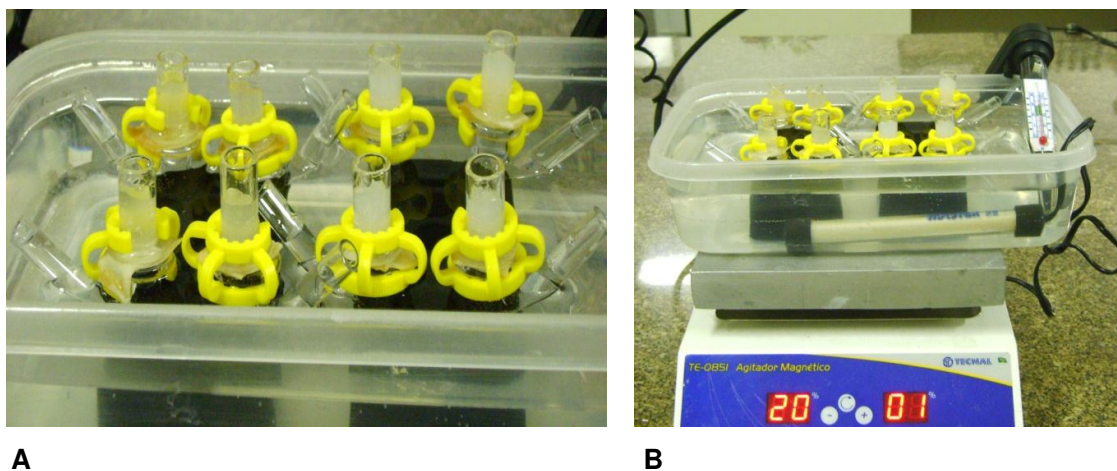
Para a determinação do título de RVC, nas diferentes formulações, foram preparadas soluções em triplicata com 0,5 g de gel de cada formulação dissolvido em 10 mL de NaCl 0,9%. Em seguida, após agitação em vórtex (até completa dispersão do gel) e repouso por 48h, foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada solução completando-se o volume com 900 µL de NaCl 0,9%. Posteriormente, o teor de RVC presente em cada amostra foi avaliado após a preparação e em diferentes intervalos de tempo, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## **8 - Ensaios *in vitro* e Determinação da Cinética de Permeação**

A avaliação da capacidade de penetração de um fármaco na pele é obtida através da determinação do fluxo de penetração e do tempo de latência. Tais parâmetros avaliam a permeação de um soluto através da pele na presença e na ausência de diferentes veículos ou promotores de absorção (Shin et al., 2003).

Para os ensaios de permeação *in vitro* foi utilizada uma célula de difusão vertical do tipo Franz (área de permeação de 0,6 cm<sup>2</sup>). O compartimento doador da célula foi preenchido com as diferentes formulações de RVC (Figura 10A), aderidas à pele (parte voltada para o estrato córneo), ao passo que o compartimento receptor foi preenchido com solução de NaCl 0,9% a 37°C sob agitação constante (Figura 10B). Em intervalos pré-estabelecidos, alíquotas da solução receptora (300 µL) foram retiradas e repostas para a manutenção do volume. Posteriormente, essas alíquotas foram analisadas por CLAE para

determinação da permeação do fármaco (Padula et al., 2003; Nicoli et al., 2005; de Araujo et al., 2010). A escolha da solução de NaCl para o compartimento receptor se deve à necessidade de solubilização da RVC, pois neste meio, abaixo de seu pKa (pKa= 8,1), o fármaco apresenta a maior parte de suas moléculas sob a forma ionizada, facilitando sua solubilização no meio receptor e, posteriormente, sua análise por CLAE.



**Figura 10** - Visualização das Células de Franz com gel anestésico no compartimento doador (A) e sob agitação constante e aquecimento (B)

Os dados obtidos foram expressos em quantidades cumulativas de fármaco permeado em função do tempo e analisados de acordo com a equação 2:

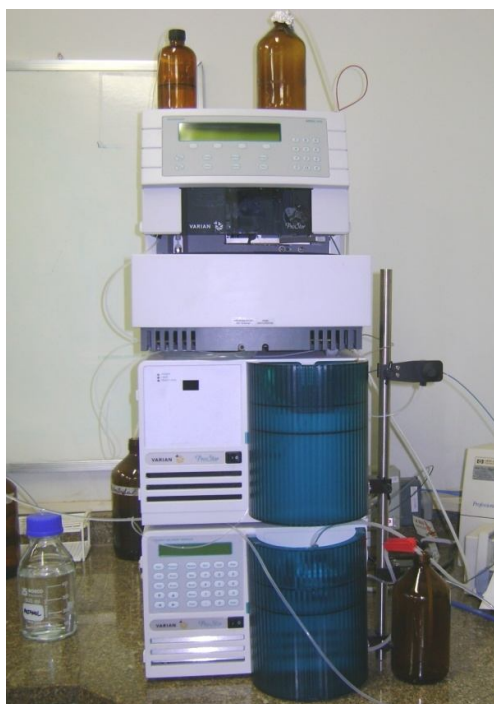
$$J = P \cdot Cd (3)$$

onde **J** é o fluxo de fármaco através da pele, **P** é o coeficiente de permeabilidade e **Cd** é a concentração de fármaco utilizado no compartimento doador (Nicoli et al., 2005). Os dados serão analisados utilizando o programa Origin 6.0 (Microcal™ Software, Inc., Northampton, MA, USA) e expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 6-8).

As diferentes formulações de géis foram comparadas entre si em termos de parâmetros de permeação (tempo necessário para permeação inicial do fármaco ou *time lag* e fluxo). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (One-way ANOVA) com teste posterior de Tukey-Kramer e nível de significância estatística  $p < 0,01$ .

## **9- Quantificação da Ropivacaína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A concentração de RVC permeada através da pele foi determinada por CLAE. Esse sistema consiste de uma bomba com injetor eletrônico de 30 µL, um detector UV-Visible Modelo ProStar 325, Varian (Figura 11) e uma coluna RP-18 Licrospher 100 (C18, 125 x 4 mm) com tamanho de partícula de 5 µm (Merck). A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato de sódio monobásico 1M e fosfato de sódio dibásico diidratado 0,5M ajustados para pH 8,0 (60:40 v/v). O fluxo foi de 1,2 mL/min e o comprimento de onda utilizado para detecção UV foi de 240 nm (United States Pharmacopeia, 2006).



**Figura 11** - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Varian®, Modelo ProStar 325

## **10- Validação da metodologia analítica da Ropivacaína**

A validação da metodologia tem por finalidade garantir a confiabilidade dos resultados, assegurando a aplicabilidade analítica do método na obtenção de análises precisas. Para atender a esta exigência, os parâmetros regulamentados pela Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) são especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção entre outros (Anvisa, 2003).

A especificidade refere-se a propriedade que o método possui em mensurar o componente em análise na presença de outras substâncias, sejam impurezas, metabólitos ou produtos de degradação. A especificidade em métodos cromatográficos é garantida quando são observados picos com pureza, isto é, isentos de componentes químicos que possam co-eluir com o analito (Anvisa, 2003; ICH, 1996).

A linearidade permite estimar se o método analítico estabelecido está em concordância com os resultados obtidos, isto é, se os mesmos são proporcionais à concentração do ativo na amostra em um determinado intervalo especificado. O valor mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser 0,99 (Anvisa, 2003).

Conforme recomendação da Anvisa, a linearidade foi determinada a partir de três curvas de calibração determinadas em três dias diferentes, totalizando portanto nove curvas analíticas. Neste trabalho, cada curva foi construída com seis concentrações diferentes de ropivacaína em um intervalo de 5 a 100 µg/mL de ropivacaína em água.

A precisão reflete o grau de proximidade dos resultados obtidos em uma série de análises de medidas de uma mesma amostra. A repetibilidade atua portanto, na avaliação da concordância entre os resultados. Em nossos estudos, a precisão foi expressa através do Desvio Padrão Relativo (DPR) conforme equação abaixo (Equação 3) (Anvisa, 2003).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (4)$$

onde:

DP = Desvio Padrão

DPR = Desvio Padrão Relativo

CMD = Concentração Média Determinada

Para assegurar a precisão do método analítico não são admitidos valores de DPR superiores a 5% (Anvisa, 2003) .

A exatidão do método analítico possibilita a comparação dos resultados obtidos pelo método em estudo com o valor verdadeiro, previamente conhecido e aceito como referência. É expressa portanto, pelos valores de porcentagem de recuperação que permitem a comparação entre as concentrações teóricas e experimentais (Anvisa, 2003; ICH, 1996) .

Os valores de porcentagem de recuperação preconizados pela Anvisa para garantir a exatidão do método analítico variam de 95 a 105%. A exatidão, traduzida pela



porcentagem de recuperação, foi expressa pela concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a equação 4 (Anvisa, 2003).

$$Exatidão = \frac{CMD}{CT} \times 100 \quad (5)$$

onde:

CMD = Concentração Média Determinada

CT = Concentração Teórica

O Limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração da substância a ser avaliada que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. A equação 5, abaixo traduz matematicamente o LD (Anvisa, 2003).

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (6)$$

onde:

DP = Desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo 3 curvas de calibração

IC = Inclinação da curva analítica média (parâmetro B da curva de calibração)

O limite de quantificação (LQ) refere-se a menor concentração da substância presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (Anvisa, 2003). Esse parâmetro foi analisado de acordo com a equação abaixo (equação 6) (Anvisa, 2003).

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (7)$$

onde:

DP = desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo 3 curvas de calibração

IC = Inclinação da curva analítica média (parâmetro B da curva de calibração).

## **11 - Avaliação da Toxicidade In Vitro**

### **11.1 - Cultura de Fibroblastos Balb/c 3T3 e Melanoma Murino B16F10**

A cultura de células de pele humana é um modelo muito útil para avaliar os potenciais irritativos que os compostos químicos podem apresentar. Sendo assim, para estimar a citotoxicidade foram realizados testes *in vitro* a partir de cultura de células de fibroblastos e melanoma murino (Lee et al., 2000).

Todas as formulações em gel com promotores de absorção (F1 a F6) e encapsulada em nanopartículas, bem como suas respectivas formulações-placebo (sem RVC), tiveram sua citotoxicidade avaliada utilizando-se como modelo celular linhagens de fibroblastos Balb/c 3T3. Estes foram mantidos em cultura contínua (meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, pH 7,4, 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>) através de repiques periódicos. O plaqueamento foi feito inoculando-se 2 x 10<sup>4</sup> células viáveis em placas de 96 poços. O período de incubação para a semiconfluência foi de 48 horas.

As culturas de melanoma murino B16F10, cedidas pelo laboratório do Prof. Dr. Marcelo Lancellotti do Depto de Bioquímica da Unicamp, obedeceram ao mesmo protocolo descrito anteriormente, excetuando-se apenas o meio de cultivo. Para estas culturas, o meio de cultivo utilizado foi o RPMI 1640 também suplementado com 10% de soro fetal bovino e 150 µL de gentamicina para 30 mL de meio de cultivo. O plaqueamento das células de melanoma também foi realizado em placas de 96 poços e estas foram incubadas por 72 horas com a finalidade de atingirem a semiconfluência. As formulações avaliadas utilizando esta linhagem celular foram aquelas que apresentaram os melhores perfis de permeação dentre as formulações com promotores e com nanopartículas. Um resumo dos ensaios de citotoxicidade pode ser visualizado na tabela 6.

**Tabela 6** – Formulações avaliadas em culturas de fibroblastos Balb/c da linhagem 3T3 e células de melanoma murino B16F10

Viabilidade celular avaliada em Fibroblastos	Viabilidade celular avaliada em células de Melanoma Murino
Formulações F1 a F6	F1, F5, F6 e F <sub>NANO 2%</sub>
Formulações-Placebo F1 a F6	
F <sub>NANO 1%</sub> e F <sub>NANO 2%</sub>	
Placebo de Nanopartículas	

Para cada formulação em estudo, os fibroblastos e as células de melanoma em cultura foram tratados com concentrações crescentes de 6,25 mg/mL a 150 mg/mL de gel em meio de cultura. Nessas concentrações, as quantidades do fármaco em questão variavam de 0,42 mM a 8,04 mM, respectivamente (Tabela 7).

Para a determinação da curva de viabilidade celular, o tempo em que os fibroblastos e as células de melanoma permaneceram em contato com as formulações de ropivacaína foi de 2 horas (tempo inicial necessário para a ação anestésica) (de Araujo et al., 2008b, de Araujo et al., 2010).

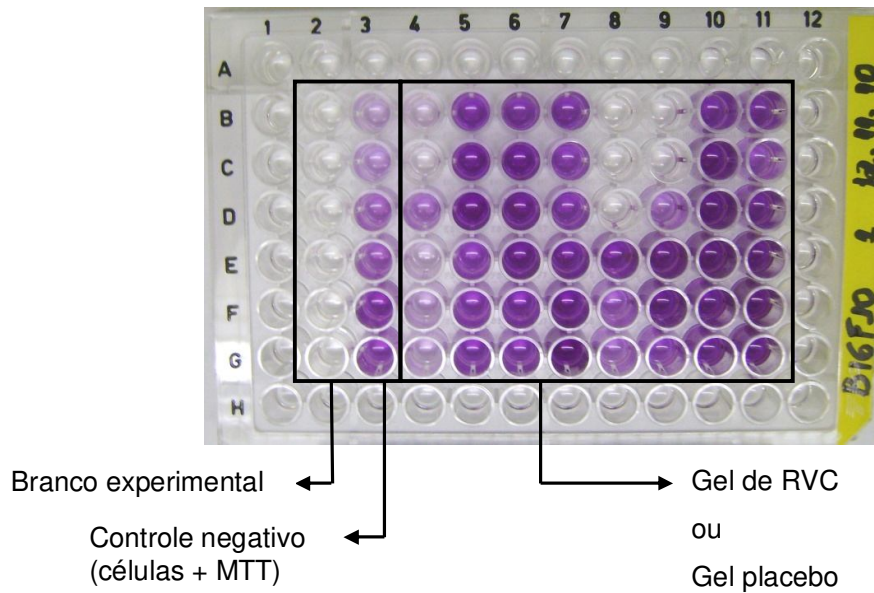
**Tabela 7** – Concentrações de gel (mg/mL) utilizadas nos testes de citotoxicidade e respectivas quantidades de RVC presentes. Concentrações do fármaco expressas em mg/mL e mM.

