



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



DOCUMENTO DE CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que o aluno Mario Rodolpho Sanjuan Barbosa, RA 083896 esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Avaliação *in vitro* da permeação de géis de lidocaína em mucosa palatina de suínos.” no ano de 2011-2012.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 26 de abril de 2012.

Profa. Dra. Michellẽ Franz Montan Braga Leite
Orientadora



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



"Avaliação *in vitro* da permeação de géis de lidocaína
em mucosa palatina de suínos"

Mario Rodolpho Sanjuan Barbosa

Piracicaba

2012

Mario Rodolpho Sanjuan Barbosa

"Avaliação *in vitro* da permeação de géis de lidocaína em mucosa palatina de suínos"

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do diploma de cirurgião dentista

Orientadora: Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

Piracicaba

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

B234a Barbosa, Mario Rodolpho Sanjuan, 1988-
 Avaliação in vitro da permeação de géis de lidocaína em
 mucosa palatina de suínos / Mario Rodolpho Sanjuan
 Barbosa. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

 Orientador: Michelle Franz Montan Braga Leite.
 Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
 Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
 Odontologia de Piracicaba.

 1. Lipossomas. 2. Anestesia. 3. Dor. I. Franz-Montan,
 Michelle. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, avós e tios, que depositaram em mim enorme expectativa de futuro e aos meus pacientes, que tornaram possível minha formação.

Agradecimentos

Agradeço a minha mãe Elaine, que sempre acreditou em mim, meu pai, que tornou os meus estudos viáveis. Agradeço também a minha avó Maria e ao meu avô Mario, que nunca me deixaram desamparado e sempre se mantiveram firmes e presentes durante a minha jornada.

Agradeço aos funcionários e as poucos professores que foram presentes e tiveram prazer em ensinar e me ajudaram durante o curso.

Agradeço à Profa. Dra. Eneida de Paula por permitir o uso do Laboratório de Biomembras do IB para realização da parte experimental deste projeto.

Agradeço à Viviane Vieira Sobral pela ajuda na validação do método analítico utilizado.

Agradeço imensamente a minha orientadora Michelle Franz Montan Braga Leite, que tive o prazer de ser orientado pela mesma e que sempre se mostrou uma excelente fonte de orientação e conhecimento o qual tornou todo o trabalho possível, e também a Profa. Dra. Maria Cristina Volpato e Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo que me possibilitaram o prazer de ser orientado pela Michelle, esta que sempre se mostrou disponível em frente a todas as adversidades.

A minha ex-namorada Bianca, que sempre me serviu de apoio em frente às dificuldades e aversões ao curso, que soube me entender quando necessitei, e que me ajudou a levantar quando por muitas vezes me via caído.

Por ultimo e não menos importante aos amigos que não me deixaram cair, em especial a Bruno Micaroni, que se provou o meu grande salvador, e aqueles que jamais serão esquecido e se mantiveram ao meu lado desde os primeiros passos, Bruno Vitti, Lucas Sicca, Staline Fatuda, Gabriel Lino, Mari Miura, Ana Viana, Julia Campana, Rosana Prada, Viviane Gatti, Daniel Pereira, Igor Ferrante, George Fonseca, Mayra Miguel, Fernanda Alves, Izabela Salomão e Bruno Cillo. Não posso deixar de lembrar da minha segunda casa, a Republica Mansão Babilônia e aos integrantes Gregório Sagara, Helcio Heiji, Rafael Araújo e Cynthia Martinelli.

"Penso noventa e nove vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio - e eis que a verdade se me revela."
Albert Einstein

RESUMO

Os anestésicos tópicos disponíveis para uso em mucosa oral ainda possuem uma eficácia questionável, considerando a dor a punção e injeção da solução anestésica. O uso de sistemas de liberação sustentada pode aumentar a eficácia de anestésicos locais. Estudos de permeação de fármacos através de barreiras biológicas como pele e mucosa vem crescendo nos últimos anos, especialmente quando envolve novas moléculas bioativas e/ou sistemas de liberação. O objetivo deste estudo foi comparar a permeação de formulações de anestésicos tópicos à base de lidocaína através de mucosa palatina de suínos. As formulações avaliadas foram as formulações comerciais: pomada de lidocaína 5% (Xylocaína[®]) e mistura eutética de lidocaína e prilocaína 5% (EMLA[®]), ambas da AstraZeneca, Brasil; e os géis de lidocaína a 2,5 e 5% encapsulada em lipossomas. Os lipossomas foram preparados através da hidratação (tampão HEPES, pH 7,4) do filme lipídico composto pela mistura de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol, na proporção molar de 4:3:0,07 e extrudados para o tamanho final de 400 nm. A permeação da lidocaína através da mucosa foi avaliada *in vitro* em células de difusão vertical do tipo *Franz* em condição não oclusiva e com dose infinita de aplicação (1,66 g/cm²) durante 5 horas. Em intervalos pré-estabelecidos, alíquotas (300 μ L) da solução receptora foram coletadas e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a quantificação da lidocaína. Os parâmetros de permeação avaliados foram fluxo, coeficiente de permeabilidade e *time lag*. Os parâmetros de permeação foram submetidos à análise de variância e comparados pelos testes de *Kruskal Wallis*, considerando nível de significância de 5%. O gel de lidocaína 5% lipossomal apresentou maior fluxo quando comparado a todas as demais formulações (P<0,001). A Xylocaína[®] apresentou o menor de coeficiente de permeabilidade e o maior *time lag* comparado às demais formulações (P<0,001). O gel de Lidocaína 5% lipossomal e o creme comercial EMLA[®] apresentaram os melhores desempenhos nos parâmetros de permeação avaliados através de mucosa palatina de suínos, sugerindo melhor penetração do anestésico local em mucosa queratinizada, e consequentemente, melhor eficácia *in vivo*.

Palavras chave: Lidocaína; Anestesia; Mucosa bucal.

ABSTRACT

The topical anesthetics available for oral mucosa use are still questionable concerning efficacy in promoting a painless needle insertion and injection. The use of control release systems can improve local anesthetic efficacy. Permeation studies enrolling drug transport across biological barriers like skin and mucosa have risen in recent years, especially when news drugs and/or drug delivery systems are involved. The objective of the present study was to evaluate permeation of lidocaine from different formulations across pig palatal mucosa. The commercially tested formulations were 5% lidocaine ointment (Xylocaína[®]) and the eutectic mixture of lidocaine/prilocaine 5% (EMLA[®]), both from AstraZeneca, Brazil; and liposome-encapsulated 2.5 and 5% lidocaine. Liposomes were prepared by dry lipid film hydration (HEPES, pH 7.4) of egg phosphatidilcholine, cholesterol and α -tocoferol (molar rate: 7:3:0.7) and extruded to a final size of 400 nm. Permeation of lidocaine across mucosa was evaluated *in vitro* in Franz type diffusion cells in non-occlusive and infinite dose conditions (1.66 g/cm²) during 5 hours. Samples were periodically withdrawn (300 μ L) from the receptor phase and analyzed by high performance liquid chromatography. Permeation parameters evaluated were: flux, permeability coefficient and time lag. The permeation parameters were submitted to analyze of variance and *Kruskal Wallis* post hoc test, considering 5% level of significance. Liposome-encapsulated 5% lidocaine showed the highest flux when compared to the other formulations (P<0.001). Xylocaína[®] demonstrated the lowest permeability coefficient and the highest time lag when compared to the other formulations (P<0.001). Liposome-encapsulated 5% lidocaine gel and EMLA[®] presented the best performances considering permeation parameters across pig palatal mucosa, suggesting a better penetration of the local anesthetic in queratinized mucosa, and therefore, the best *in vivo* efficacy.

Key words: Lidocaine; Anesthesia; Mouth mucosa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Origens e características do medo em Odontologia.....	4
2.2. Farmacologia dos anestésicos locais.....	4
2.3. Lidocaína.....	5
2.4. Lipossomas e anestésicos locais.....	6
2.5. Mucosa oral e estudos de permeação <i>in vitro</i>	8
JUSTIFICATIVA.....	9
3. PROPOSIÇÃO.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1. Materiais.....	12
4.2. Preparo dos lipossomas convencionais.....	12
4.3. Preparo do gel de lidocaína encapsulada em lipossomas.....	13
4.4. Desenvolvimento da metodologia analítica de quantificação do fármaco na avaliação do teor dos géis e durante os ensaios de permeação.....	13
4.5. Validação da metodologia analítica para quantificação da lidocaína.....	14
4.6. Determinação do título de lidocaína das formulações.....	16
4.7. Ensaio de permeação <i>in vitro</i>	16
4.8. Preparo e obtenção do epitélio de mucosa palatina para os ensaios de permeação.....	17
4.9. Ensaio de permeação <i>in vitro</i> em célula de difusão vertical tipo Franz através de epitélio de mucosa palatina de porco.....	18
4.10. Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS.....	21
5.1. Validação da metodologia analítica.....	21
5.2. Determinação do título de lidocaína das formulações.....	25

5.3. Ensaio de permeação <i>in vitro</i> em célula de difusão vertical tipo Franz através de epitélio de mucosa palatina de porco	25
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

