



## ***“Efeito da alcalinização da EMLA sobre os parâmetros de permeação na pele”***

Aluna: Lesliê Garcia Peres RA: 178689

Orientador: **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo** Matrícula 25248-4

Co-Orientador: Doutorando **Bruno Vilela Muniz**

Colaboradores:

Profa. Dra. **Michelle Franz-Montan Braga Leite**

Prof. Dr. **Sidney Figueroba Raimundo**

Doutorando **Klinger de Souza Amorim**

### **INTRODUÇÃO.**

A pele é um órgão que tem como principal função a proteção do organismo contra a passagem de substâncias, funcionando como uma barreira contra agressões físicas e químicas externas (Tadicherla & Berman, 2006). Este órgão é composto da derme e da epiderme. A derme é a porção mais densa e localizada mais internamente, mede aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ , e é uma região vascularizada onde existem as terminações nervosas livres, responsáveis pela sensação de dor (Cevc, 2004; Tadicherla & Berman, 2006; Sawyer et al., 2009).

Por ser uma barreira, a pele dificulta o acesso dos anestésicos locais (AL) as terminações nervosas na região subcutânea, para exercer sua ação. Para que os AL consigam agir na pele, as composições tópicas devem conter relativamente altas concentrações do anestésico, em comparação as formulações injetáveis, para atingir a mesma potência. Além disso, essas formulações necessitam contato prolongado com a superfície da pele (30-60 min) para atingir efeito anestésico e, em geral, requerem a oclusão ou aplicação em adesivos, para aumentar a penetração.

A mistura eutética dos AL lidocaína e prilocaína (ambos a 2,5%), comercialmente chamada de EMLA<sup>®</sup>, é uma das formulações tópicas para uso dermatológico mais utilizado, com eficácia e segurança comprovadas (Sawyer et al., 2009). A eficácia da EMLA é decorre da menor temperatura de fusão dos anestésicos quando associados, permitindo assim absorção mais completa. Entretanto, apresenta tempo de latência prolongado. Este fato é uma desvantagem significativa para esta formulação tópica, pois se torna inconveniente tanto para o médico como para o paciente, especialmente na área de pediatria, onde tempo prolongado de tratamento contribui para o aumento da ansiedade do paciente (Castilho, 1999). Além disso, a presença de prilocaína na composição requer cuidado com relação à dose, pois a mesma pode causar metemoglobinemia. Uma vez que essa está relacionada à dose e à massa corporal do paciente, crianças pequenas podem estar mais sujeitas a esse efeito tóxico (Malamed, 2013).

Uma formulação tópica considerada ideal deve promover anestesia em poucos minutos, quando aplicada na pele intacta e apresentar duração de ação prolongada (Tadicherla &

Berman, 2006). Diversos estudos recentes visam atingir esses objetivos, buscando essa formulação ideal (Wang & Black, 2013; Barbosa et al., 2013).

#### **OBJETIVOS.**

O objetivo do presente estudo foi estudar o efeito da alcalinização sobre a capacidade de permeação *in vitro* em pele de uma formulação tópica composta de lidocaína 2,5%/prilocaína 2,5% (EMLA).

#### **MATERIAIS E MÉTODOS.**

Foi utilizado tecido *ex vivo* de origem animal (porcos), por apresentarem semelhança estrutural com a pele dos seres humanos (Todo, 2017)

##### ***Delineamento experimental:***

Foram realizadas a preparação das orelhas de porco e a confecção dos géis anestésicos utilizados

##### ***Preparo das formulações em gel de Aristoflex® AVC à base de lidocaína e prilocaína:***

O gel à base de Aristoflex® AVC foi preparado de acordo com sugestão do fabricante PharmaSpecial. A tabela 1 mostra os componentes que foram utilizados para confecção do gel de Aristoflex® AVC contendo 2,5% de lidocaína e 2,5% de prilocaína. O preparo do gel consiste na mistura dos ingredientes da fase 1, seguida da pulverização da fase 2 sob agitação moderada até obtenção de um gel cristalino.

Tabela 1. Componentes utilizados no preparo dos géis de Aristoflex® AVC.