Gel (mg.mL <sup>-1</sup> )	RVC (mg.mL <sup>-1</sup> )	RVC (mM)
6,25	0,13	0,42
12,5	0,26	0,84
25	0,52	1,68
50	1,04	3,36
75	1,25	4,02
100	1,66	5,34
125	2,08	6,70
150	2,5	8,04

## **11.2 - Avaliação da viabilidade celular**

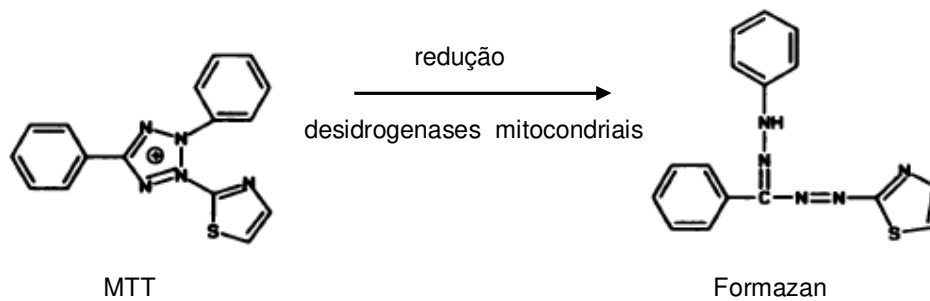
Em cada placa de cultura com 96 poços os grupos experimentais foram:

- Grupo I
  - A) Controle Negativo: fibroblastos 3T3 ou células de melanoma B16F10 que receberam meio de cultura e adição do indicador MTT. Em cultura de fibroblastos o meio de cultura utilizado foi o meio DMEM. Já em cultura de células de melanoma o meio utilizado foi o meio RPMI 1640.  
O grupo controle negativo compreendeu os poços de células com coloração púrpura (Figura 12) e o valor teórico esperado era de 100% de viabilidade celular. A adição do indicador MTT permitiu que os poços da placa de cultura que possuíam fibroblastos 3T3 ou células de melanoma B16F10 viáveis exibissem uma coloração púrpura.
  - B) Branco Experimental: fibroblastos 3T3 ou células de melanoma B16F10 que receberam apenas meio de cultura meio de cultura DMEM (fibroblastos) ou RPMI 1640 (células de melanoma). As células que não receberam o MTT resultaram portanto em poços incolores.
- Grupo II: fibroblastos 3T3 ou células de melanoma B16F10 que receberam concentrações crescentes de gel de ropivacaína ou gel placebo.



**Figura 12** - Representação do grupo I (branco experimental e controle negativo), bem como do grupo II, com as diferentes formulações de gel de RVC ou gel placebo em placas para cultura celular.

O teste de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) consiste na captação do MTT pelas células e redução a formazan (composto púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais (Figura 13), resultando em acúmulo desse composto em células viáveis. A solubilização das células possibilita a liberação do formazan, que pode ser facilmente detectado por espectrofotometria VIS (570 nm) (Nicolson et al., 1976; Denizot e Lang, 1986).



**Figura 13** – Reação de redução do MTT a formazan (adaptado de Scudiere et al., 1988).

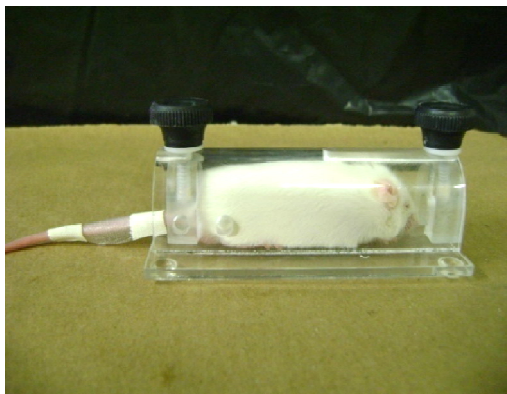
Decorrido o tempo de tratamento das células com as diferentes formulações (com e sem RVC), o meio de cultura foi substituído e as células incubadas com MTT (0,5 mg/mL) por 3 horas. Ao final desse período, o meio contendo MTT não reduzido foi removido cuidadosamente e a cada placa foi adicionado 0,1 mL de álcool etílico, a fim de dissolver os cristais de formazan produzidos pela redução do indicador. As placas foram agitadas vigorosamente por aproximadamente 20 minutos para garantir a solubilização do formazan e transferidas para um leitor de microplacas. A absorbância da solução em cada poço foi medida por espectrofotometria VIS (570 nm) e os resultados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (células tratadas apenas com meio DMEM e células tratadas com meio RPMI 1640) (Babich et al., 1991; Lee et al., 2000).

## **12 - Avaliação da Atividade Antinocepsiva: teste *tail-flick***

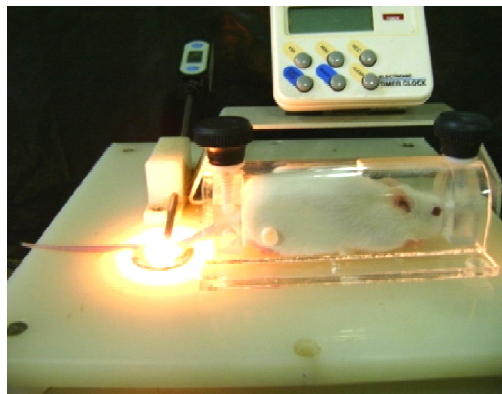
O teste de remoção da cauda (*tail-flick*) é frequentemente utilizado para avaliar a duração do bloqueio sensorial induzido por formulações de AL tanto por via parenteral quanto tópica (Yu et al., 1998; 2002, de Araujo et al., 2010). As formulações selecionadas para esse teste foram aquelas que mostraram os melhores perfis permeação associados a baixa toxicidade em cultura celular.

Inicialmente, 0,5 g de uma das formulações em gel foi aplicada com auxílio de uma espátula a 2 cm da base da cauda e distribuído uniformemente sobre a pele circundante. Em seguida, o local de aplicação foi envolvido por fita protetora Micropore™ (Figura 14A) durante 20 minutos para que o gel pudesse ser absorvido pela pele. Após esse período, a fita foi removida e o teste iniciado.

Para a realização dos testes, os animais foram mantidos em contêntores de acrílico e uma porção da cauda (2 cm a partir da base) foi exposta ao calor de uma lâmpada projetora, 150 w, ( $55 \pm 1^\circ\text{C}$ ). O tempo entre o contato com o estímulo físico e o primeiro movimento de remoção da cauda (*tail flick*) foi considerado como o tempo de latência, sendo avaliado antes da administração das formulações anestésicas (caracterizando a linha basal ou resposta normal ao estímulo) e durante cada tratamento (Figura 14B). Para evitar injúria térmica, foi estabelecido um tempo máximo (*cut off*) de 10 segundos para o contato da cauda com o estímulo nocivo. Os testes foram iniciados 20 minutos após a aplicação do gel em cada animal e a sensibilidade ao calor também foi avaliada a cada 10 minutos. Os testes foram finalizados quando a resposta final observada era igual ao valor do limiar basal acrescido de 50%. Os resultados foram expressos pelo número de animais com analgesia em função do tempo e duração da analgesia.



A



B

**Figura 14** – Aplicação do gel anestésico e proteção por fita Micropore™ (A) e aplicação do estímulo térmico focalizado durante o teste *tail-flick* (B).

## **IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **1- Validação do Método Analítico para quantificação de Ropivacaína**

Para a validação do método analítico foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas descritas na tabela abaixo (Tabela 8).

**Tabela 8** – Condições cromatográficas para a determinação de RVC em amostras de gel.

Amostra	Cloridrato de Ropivacaína
Coluna	RP-18 Licrospher 100 (C18, 125 x 4 mm) com partículas de 5 µm
Detecção	UV a 240 nm
Fase Móvel	Acetonitrila e tampão fosfato de sódio monobásico 1M e fosfato de sódio dibásico diidratado 0,5M ajustados para pH 8,0 (60:40, v/v)
Tempo de retenção	4,07 min
Tempo de corrida	8 min
Fluxo	1,2mL.min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	30 µL
Temperatura	25°C

#### **1.1 - Especificidade**

Para verificar se as condições cromatográficas eram adequadas e possibilitavam a exibição de um único pico cromatográfico característico de RVC, foi preparada uma solução do fármaco a 10 µg/mL em fase móvel. Em seguida, foram realizadas corridas cromatográficas de 8 minutos. Neste intervalo de tempo, observou-se o perfil cromatográfico do fármaco em um tempo de retenção de 4 minutos (Figura 15). O método cromatográfico apresentou-se portanto, viável e específico, pois não houve a sobreposição de interferentes como constituintes da fase móvel, substâncias presentes na pele (Figura 16), do gel-placebo com promotores de absorção (Figura 17) ou do gel-placebo de nanopartículas (Figura 18) no pico correspondente à RVC. A especificidade é justificada pelo fato de que nenhuma substância co-eluiu com a RVC, sendo atribuído o pico cromatográfico unicamente a este fármaco.



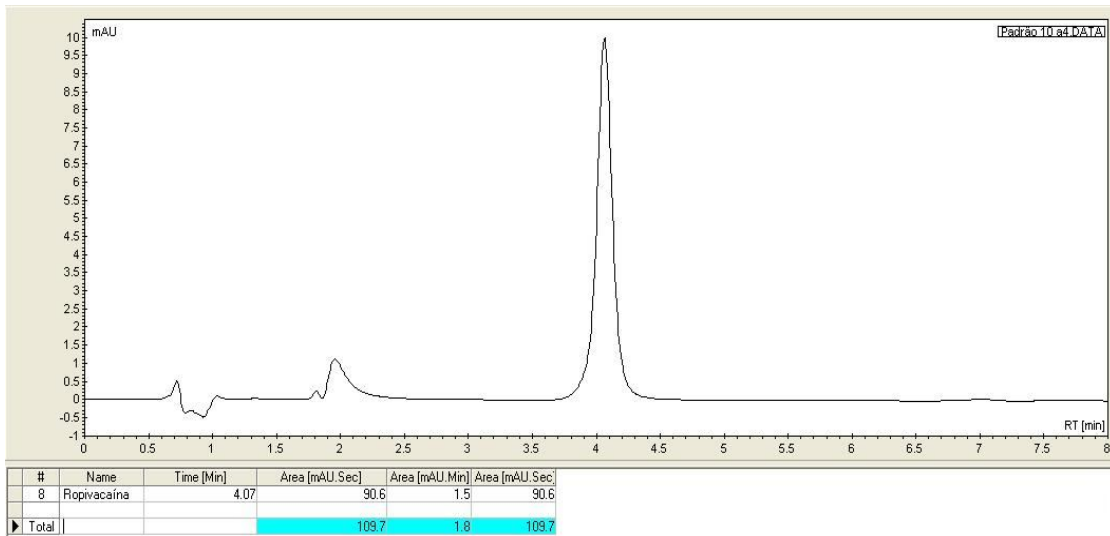
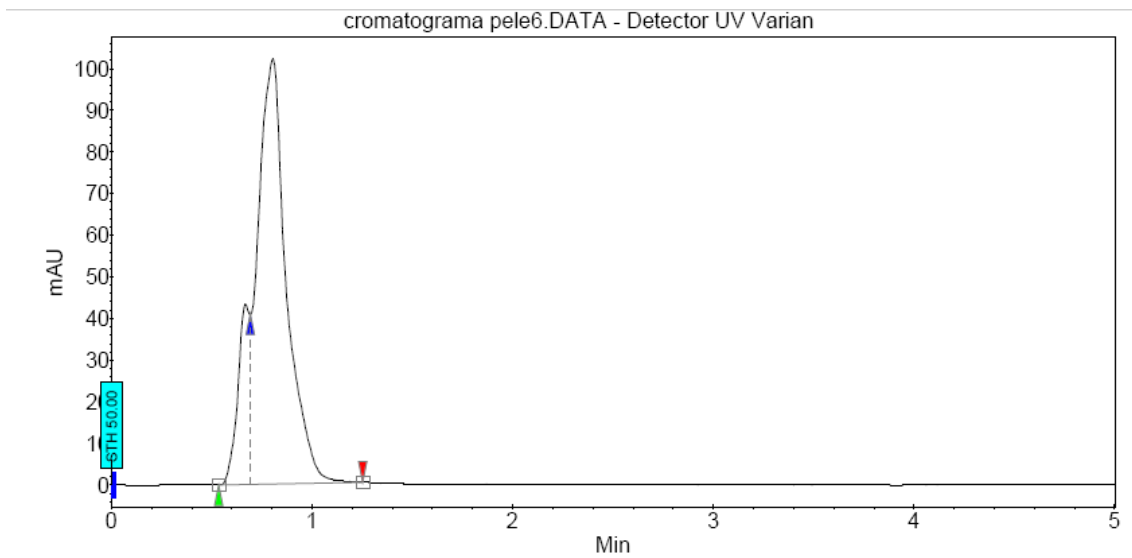


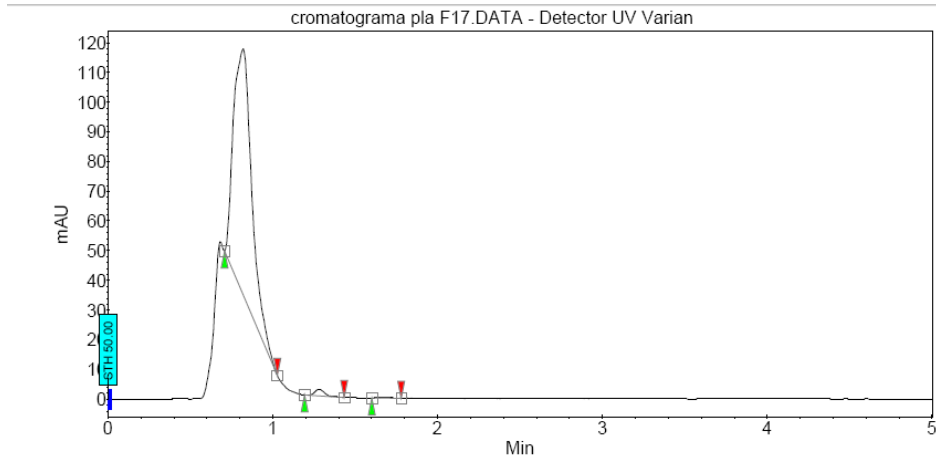
Figura 15 – Perfil cromatográfico da RVC analisada por CLAE



Peak results :

Index	Name	Time [Min]	Area [mAU.Sec]	Area [mAU.Min]
1	UNKNOWN	0.67	178.7	3.0
2	UNKNOWN	0.81	999.3	16.7
Total			1178.0	19.6

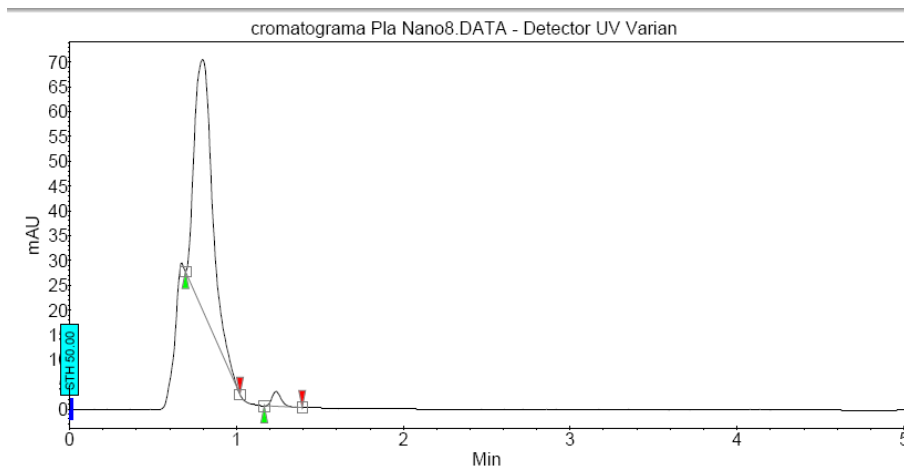
Figura 16 – Cromatograma de pele mostrando a ausência de interferentes no pico correspondente à RVC



**Peak results :**

Index	Name	Time [Min]	Area [mAU.Sec]	Area [mAU.Min]
1	UNKNOWN	0.82	632.2	10.5
2	UNKNOWN	1.28	8.4	0.1
3	UNKNOWN	1.69	1.7	0.0

**Figura 17** – Cromatograma do gel-placebo com promotores de absorção mostrando a ausência de interferentes no pico correspondente à RVC



**Peak results :**

Index	Name	Time [Min]	Area [mAU.Sec]	Area [mAU.Min]
1	UNKNOWN	0.80	374.9	6.2
2	UNKNOWN	1.24	11.7	0.2
Total			386.5	6.4

**Figura 18** – Cromatograma do gel-placebo de nanopartículas mostrando a ausência de interferentes no pico correspondente à RV

## 1.2 - Linearidade

A linearidade permitiu estimar se o método analítico em desenvolvimento apresentava proporcionalidade em relação às concentrações de RVC na amostra.