TABELA 1. COMPONENTES UTILIZADOS NO PREPARO DOS GÉIS.	13
TABELA 2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS PARA VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.	14
TABELA 3. RESULTADOS DA PRECISÃO POR REPETIBILIDADE E EXATIDÃO.....	23
TABELA 4. RESULTADOS DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO MÉTODO – DIA 1.....	23
TABELA 5. RESULTADOS DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO MÉTODO – DIA 2.....	24
TABELA 6. VALORES OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.	24
TABELA 7. FORMULAÇÕES CONTENDO LIDOCAÍNA NAS CONCENTRAÇÕES TEÓRICAS DE 2,5 E 5% BEM COMO A DETERMINAÇÃO DA MÉDIA (\pm DP) DO TEOR FINAL DO FÁRMACO NAS RESPECTIVAS PREPARAÇÕES.	25
TABELA 8. PARÂMETROS DE PERMEAÇÃO DE LIDOCAÍNA A PARTIR DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE GÉIS ATRAVÉS DE EPITÉLIO DE MUCOSA PALATINA DE PORCO (1-5 H).	27
FIGURA 1. LIPOSSOMA UNILAMELAR CONTENDO FÁRMACOS LIPOFÍLICOS NO INTERIOR DA BICAMADA E HIDROFÍLICOS NO CENTRO AQUOSO DA VESÍCULA.	7
FIGURA 2. EPITÉLIO DA MUCOSA PALATINA POSICIONADO SOBRE UM PAPEL DE FILTRO, IMEDIATAMENTE APÓS A SEPARAÇÃO DO TECIDO CONECTIVO, PARA O ARMAZENAMENTO.	17
FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO DA MONTAGEM DA CÉLULA DE FRANZ PARA REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO DE PERMEAÇÃO ATRAVÉS DA MUCOSA.....	18
FIGURA 4. MONTAGEM DA CÉLULA DE FRANZ PARA REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO DE PERMEAÇÃO ATRAVÉS DA MUCOSA.....	18
FIGURA 5. CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS: A) FORMULAÇÃO EMLA [®] ; B) GEL DE LIDOCAÍNA LIPOSSOMAL; E C) GEL PLACEBO ANALISADAS SEGUNDO AS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DESCRITAS.	21
FIGURA 6. CURVA DE CALIBRAÇÃO DE LIDOCAÍNA (LINEARIDADE).	22
FIGURA 7. PERMEAÇÃO DE LIDOCAÍNA (EM MG DE FÁRMACO PERMEADO POR CM ²) EM FUNÇÃO DO TEMPO, ATRAVÉS DO EPITÉLIO DA MUCOSA PALATINA DE PORCO A PARTIR DAS FORMULAÇÕES EM GEL LIPOSSOMAIS À BASE DE CARBOPOL [®] E DAS FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE LIDOCAÍNA.	26
FIGURA 8. PERMEAÇÃO DE LIDOCAÍNA (EM % DE FÁRMACO PERMEADO POR CM ²) EM FUNÇÃO DO TEMPO, ATRAVÉS DO EPITÉLIO DA MUCOSA PALATINA DE PORCO A PARTIR DAS FORMULAÇÕES EM GEL LIPOSSOMAIS À BASE DE CARBOPOL [®] E DAS FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE LIDOCAÍNA.	27

1. INTRODUÇÃO

A ansiedade gerada pelo medo de sentir dor ainda é uma barreira para o atendimento odontológico (Nuttall et al., 2001). A anestesia local elimina a dor durante a realização de procedimentos odontológicos; no entanto, promove desconforto aos pacientes durante a punção da agulha e injeção da solução anestésica pela ausência de um anestésico tópico eficaz, sendo um dos maiores poderosos agentes indutores de estresse e ansiedade (Meechan, 2002). Além disso, em casos mais graves de medo e ansiedade, muitos pacientes evitam a consulta odontológica, reduzindo a qualidade da saúde oral, o que pode levar a problemas dentais severos (Armfield & Milgrom, 2011). O desenvolvimento de uma formulação tópica eficaz em mucosa oral seria um benefício à Odontologia.

Pouco avanço tem sido relatado na área de anestesiologia em Odontologia, em especial no desenvolvimento de formulações tópicas eficazes. As formulações disponíveis comercialmente, a benzocaína a 20% e a lidocaína a 5%, apresentam resultados divergentes na literatura e não são eficazes em muitas situações na clínica odontológica.

Nos últimos anos tem crescido o interesse por formas de liberação de medicamentos que permitam o aumento da duração do efeito e diminuição da toxicidade. Dentre estas, a encapsulação em lipossomas tem sido bastante estudada. Alguns trabalhos clínicos conduzidos com voluntários sadios demonstraram que a encapsulação de anestésicos locais como a ropivacaína, benzocaína e a lidocaína em lipossomas aumentaram a eficácia e duração da anestesia tópica odontológica (Franz-Montan et al., 2007b; Baroni, 2009; Franz-Montan et al., 2010b). Entretanto, a ropivacaína encapsulada em lipossomas aplicada topicamente não foi eficaz em reduzir dor da injeção da solução anestésica em mucosa palatina (Franz-Montan et al., 2012), região conhecida por maior dificuldade em se obter anestesia superficial adequada por conter uma espessa camada queratinizada, que dificulta a penetração dos anestésicos locais, especialmente a região anterior (Meechan, 2002; Meechan et al., 2005).

Estudos de permeação de fármacos através de barreiras biológicas como pele e mucosa vem crescendo nos últimos anos, especialmente quando envolve novas moléculas bioativas e/ou sistemas de liberação. Durante a fase pré-clínica de

avaliação da eficácia de um medicamento de uso tópico, o estudo da permeação é de extrema importância, pois permite uma previsão do comportamento desta formulação frente à barreira utilizada, e conseqüentemente, pode ajudar a melhorar a farmacocinética e biodisponibilidade deste produto, bem como desenvolver estratégias para alterar esta barreira e aumentar a eficácia de produtos (Caon & Simões, 2011).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origens e características do medo em Odontologia

Medo e ansiedade à consulta odontológica podem ser considerados como barreiras aos pacientes para a procura e realização de um tratamento odontológico apropriado (Smith & Heaton, 2003).

Muitos aspectos que envolvem a ida ao dentista podem causar sentimentos de medo, apreensão e ansiedade aos pacientes (Oosterink et al., 2008), sendo o medo de receber injeção um dos mais comuns e composto de vários aspectos, dentre eles os mais importantes são o medo de sentir dor durante a injeção e de ser machucado com a agulha (Armfield & Milgrom, 2011).

Além de grande barreira ao atendimento odontológico, a ansiedade e medo dos pacientes principalmente à injeção do anestésico local, quando não controlada, podem precipitar episódios psicogênicos como síncope, hiperventilação e reação à epinefrina (Malamed, 2009).

Em um estudo recente que avaliou fatores que poderiam interferir a intensidade de dor associada com procedimentos de rotina no consultório odontológico, revelou que a ansiedade dental, o uso de anestésicos locais e a realização de alguns procedimentos como extração são fatores predisponentes para a sensação de dor no trans-operatório, sendo a ansiedade dental o fator que mais está relacionado à dor durante o atendimento odontológico (Tickle et al., 2012).

2.2. Farmacologia dos anestésicos locais

Os canais de sódio são responsáveis pelo início e propagação de potenciais de ação em células neuronais. O principal componente estrutural e essencial para o funcionamento desses canais é a subunidade α , que forma o poro seletivo aos cátions de sódio (Na^+). A regulação da função do canal é voltagem-dependente; assim, no estado de hiperpolarização da célula, a maioria dos canais está fechada, no estado inativado e não permite passagem dos íons, após uma despolarização da membrana, rapidamente são convertidos ao estado ativado, promovendo a abertura do canal, e conseqüentemente, permitindo o influxo dos íons Na^+ (Ragsdale et al., 1996).

O principal mecanismo de ação dos anestésicos locais reside na inibição reversível da condução de íons Na^+ nos canais de Na^+ voltagem-dependentes

bloqueando a condução do impulso nervoso nos neurônios, promovendo o bloqueio sensorial e motor promovendo anestesia local (Ragsdale et al., 1996; Haas, 2002; Malamed, 2004; Kuthiala & Chaudhary, 2011). Desta forma, estímulos dolorosos promovidos no elemento dental, periodonto e tecidos orais, não podem ser transmitidos ao sistema nervoso central (Haas, 2002).

Todos os anestésicos locais possuem uma estrutura química com três porções em comum: porção lipofílica, cadeia intermediária de hidrocarboneto e porção hidrofílica. A cadeia intermediária de hidrocarboneto contém uma ligação éster ou amida, classificando o anestésico local como tipo éster ou amida (Malamed, 2004). A estrutura química determina suas propriedades, uma delas é o tipo de biotransformação que irá sofrer; anestésicos locais do tipo éster são rapidamente hidrolisados no plasma, enquanto do tipo amida, são metabolizados no fígado principalmente.

2.3. Lidocaína

A lidocaína foi introduzida comercialmente em 1948 e graças a sua boa eficácia, reduzida alergenicidade, baixo custo e boa segurança clínica está entre os anestésicos locais do grupo amida mais utilizados e é considerado como padrão ouro de comparação (Moore & Hersh, 2010; Shipton, 2012).

Além do uso como anestésico injetável, o cloridrato de lidocaína está disponível em formulações de uso tópico em concentrações de 2, 4, 5 e 10% em forma de pomadas, geleia, creme e sprays para uso em mucosas visando diminuir a dor à punção em odontologia, reduzir o desconforto em procedimentos de proctoscopia, sigmoidoscopia, cistoscopia, intubação endotraqueal e endoscopia digestiva (Bula Xylocaína[®] AstraZeneca geléia 100 mg/5 g; Bula Xylocaína[®] AstraZeneca pomada 50 mg/g; Bula Xylocaína[®] AstraZeneca solução oral 100 mg/mL).

Em odontologia, a anestesia tópica induzida pelo gel de lidocaína a 5% não foi eficaz em reduzir a dor à injeção da solução anestésica em mucosa palatina (Bhalla et al., 2009) e em injeção intraligamentar (Meechan & Thomason, 1999).

Desde 1985 o EMLA[®], (*euthetic mixture of local anesthetics*; creme de uso dermatológico comercializado pela AstraZeneca Brasil e composto de uma mistura eutética de lidocaína e prilocaína ambas a 2,5%) vem sendo testado para uso tópico

em odontologia e sua eficácia clínica foi comprovada em diversos estudos (Svensson et al., 1992; Donaldson & Meechan, 1995; Vickers et al., 1997; McMillan et al., 2000; Al-Melh & Andersson, 2007).

Apesar de ter sido utilizada na cavidade oral, esta formulação não é indicada para uso odontológico, além disso, recentemente foi demonstrado que esse anestésico tópico também não foi eficaz em reduzir o desconforto durante a injeção da solução anestésica em mucosa palatina (Franz-Montan et al., 2012). Deste modo, ainda não existe na odontologia um anestésico tópico ideal com eficácia garantida na maioria dos casos, em baixas concentrações e com baixo tempo de latência (Meechan, 2002; Franz-Montan et al., 2012).