	<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Função</b>
<b>FASE 1</b>	<b>Metilparabeno</b>	0,2%	Conservante
	<b>Propilenoglicol</b>	5%	Solvente e umectante
	<b>Glicerina</b>	3%	Agente umectante e emoliente
	<b>Prilocaína</b>	2,5%	Anestésico local
	<b>Lidocaína</b>	2,5%	Anestésico local
	<b>Água deionizada</b>	Q.s.p. 100%	Solvente
<b>FASE 2</b>	<b>Aristoflex® AVC</b>	2,5%	Gelificante

Para a confecção do gel de EMLA com bicarbonato a 8,5% (Malamed, 2011), uma 3ª fase será utilizada, como mostra a Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Componentes utilizados no preparo dos géis com bicarbonato.

	<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Função</b>
<b>FASE 1</b>	<b>Metilparabeno</b>	0,2%	Conservante
	<b>Propilenoglicol</b>	5%	Solvente e umectante
	<b>Glicerina</b>	3%	Agente umectante e emoliente
	<b>Prilocaína</b>	2,5%	Anestésico local
	<b>Lidocaína</b>	2,5%	Anestésico local
	<b>Água deionizada</b>	Q.s.p. 100%	Solvente
<b>FASE 2</b>	<b>Aristoflex® AVC</b>	2,5%	Gelificante
<b>FASE 3</b>	<b>Bicarbonato de sódio</b>	8,5%	Agente alcalinizador

**Metodologia analítica de quantificação dos fármacos para os ensaios de liberação e permeação:**

Foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Thermo®, acoplado com Coletor automático Thermo® e interligados com o software surveyor ChromQuest 5.0. Essas condições analíticas e a metodologia de quantificação do fármaco foram validadas previamente segundo parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Quadro 1. Condições cromatográficas utilizadas para validação de metodologia analítica.

<b>Amostra</b>	Lidocaína e prilocaína em solução fisiológica
<b>Fase móvel</b>	Acetonitrila/Tampão (25 mM NH <sub>4</sub> OH, pH ajustado para 7,0 com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) (40/60, v/v)
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Fluxo</b>	1,2 mL/min
<b>Detector (λ)</b>	Ultravioleta (UV), λ = 220nm
<b>Coluna</b>	Phenomenex, Gemini, C18 fase reversa 5µ, 150 x 4,60mm

**Ensaio e determinação da cinética de liberação in vitro:**

Esse experimento foi realizado utilizando células de difusão vertical (Figura 1) tipo *Franz* (Sistema Transdérmico Manual, Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA, USA), com área de permeação de 1,77 cm<sup>2</sup> e volume do compartimento receptor de 7 mL, de acordo com metodologias propostas por Herai et al. (2007) e Taveira (2007).

**Ensaio de permeação in vitro através da pele de orelha de porco:**

O experimento de permeação com as formulações através da pele de porco foi realizada na célula de difusão vertical tipo *Franz*, sendo a membrana substituída pela pele de orelha do porco. Os ensaios de permeação foram realizados durante um período de 8 horas, à temperatura controlada de 32°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, 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. Para cada célula, foi construído um gráfico a partir da quantidade de anestésico acumulado no compartimento receptor *versus* tempo (intervalos de tempo de cada coleta). A inclinação da porção linear dos gráficos representa o fluxo de penetração dos anestésicos locais através da mucosa e a sua intersecção com o eixo das abscissas permitirá 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:

$$J = P \times Cd$$

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).

#### **Análise de dados:**

Para se testar a hipótese nula de que qualquer diferença encontrada nos tratamentos deva ser devida meramente ao acaso, esses dados serão testados quanto à normalidade de distribuição (teste de Shapiro-Wilks) e equivalência das variâncias (teste de Levene) e, posteriormente submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e Dunn. O nível de significância para todos os testes foi de 5% e o software utilizado foi o GraphPad Prism 7.0.

## **VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Tabela 3 mostra o fluxo e o time lag para os dois anestésicos utilizados na mistura testada.

Tabela 3. Comparação dos parâmetros de permeação dos diferentes géis.