Para esta análise foi necessário a construção da curva analítica média e a determinação do coeficiente de correlação linear a partir de três curvas analíticas determinadas em três dias diferentes. Dessa forma, a construção da curva analítica média utilizada para análise de linearidade, foi realizada a partir das análises de regressão linear de nove curvas analíticas (Figura 17).

Em cada dia de experimento, cada curva analítica foi construída a partir de seis pontos: a solução estoque de RVC a 100 $\mu\text{g/mL}$  e as seguintes concentrações finais de 5, 10, 25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$  de RVC, obtidas através das diluições da solução estoque inicial. Em seguida, os valores de área dessas soluções em triplicata foram estabelecidos por CLAE. Esses valores foram plotados no gráfico da curva analítica, o qual é traduzido pela área (mAu/seg) em função das concentrações de RVC ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Em nosso estudo, a partir da curva analítica média (n=9), foi possível obter o valor do coeficiente de correlação linear, expresso por 0,9999. Verificou-se portanto, que este valor atende a resolução RE 899 da ANVISA, que estabelece um coeficiente de no mínimo 0,99 (Anvisa, 2003). O método desenvolvido foi considerado linear no intervalo de concentração de 5 a 100  $\mu\text{g/mL}$  de RVC.

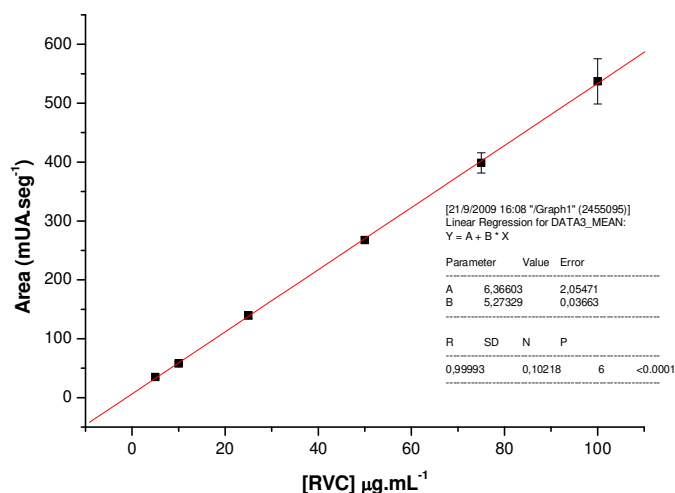


Figura 19 – Curva analítica da RVC (n=9)

### **1.3 - Precisão**

A avaliação da precisão possibilitou aferir se os resultados expressos em uma série de medidas de uma mesma amostra de RVC eram relativamente próximos. Este parâmetro de validação foi determinado através do método de repetibilidade, a partir de três concentrações de RVC: 10, 25 e 75 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata e em dois dias diferentes.

A tabela abaixo mostra os valores de precisão em dois dias de experimento obtidos a partir da equação do desvio padrão relativo (DPR), descrita no item *Validação da metodologia analítica*. Além disso, exibe a precisão inter dias determinada com base no desvio padrão relativo (DPR) inter dias. Este último pode ser definido pela média dos valores de DPR do dias 1 e 2. A Tabela 9 expressa os resultados de DPR.

**Tabela 9** – Valores DPR das concentrações de RVC (n=6) expressos em porcentagem para avaliação da precisão

<b>RVC (µg/mL)</b>	<b>DPR dia 1 (%)</b>	<b>DPR dia 2 (%)</b>	<b>DPR Inter- dias (%)</b>
10	1,00	1,03	1,01
25	0,39	0,42	0,40
75	0,13	0,14	0,13

Os valores de DPR intra dia (nos dois dias de experimento) e inter dias mostram que o método desenvolvido dispõe de precisão analítica, pois segundo preconiza a ANVISA os valores de DPR devem ser no máximo 5% e todos os nossos resultados encontrados situam-se abaixo deste valor. Em razão disso, o método analítico desenvolvido pode ser caracterizado como preciso e atende à resolução normativa de forma satisfatória.

### **1.4 - Exatidão**

A exatidão permitiu verificar se o resultado de uma determinada concentração de RVC obtido pelo método desenvolvido era próximo do valor aceito como padrão. Para a determinação deste parâmetro foram utilizadas três concentrações de RVC: 10, 25 e 75 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata e em dois dias diferentes.

Os valores gerados experimentalmente pelo método analítico foram comparados com a concentração teórica, conforme se observa na Tabela 10.

**Tabela 10** – Valores das concentrações de RPV (n=6) determinados em µg/mL para avaliação da exatidão

RVC* (µg/mL)	RVC** (µg/mL) Dia 1	RVC** (µg/mL) Dia 2	RVC** (µg/mL) Inter- dias
10	10,13	9,88	10,00
25	25,70	24,22	24,96
75	76,81	71,89	74,35

\* Concentração teórica de RVC

\*\* Concentração de RVC obtida experimentalmente

A exatidão calculada como porcentagem de recuperação (equação 4 do item *Validação da metodologia analítica*) traduz a eficiência do método analítico ao permitir a comparação entre os valores experimentais e teóricos de RVC expressos em porcentagem, como pode se observar na Tabela 11.

**Tabela 11** – Valores de porcentagem de recuperação de RVC ( n=6) determinados para avaliação da exatidão

RVC (µg/mL)	% de Recuperação		
	Dia 1	Dia 2	Inter- dias
10	101,3	98,8	100,05
25	102,8	96,88	99,84
75	102,4	95,85	99,12

Pela observação da Tabela 11 pode-se concluir que todos os nossos valores de porcentagem de recuperação se encontram entre 95, 85 e 102,4%, portanto dentro da faixa percentual da recomendada pela Anvisa, a qual estabelece como critério de exatidão aceitável os valores de porcentagem de recuperação de 95 a 105%. Sendo assim, pode se

considerar que este método analítico oferece exatidão e está adequado às especificações normativas em vigor.

### **1.5 - Limite de Detecção e Limite de Quantificação**

Os Limites de Detecção e Quantificação referem-se às menores concentrações de RVC que foram detectadas e quantificadas respectivamente. É importante ressaltar que a diferença entre esses parâmetros reside no fato de que no limite de detecção a menor quantidade detectada não necessariamente oferece características como precisão e exatidão aceitáveis, as quais são asseguradas confiavelmente no limite de quantificação.

A construção da curva linear média forneceu dados como Desvio Padrão e Inclinação da Curva para a aplicação nas equações 5 e 6 que se referem aos Limite de Detecção e Limite de Quantificação, respectivamente descritas no item Validação da Metodologia Analítica.

Os resultados encontrados foram 0,05813µg/mL para o Limite de Detecção e 0,1937 µg/mL para o Limite de Quantificação.

## **2 - Determinação do Título de Ropivacaína nas formulações em gel**

Teoricamente, a concentração de RVC nas formulações em gel propostas neste trabalho foi de 2%. A escolha desse valor se deve ao fato de que nas formulações destinadas a uso tópico, recomenda-se um valor de três a quatro vezes superiores ao utilizado em uma formulação injetável.

Observa-se que comercialmente, a RVC está disponível nas seguintes concentrações: 0,2; 0,5; 0,75 e 1% em ampolas de 10 e 20 mL, e em solução a 0,2 % em bolsas de infusão com volume de 100 e 200 mL. Clinicamente, a mesma é utilizada nas concentrações de 0,125% a 1%, sendo mais frequentemente, por via infiltrativa, em várias situações como anestesia epidural e bloqueios nervosos periféricos (0,5 a 0,75%) (Simpson et al., 2005) e bloqueio nervoso mandibular (0,75%) (Ernberg e Kopp, 2002). Topicamente, relata-se que a RVC empregada a 1% foi eficiente em cirurgias de catarata para anestesia de mucosa (Martini et al., 2002).

Nesse sentido, considerando-se como referência as concentrações usualmente adotadas de RVC na prática clínica, podemos afirmar que o valor estimado de 2% deste fármaco para nossas formulações destinadas a uso dermatológico está adequado. É importante destacar ainda que não há na literatura relatos de gel de RVC para anestesia tópica em pele.

Experimentalmente, os valores das concentrações de RVC obtidos revelaram proximidade em relação ao valor teórico e foram expressos na tabela abaixo (Tabela 12).

**Tabela 12** – Quantidade total de RVC presente em diferentes formulações de géis à base de Carbopol®

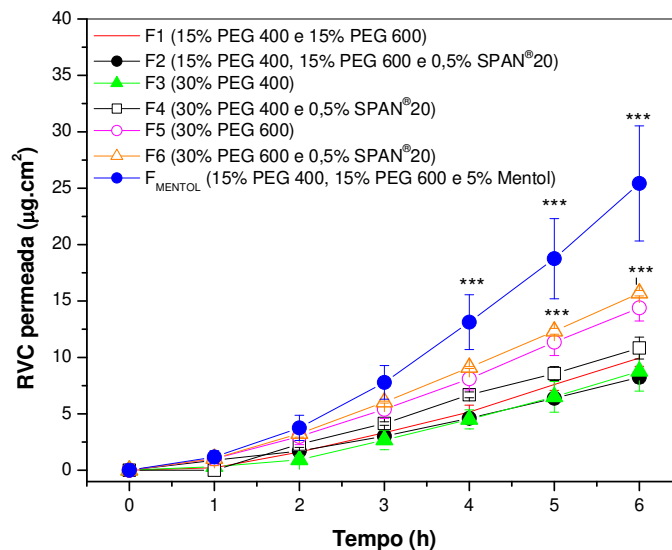
<b>Formulações</b>	<b>RVC (%)</b>
F1	2,06 ± 0,48
F2	1,98 ± 0,15
F3	1,97 ± 0,27
F4	1,88 ± 0,13
F5	1,99 ± 0,33
F6	2,22 ± 0,09
F7	2,13 ± 0,02
F <sub>MENTOL</sub>	2,15 ± 0,01
F <sub>NANO 2%</sub>	1,94 ± 0,12
F <sub>NANO 1%</sub>	1,02 ± 0,06

Nota: Dados expressos em média ± desvio padrão (n = 9).

### **3 - Ensaios de permeação *in vitro* em formulações com promotores de absorção**

Com o objetivo de caracterizar os perfis de permeação das diferentes formulações, todos os ensaios foram realizados sob condições de dose infinita. Os resultados obtidos foram expressos em quantidades cumulativas de RVC permeada em função do tempo (Figura 20).

A inclinação da reta no intervalo de 2-6 horas (porção linear do gráfico) representa o fluxo de penetração da RVC através da pele. Já a intersecção dessa mesma porção linear com o eixo das abscissas permitiu a determinação do tempo necessário para início de permeação (*time lag*) (Kaushik et al. 2010), como apresentado na tabela 13.



**Figura 20** - Perfis de permeação (dose infinita) da ropivacaína a partir de diferentes formulações de géis à base de Carbopol®. Dados apresentados como média e desvio padrão (n= 4-6, \*\*\* p<0,001; análise de variância de uma via com teste posterior de Tukey-Kramer).

Os resultados apontam que dentre as formulações com promotores de absorção (F1 a F6), a formulação contendo mentol (F<sub>MENTOL</sub>) apresentou os maiores valores de fluxo de permeação ( $5,39 \pm 0,35 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) e *time lag* ( $1,68 \pm 0,17 \text{ h}^{-1}$ ). Esses dados indicam que a preparação anestésica em estudo foi capaz de romper a barreira imposta pelo estrato córneo. No entanto, o tempo necessário para isso ocorrer foi demasiadamente longo. Já o alto fluxo de permeação demonstra que a formulação pôde penetrar ativamente, não se restringindo, portanto, às camadas superficiais da pele.

De fato, segundo Sapra et al. (2008) o mentol distribui-se nos domínios lipídicos intercelulares do estrato córneo, alterando sua organização estrutural de forma reversível. Além disso, o estudo de Fang et al. (2008) mostrou em micrografias que a incorporação deste promotor de absorção, na concentração de 5%, promoveu a descamação das células do estrato córneo após a aplicação de géis contendo tetracaína a 4%. Com esses achados, pode-se também relacionar o fluxo de permeação obtido nesses ensaios com mentol ao trabalho de Jantharaprapap e Stagni (2007), no qual foi observado que a adição daquele promotor (também na concentração de 5%), a uma formulação tópica de gel contendo meloxicam, promoveu o máximo fluxo de permeação ( $2,43 \pm 0,47 \text{ g}/\text{cm}^2$ ) em pele humana.



**Tabela 13** – Parâmetros de permeação dos diferentes géis de RVC através da pele de orelha de suínos (intervalo: 3-6 h)

Formulações	Quantidade Aplicada de RVC ( $\mu\text{g.g gel}^{-1}$ )	Fluxo ( $\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ )	Time Lag ( $\text{h}^{-1}$ )	% RVC Permeada (6h)
F1	1467,5	2,23 $\pm$ 0,39	1,55 $\pm$ 0,43	0,67
F2	1451,9	1,74 $\pm$ 0,23	1,29 $\pm$ 0,16	0,57
F3	1172,3	1,79 $\pm$ 0,70	1,74 $\pm$ 0,60	0,75
F4	1498,8	1,89 $\pm$ 0,85	0,97 $\pm$ 0,05	0,72
F5	1167,1	3,02 $\pm$ 0,38	1,35 $\pm$ 0,08	1,23
F6	2106,6	3,21 $\pm$ 0,09	1,14 $\pm$ 0,10	0,74
F7	2133,0	5,86 $\pm$ 1,86 <sup>***</sup>	1,93 $\pm$ 0,65	1,7
F <sub>MENTOL</sub>	2153,4	5,39 $\pm$ 0,35 <sup>***</sup>	1,68 $\pm$ 0,17	1,2
RVC solução 2%	-	5,15 $\pm$ 0,49	4,36 $\pm$ 0,77	-

Nota: dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 8).

A adição de promotores de absorção pertencentes a outras classes, como o tensoativo Tween<sup>®</sup>20, também foi estudada no trabalho de Jantharaprapap e Stagni (2007) ao observarem a diminuição do fluxo do meloxicam em membranas de celulose saturadas com isopropil miristato. O efeito observado foi justificado pelo fato deste tensoativo induzir a formação de micelas que incorporam o fármaco no veículo e diminuem, portanto, sua permeabilidade através da pele.

Os resultados aqui obtidos estão em concordância com esta informação, pois as formulações que possuem Span<sup>®</sup>20 em sua composição (F2, F4 e F6) apresentaram os menores valores de *time lag* dentre todas as formulações estudadas. Diante dessa constatação, pode-se afirmar que, o Span<sup>®</sup>20 deve alterar inicialmente a estrutura do estrato córneo, facilitando a rápida difusão da RVC, fator este que pode ser explicado pelo reduzido *time lag*.

No entanto, em estudo anterior, Peltonen et al. (2001) determinaram que a concentração micelar crítica para o Span<sup>®</sup>20 é de 0,021 mM. Considerando que a concentração utilizada neste trabalho foi de 0,5% (14 mM), ou seja, acima da concentração micelar crítica, é possível sugerir que à semelhança do efeito proporcionado pelo Tween 20 na permeação do meloxicam, o Span<sup>®</sup>20 deve promover a incorporação da RVC em micelas

e favorecer seu acúmulo nas camadas superficiais da pele, resultando, portanto, nos menores fluxos de permeação visualizados em nosso trabalho.