2.4. Lipossomas e anestésicos locais

Os principais objetivos na área de sistemas de liberação sustentada (*drug delivery systems*) são a melhora na biodisponibilidade, redução da toxicidade e conseqüentemente, o aumento do índice terapêutico de fármacos. Em especial, diversos anestésicos locais tem sido encapsulados, associados ou complexados a vários sistemas de liberação sustentada, baseados em ciclodextrinas, lipossomas e biopolímeros (micro ou nanopartículas poliméricas), em busca da melhora na eficácia e diminuição da toxicidade (de Paula et al., 2010).

Os lipossomas consistem de esferas microscópicas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, circundadas por solvente aquoso. A simples agitação mecânica de fosfolípidios em meio aquoso é suficiente para formar lipossomas de tamanho e número de bicamadas variáveis, sendo necessários métodos físicos como extrusão e sonicação para diminuir e homogeneizar o tamanho das vesículas (Amselem et al., 1993). A encapsulação de fármacos é orientada pela hidro ou lipofilicidade dos mesmos, fármacos lipofílicos são encapsulados no interior da bicamada, já os hidrofílicos, no centro aquoso da vesícula. A Figura 1 ilustra um lipossoma formado por uma bicamada lipídica, com os possíveis locais de encapsulação de fármacos.

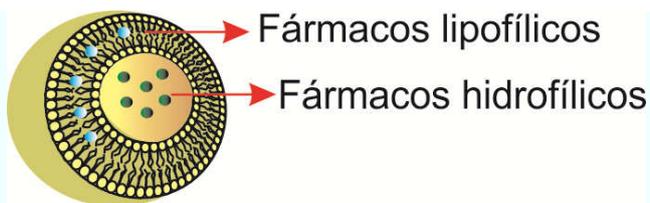


Figura 1. Lipossoma unilamelar contendo fármacos lipofílicos no interior da bicamada e hidrofílicos no centro aquoso da vesícula.

O uso dos lipossomas como carreadores para a liberação sustentada (“drug-delivery”) é amplo (Torchilin, 2005; Cereda et al., 2006; Torchilin, 2006; Schwendener, 2007; Elbayoumi & Torchilin, 2010) principalmente por sua biocompatibilidade, já que lipossomas convencionais são constituídos basicamente por componentes naturais das biomembranas como fosfolipídios e colesterol (Kaszás et al., 2008).

Para os anestésicos locais, a encapsulação oferece como vantagens a liberação lenta, prolongando a duração da anestesia e a redução da toxicidade para os sistemas cardiovascular e nervoso central (Boogaerts et al., 1993; Mowat et al., 1996; Bucalo et al., 1998).

Para anestesia tópica em pele humana, há relatos de encapsulação de tetracaína e lidocaína em lipossomas que demonstram maior segurança, eficácia e duração da anestesia se comparados a formulações não-encapsuladas (Gesztes & Mezei, 1988; Singh & Vyas, 1996; Hung et al., 1997; Bucalo et al., 1998; Fisher et al., 1998; Grant & Bansinath, 2001; Grant et al., 2001; Eichenfield et al., 2002; Nestor, 2006). Além disso, formulações lipossomais de lidocaína a 4 e a 5% na forma de creme já estão disponíveis comercialmente nos EUA com os nomes LMX-4[®] ou ELA-max4[®] e LMX-5[®] ou ELA-max5[®] (Friedman et al., 1999; Friedman et al., 2001; Eichenfield et al., 2002; Kaweski & Committee, 2008).

Recentemente, os anestésicos locais ropivacaína, benzocaína e lidocaína encapsulados em lipossomas demonstraram eficácia quando aplicados topicamente em mucosa oral de voluntários sadios. Franz-Montan e colaboradores (Franz-Montan et al., 2007a; Franz-Montan et al., 2010a) demonstraram que a ropivacaína encapsulada reduziu dor à punção na mucosa vestibular. Em outro trabalho

semelhante, foi demonstrado que a benzocaína encapsulada prolongou a duração da anestesia tópica na mesma região (Franz-Montan et al., 2010b).

Em mucosa palatina, região conhecida pela maior dificuldade em atingir anestesia tópica satisfatória, a lidocaína a 5% encapsulada em lipossomas foi equivalente ao EMLA[®] em diminuir a dor à punção e injeção da solução anestésica (Baroni, 2009). No entanto, outros autores não obtiveram anestesia tópica satisfatória em mucosa palatina tanto com o anestésico lipossomal, no caso a ropivacaína a 1% quanto com o EMLA[®] (Franz-Montan et al., 2012).

2.5. Mucosa oral e estudos de permeação *in vitro*

Estudos de permeação de fármacos através de barreiras biológicas como pele e mucosa vem crescendo nos últimos anos, especialmente quando envolve novas moléculas bioativas e/ou sistemas de liberação.

Alguns métodos *in vitro* e *ex vivo* foram propostos para avaliar o perfil de permeação e cinética de absorção de fármacos através da mucosa, sendo o método *in vitro* utilizando tecido bucal de animais em célula de difusão vertical (tipo *Franz*) um dos mais utilizados. Esses métodos são de extrema importância na fase pré-clínica de um medicamento em desenvolvimento, bem como para avaliar os mecanismos de transporte de drogas através da mucosa e para avaliar o potencial de um promotor de absorção (Caon & Simões, 2011).

Apesar dos estudos de permeação em mucosa utilizar mucosa da cavidade oral de diversos animais como coelhos, ratos e cachorros, a mucosa bucal de porco foi demonstrada ser a mais semelhante aos humanos em termos de estrutura, composição e permeabilidade (Shojaei, 1998). Normalmente, estudos de permeação de fármacos através da mucosa, visam à absorção sistêmica dos medicamentos, utilizando a cavidade oral como via de administração tópica para esses fármacos, especialmente a região sublingual e mucosa jugal (Patel et al., 2011).

Na Odontologia, o objetivo do anestésico local aplicado topicamente é atingir as terminações nervosas livres localizadas na região submucosa, para que seja atingido o objetivo final: a anestesia superficial. Para isso, é de extrema importância para uma formulação de anestésico tópico em desenvolvimento, visando este

mesmo objetivo, que ela seja capaz de atravessar todas as barreiras do epitélio oral da região onde ela foi aplicada.

A cavidade oral é revestida por um epitélio escamoso estratificado suportado por um tecido conectivo chamado lâmina própria. Em regiões sujeitas a forças mecânicas associadas à mastigação (como por exemplo, a gengiva e o palato) existe um epitélio queratinizado que se assemelha àquele que reveste a pele. Este epitélio dificulta a penetração de anestésicos aplicados topicamente, impedindo a eficácia. As regiões que não sofrem atrito como o assoalho da boca e a bochecha são cobertas por um epitélio não-queratinizado (Squier & Kremer, 2001).

Sabe-se que para exercer o mecanismo de ação dos anestésicos locais, é preciso que este seja capaz de atravessar as barreiras existentes e atingir as terminações nervosas para efetivamente bloquear o impulso nervoso. Visto que já foi demonstrado que alguns anestésicos locais encapsulados em sistemas lipossomais são capazes de penetrar através da mucosa oral e conseguir anestesia tópica eficaz, o presente estudo teve por objetivo traçar o perfil de permeação da lidocaína em mucosa de porco em célula de difusão vertical do tipo *Franz*.

JUSTIFICATIVA

Até o momento já foram demonstrados que alguns anestésicos locais encapsulados em sistemas lipossomais são capazes de penetrar através da mucosa oral e conseguir anestesia tópica eficaz. No entanto o perfil de permeação desses anestésicos locais através da mucosa ainda não foi descritos na literatura.

Atualmente a ANVISA através da RDC 48/2009 (Brasil, 2009) estabeleceu novas normas no pós-registro de medicamentos semi-sólidos e líquidos (medicamentos específicos, genéricos, novos e similares) já registrados. Instituiu requisitos mínimos para os procedimentos de alteração, inclusão, suspensão, reativação e cancelamento pós-registro de medicamentos, dentre a documentação e os ensaios exigidos pela ANVISA, foi incluído a apresentação de resultados comparativos entre a taxa de permeação cutânea da condição anteriormente registrada e da nova condição. E isso pode vir a ser uma exigência no futuro para medicamentos de aplicação tópica em mucosas.

O estudo de permeação de um fármaco através de uma barreira biológica, sendo ela a pele ou a mucosa, é de extrema importância para traçar uma suposição de como este fármaco irá permear, e poder desenvolver estratégias para alterar esta barreira e aumentar a eficácia de produtos, através da melhora farmacocinética e biodisponibilidade de fármacos.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho de pesquisa foi de avaliar o perfil de permeação da lidocaína em gel lipossomal em diferentes concentrações em comparação às formulações comerciais em mucosa de palato de porco.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os principais materiais utilizados para o preparo das suspensões lipossomais e das formulações em gel foram:

- Lidocaína (Grau de pureza - 100%): Sigma-Aldrich
- Polímero Carboxivinílico (Carbopol Ultrez[®]): Galena Química e Farmacêutica
- Lipídios: fosfatidilcolina de ovo e colesterol: Sigma Chem. Co.
- Acetato de alfa-tocoferol (Sigma Chem. Co.),
- Propilenoglicol: Galena Química e Farmacêutica
- Glicerina: Galena Química e Farmacêutica
- Metilparabeno (Nipagin[®]): Galena Química e Farmacêutica
- Trietanolamina: Labsynth Ltda
- Clorofórmio (Labsynth Ltda)
- HEPES (Sigma Chem. Co.)
- Pomada de lidocaína 5% (Xylocaína[®] pomada - AstraZeneca)
- Mistura eutética de lidocaína e prilocaína 5% (EMLA[®] creme - AstraZeneca)

4.2. Preparo dos lipossomas convencionais

As vesículas unilamelares foram preparadas pelo método de hidratação de filme seco retirando-se alíquotas de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol (na proporção molar de 4:3:0,07) de solução estoque em clorofórmio. A mistura foi então evaporada sob fluxo de N₂ seguido de vácuo por 2 h, à temperatura ambiente (Cereda et al., 2004; de Araujo et al., 2008). Após a secagem, foi adicionado o tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 com NaCl 150 mM, a dispersão fora agitada por 5 minutos em vórtex para formação de vesículas multilamelares concêntricas (MLV).