LDC-PLC 2.5%	Lidocaína		Prilocaína	
	Fluxo	Time Lag	Fluxo	Time Lag
<b>c/bicarbonato</b>	36.50 <sup>a</sup> ± 12.28	3.09 <sup>c</sup> ± 1.20	44.21 <sup>a</sup> ± 14.64	3.51* ± 0.32
<b>s/bicarbonato</b>	20.70 <sup>b</sup> ± 0.74	1.60 <sup>d</sup> ± 0.09	42.42 <sup>a</sup> ± 2.18	2.33 # ± 0.34

**Legendas:** p<0.05, Kruskal-Wallis/Dunn. Letras diferentes: diferença entre os parâmetros da lidocaína. Símbolos diferentes: diferença entre os parâmetros da prilocaína.

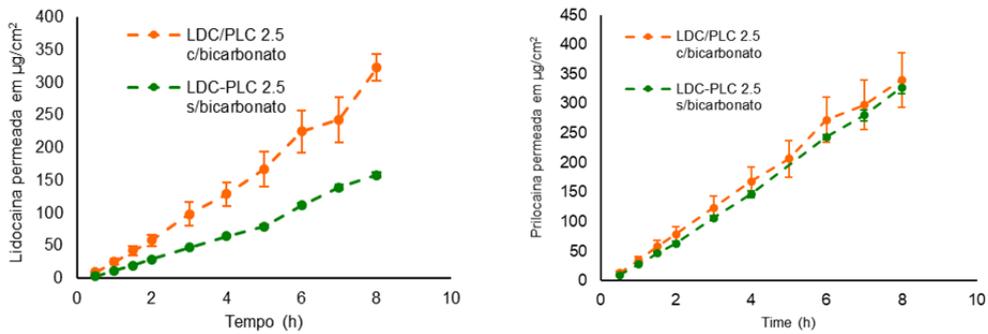
Comparando o parâmetro de permeação “fluxo” das formulações com e sem bicarbonato através da pele de porco, pode-se notar que houve um aumento significativo do fluxo da lidocaína (p<0,05) no grupo com bicarbonato. Porém, esse mesmo efeito não foi observado no fluxo da prilocaína (p>0,05), sendo que não houve diferença no fluxo entre as formulações.

Apesar do pKa de ambos os anestésicos locais serem em torno de 7,9 (Nyqvist-Mayer et al, 1986), essa diferença no comportamento dos AL frente a alteração do pH já foi reportado na literatura usando lipossomas com gradiente de concentração iônico, onde o pH do interior do lipossoma é diferente do externo. Engström et al. (1999) observaram que a lidocaína foi mais sensível ao pH de 7.4 no interior do lipossoma, gerando mais formas carregadas positivamente do que a prilocaína, a qual interagiu com as cargas negativas dos fosfolipídios de membrana. Esse mesmo comportamento não foi observado para a prilocaína que teve uma menor interação com a membrana. Provavelmente essa diferença de comportamento pode justificar o porquê de apenas o fluxo da lidocaína ter sido alterado na presença de bicarbonato.

O maior fluxo da lidocaína no grupo com bicarbonato poderia significar um tempo de anestesia mais longo *in vivo*, devido a maior quantidade de moléculas de lidocaína que poderiam atravessar a barreira e estariam efetivamente prontas para acessar neurônios. Os parâmetros de permeação (Figura 4) mostram que esse maior fluxo é sustentado ao longo do tempo, mostrando a vantagem do sistema.

Quando avaliado o parâmetro time lag, que é o tempo de início de permeação, tanto para a lidocaína quanto para a prilocaína, foi possível notar um atraso no início da permeação no grupo com bicarbonato, quando comparado com sem bicarbonato ( $p < 0,05$ ). Esse atraso no time lag em sistemas de liberação já foi observada para ambos os fármacos em mistura eutética em mucosa palatina (queratinizada) (Muniz et al., 2018). Provavelmente, as formas moleculares com carga dos fármacos estariam ligadas nos polímeros dos géis e podem ter demorado alguns minutos a mais para mudar de forma e se soltar dos hidrogéis com bicarbonato, levando a esse leve atraso no início da permeação.

O perfil de permeação de lidocaína e prilocaína dos géis com e sem anestésicos pode ser observado na Figura 4 abaixo.



**Figura 4.** Perfil de permeação de lidocaína e prilocaína dos géis com e sem bicarbonato.

## VII. CONCLUSÃO

Concluimos que a alcalinização da formulação contendo lidocaína e prilocaína melhora a permeabilidade da lidocaína, mas não afeta a prilocaína.