Em outro trabalho, Lopez-Castellano et al. (2000) sugerem que o Span<sup>®</sup>20 atua sobre os lipídios intercelulares do estrato córneo em monocamadas lipídicas propondo um mecanismo onde este promotor de penetração modifica o estado de condensação das ceramidas e do colesterol aumentando a fluidez na monocamada e, conseqüentemente, a difusibilidade das moléculas a serem permeadas. De fato, em nossos resultados verificamos que a difusão de ropivacaína através da pele com o uso Span<sup>®</sup>20 foi alterada, porém de forma insatisfatória, como observado pelos baixos fluxos de permeação.

As formulações com polietilenoglicol 400 (F3), polietilenoglicol 600 (F5) ou uma associação destes (F1), exibiram parâmetros de permeação (fluxo e *time lag*) intermediários, em comparação às demais formulações. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que esses promotores de absorção apenas solubilizaram a ropivacaína no gel de Carbopol<sup>®</sup>, contribuindo para o aumento da disponibilidade da molécula para permeação. Estes promotores não alteram, portanto, o estrato córneo em termos estruturais, agindo preferencialmente como solubilizadores (Herkenne et al., 2006).

Ainda em termos comparativos, observou-se que a solução de RVC a 2% possui um alto fluxo ( $5,15 \pm 0,49 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) em relação às demais formulações (F1 a F6). Esse resultado mostra que a ropivacaína isolada, isto é, sem a presença de promotores de absorção, possui alta difusibilidade através da pele. No entanto, ao observarmos o valor de *time lag* ( $4,36 \pm 0,77\text{h}^{-1}$ ), verifica-se que este valor é superior a todos aqueles obtidos para as demais formulações. Tal fato evidencia que o longo tempo para início de ação associado à forma farmacêutica inadequada para a manutenção do fármaco no local de aplicação, torna esta solução desfavorável para a aplicação clínica, sendo necessária portanto a introdução de promotores de absorção e a veiculação do fármaco em uma base semi-sólida.

A literatura relata que os promotores de absorção contribuem para o aumento da penetração das moléculas de duas formas: alterando reversivelmente a função de barreira desempenhada pelo estrato córneo, através da via intercelular (Escribano et al., 2003), ou aumentando o coeficiente de partição da droga na pele, o que pode ser traduzido pelo aumento da difusão (Chorilli et al., 2007). Neste trabalho, pode-se verificar que a função de barreira foi modificada pelas formulações contendo mentol ( $F_{\text{MENTOL}}$ ) e Span<sup>®</sup>20 (F2, F4 e F6) como promotores de absorção.

## **4 - Análise das formulações com Ropivacaína em nanopartículas de alginato-quitosana**

### **4.1 - Caracterização das nanoestruturas**

Os dados de tamanho (raio hidrodinâmico), índice de polidispersão e potencial zeta são apresentados na Tabela 14 observando-se uma variação de tamanho entre 435 e 600 nm, de acordo com a concentração de anestésico utilizada. Embora os valores de polidispersão estejam acima de 0,3, indicando um sistema pouco homogêneo (Gupta et al., 2010), esse “comportamento” é condizente com a literatura para partículas com essa composição (Grillo et al., 2010) e também está de acordo com o trabalho de Motwani (2008), onde os valores de polidispersão se encontram entre 0,325 e 0,489.

As medidas de potencial zeta apresentaram valores abaixo de 30 mV em módulo, os quais refletem baixa estabilidade coloidal e tendência à agregação em virtude da pequena força disponível para repulsão entre as partículas (Schaffazick et al., 2003).

**Tabela 14** - Valores de diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta e percentagem de ropivacaína permeada para as nanopartículas de alginato-quitosana (n=3).

<b>Nanoestruturas</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>Polidispersão</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
RVC 1%	435,1 ± 9,4	0,302 ± 0,02	-24,9 ± 0,1
RVC 2%	600,3 ± 12,0	0,471 ± 0,04	-25,0 ± 0,2

Embora a realização de estudos para verificar a estabilidade das nanopartículas de alginato-quitosana ainda sejam necessários, a principal finalidade da incorporação das mesmas nas formulações foi a avaliação da interferência de um sistema vesicular na liberação de RVC sobre a epiderme e, conseqüentemente, no efeito anestésico.

Sundar et al. (2010) relataram que o tamanho da partícula carreadora de fármaco afeta a liberação deste, sendo atribuído que partículas maiores liberam gradativamente a droga contida em seu interior. Relacionando essa informação com o diâmetro médio das partículas preparadas, verifica-se que apesar das nanoestruturas apresentarem dimensões relevantes (acima de 400 nm), a liberação do fármaco no estrato córneo foi potencializada, pois os valores de *time lag* (*discutidos mais adiante na análise dos resultados de permeação*) associados foram relativamente curtos.

#### **4.2 - Eficiência de associação da Ropivacaína nas nanopartículas**

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, o que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada (Soppimath, et al., 2001). Além disso, outros fatores influenciam a associação, como por exemplo, as características físico-químicas do fármaco (Calvo et al., 1996; Guterres et al., 1995), o pH do meio (Govender et al., 1999), as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação (Brausser et al., 1991), a ordem de adição do fármaco na formulação e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (Schaffazick et al., 2003). Conhecendo todas estas interferências, foram preparadas nanopartículas de alginato-quitosana contendo RVC e a eficiência de associação do fármaco foi dada de acordo com o as condições descritas no item *Validação da Metodologia Analítica*. Os cromatogramas foram analisados, as áreas calculadas e transformadas em porcentagem, sendo a porcentagem de incorporação de RVC cerca de 40 %.

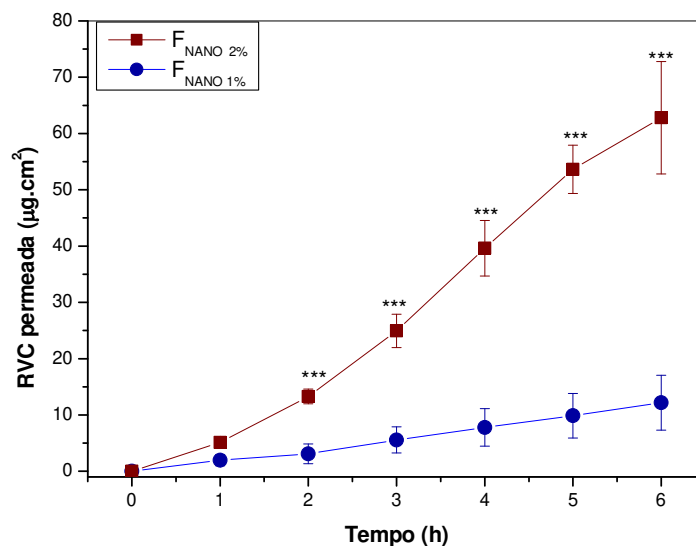
#### **4.3 - Análise dos resultados de permeação *in vitro* de formulações com Ropivacaína encapsulada em nanopartículas de alginato-quitosana**

A utilização de nanopartículas produzidas a partir de polímeros biodegradáveis, como os polissacarídeos alginato e quitosana, para liberação de drogas tem sido amplamente explorada. Esses sistemas de liberação nanoparticulados têm o potencial para melhorar a estabilidade de drogas e garantir uma liberação sustentada, aumentando consequentemente a duração do efeito terapêutico (Li et al., 2008; Sundar et al., 2010).

O alginato é um polissacarídeo solúvel em água, linear extraído de algas marrons e é composto de dois tipos de ácidos: ácido  $\alpha$ -L-gulurônico e  $\beta$ -D-manurônico. Apresenta propriedades mucoadesiva, biocompatível, não imunogênica e sofre biodegradação e dissolução sob condições fisiológicas normais. A solubilidade do alginato em água depende de sua associação com cátions. Dessa forma, foi proposta sua associação com quitosana. Esta, devido as suas propriedades biocompatível, biodegradável e não tóxica foi selecionada para ser complexada às nanopartículas de alginato (Li et al., 2008; Sundar et al., 2010).

A quitosana é um polissacarídeo linear, hidrofílico, carregado positivamente e constituído por unidades de glicosamina e N-acetilglicosamina, sendo produzido por desacetilação da quitina extraída, por exemplo, de conchas (Li et al., 2008; Sundar et al., 2010).

Os resultados aqui apresentados mostram que a  $F_{\text{NANO } 2\%}$ , apresentou o melhor perfil de permeação devido ao alto valor de fluxo ( $10,0 \pm 1,30 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) e menor *time lag* ( $0,58 \pm 0,04\text{h}$ ) em relação à  $F_{\text{NANO } 1\%}$  (Figura 21) e demais formulações com promotores de absorção. As nanopartículas presentes nesta formulação são responsáveis pelo maior poder de penetração do fármaco na pele.



**Figura 21** - Perfis de permeação (dose infinita) da RVC (1 e 2%) encapsulada em nanopartículas de alginato-quitosana dispersas em géis à base de Carbopol<sup>®</sup>. Dados apresentados como média e desvio padrão (n= 4-6, \*\*\* p<0,001; teste t-não pareado).

Em termos de relevância no cenário clínico, observa-se que o valor de fluxo apresentado pela formulação de RVC a 2% encapsulada em nanopartículas (Tabela 15), mostra-se como um dado importante na potencialização da analgesia induzida pela RVC. Além disso, os dados referentes à cinética de permeação permitem deduzir que a preparação anestésica em questão, por apresentar *time lag* reduzido, exibe um perfil clínico bastante interessante no que se refere ao rápido início de ação, minimizando o tempo para o início do efeito anestésico na prática clínica.

**Tabela 15** – Parâmetros de permeação  $F_{\text{NANO 1\%}}$  e  $F_{\text{NANO 2\%}}$  através da pele de orelha de suínos (intervalo: 2-6 h)

Formulações	Quantidade de RVC Aplicada ( $\mu\text{g.g gel}^{-1}$ )	Fluxo ( $\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ )	Time Lag ( $\text{h}^{-1}$ )	% RVC Permeada (6h)
$F_{\text{NANO 1\%}}$	1284,2	$2,18 \pm 0,87^{***}$	$1,43 \pm 0,33^{***}$	0,94
$F_{\text{NANO 2\%}}$	1948,7	$10,0 \pm 1,30^{***}$	$0,58 \pm 0,04^{***}$	3,2

Nota: dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 8).

Pode-se comparar ainda, em termos de *time lag*,  $F_{\text{NANO 2\%}}$  com a formulação contendo 30 % PEG<sup>®</sup> 400 e 0,5% de Span<sup>®</sup> 20 (F4). Verifica-se que ambas possuem reduzido *time lag* ( $0,58 \pm 0,04$  e  $0,97 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente), o que indicaria clinicamente um curto período para início anestésico. No entanto, comparando-se essas mesmas formulações em relação ao fluxo de permeação ( $10,0 \pm 1,30$  e  $1,89 \pm 0,85 \text{ g/cm}^2$ ), pode-se constatar que a F4, por apresentar baixo fluxo através da pele, não possui viabilidade de aplicação, ou seja, provavelmente não apresenta eficácia clínica satisfatória.

A permeação das nanopartículas através da pele apresenta reflexões controversas. Alguns autores consideram que as nanopartículas penetram em todas as camadas da pele, enquanto outros relatam que as mesmas se restringem ao estrato córneo e regiões foliculares (Narasimha Murthy et al., 2010). De uma forma geral, a maioria dos estudos têm demonstrado que a penetração de nanopartículas menores que 40 nm, independentemente da carga de superfície, são carregadas tanto pelas vias intercelular quanto folicular do estrato córneo. Pela rota folicular podem ainda atingir a região da derme (Narasimha Murthy et al., 2010).

No que se refere às nanopartículas elásticas com diâmetro médio variando entre 100-150 nm, os estudos demonstram que as mesmas são capazes de permear todo o estrato córneo e atingir a epiderme viável, o que não ocorre com as nanopartículas rígidas de tamanho semelhante (Narasimha Murthy et al., 2010).

Os estudos de Alvarez-Roman et al. (2004) mostram claramente que as nanopartículas se acumulam preferencialmente nas aberturas foliculares. Esses autores atribuem esta localização ao tamanho das estruturas, pois as nanopartículas menores se acumulavam especificamente regiões foliculares. Essas informações corroboram com o

trabalho de Landemann et al. (2007), o qual evidencia que as investigações recentes atribuem um papel significativo aos folículos pilosos na penetração de ativos através da pele. Foi revelado que as maiores taxas de absorção de compostos ocorrem em áreas da pele com maior densidade de folículos.

Landemann et al. (2007) e Paramjit Singh et al. (2000), afirmam que as partículas superiores 5  $\mu\text{m}$  (5000 nm), não penetram nas camadas de lipídios do estrato córneo, mas somente no infundíbulo do folículo piloso, podendo ser considerados ainda um reservatório a longo prazo para as substâncias aplicadas topicamente, uma vez que o estrato córneo por sofrer descamação não dispõe dessa propriedade.

O trabalho de Prow et al. (2011) esclarece que a pele constitui uma barreira física natural contra a penetração de partículas e que a maioria das substâncias permeadas são carregadas através da via intercelular. As moléculas pequenas são capazes de circular livremente no interior dos espaços intercelulares e a taxas de difusão são basicamente direcionadas pela lipofilia, mas também por propriedades, tais como peso molecular ou solubilidade.

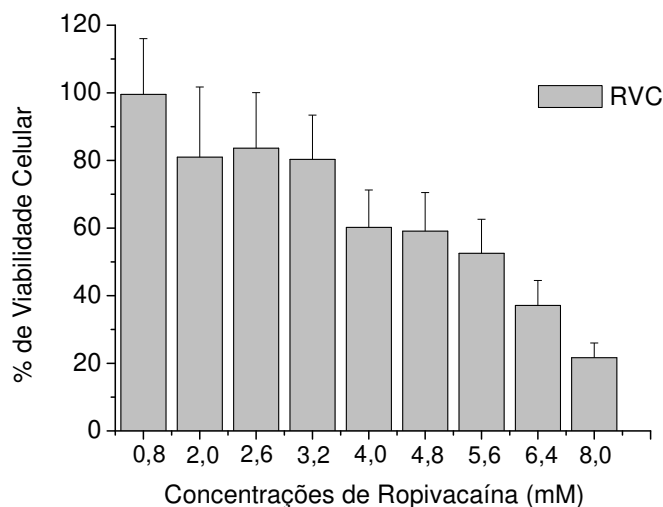
No entanto, o transporte intradérmico de nanopartículas ocorre especialmente na pele lesada e nas aberturas dos folículos pilosos. Prow et al. (2011) discutem ainda que as nanopartículas com mais 10 nm de diâmetro, provavelmente não são permeadas através do estrato córneo, mas nas aberturas dos folículos pilosos. Dessa forma, com base na literatura, verifica-se que no sistema nanoparticulado aqui desenvolvido, a dimensão das estruturas variou entre 400-600 nm de diâmetro e que a rota transfolicular pode ter sido utilizada para o carregamento da RVC através da pele.

## **5 - Ensaio de citotoxicidade em cultura de fibroblastos 3T3**

### **5.1 - Efeitos da Ropivacaína livre**

A figura abaixo (Figura 19) mostra a curva de viabilidade celular após tratamento das células com soluções de RVC nas concentrações de 0,4 a 8 mM. A curva permite verificar que nas concentrações acima de 6,4 mM de RVC, a porcentagem de fibroblastos viáveis foi reduzida, evidenciando a citotoxicidade da RVC em concentrações acima do referido valor. Cabe salientar ainda, que na concentração de 8 mM (concentração limite de solubilidade da RVC), a porcentagem de células viáveis é drasticamente reduzida para 25,07%. Esse valor mostra a alta toxicidade de RVC nesta concentração para fibroblastos Balb/c 3T3.