As vesículas unilamelares de 0,4 μ m (LUV) foram preparadas por extrusão das vesículas multilamelares descritas acima. Assim, sob pressão de nitrogênio, à temperatura ambiente, a amostra de vesículas multilamelares foi passada por um disco de drenagem e uma membrana de policarbonato com poros de tamanho

controlado (0,4 μm), por 12 vezes. Os lipossomas foram deixados em repouso, por pelo menos 2h, para o intumescimento das vesículas. As formulações dos lipossomas tiveram concentração de vesículas unilamelares de 5 mM. A incorporação do anestésico local foi realizada após a preparação das vesículas (incorporação passiva), para a concentração final desejada (5%).

4.3. Preparo do gel de lidocaína encapsulada em lipossomas

Após a encapsulação do anestésico local, foram adicionados os componentes descritos na Tabela 1 para obtenção da forma farmacêutica desejada (patente # WO/2008/138089).

Tabela 1. Componentes utilizados no preparo dos géis.

Componente	Função
Polímero carboxivinílico (Carbopol Ultrez[®])	Utilizado como agente geleificante, de fácil dispersão
Propilenoglicol	Agente de levigação com o intuito de reduzir ainda mais o tamanho das partículas do anestésico (lidocaína), formando uma pasta do material sólido, evitando aspereza na formulação; age, ainda, como solvente e umectante.
Metilparabeno	Conservante com espectro de ação sobre fungos e leveduras
Glicerina	Agente umectante e emoliente
Água Desionizada	Solvente
Trietanolamina	Agente alcalinizante q.s.p. para pH = 7,0
Solvente orgânico	Adjuvante farmacêutico

4.4. Desenvolvimento da metodologia analítica de quantificação do fármaco na avaliação do teor dos géis e durante os ensaios de permeação

A quantificação da lidocaína presente nas formulações em gel e nos experimentos de permeação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se um equipamento composto de uma bomba ternária da Varian 9012, com arranjo de foto diodos também da Varian, modelo ProStar 335 DAD, acoplados com o coletor automático da Varian e interligados com o software

Galaxie, modelo ProStar 410. A metodologia analítica foi adaptada de Wei e colaboradores (Wei et al., 2007).

As condições cromatográficas utilizadas durante todo processo de desenvolvimento e validação do método estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para validação de metodologia analítica.

Amostra	Lidocaína em solução fisiológica
Fase móvel	Metanol / Tampão (4,35 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ , pH ajustado para 7,0 com Trietanolamina) (60/40, v/v)
Volume de injeção	40 µL
Fluxo	1,5 mL/min
Temperatura	40°C
Detector (λ)	Ultravioleta (UV), λ = 220nm
Coluna cromatográfica	Phenomenex, C ₁₈ fase reversa 5µ, 150 x 4,60mm

As condições analíticas e a metodologia de quantificação do fármaco foram validadas segundo parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e “International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use” – ICH (ICH, 1996; ANVISA, 2003).

4.5. Validação da metodologia analítica para quantificação da lidocaína

A validação da metodologia analítica tem como objetivo a diminuição e controle dos fatores que podem tornar dados imprecisos, atendendo às exigências estabelecidas pela ANVISA, assegurando confiabilidade dos resultados. Os parâmetros geralmente envolvidos na validação de metodologia analítica são linearidade, limite de quantificação e detecção, exatidão e precisão.

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade do método foi determinada a partir de três curvas analíticas em três dias consecutivos, totalizando

nove curvas, apresentando cada uma 6 concentrações compreendidas entre 40 e 150 µg/mL de LIDOCAÍNA diluída em solução fisiológica. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2003).

Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Repetibilidade (precisão intra-dia) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Precisão intermediária reflete a concordância entre os resultados das mesmas amostras em dias diferentes (ANVISA, 2003).

A repetibilidade ou precisão foi avaliada a partir do cálculo de desvio padrão relativo (DPR), que pode ser observado na Equação 1.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (1)$$

onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (ANVISA, 2003).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, segundo a Equação 2 (ANVISA, 2003).

$$\text{Exatidão} = \frac{CMD}{CT} \times 100 \quad (2)$$

onde, CT é a concentração teórica.

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

A estimativa do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi realizada a partir de dados obtidos com as regressões lineares das curvas analíticas aplicados às Equações 3 e 4, respectivamente.

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

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (4)$$

onde, DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação da curva analítica média.

4.6. Determinação do título de lidocaína das formulações

Para a determinação do título de lidocaína nas diferentes formulações, foram preparadas soluções em triplicata, com cerca de 0,2 g de amostra (equivalente a 10 e 5 mg de lidocaína para as formulações a 5 e 2,5%, respectivamente), cuidadosamente pesada, em um balão de 10 mL. Foi adicionado metade do volume de fase móvel, e em seguida, foram levados ao ultrassom por 15 minutos, agitando-se manualmente de 5 em 5 minutos. Após o completo resfriamento das amostras, o volume foi completado com fase móvel e 500 µL desta solução foram transferidos para um balão volumétrico de 5 mL para nova diluição com fase móvel. A amostra foi filtrada em filtros do tipo *miltex* com poros de 0,45 µm e analisadas por CLAE, pelo método já descrito.

4.7. Ensaio de permeação *in vitro*

As formulações testadas foram:

- Gel de lidocaína 5% encapsulada em lipossomas
- Gel de lidocaína 2,5% encapsulada em lipossomas
- Pomada de lidocaína 5% (Xylocaína[®] pomada - AstraZeneca),

- Mistura eutética de lidocaína e prilocaína 5% (EMLA[®] creme - AstraZeneca)

4.8. Preparo e obtenção do epitélio de mucosa palatina para os ensaios de permeação

As maxilas de porco foram compradas em um abatedouro devidamente certificado pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (Frigar[®] Abatedouro Ind. e Com. de Conservas, Campinas-SP). As maxilas foram adquiridas logo após o sacrifício dos animais e transportados em tampão fosfato (pH 7,4). A separação do epitélio da mucosa palatina de porco foi realizada a partir de uma adaptação da metodologia proposta por Diaz Del Consuelo e colaboradores (Diaz Del Consuelo et al., 2005b). A mucosa palatina foi cuidadosamente separada do osso palatino com auxílio de um bisturi e um descolador gengival (Descolador Molt 9, Golgran) e lavada com solução salina. O epitélio queratinizado foi separado do tecido conectivo (lâmina própria) com uma espátula após a imersão da mucosa a 60°C em água destilada durante dois minutos. O tecido obtido foi posicionado em um papel de filtro (Figura 2), envolto por papel alumínio e congelado (-20°C) até o momento do uso, sendo este não superior a 1 semana.



Figura 2. Epitélio da mucosa palatina posicionado sobre um papel de filtro, imediatamente após a separação do tecido conectivo, para o armazenamento.

4.9. Ensaio de permeação *in vitro* em célula de difusão vertical tipo Franz através de epitélio de mucosa palatina de porco

O experimento de permeação através da mucosa foi realizado na célula de difusão vertical tipo Franz (Disa, Milano, I), com área de permeação de 0,6 cm² conforme esquema representado pela Figura 3.

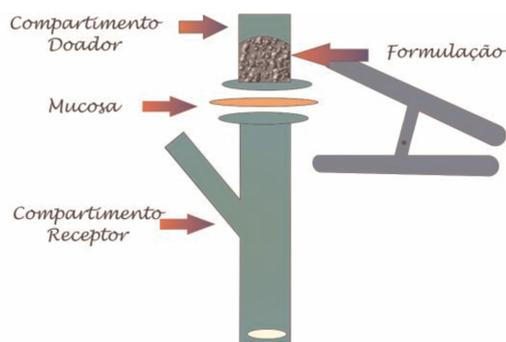


Figura 3. Ilustração da montagem da célula de Franz para realização do experimento de permeação através da mucosa.

O epitélio da mucosa do palato foi descongelado em solução fisiológica em temperatura ambiente e posicionado com o lado conectivo sobre o filtro de celulose regenerada (poros de diâmetro de 0,45 µm) e com o epitélio voltado para o compartimento doador. A mucosa e o filtro foram posicionados juntos na célula de Franz entre o compartimento doador e o receptor (Figura 4).

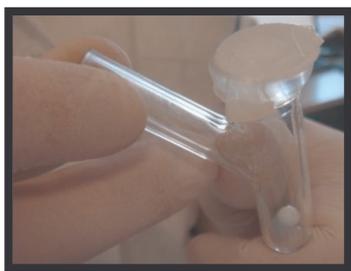


Figura 4. Montagem da célula de Franz para realização do experimento de permeação através da mucosa.

A função do filtro é dar um suporte ao epitélio da mucosa, devido à sua grande fragilidade. O compartimento doador foi preenchido com 1g de cada formulação em gel de lidocaína e o compartimento receptor foi preenchido com cerca de 4,2 mL de solução fisiológica. As condições *Sink* foram mantidas durante o experimento, isto garante que a quantidade máxima do fármaco permeado no

compartimento receptor foi 10 vezes menor que a solubilidade máxima do fármaco naquele solvente.

Os ensaios de permeação foram realizados durante um período de 5 horas, à temperatura controlada de 37°C e sob agitação constante. Em intervalos pré-estabelecidos, foram retiradas alíquotas da solução receptora (300 µL), e analisadas por CLAE. Ao compartimento receptor, foram adicionados volumes idênticos aos retirados os quais foram utilizados para o cálculo da diluição realizada.

Após a quantificação por CLAE foram calculados os parâmetros de permeação do fármaco tais como: tempo necessário para permeação inicial do fármaco ou *time lag*; fluxo e coeficiente de permeabilidade. Os experimentos foram realizados no mínimo em sextuplicatas. A quantidade de droga acumulada no compartimento receptor foi calculada e obtida uma média.

A inclinação da porção linear dos gráficos representa o fluxo de penetração da lidocaína através da mucosa e a sua intersecção com o eixo das abscissas permitiu determinar o valor do tempo de latência (*time lag*). Dessa forma, os dados obtidos a partir dos experimentos de permeação foram expressos em quantidades cumulativas de fármaco permeado em função do tempo, em um intervalo de 5 horas e analisados de acordo com a Equação 5:

$$J = P \times Cd \quad (5)$$

onde **J** é o fluxo de fármaco através da mucosa, **P** é o coeficiente de permeabilidade e **Cd** é a concentração de fármaco utilizado no compartimento doador. Os dados foram analisados utilizando o programa Origin 6.0 (Microcal™ Software, Inc., Northampton, MA, USA) e expressos em média ± desvio padrão (n = 6). Os parâmetros de permeação foram determinados a partir da quantidade de lidocaína permeada em função do tempo para as diferentes formulações.

4.10. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados pelos testes de *Kruskal Wallis* (parâmetros de permeação da lidocaína), considerando

nível de significância de 5%. Todas as análises foram feitas com o pacote estatístico GraphPad, InStat (GraphPad Software, Inc.).

5. RESULTADOS

5.1. Validação da metodologia analítica

A metodologia para quantificação de lidocaína foi validada a fim de verificar os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão do método, certificando assim a confiabilidade dos resultados.

Foram preparadas amostras de gel placebo, gel de lidocaína lipossomal e da formulação EMLA[®] e todas elas injetadas nas condições estabelecidas para avaliar a seletividade do método. A Figura 5 mostra o cromatograma das amostras avaliadas. Através da observação dos cromatogramas foi possível concluir que nenhum pico referente às formulações interferiu na detecção da lidocaína sendo o método seletivo e específico para o fármaco em questão.

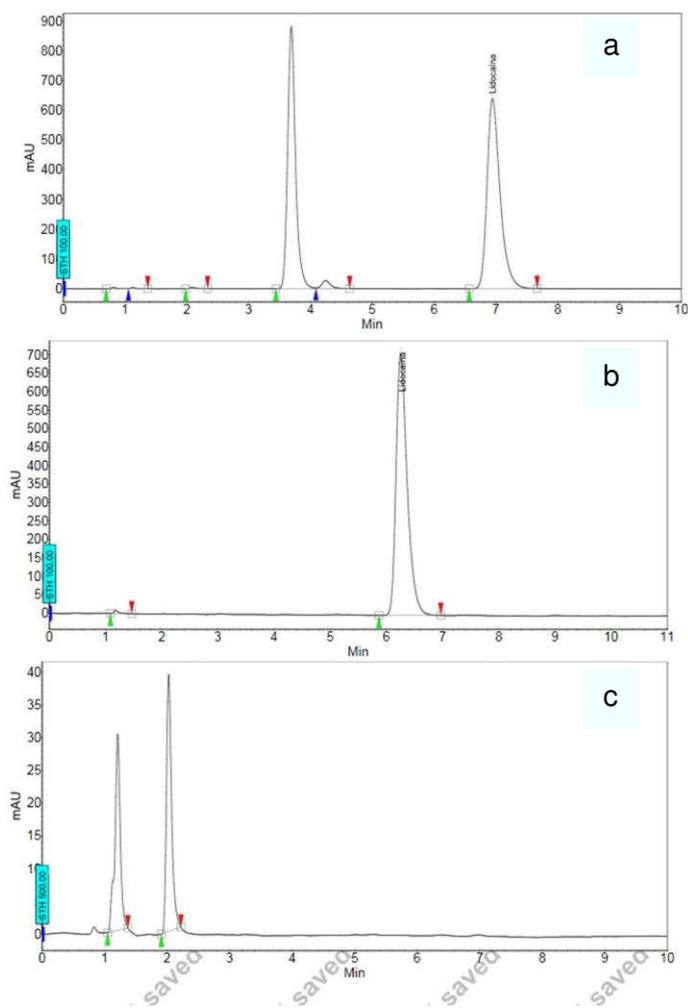


Figura 5. Cromatogramas das amostras: a) formulação EMLA[®]; b) gel de lidocaína lipossomal; e c) gel placebo analisadas segundo as condições cromatográficas descritas.

A concentração de trabalho determinada para o método foi de 100 µg/mL, as concentrações da linearidade foram calculadas com base na concentração de trabalho e as amostras preparadas na faixa de concentração de 40 µg/mL a 150 µg/mL, que correspondem em porcentagem de 40% a 150% da concentração de trabalho.

O gráfico de área versus concentração do analito foi plotado (Figura 6) e após tratamento estatístico foi determinado um coeficiente de correlação de 0,9999. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 segundo RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003, da ANVISA. O coeficiente de correlação calculado demonstra que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

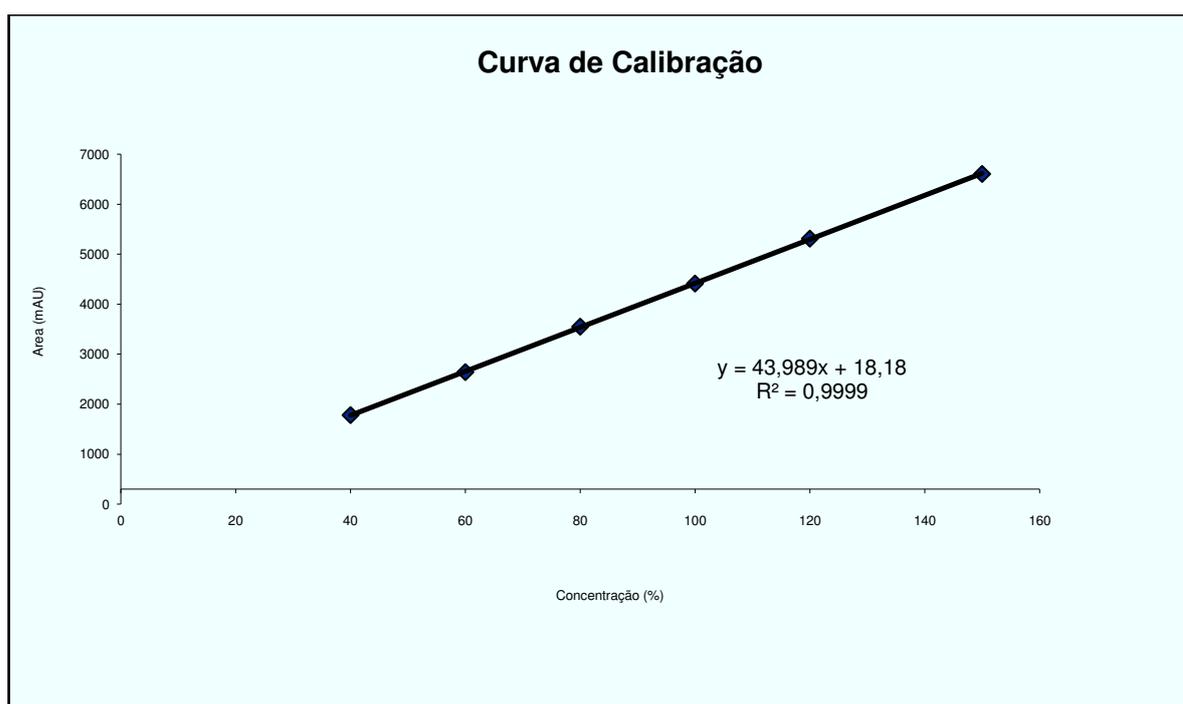


Figura 6. Curva de calibração de Lidocaína (Linearidade).

Para o método descrito para quantificação de lidocaína nas formulações, foram avaliadas as precisões por repetibilidade e precisão intermediária conforme demonstram as Tabelas 3, 4 e 5. Os resultados cumprem com o critério exigido pela legislação, apresentando desvio padrão menor que 5%.

Tabela 3. Resultados da precisão por repetibilidade e exatidão.

Injeções	Réplicas					
	Amostra 80%		Amostra 100%		Amostra 120%	
	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/mL	%
1	0,064	80,24	0,100	99,81	0,143	119,43
2	0,065	80,67	0,100	100,44	0,145	120,69
3	0,064	80,16	0,099	99,32	0,146	121,49
MÉDIA	0,064	80,36	0,100	99,86	0,145	120,53
DP	0,000	0,28	0,001	0,56	0,001	1,04
DPR (%)	0,34	0,34	0,56	0,56	0,86	0,86
EXATIDÃO	*	100,45	*	99,86	*	100,45

Tabela 4. Resultados da precisão intermediária do método – Dia 1.

Injeções	Dia 1					
	Amostra 80%		Amostra 100%		Amostra 120%	
	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/mL	%
1	0,065	81,40	0,102	102,08	0,148	123,25
2	0,065	81,69	0,103	103,06	0,148	123,11
3	0,066	82,76	0,103	102,82	0,148	123,57
MÉDIA	0,065	81,76	0,103	102,65	0,148	123,31
DP	0,000	0,39	0,001	0,512	0,000	0,235
DPR (%)	0,48	0,48	0,50	0,50	0,19	0,19

Tabela 5. Resultados da precisão intermediária do método – Dia 2.

Injeções	Dia 2					
	Amostra 80%		Amostra 100%		Amostra 120%	
	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/mL	%
1	0,063	78,85	0,097	96,72	0,141	117,54
2	0,063	79,08	0,097	96,91	0,140	116,58
3	0,063	78,40	0,098	97,99	0,141	117,38
MÉDIA	0,063	78,78	0,103	97,21	0,141	117,17
DP	0,000	0,35	0,001	0,69	0,001	0,51
DPR (%)	0,44	0,44	0,71	0,71	0,44	0,44

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, a recuperação das amostras está entre a faixa de 99% a 101%, demonstrando boa exatidão do método.

Os valores obtidos para o Limite de Detecção (Equação 3) e Limite de Quantificação (Equação 4) foram determinados a partir do intercepto e da inclinação da curva de calibração analítica. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação.

Parâmetro	Valor (µg/mL)
Limite de detecção	0,340
Limite de quantificação	1,134

O limite de detecção determinado indica que este é o valor da menor concentração de BZC que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade; já o limite de quantificação indica a concentração mais baixa da substância em questão, que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitável.

5.2. Determinação do título de lidocaína das formulações.

A Tabela 7 apresenta as formulações preparadas contendo lidocaína lipossomal nas concentrações teóricas de 2,5 e 5%, as formulações comerciais de Lidocaína a 2,5 e 5% assim como a determinação do teor final do fármaco nas respectivas preparações.

Tabela 7. Formulações contendo lidocaína nas concentrações teóricas de 2,5 e 5% bem como a determinação da média (\pm DP) do teor final do fármaco nas respectivas preparações.