O efeito tóxico dos anestésicos locais, como a RVC é manifestado quando alteram as propriedades físico-químicas da membrana, como a fluidez ou ordenamento lipídico. A indução da fluidização da membrana ou a apenas a desorganização estrutural, através da modificação do ambiente lipídico ou da conformação de proteínas influencia a atividade de canais, receptores e enzimas e conseqüentemente a função da membrana (Tsuchiya et al., 2009).

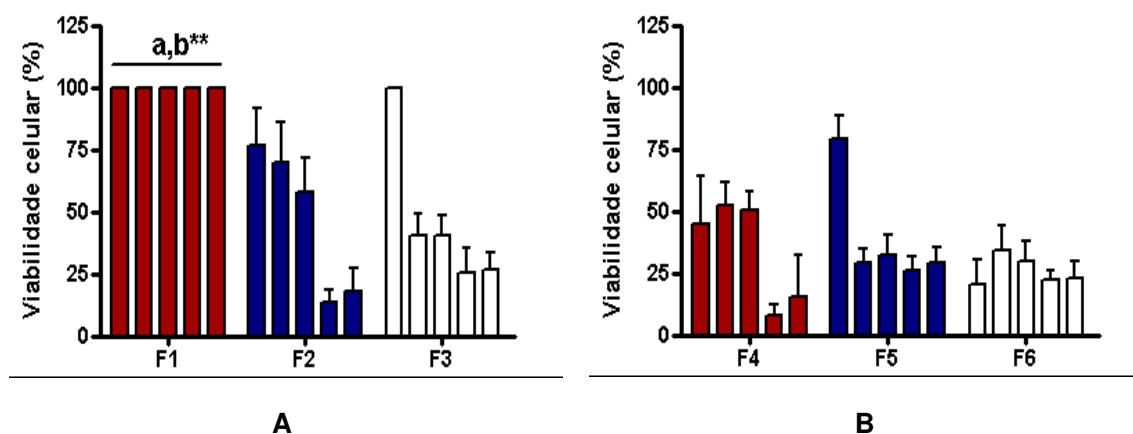


**Figura 19** – Curva de viabilidade celular da RVC livre (n=6-8; Cereda et al., 2011).

## **5.2 - Efeito dos géis de Ropivacaína com promotores de absorção e respectivos géis-placebo**

Nos testes de viabilidade celular em fibroblastos 3T3, verificou-se que as formulações F2, F3, F4, F5 e F6 alteraram a porcentagem de células viáveis (Figuras 23A e 23B) em relação ao controle (MTT). As concentrações de gel utilizadas para esta avaliação compreenderam o intervalo de 50 a 150mg/mL de gel ou 3,36 a 8,04mM de RVC.





**Figura 23** – Porcentagem de fibroblastos viáveis após tratamento com as formulações F1, F2 e F3 (A) e após tratamento com as formulações F4, F5 e F6 (B). Dados expressos em médias e desvio padrão. Análise de variância de uma via com teste posterior de Tukey-Kramer, \*\*  $p < 0,01$  ( $n = 3$ ).

As figuras 23 A e B representam as concentrações de RVC no gel, sendo: 3,36, 4,02, 5,34, 6,70 e 8,04 mM. Cada coluna presente no gráfico está associada a uma destas concentrações, respectivamente. Sendo assim, observa-se que as formulações F2, F4 e F6 exibiram menor porcentagem de células viáveis principalmente nas concentrações de 6,70 e 8,04 mM de RVC. Este dado evidencia a alta toxicidade das referidas formulações, as quais apresentam em sua composição o tensoativo SPAN<sup>®</sup>20 como promotor de absorção.

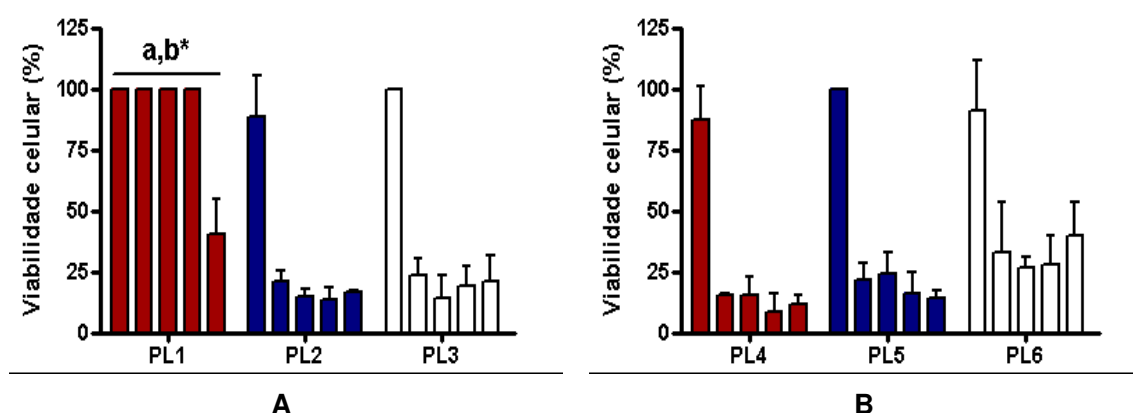
As formulações F1, F3 e F5 podem ser consideradas menos tóxicas, pois mostram mais de 25% de viabilidade celular em todas as concentrações analisadas. Os menores efeitos citotóxicos observados parecem estar associados ao fato dessas formulações apresentarem apenas PEG<sup>®</sup>400 (F3) ou PEG<sup>®</sup>600 (F5) isolados ou em combinação (F1).

Dentre essas formulações que induziram menor efeito citotóxico (F1, F3 e F5), podemos destacar a F5 que apresenta o maior fluxo ( $3,02 \pm 0,38 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) e o menor *time lag* ( $1,35 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$ ) em comparação às demais preparações anestésicas. Essa formulação por dispor de um perfil de permeação bastante interessante nos ensaios de permeação *in vitro* e menor efeito citotóxico nesses estudos preliminares, mostra-se como candidata à administração tópica de RVC.

Ainda em relação aos promotores de absorção, é necessário ressaltar que o mentol não foi avaliado no teste de citotoxicidade em decorrência da insolubilidade no meio de cultura DMEM, o que inviabilizou o teste.

Para os géis placebo de RVC com promotores de absorção, as Figuras 24A e B mostram a porcentagem de viabilidade dessas formulações sem o efeito aditivo do anestésico local.

A partir da interpretação dos dados observou-se que tanto F2 e F4 quanto suas respectivas formulações-placebo, PL2 e PL4, apresentam alta citotoxicidade (viabilidade celular abaixo de 25%), principalmente a partir das concentração de 4,02 mM de RVC. No entanto, situação oposta ocorreu em relação ao PL6, pois mostrou-se menos tóxico em relação à respectiva F6. Nesta última, a viabilidade celular foi inferior a 50% em todas as concentrações analisadas, enquanto para o respectivo placebo (PL6) foi superior a 25% em todas as concentrações.

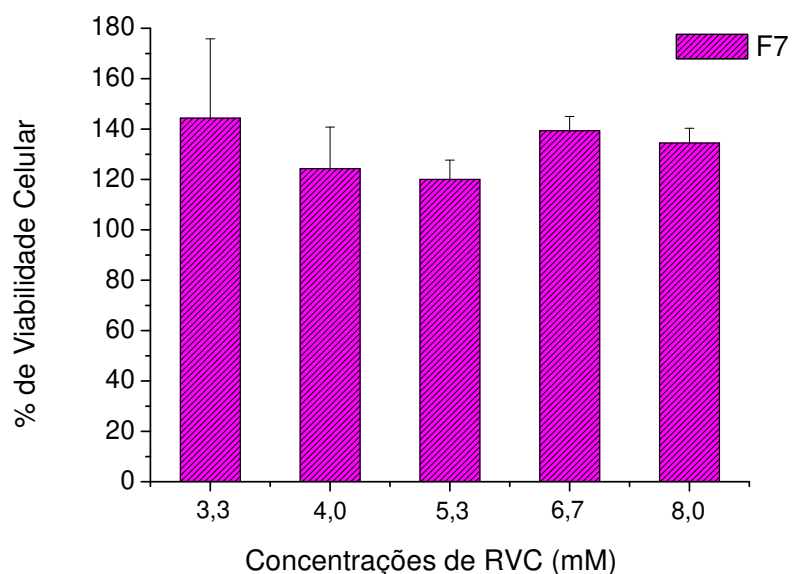


**Figura 24** – Porcentagem de fibroblastos viáveis após tratamento com as formulações PL1, PL2 e PL3 (A) e após tratamento com as formulações PL4, PL5 e PL6 (B). Dados expressos em médias e desvio padrão. Análise de variância de uma via com teste posterior de Tukey-Kramer, \*\*  $p < 0,01$  ( $n = 3$ ).

Comparativamente, a F5 que exibiu menor toxicidade, mostrou um placebo (PL5) com alto grau de toxicidade, pois a viabilidade foi inferior a 25% em todas as concentrações. Da mesma forma, o placebo da formulação 3 (PL3) mostrou-se mais tóxico em relação à respectiva F3, pois a partir da concentração de 4,02 mM de RVC, a taxa de sobrevivência das células foi inferior a 25%. Diante dessas constatações, pudemos compreender que em relação às formulações contendo RVC com promotores de absorção e seus respectivos géis-placebo, os efeitos citotóxicos não são causados pela ropivacaína, mas provavelmente estão associados aos promotores e/ou outros excipientes presentes nas formulações. Essa informação pode ser comprovada pela observação das taxas de viabilidade celular após tratamento com o PL3 e PL5, os quais se mostraram mais tóxicos em relação às respectivas formulações com RVC, F3 e F5. Quando se observa a F7 (Figura 25) podemos compreender a partir da análise de citotoxicidade desta formulação que de fato, a RVC

exerce um papel protetor, pois a viabilidade celular nesta formulação que apresenta somente RVC em sua composição foi de 100% em todas as concentrações analisadas.

Por fim, a F1 e seu respectivo placebo, PL1 não mostraram evidências de citotoxicidade, pois ambas formulações apresentaram, de modo geral altas taxas de viabilidade celular.

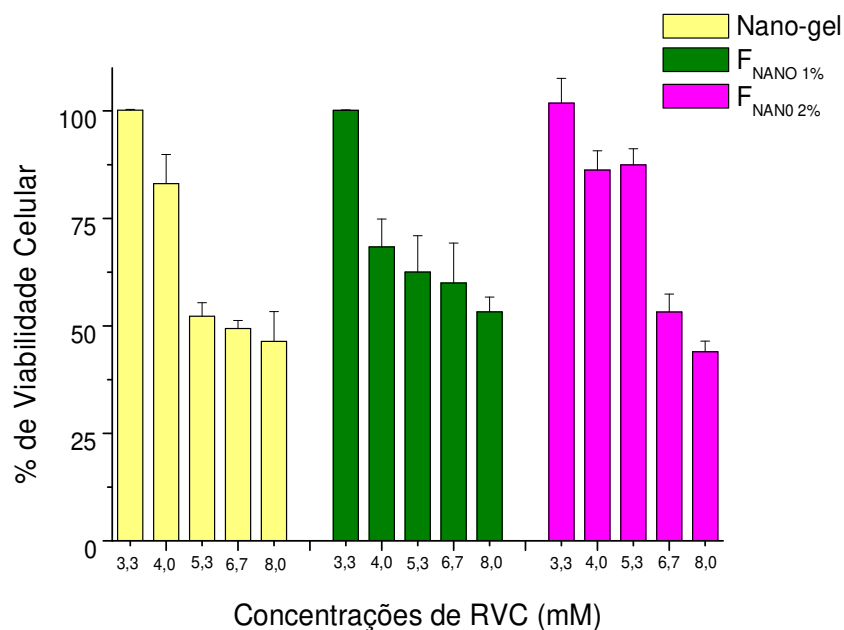


**Figura 25** – Porcentagem de fibroblastos viáveis após tratamento com a formulação 7 (n = 3).

### **5.3 - Efeito dos géis de Ropivacaína encapsulada em nanopartículas de alginato-quitosana e respectivos géis-placebo**

Comparando-se os efeitos citotóxicos do gel placebo de nanopartículas de alginato-quitosana (Nano-Gel) (Figura 26) em relação à  $F_{NANO\ 2\%}$  não foram observadas diferenças estatísticas significativas, embora se verifique redução da viabilidade celular (abaixo de 50%) somente nas concentrações mais altas (8,04 mM de RVC) de ambas as formulações.

A literatura relata que a quitosana, bem como os polímeros derivados desta, não apresentam toxicidade (Li et al., 2008) e em razão de sua alta massa molar (aproximadamente 2000 kDa), as nanopartículas de quitosana não atravessam o estrato córneo, limitando sua atividade e biotransformação somente a este local (Sundar et al., 2010).



**Figura 26** – Porcentagem de fibroblastos viáveis após tratamento com as formulações placebo de nanopartículas (Nano-Gel), F<sub>NANO 1%</sub> e F<sub>NANO 2%</sub>, (n=6).

## **6- Ensaios de citotoxicidade em cultura de células de melanoma murino B16F10**

Neste ensaio foram selecionadas as formulações com as maiores porcentagens de viabilidade celular quando testadas em culturas de fibroblastos. Dessa forma, dentre as formulações com promotores de absorção foram avaliadas a F1, F5 e F6 com os melhores perfis de permeação (fluxos mais altos), e dentre as formulações de RVC encapsulada em nanopartículas, a F<sub>NANO 2%</sub> com o mais alto fluxo.

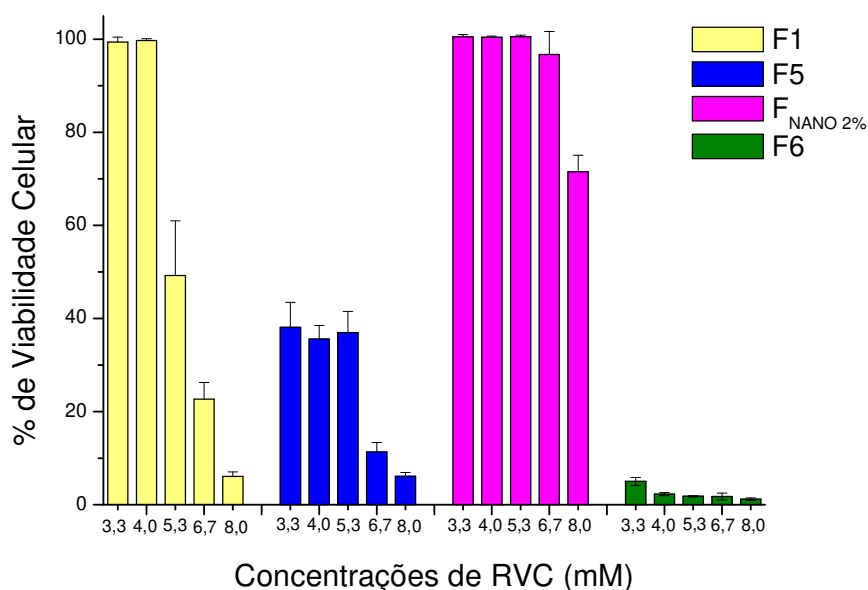
Ressalta-se que a F<sub>MENTOL</sub>, apesar de apresentar alto fluxo de permeação, não foi avaliada também em decorrência da insolubilidade da RVC no meio de cultura RPMI utilizado neste ensaio de citotoxicidade.