<i>Formulações</i>	<i>Teor de Lidocaína (%)</i>
Lidocaína a 2,5% lipossomal	2,59 \pm 0,09
Lidocaína a 5% lipossomal	5,43 \pm 0,08
EMLA [®] (lidocaína a 2,5%)	2,69 \pm 0,00
Xylocaína [®] (lidocaína a 5%)	5,07 \pm 0,01

5.3. Ensaio de permeação *in vitro* em célula de difusão vertical tipo Franz através de epitélio de mucosa palatina de porco

Os perfis de permeação da lidocaína através do epitélio de mucosa palatina foram expressos em quantidade (mg/cm^2) e porcentagem ($\%/ \text{cm}^2$) de lidocaína permeada em função do tempo (Figura 7 e Figura 8, respectivamente). A apresentação em % foi necessária visto que as formulações testadas apresentavam diferentes concentrações de lidocaína.

Na Figura 7 foi possível observar que a o gel de Lidocaína 5% lipossomal foi a formulação que apresentou maior quantidade do fármaco (mg) permeado por cm^2 ao longo do tempo. A formulação comercial Xylocaína[®], mesmo com a maior % de lidocaína, apresentou a menor quantidade de lidocaína (mg) permeada ao longo do tempo. Tanto o EMLA[®] quanto o gel de Lidocaína 2,5% lipossomal apresentaram valores intermediários de quantidade de fármaco permeado (mg) em função do tempo.

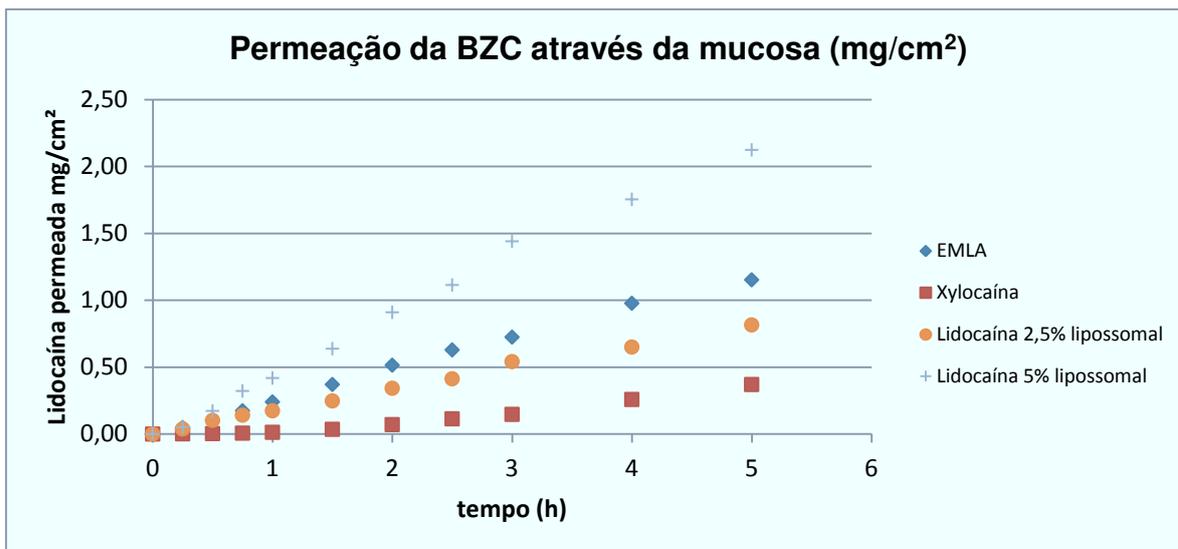


Figura 7. Permeação de lidocaína (em mg de fármaco permeado por cm²) em função do tempo, através do epitélio da mucosa palatina de porco a partir das formulações em gel lipossomais à base de Carbopol[®] e das formulações comerciais de lidocaína.

Já na Figura 8, quando levamos em consideração a % do fármaco liberado em relação à quantidade total aplicada no compartimento doador, é possível observar perfis diferentes de permeação da lidocaína. A formulação que apresentou maior % de droga permeada em função do tempo foi a formulação comercial EMLA[®], seguido do gel de Lidocaína 5% lipossomal. A formulação que apresentou menor % de fármaco permeado em função do tempo continuou sendo a formulação comercial Xylocaína[®].

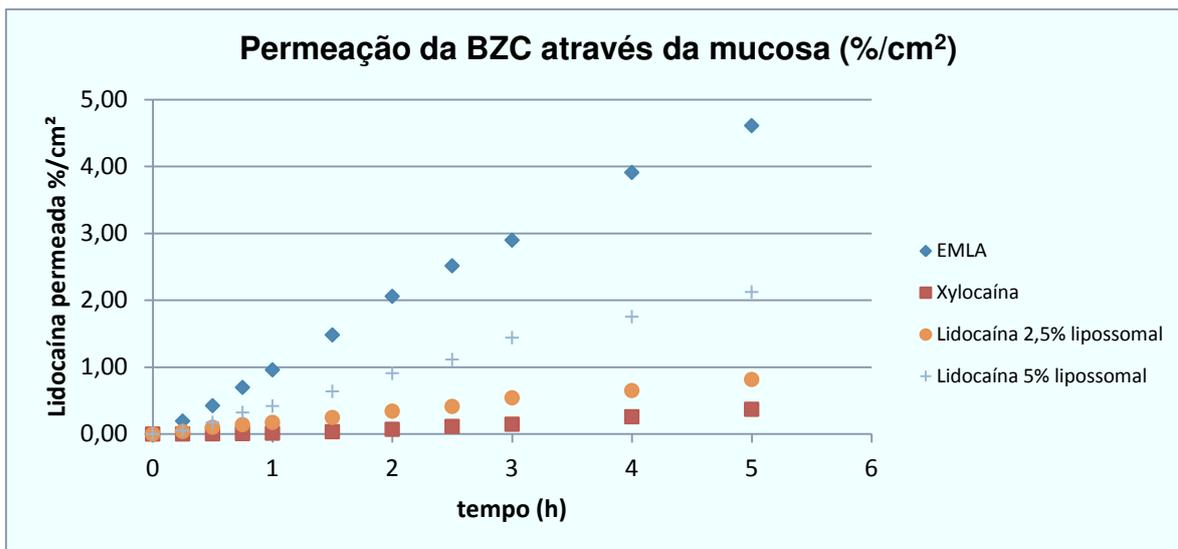


Figura 8. Permeação de lidocaína (em % de fármaco permeado por cm^2) em função do tempo, através do epitélio da mucosa palatina de porco a partir das formulações em gel lipossomais à base de Carbopol[®] e das formulações comerciais de lidocaína.

Após a confecção dos gráficos de quantidade de lidocaína permeada (mg) em função do tempo, foram calculados os parâmetros de permeação da lidocaína a partir de cada célula de cada formulação. A Tabela 8 mostra os valores dos parâmetros de permeação encontrados.

Tabela 8. Parâmetros de permeação de lidocaína a partir de diferentes composições de géis através de epitélio de mucosa palatina de porco (1-5 h).

Formulação	Fluxo ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	Coefficiente de permeabilidade ($\cdot 10^{-3}\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)	Time lag (h)
Lidocaína 2,5% lipossomal (0,5-4h)	$0,16\pm 0,04$	$6,51\pm 1,58^{f***}$	-
Lidocaína 5% lipossomal (0,5-5h)	$0,44\pm 0,04^{a,b,c***}$	$8,80\pm 0,85^{c***}$	-
EMLA [®] (0,5-5h)	$0,24\pm 0,05^{d***}$	$9,44\pm 2,14^{d***,e*}$	-
Xylocaína [®] (2-5h)	$0,09\pm 0,05$	$1,73\pm 1,21$	$1,46\pm 0,14^{c,d,f***}$

Onde: **a** – Lidocaína 5% lipossomal vs. Lidocaína 2,5% lipossomal; **b** – Lidocaína 5% lipossomal vs. EMLA[®]; **c** – Lidocaína 5% lipossomal vs Xylocaína[®]; **d** – EMLA[®] vs. Xylocaína[®]; **e** – EMLA[®] vs. Lidocaína 2,5% lipossomal; **f** – Lidocaína 2,5% lipossomal vs. Xylocaína[®]. Resultados expressos em média \pm D.P. (n=6-7). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. Análise de variância, seguida do teste de Tukey-Kramer.

A formulação de Lidocaína 5% lipossomal apresentou maior fluxo quando comparado a todas as demais formulações ($P < 0,001$). Ainda, o EMLA[®] apresentou fluxo superior ao da Xylocaína[®] ($P < 0,001$).

A formulação comercial EMLA[®] apresentou o maior valor de coeficiente de permeabilidade, como também pode ser observado na Figura 8, sendo estatisticamente superior aos coeficientes de permeabilidade da Lidocaína 2,5% lipossomal e da Xylocaína[®] ($P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente). No entanto, o EMLA[®] não diferiu estatisticamente do gel de Lidocaína 5% lipossomal ($P < 0,05$) em relação a este parâmetro. De uma maneira geral, todas as formulações de Lidocaína avaliadas apresentaram maiores coeficientes de permeabilidade quando comparados à formulação comercial Xylocaína[®] ($P < 0,05$).

Em relação ao *time lag*, ou seja, tempo necessário para início da permeação da lidocaína, ambas as formulações lipossomais e a formulação comercial EMLA[®] apresentaram valores nulos, ou seja, iniciaram a permeação da lidocaína imediatamente após o início do ensaio de permeação. A formulação comercial Xylocaína[®] apresentou maior valor de *time lag* quando comparado às demais formulações ($P < 0,001$).

6. DISCUSSÃO

Para a quantificação da lidocaína nos ensaios de permeação, bem como para avaliação do teor das formulações, foi necessário o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica, especialmente para garantir a confiabilidade dos resultados (ICH, 1996; ANVISA, 2003). O método analítico escolhido para o presente trabalho foi a Cromatografia Líquida De Alta Eficiência, pois é uma ferramenta com alta sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade.

Os parâmetros analíticos empregados no presente estudo foram baseados no trabalho descrito por Wei e colaboradores (Wei et al., 2007) e validada de acordo com as normas da Anvisa e do ICH (ICH, 1996; ANVISA, 2003). De maneira semelhante à encontrada por estes autores, a metodologia apresentou boa linearidade na faixa de concentração de 40 a 150 µg/mL ($r^2 = 0,9999$), precisão e exatidão, atendendo todas as exigências da ANVISA necessárias para validação de um método analítico.

A faixa de concentração da curva de calibração no presente estudo (de 40 à 150 µg/mL) foi superior àquela utilizada por Wei e colaboradores (0,1 à 50 µg/mL) (Wei et al., 2007) visto que estes autores realizaram quantificações plasmáticas dos anestésicos locais, concentrações estas muito inferiores às encontradas em ensaios de permeação.

O limite de quantificação encontrado no presente estudo (1,1 µg/mL) foi superior ao valor encontrado por Wei e colaboradores (0,1 µg/mL) (Wei et al., 2007). Esta diferença pode ser justificada, porque normalmente mudanças de equipamento, metodologia e operador resultam nesses tipos de variáveis.

Estudos de permeação de fármacos através de mucosa oral de porcos na maioria das vezes são realizados com intuito do uso desta via para administração tópica, visando efeito sistêmico dos medicamentos. Como exemplos, podemos citar alguns estudos envolvendo a galantamina (De Caro et al., 2008), o atenolol (Monti et al., 2010) a carbamazepina (Giannola et al., 2005; Campisi et al., 2008), a naltrexona (Giannola et al., 2007) e o nimesulida (Maffei et al., 2004), dentre outras.

O objetivo da realização do ensaio de permeação no presente estudo difere destes estudos pois, o anestésico local não visa absorção sistêmica; para fazer o

efeito desejado ele necessita apenas atravessar a barreira do epitélio da região onde foi aplicado e atingir as terminações nervosas situadas na região submucosa. Para isso, utilizamos o epitélio de uma região que apresenta alto grau de queratinização (Squier & Kremer, 2001), simulando uma região com grande dificuldade de atingir anestesia superficial satisfatória, a mucosa palatina.

A literatura é escassa no que diz respeito a estudos de permeação com mucosa de diferentes regiões da cavidade oral de porcos, já que normalmente os estudos são realizados com epitélio de mucosa jugal e esôfago de porco (Diaz Del Consuelo et al., 2005b). Esta última foi desenvolvida para superar algumas dificuldades da mucosa jugal do porco, como danificação da integridade do tecido por injúrias da mastigação, área e qualidade de tecido removido, além de apresentar histologia semelhante à mucosa oral (i.e. tecido escamoso estratificado não-queratinizado suportado pela lâmina própria) (Diaz Del Consuelo et al., 2005a; Diaz Del Consuelo et al., 2005b; Diaz-Del Consuelo et al., 2005).

O único trabalho de permeação de anestésico local em mucosa palatina relatado na literatura demonstrou, como o esperado, que o fluxo da lidocaína através da mucosa palatina (queratinizada) foi significativamente menor daquele encontrado em mucosa da bochecha (não-queratinizada) de porco em decorrência do seu grau de queratinização, o qual dificultou a passagem do anestésico local (Ganem-Quintanar et al., 1998).

O interesse em avaliar o perfil de permeação da lidocaína a partir de diferentes formulações (lipossomais e comerciais) em epitélio de mucosa palatina de suínos surgiu a partir dos resultados clínicos positivos encontrados em um trabalho de dissertação de mestrado realizado em voluntários sadios na FOP/UNICAMP (Baroni, 2009). Neste trabalho foi demonstrado que a Lidocaína a 5% lipossomal foi semelhante ao EMLA[®] (considerado como anestésico tópico mais eficaz em mucosa oral apesar de não ser comercializado para este local de aplicação) em reduzir dor durante a punção da agulha e injeção de uma solução anestésica em mucosa palatina.

O perfil de permeação da lidocaína existente nas formulações testadas nos voluntários (Baroni, 2009) foi avaliada no presente estudo *in vitro* em células de

difusão vertical do tipo *Franz*. Ao observar os resultados dos perfis de permeação da lidocaína através do epitélio de mucosa palatina de porco, foi possível verificar uma semelhança com os resultados encontrados *in vivo*. De uma maneira geral, as formulações de Lidocaína 5% lipossomal e a formulação comercial EMLA® apresentaram comportamento semelhantes em relação aos parâmetros de permeação avaliados: apresentaram maiores valores de fluxo e coeficiente de permeabilidade através deste epitélio, correspondendo com a melhor eficácia tópica em reduzir dor à punção e à injeção da solução anestésica. Além disso, estas formulações apresentaram valores nulos de *time lag*, sugerindo rápido início de ação *in vivo*.

Desta forma, tratamentos estatísticos de correlação são necessários para confirmar uma possível correlação positiva entre os dados *in vitro/in vivo* para que, no futuro, formulações em fase de desenvolvimento possam ter sua eficácia prevista durante os ensaios *in vitro* de permeação.

7. CONCLUSÃO

O gel de Lidocaína 5% lipossomal e o creme comercial EMLA[®] exibiram os melhores desempenhos durante os ensaios de permeação *in vitro* através de mucosa palatina de suínos. Ambas as formulações apresentaram maiores valores de fluxo e coeficiente de permeabilidade através do epitélio de mucosa oral, sugerindo melhor penetração do anestésico local em mucosa queratinizada. Além disso, estas formulações apresentaram valor nulo para o *time lag*, sugerindo rápida latência *in vivo*.

Tratamentos estatísticos de correlação serão necessários para confirmar uma possível correlação positiva entre os dados *in vitro* encontrados no presente estudo e *in vivo*, realizado em voluntários sadios, para que, no futuro, formulações em fase de desenvolvimento possam ter sua eficácia prevista durante os ensaios *in vitro* de permeação.

REFERÊNCIAS*

1. 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, e16-20.
2. AMSELEM, S., A, G. & Y, B. (1993). A large-scale method for the preparation of sterile and non-pyrogenic liposomal formulations of defined size distributions for clinical use. — Boca Raton: CRC Press, *Liposome technology*. 2nd.
3. ANVISA. (2003). "Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos." RE 899 de 29 de maio de 2003.
4. ARMFIELD, J. M. & MILGROM, P. (2011). A clinician guide to patients afraid of dental injections and numbness. — *SAAD Dig* 27, 33-9.
5. BARONI, D. B. (2009). AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANESTÉSICA DA LIDOCAÍNA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS, EM ANESTESIA TÓPICA PALATINA. Dissertação de mestrado defendida em 2009. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP.
6. BHALLA, J., MEECHAN, J. G., LAWRENCE, H. P., GRAD, H. A. & HAAS, D. A. (2009). Effect of time on clinical efficacy of topical anesthesia. — *Anesth Prog* 56, 36-41.
7. BOOGAERTS, J., DECLERCQ, A., LAFONT, N., BENAMEUR, H., AKODAD, E. M., DUPONT, J. C. & LEGROS, F. J. (1993). Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. — *Anesth Analg* 76, 553-5.
8. BUCALO, B. D., MIRIKITANI, E. J. & MOY, R. L. (1998). Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine, and EMLA using 30-minute application time. — *Dermatol Surg* 24, 537-41.
9. BULA XYLOCAÍNA (ASTRAZENECA DO BRASIL LTDA) GELÉIA 100 MG/5 G. [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25441-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25441-1-0].PDF) acessado em 06/04/2012.
10. BULA XYLOCAÍNA (ASTRAZENECA DO BRASIL LTDA) POMADA 50 MG/G. [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25445-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25445-1-0].PDF) acessado em 06/04/2012.
11. BULA XYLOCAÍNA (ASTRAZENECA DO BRASIL LTDA) SOLUÇÃO ORAL 100 MG/ML [HTTP://WWW4.ANVISA.GOV.BR/BASE/VISADOC/BM/BM\[25446-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25446-1-0].PDF) acessado em 06/04/2012.
12. CAMPISI, G., PADERNI, C., SACCONI, R., SIRAGUSA, M. G., LO MUZIO, L., TRIPODO, C., GIANNOLA, L. I. & FLORENA, A. M. (2008). Carbamazepine transbuccal delivery: the histo-morphological features of reconstituted human oral epithelium and buccal porcine mucosae in the transmucosal permeation. — *Int J Immunopathol Pharmacol* 21, 903-10.
13. CAON, T. & SIMÕES, C. M. (2011). Effect of freezing and type of mucosa on ex vivo drug permeability parameters. — *AAPS PharmSciTech* 12, 587-92.
14. CEREDA, C. M., BRUNETTO, G. B., DE ARAÚJO, D. R. & DE PAULA, E. (2006). Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. — *Can J Anaesth* 53, 1092-7.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

15. CEREDA, C. M., DE ARAUJO, D. R., BRUNETTO, G. B. & DE PAULA, E. (2004). Liposomal prilocaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation. — *J Pharm Pharm Sci* 7, 235-40.
16. 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. E. F. & DE PAULA, E. (2008). Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. — *J Pharm Pharmacol* 60, 1449-57.
17. DE CARO, V., GIANDALIA, G., SIRAGUSA, M. G., PADERNI, C., CAMPISI, G. & GIANNOLA, L. I. (2008). Evaluation of galantamine transbuccal absorption by reconstituted human oral epithelium and porcine tissue as buccal mucosa models: part I. — *Eur J Pharm Biopharm* 70, 869-73.
18. DE PAULA, E., CEREDA, C., TOFOLI, G., FRANZ-MONTAN, M., FRACETO, L. & DE ARAÚJO, D. (2010). Drug delivery systems for local anesthetics. — *Recent Pat Drug Deliv Formul* 4, 23-34.
19. DIAZ DEL CONSUELO, I., FALSON, F., GUY, R. H. & JACQUES, Y. (2005a). Transport of fentanyl through pig buccal and esophageal epithelia in vitro: influence of concentration and vehicle pH. — *Pharm Res* 22, 1525-9.
20. DIAZ DEL CONSUELO, I., PIZZOLATO, G. P., FALSON, F., GUY, R. H. & JACQUES, Y. (2005b). Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. — *J Pharm Sci* 94, 2777-88.
21. DIAZ-DEL CONSUELO, I., JACQUES, Y., PIZZOLATO, G. P., GUY, R. H. & FALSON, F. (2005). Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. — *Arch Oral Biol* 50, 981-7.
22. DONALDSON, D. & MEECHAN, J. G. (1995). A comparison of the effects of EMLA cream and topical 5% lidocaine on discomfort during gingival probing. — *Anesth Prog* 42, 7-10.
23. 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, 1093-9.
24. ELBAYOUMI, T. A. & TORCHILIN, V. P. (2010). Current trends in liposome research. — *Methods Mol Biol* 605, 1-27.
25. FISHER, R., HUNG, O., MEZEI, M. & STEWART, R. (1998). Topical anaesthesia of intact skin: liposome-encapsulated tetracaine vs EMLA. — *Br J Anaesth* 81, 972-3.
26. FRANZ-MONTAN, M., DE PAULA, E., GROPPA, F., SILVA, A., RANALI, J. & VOLPATO, M. (2010a). Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia. — *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 800-804.
27. FRANZ-MONTAN, M., DE PAULA, E., GROPPA, F. C., SILVA, A. L., RANALI, J. & VOLPATO, M. C. (2012). Liposomal delivery system for topical anaesthesia of the palatal mucosa. — *Br J Oral Maxillofac Surg* 50, 60-4.