Na cultura de células de melanoma (Figura 27), observa-se que a viabilidade celular foi reduzida significativamente após o tratamento das células com a F6. Esses dados são compatíveis com os dados observados anteriormente na cultura de fibroblastos. Em ambas as culturas, a F6 reduz a porcentagem de células viáveis, corroborando para a evidência do potencial tóxico desta formulação.

A viabilidade celular também foi alterada no tratamento com a formulação F1, porém de forma menos acentuada em comparação com as demais formulações. Somente

nas concentrações de 6,70 e 8,04 mM de RVC a viabilidade celular foi reduzida para valores inferiores a 50%. Sendo assim, esta preparação anestésica embora menos tóxica tanto em fibroblastos quanto em células de melanoma murino, não se mostra plenamente satisfatória à administração cutânea, pois os parâmetros de permeação obtidos em pele de orelha de suínos mostram baixo fluxo através da pele ( $2,23 \pm 0,39 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) e lento início de ação ( $\text{time lag} = 1,55 \pm 0,43\text{h}$ ) em relação às demais formulações.

A formulação 5 embora disponha de melhor perfil de permeação (fluxo =  $3,02 \pm 0,38 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ;  $\text{time lag} = 1,35 \pm 0,08 \text{h}^{-1}$ ) em relação a F1 e baixa toxicidade na cultura de fibroblastos, apresenta alta toxicidade na cultura de células de melanoma, a qual pode ser visualizada pela viabilidade celular inferior a 50% em todas as concentrações analisadas.



**Figura 27** – Porcentagem de células de melanoma viáveis após tratamento com as formulações F1, F5, F<sub>NANO 2%</sub> e F6, (n=6).

Já a F<sub>NANO 2%</sub> apresentou o melhor perfil de permeação dentre todas as formulações estudadas. O alto fluxo e o reduzido  $\text{time lag}$  ( $10,0 \pm 1,30 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  e  $0,58 \pm 0,04 \text{h}^{-1}$  respectivamente) associado a baixa toxicidade tanto em fibroblastos (Figura 26) quanto em células de melanoma (Figura 27) nas concentrações de 3,36 a 8,04 mM de RVC fornecem subsídios importantes para potencial uso na prática clínica.

## **7 – Avaliação da atividade farmacológica: teste de tail-flick**

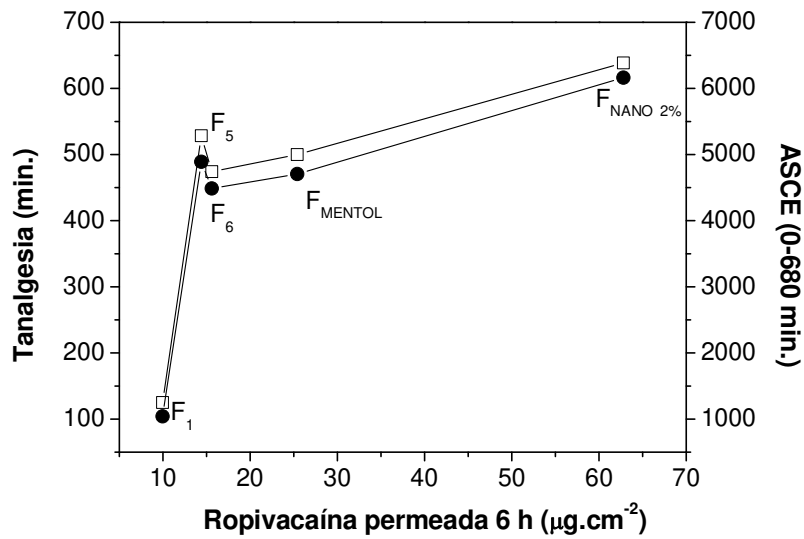
Para este teste foram selecionadas as formulações que apresentaram os melhores perfis de permeação ( $F_{\text{NANO 1\%}}$ ,  $F_{\text{NANO 2\%}}$ ,  $F_{\text{MENTOL}}$ , F5, F6 e F1) evidenciados em relação ao fluxo através da pele. Dentre as formulações testadas,  $F_{\text{NANO 1\%}}$ ,  $F_{\text{NANO 2\%}}$  e  $F_{\text{MENTOL}}$ , induziram maior duração do bloqueio sensorial associado a um aumento no tempo de ação total do fármaco, como observado pelos valores de Área Sobre a Curva de Efeito em Função do Tempo (ASCE) (Tabela 16 e Figura 28).

**Tabela 16** - Duração da analgesia ( $T_{\text{analgesia}}$ ) e Área Sobre a Curva de Efeito em função do tempo (ASCE) para as diferentes formulações de ropivacaína em gel

<b>Formulação</b>	<b><math>T_{\text{analgesia}}</math> (min.)</b>	<b>ASCE (0-680 min.)</b>
F1	125,0 ± 20,7	1041,8 ± 253,6
F5	528,5 ± 14,6	4890,0 ± 144,4 <sup>e**</sup>
F6	474,2 ± 24,4	4487,4 ± 280,1 <sup>d***</sup>
$F_{\text{MENTOL}}$	500,0 ± 23,0	4705,8 ± 172,5 <sup>c***</sup>
$F_{\text{NANO 1\%}}$	491,4 ± 12,1	4661,4 ± 111,9 <sup>b***</sup>
$F_{\text{NANO 2\%}}$	638,5 ± 17,7	6163,6 ± 126,2 <sup>a***</sup>

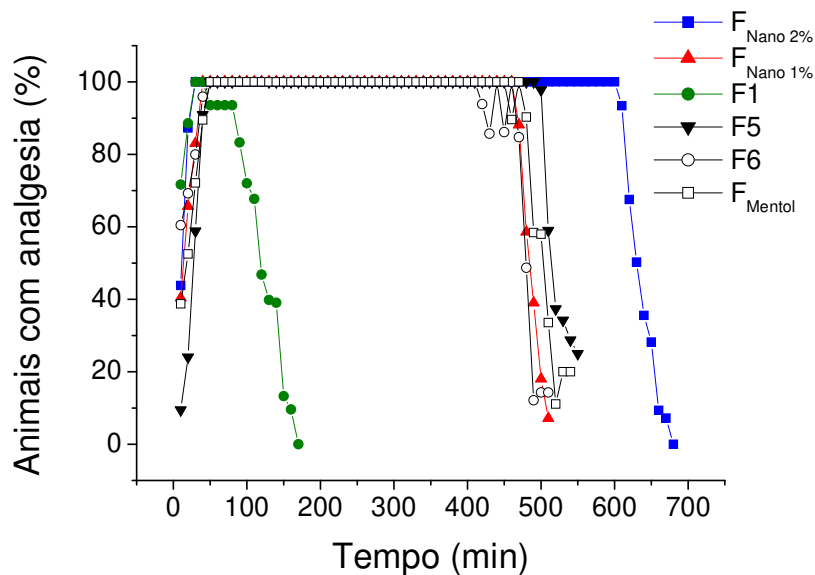
Nota: dados representados como média ± desvio padrão (n=6-7/grupo). *One-way ANOVA* com teste posterior de Tukey-Kramer. a-  $F_{\text{NANO 2\%}}$  vs. F1, F5, F6,  $F_{\text{MENTOL}}$  e  $F_{\text{NANO 1\%}}$ , b-  $F_{\text{NANO 1\%}}$  vs F1, c-  $F_{\text{MENTOL}}$  vs. F1, d- F5 vs. F6, F1, e- F6 vs. F1. \*\*\* p < 0,001; \*\*p < 0,01.

A Figura 28 correlaciona efeito total do anestésico (intensidade e duração de ação) expresso pela ASCE, tempo de analgesia e concentração de RVC permeada ao longo de 6 horas. Pode-se inferir que a formulação  $F_{\text{Nano 2\%}}$  obteve o melhor desempenho dentre as demais formulações, onde a intensidade e duração do efeito analgésico foi proporcional à concentração de fármaco permeado em função do tempo.



**Figura 28** - Relação entre a quantidade de ropivacaína permeada através da pele em 6 horas e a ASCE<sub>0-680</sub> obtida.

A Figura 29 mostra a porcentagem de animais com analgesia em função do tempo. Observa-se que dentre as formulações selecionadas para o teste *Tail-Flick*, a F<sub>Nano 2%</sub> apresentou a maior duração do efeito anestésico ( $638,5 \pm 17,7$  min), o que demonstra maior tempo de permanência do anestésico nas camadas da pele. Tal efeito, decorrente da ação das nanopartículas carreadoras, indicam uma liberação sustentada da RVC ao longo do tempo, prolongando a analgesia devido ao maior poder de penetração através da pele.



**Figura 29** – Eficácia anestésica evidenciada pela porcentagem de animais com analgesia em função do tempo (n=7/grupo).

Um resultado satisfatório semelhante pode ser observado após a administração de  $F_{\text{NANO } 1\%}$ , onde esta formulação apresentou perfil farmacológico semelhante àquelas contendo promotores de absorção associados ao fármaco na concentração de 2%, demonstrando que a incorporação do anestésico local em nanopartículas promoveu um aumento na duração do efeito analgésico com a possibilidade de aplicação de concentrações menores, reduzindo possivelmente os efeitos tóxicos locais.



## V. CONCLUSÕES

Este trabalho relata, pela primeira vez, a possibilidade de uso dérmico da ropivacaína, desenvolvendo formulações contendo promotores de absorção ou utilizando nanopartículas de alginato-quitosana como sistemas carreadores.

Dentre as formulações de RVC com promotores de absorção, as formulações F5, F6 e F<sub>MENTOL</sub> apresentaram os melhores perfis de permeação em termos de fluxo e time lag. A duração do bloqueio sensorial (*tail flick*) induzido por tais formulações foi significativo. No entanto, em termos de potencial citotóxico as formulações com PEG 600 e PEG 600 associado a Span<sup>®</sup> 20 mostraram uma redução na viabilidade celular o que pode limitar seu uso na prática clínica.

As formulações de RVC associadas ao tensoativo Span<sup>®</sup>20 exibiram os menores valores de *time lag* devido, provavelmente, à ação deste sobre o estrato córneo. No entanto, essa alteração promovida na camada superficial da pele deve ocorrer de forma acentuada em relação aos outros promotores, uma vez que os maiores efeitos citotóxicos foram visualizados nestas formulações.

A melhor formulação desenvolvida em termos de perfil de permeação, citotoxicidade e duração do efeito anestésico foi a F<sub>NANO 2%</sub>. Esses dados indicam baixo potencial irritativo à pele e possibilidade de aplicação clínica. Além disso, os testes de *tail-flick* indicaram um aumento na duração de analgesia, confirmando a efetividade anestésica da formulação.

Os dados obtidos neste trabalho permitem inferir que a RVC incorporada em nanopartículas de alginato-quitosana apresenta viabilidade para aplicação clínica em face aos resultados observados, os quais evidenciam boa penetração através da pele, rápido início de ação, toxicidade dérmica reduzida e tempo de analgesia prolongado.

## **VI. PERSPECTIVAS FUTURAS**

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de permeação *in vitro*, testes de citotoxicidade e teste *tail-flick*, foi possível estabelecer que a formulação contendo ropivacaína a 2% incorporada em nanopartículas de alginato-quitosana oferece parâmetros farmacológicos satisfatórios como penetração eficiente através da pele, rápido início de ação, toxicidade dérmica reduzida e tempo de analgesia prolongado. Tais resultados indicam que a formulação em estudo possui viabilidade para uso clínico. Entretanto, tornam-se necessários ainda estudos complementares que possam atestar a eficácia e a segurança para a efetiva introdução clínica.

Uma vez que já foram realizados ensaios *in vitro* de citotoxicidade, pode-se propor a realização de estudos de biocompatibilidade por meio da análise histopatológica em pele de animais. Neste estudo, o potencial lesivo da formulação pode ser aferido pela intensidade da injúria tecidual verificada através da análise da infiltração leucocitária ou pela observação de áreas necrosadas na epiderme e derme.

Com a finalidade de se verificar mais precisamente em quais regiões há acúmulo de RVC, pode-se utilizar estudos em microscopia confocal, a qual permite determinar a profundidade de penetração da formulação através das camadas da pele confirmando, portanto, a eficácia da formulação.

Posteriormente, pode-se demonstrar ainda a eficácia clínica desta formulação que se mostra promissora através da anestesia tópica em pele ou mucosa em humanos. Dessa forma a aplicação em Odontologia pode ser realizada por meio da avaliação da anestesia pulpar e em tecidos moles (gengiva), na tentativa de se eliminar a utilização das agulhas na anestesia local.

## **VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Alvarez-Román, R.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Guy, R.H.; Fessi, H. (2004). Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release** **99**:53–62.
2. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 23 de maio de 2003, Brasil. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <[http:// www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acessado em 14 de janeiro de 2011.
3. Al-Melh, M.A.; Andersson L. (2007). Comparison of topical anesthetics (EMLA/Oraqix vs. benzocaine) on pain experienced during palatal needle injection. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** **103(5)**:e16-e20.
4. Alster, T.S. (2007). The Lidocaine/Tetracaine Peel: A Novel Topical Anesthetic for Dermatologic Procedures in Adult Patients. **Dermatol Surg** **33**:1073–1081
5. AstraZeneca Pharmaceuticals, USA. (2004). **EMLA**. Disponível em <<http://www1.astrazeneca-us.com/pi/EMLA.pdf>>. (Acessado em 20 de fevereiro de 2011).
6. Aulton, M.E. (2005). Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed.
7. Azulay, R.D.; Azulay, D.R. (1999). Dermatologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.
8. Babich, H.; Borenfreund, E. (1991). Cytotoxicity of T-2 Toxin and Its Metabolites Determined with the Neutral Red Cell Viability Assay. **Applied and Environmental Microbiology** **57**:2101-2103.
9. Bagesund, M.; Tabrizi, P. (2008). Lidocaine 20% patch vs lidocaine 5% gel for topical anaesthesia of oral mucosa. **International Journal of Paediatric Dentistry** **18**:452-460.
10. Berardesca, E.; Distanto, F.; Vignoli, G.P.; Oresajo, C.; Green, B. (1997). Alpha hydroxyacids modulate stratum corneum barrier function. **Br J Dermatol** **137(6)**: 934-8.
11. Bryan, H.A.; Alster, T.S. (2002). The S-Caine Peel: A novel topical anesthetic for cutaneous laser surgery. **Dermatol Surg** **28**: 999-1003.
12. Bouwstra, J.A.; Honeywell-Nguyena, P.L.; Gooris, G.S.; Ponc, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**. **42**:1-36.
13. Brasseur, N.; Brault, D.; Couvreur, P. (1991). Adsorption of hematoporphyrin onto poly-alkylcyanoacrylate nanoparticles: **carrier capacity and drug release**. **Int. J. Pharm.****70**:129-135.
14. Brisman, M., Ljung, B.M.L.; Otterbom, I.; Larsson, L.E.; Andréasson, S.E. (1998). Methaemoglobin formation after the use of EMLA cream in term neonates. **Acta Paediatr.** **87**:1191-1994.