28. FRANZ-MONTAN, M., SILVA, A., FRACETO, L., VOLPATO, M., PAULA, E., RANALI, J. & GROPPPO, F. (2010b). Liposomal encapsulation improves the duration of soft tissue anesthesia but does not induce pulpal anesthesia. — *J Clin Anesth* 22, 313-7.
29. FRANZ-MONTAN, M., SILVA, A. L. R., COGO, K., BERGAMASCHI, C., VOLPATO, M. C., RANALI, J., DE PAULA, E. & GROPPPO, F. C. (2007a). Efficacy of 1% ropivacaine gel for topical anesthesia of human oral mucosa. — *Quintessence Int* 38, 601-606.
30. FRANZ-MONTAN, M., SILVA, A. L. R., COGO, K., BERGAMASCHI, C. D., VOLPATO, M. C., RANALI, J., DE PAULA, E. & GROPPPO, F. C. (2007b). Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. — *Anesth Analg* 104, 1528-1531.
31. 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, 950-4.
32. FRIEDMAN, P. M., MAFONG, E. A., FRIEDMAN, E. S. & GERONEMUS, R. G. (2001). Topical anesthetics update: EMLA and beyond. — *Dermatol Surg* 27, 1019-26.
33. GANEM-QUINTANAR A, QUINTANAR-GUERRERO D, FALSON-RIEG F & P., B. (1998). Ex vivo oral mucosal permeation of lidocaine hydrochloride with sucrose fatty acid esters as absorption enhancers. — *Int J Pharm* 173, 203-2010.
34. GESZTES, A. & MEZEI, M. (1988). Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine. — *Anesth Analg* 67, 1079-81.
35. GIANNOLA, L. I., DE CARO, V., GIANDALIA, G., SIRAGUSA, M. G., D'ANGELO, M., LO MUZIO, L. & CAMPISI, G. (2005). Transbuccal tablets of carbamazepine: formulation, release and absorption pattern. — *Int J Immunopathol Pharmacol* 18, 21-31.
36. GIANNOLA, L. I., DE CARO, V., GIANDALIA, G., SIRAGUSA, M. G., TRIPODO, C., FLORENA, A. M. & CAMPISI, G. (2007). Release of naltrexone on buccal mucosa: permeation studies, histological aspects and matrix system design. — *Eur J Pharm Biopharm* 67, 425-33.
37. GRANT, G. J. & BANSINATH, M. (2001). Liposomal delivery systems for local anesthetics. — *Reg Anesth Pain Med* 26, 61-3.
38. GRANT, G. J., BARENHOLZ, Y., PISKOUN, B., BANSINATH, M., TURNDORF, H. & BOLOTIN, E. M. (2001). DRV liposomal bupivacaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation in mice. — *Pharm Res* 18, 336-43.
39. HAAS, D. A. (2002). An update on local anesthetics in dentistry. — *J Can Dent Assoc* 68, 546-51.
40. HUNG, O. R., COMEAU, L., RILEY, M. R., TAN, S., WHYNOT, S. & MEZEI, M. (1997). Comparative topical anaesthesia of EMLA and liposome-encapsulated tetracaine. — *Can J Anaesth* 44, 707-11.
41. ICH. (1996). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology. . — In.
42. KASZÁS, N., BUDAI, M., BUDAI, L., GRÓF, P., ZIMMER, A. & KLEBOVICH, I. (2008). [Methods to increase the encapsulation efficiency for liposomal drugs]. — *Acta Pharm Hung* 78, 69-74.

43. KAWESKI, S. & COMMITTEE, P. S. E. F. T. A. (2008). Topical anesthetic creams. — *Plast Reconstr Surg* 121, 2161-5.
44. KUTHIALA, G. & CHAUDHARY, G. (2011). Ropivacaine: A review of its pharmacology and clinical use. — *Indian J Anaesth* 55, 104-10.
45. MAFFEI, P., LOMBARDI BORGIA, S., SFORZINI, A., BERGAMANTE, V., GESCHEL, G. C., FINI, A. & RONCHI, C. (2004). Mucoadhesive tablets for buccal administration containing sodium nimesulide. — *Drug Deliv* 11, 225-30.
46. MALAMED, S. (2004). *Manual de Anestesia Local*. 5a ed.
47. MALAMED, S. (2009). What's new in local anaesthesia? — *SAAD Dig* 25, 4-14.
48. McMILLAN, A. S., WALSHAW, D. & MEECHAN, J. G. (2000). The efficacy of Emla and 5% lignocaine gel for anaesthesia of human gingival mucosa. — *Br J Oral Maxillofac Surg* 38, 58-61.
49. MEECHAN, J. G. (2002). Effective topical anesthetic agents and techniques. — *Dent Clin North Am* 46, 759-66.
50. MEECHAN, J. G., HOWLETT, P. C. & SMITH, B. D. (2005). Factors influencing the discomfort of intraoral needle penetration. — *Anesth Prog* 52, 91-4.
51. MEECHAN, J. G. & THOMASON, J. M. (1999). A comparison of 2 topical anesthetics on the discomfort of intraligamentary injections: a double-blind, split-mouth volunteer clinical trial. — *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 87, 362-5.
52. MONTI, D., BURGALASSI, S., ROSSATO, M. S., ALBERTINI, B., PASSERINI, N., RODRIGUEZ, L. & CHETONI, P. (2010). Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part II: In vitro/in vivo evaluation. — *Int J Pharm* 400, 32-6.
53. MOORE, P. A. & HERSH, E. V. (2010). Local anesthetics: pharmacology and toxicity. — *Dent Clin North Am* 54, 587-99.
54. MOWAT, J. J., MOK, M. J., MACLEOD, B. A. & MADDEN, T. D. (1996). Liposomal bupivacaine. Extended duration nerve blockade using large unilamellar vesicles that exhibit a proton gradient. — *Anesthesiology* 85, 635-43.
55. NESTOR, M. S. (2006). Safety of occluded 4% liposomal lidocaine cream. — *J Drugs Dermatol* 5, 618-20.
56. NUTTALL, N. M., BRADNOCK, G., WHITE, D., MORRIS, J. & NUNN, J. (2001). Dental attendance in 1998 and implications for the future. — *Br Dent J* 190, 177-82.
57. OOSTERINK, F. M., DE JONGH, A. & AARTMAN, I. H. (2008). What are people afraid of during dental treatment? Anxiety-provoking capacity of 67 stimuli characteristic of the dental setting. — *Eur J Oral Sci* 116, 44-51.
58. PATEL, V. F., LIU, F. & BROWN, M. B. (2011). Advances in oral transmucosal drug delivery. — *J Control Release* 153, 106-16.
59. RAGSDALE, D. S., MCPHEE, J. C., SCHEUER, T. & CATTERALL, W. A. (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9270-5.

60. SCHWENDENER, R. A. (2007). Liposomes in biology and medicine. — *Adv Exp Med Biol* 620, 117-28.
61. SHIPTON, E. A. (2012). New formulations of local anaesthetics-part I. — *Anesthesiol Res Pract* 2012, 546409.
62. SHOJAEI, A. H. (1998). Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. — *J Pharm Pharm Sci* 1, 15-30.
63. SILVA, ANDRÉ LUIZ ROTOLO, FRANZ-MONTAN, MICHELLE, GROPPPO, FRANCISCO CARLOS, VOLPATO, MARIA CRISTINA, RANALI, JOSÉ, FRACETO, LEONARDO FERNANDES, DE PAULA, ENEIDA. (2008). *Pharmaceutical composition comprising a local anaesthetic and a carboxyvinyl polymer.* (PATENT # WO/2008/138089).
64. SINGH, R. & VYAS, S. P. (1996). Topical liposomal system for localized and controlled drug delivery. — *J Dermatol Sci* 13, 107-11.
65. SMITH, T. A. & HEATON, L. J. (2003). Fear of dental care: are we making any progress? — *J Am Dent Assoc* 134, 1101-8.
66. SQUIER, C. A. & KREMER, M. J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. — *J Natl Cancer Inst Monogr*, 7-15.
67. SVENSSON, P., BJERRING, P., ARENDT-NIELSEN, L. & KAABER, S. (1992). Hypoalgesic effect of EMLA and lidocaine gel applied on human oral mucosa: quantitative evaluation by sensory and pain thresholds to argon laser stimulation. — *Anesth Prog* 39, 4-8.
68. TICKLE, M., MILSOM, K., CRAWFORD, F. I. & AGGARWAL, V. R. (2012). Predictors of pain associated with routine procedures performed in general dental practice. — *Community Dent Oral Epidemiol*.
69. TORCHILIN, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. — *Nat Rev Drug Discov* 4, 145-60.
70. TORCHILIN, V. P. (2006). Multifunctional nanocarriers. — *Adv Drug Deliv Rev* 58, 1532-55.
71. VICKERS, E. R., MARZBANI, N., GERZINA, T. M., MCLEAN, C., PUNNIA-MOORTHY, A. & MATHER, L. (1997). Pharmacokinetics of EMLA cream 5% application to oral mucosa. — *Anesth Prog* 44, 32-7.
72. WEI, H., CHEN, Y., XU, L. & ZHENG, J. (2007). Percutaneous penetration kinetics of lidocaine and prilocaine in two local anesthetic formulations assessed by in vivo microdialysis in pigs. — *Biol Pharm Bull* 30, 830-4.