15. Butterworth, J. F. (2002). **Local Anesthetics: Agents, Additives, Mechanisms and Misconceptions.**  
Disponível em: [http://www.csaol.cn/img/2007asa/RCL\\_src/132\\_Butterworth.pdf](http://www.csaol.cn/img/2007asa/RCL_src/132_Butterworth.pdf)  
(Acessado em 16 de janeiro de 2011).
16. Butterworth, J. F.; Strichartz, G. R. (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. **Anesthesiology** **72(4)**:711-34
17. Caccavale, A.; Romanazzi, F.; Imparato, M.; Negri, A.; Porta, A.; Ferentini, F. (2010). Ropivacaine for topical anesthesia in pterygium surgery with fibrin glue for conjunctival autograft. **Cornea** **29(4)**:375-6
18. Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. (1996). Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **J. Pharm. Sci.** **85**:530-536.
19. Carpenter, K.J.; Dickenson A.H. (2002). Molecular aspects of pain research. **The Pharmacogenomics J.** **2**:87-95.
20. Cada, D.J.; Arnold, B.; Levien, T.; Baker, D.E. (2006). Lidocaine/Tetracaine Patch. **Hospital Pharmacy** **41(3)**:265-273.
21. Cereda, C.M.S.; Tófoli, G.R.; Maturana, L.G.; Nunes, L.A.S.; Oliveira, A.L.R.; Arana, S.; Braga, A.F.A.; de Araujo, D.R.; de Paula, E. (2011). Local Neurotoxicity and Myotoxicity Evaluation of Bupivacaine or Ropivacaine in 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes Submetido ao **Br. J. Anaesthesiol.**
22. Chorilli, M.; Brizante, A.C.; Rodrigues, C.A.; Salgado, H.R.N. (2007) Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev Bras Farm.** **88(1)**:7-13
23. Chung, N.Y.; Batra, R.; Itzkevitch, M.; Boruchov, D.; Baldauf, M. (2010). Severe methemoglobinemia linked to gel-type topical benzocaine use: a case report. **J Emerg Med** **38(5)**:601-6.
24. Copoví, A.; Díez-Sales, O.; Herráez-Domínguez, J.V.; Herráez-Domínguez, M. 2006. Enhancing effect of alpha-hydroxyacids on "in vitro" permeation across the human skin of compounds with different lipophilicity. **International Journal of Pharmaceutics** **314**:31-36.
25. Covino, B.G. (1986). Pharmacology of local anaesthetic agents. **Br J Anaesth.** **58(7)**:701-16.
26. Cornélio, R.; Mayorga, P. 2007. Estudo da penetração cutânea do flurbiprofeno. **Lat. Am. J. Pharm.** **26**: 883-888.
27. da Silva, A.L.R. (2007). Preparação, caracterização e estudos de estabilidade em formulações de gel de benzocaína lipossomal e não lipossomal para uso tópico em odontologia. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia/Unicamp.
28. de Araujo, D.R.; Cereda, C.M.; Brunetto, G.B.; Pinto, L.M.; Santana, M.H.; de Paula, E. 2004. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. **Can J Anaesth** **51(6)**:566-72.

29. de Araujo, D.R.; Cereda, C.M.; Brunetto, G.B.; Vomero, V.U.; Pierucci, A.; Neto, H.S.; de Oliveira, A.L.; Fraceto, L.F.; Braga, A.F.A.; de Paula, E. (2008a). Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. **J Pharm Pharmacol.** **60(11)**:1449-5.
30. de Araujo, D.R.; Tsuneda, S.S.; Cereda, C.M.; Del G, F.; Carvalho, F.; Preté P.S.; Fernandes, S.A.; Yokaichiya, F.; Franco, M.K.; Mazzaro, I.; Fraceto, L.F.; de F A Braga, A., de Paula, E. (2008b). Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. **Eur J Pharm Sci.** **33(1)**:60-71.
31. de Araujo, D.R.; Padula, C.; Cereda, C.M.; Tófoli, G.R.; Brito, R.B.; de Paula, E.; Nicoli, S.; Santi, P. (2010). Bioadhesive films containing benzocaine: correlation between in vitro permeation and in vivo local anesthetic effect. **Pharm Res.** **27(8)**:1677-86.
32. de Paula, E.; Schreier, S. (1996). Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. **Braz. J. Med. Biol. Res** **29(7)**:877-94
33. de Paula, E.; Schreier, S.; Jarrel H.C., Fraceto, L.F. (2008). Preferential location of lidocaine and etidocaine in lecithin bilayers as determined by EPR, fluorescence and 2H NMR. **Biophys Chim** **132(1)**:47-54.
34. Denizot, F.; Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods** **89(2)**:271-7.
35. Dennis, A.C.; McGarvey, J.J.; Woolfson, A.D.; McCafferty, D.F.; Moss, G.P. (2004). A Raman spectroscopic investigation of bioadhesive tetracaine local anaesthetic formulations. **Int J Pharm** **279**:43–50.
36. Eichenfield, L.F.; Funk, A.; Fallon-Friedlander, S.; Cunningham, B.B. (2002). A clinical study to evaluate the efficacy of ELA-Max (4% Liposomal Lidocaine) as compared with eutectic mixture of local anesthetics cream for pain reduction of venipuncture in children. **Pediatrics** **109**:1093-1099.
37. Ernberg, M.; Kopp, S. (2002). Ropivacaine for dental anesthesia: a dose-finding study. **J Oral Maxillofac Surg.****60(9)**:1004-10.
38. Escribano, E.; Calpena, A.C.; Queraltb, J.; Obacha, R.; Domenech, J. (2003). Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. **Eur J Pharm Sci.** **19(4)**:203-10.
39. Fang, C.; Liu, Y.; Ye X.; Rong, Z.X.; Feng, X.M.; Jiang, C.B., Chen H.Z. (2008). Synergistically enhanced transdermal permeation and topical analgesia of tetracaine gel containing menthol and ethanol in experimental and clinical studies. **Eur J Pharm Biopharm** **68(3)**:735–740.
40. Fartasch, M.; Teal, J.; Menon, G.K. (1997). Mode of action of glycolic acid on human stratum corneum: ultrastructural and functional evaluation of the epidermal barrier. **Arch Dermatol Res.** **289**:404–409.
41. Fernández, S.A.; Dios, E.; Diz, J.C. (2009). Comparative study of topical anaesthesia with lidocaine 2% vs levobupivacaine 0.75% in cataract surgery. **British Journal of Anaesthesia** **102 (2)**: 216–20.

42. França, V.P. (2010). O namoro de Freud e a descoberta da anestesia tópica **Rev Med Minas Gerais** **20(1)**:131-137.
43. Franz-Montan, M.; Silva, A.L.; Cogo, K.; Bergamaschi, C.; Volpato, M.C.; Ranali, J.; de Paula, E.; Groppo, F.C. (2007). Efficacy of 1% ropivacaine gel for topical anesthesia of human oral mucosa. **Quintessence Int.** **38(7)**:601-6.
44. Franz-Montan, M.; de Paula, E.; Groppo, F.C.; Silva, A.L.R.; Ranali, J.; Volpato, M.C. (2010). Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology** **110(6)**:800-4.
45. Franz, T.J. (1975). Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **J. Invest Dermatol.** **64(3)**:190-195.
46. Fraceto, L.F.; Pinto, L.M.A.; Franzoni, L.; Spisni, A.; Schreier, S.; de Paula, E. (2002). Specific location of lidocaine in phospholipid bilayers: A <sup>1</sup>H-NMR and RPE study. **Biophys Chem** **99**:229-4
47. Fraceto, L.F.; Spisni, A.; Schreier, S.; de Paula, E. (2005). Differential effects of uncharged aminoamide local anesthetics on phospholipid bilayers, as monitored by <sup>1</sup>H-NMR measurements. **Biophys Chem** **115**:11-8.
48. Fraceto, L. F.; Oyama-Jr, S.; Nakaie, C. R.; Spisni, A.; de Paula, E.; Pertinhez, T. A. (2006). Interaction of local anesthetics with a peptide encompassing the IV/S4-S5 linker of the Na<sup>+</sup> channel. **Biophys. Chem.** **123(1)**:29-39.
49. Friedman, P.M.; Fogelman, J.P.; Nouri, K.; Levine, V.J.; Ashinoff, R. (1999). Comparative study of the efficacy of four topical anesthetics. **Dermatol Surg.** **25**: 950-954.
50. Fukayama, H.; Suzuki, N.; Umino, M. (2002). Comparison of topical anesthesia of 20% benzocaine and 60%lidocaine gel. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** **94**:157-61.
51. Gamisans, F.; Lacoulonche, F.; Chauvet, A.; Espina, M.; Garcia, M. L.; Egea, M. A. (1999). Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. **Int. J. Pharm.** **179**:37-48.
52. Golembiewski, J. (2007). Local Anesthetics. *Journal of PeriAnesthesia Nursing* **22(4)**:285-288.
53. Gratieri, T.; Gelfuso, G. M.; Lopez, R. F. V. (2008). Princípios básicos e aplicação da iontoforese na permeação cutânea de fármacos. **Quim. Nova** **31(6)**:1490-1498.
54. Godin, B.; Touitou E. 2007. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews** **59**:1152–1161.
55. Groen, D.; Gooris, G.S.; Ponec, M.; Bouwstra, J. (2008). Two new methods for preparing a unique stratum corneum substitute. **Biochimica et Biophysica Acta** **1778**: 2421–2429.

56. Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **J. Control. Release** **57**:171-185.
57. Grillo, R.; de Melo, N.F.; de Araújo D.R.; de Paula, E.; Rosa, A.H.; Fraceto, L.F. (2010). Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. **J Drug Target** **18(9)**:688-99.
58. Gupta, V.K.; Karar, P.K.; Ramesh, S.; Misra, S.P.; Gupta, Alok. (2010). Nanoparticle Formulation for Hydrophilic & Hydrophobic Drugs. **Int. J. Res. Pharm. Sci.** **1**:163-169
59. Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Devissaguet, J-PH.; Puisieux, F. (1995). Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **Int. J. Pharm.** **113**:57-63
60. ICH. **Internacional Conference on Harmonization**; Guidance for Industry – Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology; Londres, 1996.
61. Hadgraft, J. (2001). Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics** **224**:1-18.
62. Herkenne, C.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Hadgraft, J.; Guy, R.H. (2006) Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. **Pharm Res.** **23(8)**:1850-6.
63. Hersh, E.V.; Houpt, M.I.; Cooper, S.A.; Feldman, R.S.; Wolff, M.S.; Levin, L.M. (1996). Analgesic efficacy and safety of an intraoral lidocaine patch. **J Am Dent Assoc** **127(11)**:1626-34.
64. Ibrahim, S.A.; Li, S.K. (2009). Effects of chemical enhancers on human epidermal membrane: Structure-enhancement relationship based on maximum enhancement (E(max)). **Journal of Pharmaceutical Sciences** **98**:926–944.
65. Jacobi, U.; Kaiser, M.; Toll, R.; Mangelsdorf, S.; Audring, H.; Otberg, N.; Sterry, W.; Lademann, J. (2007). Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. **Skin Research and Technology** **13**:19–24.
66. Jager, M.; Groenink, W.; Spek, J.; Janmaat C.; Gooris, G.; Ponc M.; Bouwstra, J.(2006). Preparation and characterization of a stratum corneum substitute for in vitro percutaneous penetration studies. **Biochimica et Biophysica Acta** **1758**:636–644.
67. Jantharaprapap, R.; Stagni, G. (2007). Effects of penetration enhancers on in vitro permeability of meloxicam gels. **Int J Pharm.** **343(1-2)**:26-33.
68. Jussi, L.; Lammintausta, K. (2009). Sources of sensitization, cross-reactions, and occupational sensitization to topical anaesthetics among general dermatology patients. **Contact Dermatitis** **60**:150-154.
69. Kanikkannan N., Kandimalla K., Lamba S. S., M. Singh.(2000). Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. **Curr Med Chem** **7(6)**:593-608.
70. Kaweski, S. (2008). Topical anesthetic creams. **Plast Reconstr Surg.** **121(6)**:2161-5.

71. Kaushik, D.; Costache, A.; Michniak-Kohn, B. (2010). Percutaneous penetration modifiers and formulation effects. **International Journal of Pharmaceutics** **386**: 42-51.
72. Kessner D.; Ruettinger, A.; Kiselev, M.A.; Wartewig, S.; Neubert R.H.H. (2008). Properties of Ceramides and Their Impact on the Stratum Corneum Structure: A Review. **Skin Pharmacol Physiol** **21**:58–74.
73. Kilic, A.C.; Capan, Y.; Vural, I.; Gursoy, R.N.; Dalkara, T.; Cuine, A.; Hincal, A.A. (2005). Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. **J. Microencapsulation** **22**:633-641.
74. Koehler, A.; Oertel, R.; Kirch, W. (2005). Simultaneous determination of bupivacaine, mepivacain, prilocaine and ropivacain in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**. **1088**:126-130.
75. Koh, J.L.; Harrison, D.; Myers, R., Dembinski, R.; Turner, H.; McGraw, T. (2004). A randomized, double-blind comparison study of EMLA and ELA-Max for topical anesthesia in children undergoing intravenous insertion. **Pediatr Anaesth**.**14**(12):977-82.
76. Kravitz, N.D. (2007). The use of compound topical anesthetics: A review. **J Am Dent Assoc** **138**:1333-1339.
77. Krenzischek, D.A.; Dunwoody, C.J.; Polomano, R.C.; Rathmell, J.P. (2008). Pharmacotherapy for acute pain: implications for practice. **J. Perianesth Nurs**. **23**: 28-42.
78. Kundu, S.; Achar, S. (2002). Principles of office anesthesia: part II. Topical anesthesia. **American Family Physician** **66**:99-102.
79. Lacaz, C.S. (1973). **Micologia médica**. 5. ed. São Paulo: Sarvier.
80. Lademann, J.; Richter, H.; Teichmann, A.; Otberg, N.; Blume-Peytavi, U.; Luengo, J.; Wei, B.; Schaefer, U.F.; Lehr, C.M.; Wepf, R.; Sterry, W. (2007). Nanoparticles – an efficient carrier or drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** **66**:159-164.
81. Lee, J.K.; Kim, D.B.; Kim, J.I.; Kim, P.Y. (2000). In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. **Toxicology in Vitro** **14**:345-349.
82. Leone, S.; Di Cianni, S.; Casati, A.; Fanelli, G. (2008). Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. **Acta Biomed**. **79**:92-105.
83. Leopold, A.; Wilson, S.; Weaver, J.S.; Moursi, A.M. (2002). Pharmacokinetics of lidocaine delivery from a transmucosal patch in children. **Anesth Prog**. **49**:82-87.
84. Li, H. L.; Galue, A.; Meadows, L.; Ragsdale, D. S. (1999). A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. **Mol. Pharmacol**. **55**(1):134-41.



85. Li, P.; Dai, Y.N.; Zhang, J.P.; Wang, A.Q.; Wei, Q. (2008). Chitosan–Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. **Int J Biomed Sci** **4(3)**:221-228.
86. Lira, A.A.M. (2003). **Estudo de permeação in vitro e avaliação térmica de emulgel tópico a base de lapachol**. Dissertação de mestrado – Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco.
87. López-Castellano, A.; Cortell-Ivars, C.; López-Carballo, G.; Herráez-Domínguez, M. (2000). The influence of Span<sup>®</sup>20 on stratum corneum lipids in Langmuir monolayers: comparison with Azone<sup>®</sup>. **International Journal of Pharmaceutics** **203**:245-253.
88. Luhmann, J.; Hurt, S.; Shootman, M.; Kennedy, R. (2004). A comparison of buffered lidocaine versus eLA-max before peripheral intravenous catheter insertions in children. **Pediatrics** **113(3)**:e217-e220.
89. Malamed, S. F. (2001). **Manual de anestesia local**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
90. Martin, M.D.; Ramsay, D.S.; Whitney, C.; Fiset, L.; Weinstein, P. (1994). Topical anesthesia: differentiating the pharmacological and psychological contributions to efficacy. **Anesth. Prog.** **41**:40-47.
91. Martini, E.; Cavallini, G.M.; Campi, C.;Lugli, N.; Neri, G.; Molinari, P. (2002). Lidocaine versus ropivacaine for topical anesthesia in cataract surgery. **J Cataract Refract Surg** **28(6)**:1018-22.
92. Mather, L. E. (2010). The acute toxicity of local anesthetics. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology** **6(11)**:1313-1332.
93. Menon, G.K. (2002). New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews** **54 Suppl. 1**:S3 –S17.
94. Matsuda H.; Arima, H. (1999). Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Adv Drug Deliv Rev.** **36**:81-99.
95. McLure, H.A.; Rubin, A.P. (2005). Review of local anaesthetic agents. **Minerva Anesthesiol.** **71**:59-74.
96. Moore, T.J.; Walsh, C.S.; Cohen, M.R. (2004). Reported adverse event cases of methemoglobinemia associated with benzocaine products. **Arch Intern Med.****164**:1192-1196.
97. Morgan, C.J.; Renwick, A.G.; Friedmann, P.S.( 2003). The role of stratum corneum and dermal microvascular perfusion in penetration and tissue levels of water-soluble drugs investigated by microdialysis. **British Journal of Dermatology** **148**: 434–443.
98. Morrow, D.I.J.; McCarron, P.A.; Woolfson, A.D.; Donnelly, R.F. (2007). Innovative Strategies for Enhancing Topical and Transdermal Drug Delivery. **The Open Drug Delivery Journal** **1**:36-59

99. Motwani, S.K.; Chopra, S.; Talegaonkar, S.; Kohli, K.; Ahmad, F.J.; Khar, R.K. (2008). Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimization and *in vitro* characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** **68**:513–525
100. Musawi, A.A.; Andersson, L. (2010). Use of topical as only anesthetic for suturing a traumatic facial laceration. **Dent Traumatol.** **26**(3):292-3.
101. Narasimha Murthy, S.; Nair, A.B.; Hammer, N.; Vaka, S.R.K.; Wright, A.E. (2010). Dermatokinetics of Nanoparticles (25 nm). **International Journal of Innovative Pharmaceutical Research** **1**(2):37-43.
102. Nicolazzo, J.A.; Reed, B.L.; Finnin, B. C. (2004). Modification of buccal drug delivery following pretreatment with skin penetration enhancers. **J Pharm Sci** **93**(8):2054-63.
103. Nicoli, S.; Colombo, P.; Santi, P. (2005). Release and permeation kinetics of caffeine from bioadhesive transdermal films. **AAPS Journal** **7**:218-223.
104. Nicolson, G.L.; Smith, J.R.; Poste, G. (1976). Effects of local anesthetics on cell morphology and membrane-associated cytoskeletal organization in BALB/3T3 cells. **J. Cell Biology** **68**:395-402.
105. O'Brien, L.; Taddio, A.; Ipp, M.; Goldbach, M.; Koren, G. (2004). Topical 4% amethocaine gel reduces the pain of subcutaneous measles-mumps-rubella vaccination. **Pediatrics** **114**:e720-e724.
106. Ohzeki, k.; Kitahara, M.; Suzuki, N.; Taguchi, K.; Yamazaki, Y.; Akiyama, S.; Takahashi, K.; Kanzaki, Y. (2008). Local anesthetic cream prepared from lidocaine-tetracaine eutectic mixture. **Yakugaku Zasshi** **128**(4):611-616.
107. Padula, C.; Colombo, G.; Nicoli, S.; Catellani, P.L.; Massimo, G.; Santi, P. (2003). Bioadhesive film for the transdermal delivery of lidocaine: in vitro and in vivo behavior. **J. Control. Rel.** **88**:277-285.
108. Pandya V, Parmar KS, Shah BJ, Bilimoria FE. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2005; 71:393-397.
109. Paramjit Singh; Sihorkar, V.; Jaitely, V.; Kanaujia, P.; Vyas, S. P. (2000). Pilosebaceous unit: Anatomical considerations and drug delivery opportunities. **Indian Journal of Pharmacology** **32**:269-281.
110. Pathak, P.; Nagarsenker, M. (2009). Formulation and Evaluation of Lidocaine Lipid Nanosystems for Dermal Delivery. **AAPS Pharm Sci Tech** **10**(3): 985-992.
111. Peltonen, L.; Hirvonen, J.; Yliruusi, J. (2001). The behavior of sorbitan surfactants at the water-oil interface: straight-chained hydrocarbons from pentane to dodecane as an oil phase. *Journal of Colloid and Interface Science* **240**:272–276.
112. Prausnitz, M. R.; Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. **Nat Biotechnol.** **26**(11):1261-8.
113. Proksch, E.; Brandner, J.M.; Jensen, J-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**; **17**:63–1072.

114. Prow, T.W.; Grice, J.E.; Lin, L.L.; Faye, R.; Butler, M.; Becker, W.; Wurm, E.M.; Yoong, C.; Robertson, T.A.; Soyer, H.P.; Roberts, M.S. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2011 in press.
115. Queiroz, G.R.S.; Cunha, A.M.F.; Maia, P.F.C.M.D.; Rizzo, E.S.C.S. (2008). Alergia aos anestésicos locais: aspectos atuais. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac.* **8(4)**:9-16.
116. Ragsdale, D. S.; McPhee, J. C.; Scheuer, R.; Catterall, W. A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na<sup>+</sup> channels by local anesthetics. *Science* **265(5179)**:1724-8.
117. Ragsdale, D. S.; McPhee, J. C.; Scheuer, R.; Catterall, W. A. (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93(17)**:9270-5.
118. Ragsdale, D. S.; Avoli, M. (1998). Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Res Brain Res Rev* **26(1)**:16-28.
119. Railan, D.; Alster, T.S. (2007). Use of topical lidocaine for cosmetic dermatologic procedures. *J Drugs Dermatol.* **6(11)**:1104-1108.
120. Reif, S.; Le Corre, P.; Dollo, G.; Chevanne, F.; Le Verge, R. 1998. High-performance liquid chromatographic determination of ropivacaine, 3-hydroxy-ropivacaine, 4-hydroxy-ropivacaine and 2',6'-pipecoloxylidide in plasma. *Journal of Chromatography B* **719**:239-244.
121. Sapra, B.; Jain, S.; Tiwary, A.K. (2008). Percutaneous Permeation Enhancement by Terpenes: Mechanistic View. *The AAPS Journal* **10**:120-132.
122. Sarmiento, B.; Ribeiro, A.; Veiga, F.; Neufeld, R.; Ferreira, D. (2005). Insulin-loaded alginate/chitosan nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation. *Revista Portuguesa Farmácia* **LII(2)**:139-140.
123. Sato, M.E.O.; Gomara, F.; Pontarolo, R.; Andreazza, I.F. (2007). Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*; **43**:195-203.
124. Sawyer, J.; Febbraro, S.; Masud, S.; Ashburn, M. A.; Campbell, J.C. (2009). Heated lidocaine/tetracaine patch (Synera<sup>TM</sup>, Rapydan<sup>TM</sup>) compared with lidocaine/prilocaine cream (EMLA<sup>®</sup>) for topical anaesthesia before vascular access. *British Journal of Anaesthesia* **102 (2)**:210-15.
125. Schaffazick, S.R.; Guterres S.S.; Freitas, L.L.; Pohlmann, A.R. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova* **26**:726-737
126. Scudiere, D.A.; Shoemaker, R. H.; Kenneth, D. P.; Monks, A.; Tierney S.; Nofziger, T.H.; Currens, M.J.; Seniff, D.; Boyd M.R. (1988). Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research* **48**:4827-4833
127. Sekkat, N.; Kalia, Y.N.; Guy, R.H. (2004). Porcine ear skin as a model for the assessment of transdermal drug delivery to premature neonates. *Pharmaceutical Research.* **21**:1390-1397.

128. Shin, S.C.; Lee, J.W.; Yang, K.H.; Lee, C.H. (2003). Preparation and evaluation of bioadhesive benzocaine gels for enhanced local anesthetic effects. **International Journal of Pharmaceutics** **260**:77–81.
129. Simon, G.A.; Maibach, H.I. (2000). The Pig as an Experimental Animal Model of Percutaneous Permeation in Man: Qualitative and Quantitative Observations – An Overview. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology** **13**:229-234
130. Simonetti, M.P.B. (1995). Ropivacaína: estado atual e perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Anestesiologia** **45(2)**:131-140.
131. Simpson, D.; Curran, M.P.; Oldfield, V.; Keating, G.M. (2005). Ropivacaine: A review of its use in regional anaesthesia and acute Pain Management. **Drugs** **65(18)**:2675-2717.
132. Song, Y.; Wang Y.; Thakur, R.; Meidan, V.M.; Michniak, B. (2004). Mucosal drug delivery: membranes, methodologies, and applications. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.** **21**:195-256.
133. Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. (2001), Chemically modified polyacrylamide-g-guar gum-based crosslinked anionic microgels as pH-sensitive drug delivery systems: preparation and characterization. **J. Controlled Release** **70**: 331-345.
134. Sundar, S.; Kundu, J.; Kundu; S.C. (2010). Biopolymeric nanoparticles. **Sci. Technol. Adv. Mater.** **11**:1-13.
135. Tadicherla, S.; Berman, B. (2006). Percutaneous dermal drug delivery for local pain control. **Ther Clin Risk Manag.** **2(1)**:99-113.
136. Tanner, T.; Marks, R. (2008). Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. **Skin Research and Technology** **14**:249–260.
137. Thong, H.-Y.; Zhai, H.; Maibach, H.I. (2007). Percutaneous Penetration Enhancers: An Overview. **Skin Pharmacol Physiol** **20**:272–282.
138. Timmermans, M.W.H.; Bruynzeel, D.P.; Rustemeyer, T. (2009). Allergic contact dermatitis from EMLA cream: concomitant sensitization to both local anesthetics lidocaine and prilocaine. **Journal of the German Society of Dermatology** **7**:237-238.
139. Touitou, E.; Godin, B.; Karl, Y.; Bujanover, S.; Becker, Y. (2002). Oleic acid, a skin penetration enhancer, affects Langerhans cells and corneocytes. **J Control Release** **80(1-3)**:1-7.
140. Touitou, E.; Fabin, B.; Dany, S.; Almog, S. (1988). Transdermal delivery of tetrahydrocannabinol. **Int. J. Pharm.** **43**:9-15.
141. Tsuchiya, H.; Ueno, T.; Mizogami, M.; Takakura, K. (2010). Local anesthetics structure-dependently interact with anionic phospholipid membranes to modify the fluidity. **Chem Biol Interact** **183(1)**:19-24.
142. United States Pharmacopeia (2006). Rockville: U.S. Pharmacopeial Convention.

143. Venkatraman, S. S.; Jie, P.; Min, F.; Freddy, B.Y.C.; Leong-Huat, G. (2005). Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. **Int. J. Pharm.** **298**: 219-232.
144. Williams, A.C.; Barry, B.W. (2004). Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews** **56**:603-618.
145. Yu, H.Y.; Sun, P.; Hou, W.Y. (1998). Prolonged local anesthetic effect of bupivacaine liposomes in rats. **Int J Pharm.** **176**:133-136.
146. Yu, H.Y.; Li, S.D.; Sun, P. (2002). Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. **J Pharm Pharmacol.** **54(9)**:1221-7
147. Zuo, M.; Duan, G.L.; Ge, Z.G. (2004). Simultaneous determination of ropivacaine and antipyrine by high performance liquid chromatography and its application to the in vitro transplacental study. **Biomed. Chromatogr** **18**:752-755.

## **VIII. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

### **Resumos publicados em anais de congresso**

STOCO, SM; GRILLO, R; MELLO NFS; GUILHERME VA; FRANZ-MONTAN, M; TÓFOLI, GR; FRACETO LF; de PAULA E; de ARAUJO DR. ROPIVACAINE GEL FOR TOPICAL ANESTHESIA: *IN VITRO* PERMEATION SKIN AND CYTOTOXIC EFFECTS. *In*: 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto.

FRANZ-MONTAN, M.; CEREDA, CMS; STOCO, S.; de ARAUJO, D. R.; PAULA E. TRANSDERMAL DELIVERY OF BENZOCAINE FROM ELASTIC AND CONVENTIONAL VESICLES. *In*: International Liposomes Research Days: lipids, liposome and membrane biophysics, 2010, Vancouver, Canadá.

STOCO, SM; FRANZ-MONTAN, M; TÓFOLI, GR; CEREDA, CMS; de PAULA E; de ARAUJO DR. LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE ANESTÉSICOS LOCAIS ATRAVÉS DA PELE. *In*: II Workshop Temático - Novas Formulações Farmacêuticas de Anestésicos Locais de Ação Prolongada - Do desenvolvimento ao teste clínico odontológico, 2010, Campinas

### **Formação Complementar**

Absorção Cutânea: da teoria à aplicação no estudo de produtos de uso tópico. Curso promovido pela empresa Dosage Pesquisas Laboratoriais Ltda em 13/09/10, Campinas – SP (4h)

**IX. ANEXOS**

**CERTIFICADO DE REGISTRO DO ABATEDOURO FRIGAR NA SECRETARIA DE AGRICULTURA  
E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO**

FROM : PHONE NO. : +++ + =2 . 04 2060 05:01PM P01

 SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (CIA)  
GRUPO DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL 

**CERTIFICADO**

O Centro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (CIPOA) concedeu para o estabelecimento:

SISP: 1015  
FRIGAR ABATEDOURO E CONSERVAS LTDA - ME

o Registro para o(s) Produto(s):

No. do Registro	Produto	Nome Fantasia	DI Registro
1015/7271	CARNE RESFRIADA DE SUINO COM OSSO CORTES:	- FRIGAR	- 19/11/2002
1015/7272	CARNE CONGELADA DE SUINO COM OSSO CORTES:	- FRIGAR	- 19/11/2002
1015/7273	CARNE CONGELADA DE SUINO SEM OSSO CORTES:	- FRIGAR	- 19/11/2002
1015/7274	CARNE RESFRIADA DE SUINO SEM OSSO CORTES:	- FRIGAR	- 19/11/2002
1015/7275	LINGUIÇA TOSCANA FRESCAL	- FRIGAR	- 19/11/2002
1015/7276	LINGUIÇA DE FRANGO FRESCAL	- FRIGAR	- 19/11/2002
1015/7277	LINGUIÇA DE LOMBO SUINO FRESCAL	- FRIGAR	- 19/11/2002
1015/7278	LINGUIÇA DE PERNIL SUINO FRESCAL	- FRIGAR	- 19/11/2002
1015/7279	LINGUIÇA CALABRESA FRESCAL	- FRIGAR	- 19/11/2002

Este Certificado cancela todos os anteriores.

Campinas, 22 / 11 / 2002

  
DIRETOR  
CARLOS MAURÍCIO LEAL  
MÉD.VET.CRMV 1724

AV. LUIZ DE OLIVEIRA, 2360 - CAMPINAS - SP - CEP: 13061-140 - (019) 241-3000 (RAMAL 206) - FAX: (019) 241-3900 (RAMAL 227) - CARRÃO Nº 152 - C.P. 13061-001



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL PELA CEUA/UNICAMP**



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp**

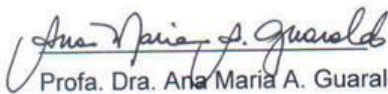
**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **2241-1**, sobre "**Liberação transdérmica de ropivacaína em gel**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo / Sheila Maria Stoco**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **13 de setembro de 2010**.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **2241-1**, entitled "**Transdermal delivery of ropivacaine from gels**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 13, 2010**.

Campinas, 13 de setembro de 2010.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>